Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Rol de BDNF y de la vía de señalización de Wnt y Sox2 en la diferenciación de progenitores neurales en el epitelio olfatorio

Frontera, Jimena Laura

2015-02-26

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:
Frontera, Jimena Laura. (2015-02-26). Rol de BDNF y de la vía de señalización de Wnt y Sox2 en la diferenciación de progenitores neurales en el epitelio olfatorio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Frontera, Jimena Laura. "Rol de BDNF y de la vía de señalización de Wnt y Sox2 en la diferenciación de progenitores neurales en el epitelio olfatorio". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-02-26.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Rol de BDNF y de la vía de señalización de Wnt y Sox2 en la diferenciación de progenitores neurales en el epitelio olfatorio.

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

Lic. Jimena Laura Frontera

Director de Tesis y Consejero de Estudios: **Dr. Dante A. Paz**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología del desarrollo (IFIByNE-CONICET), DBBE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 26 Febrero 2015.

Rol de BDNF y de la vía de señalización de Wnt y Sox2 en la diferenciación de progenitores neurales en el epitelio olfatorio.

Resumen

El epitelio olfatorio (EO) de vertebrados es conocido por su remarcable propiedad de renovación de neuronas receptoras olfatorias en forma activa a lo largo de la vida, debido a la presencia de células madre neurales. El EO de larvas de *Xenopus laevis* muestra todas las características de un vertebrado adulto con una robusta capacidad regenerativa, ofreciendo un sistema ideal para el estudio de células madre neurales en adultos y de factores involucrados en la regeneración del tejido y la diferenciación del linaje neuronal.

La identidad y características específicas de las células madre neurales del EO siguen siendo poco conocidas. Estudios previos en otros sistemas como en retina de Xenopus, han sugerido que la señalización de Wnt podría ser necesaria para la expresión de Sox2, el cual a su vez activa la expresión de genes proneurales, y bloquea la diferenciación neuronal a través de la activación de Notch.

En el presente trabajo, analizamos la expresión de genes marcadores de células madre neurales en el EO de *X. laevis*. Además, describimos un

incremento significativo en el número de células basales proliferativas y el número de células basales que expresan Sox2, durante la regeneración masiva luego de la destrucción del EO mediante el tratamiento con $ZnSO_4$. Por otra parte, hemos observado que la vía de señalización de Wnt/β-catenina es necesaria para la expresión de Sox2 en células basales del EO principalmente durante la regeneración masiva. Sin embargo, en condiciones fisiológicas normales la expresión de Sox2 podría estar regulada por otros factores. No obstante, no se observó activación de las vías no canónicas de Wnt, como Wnt/JNK o Wnt/Ca^{++}, en células basales en condiciones normales. Estos resultados sugieren un importante rol de Sox2 en las células proliferativas indiferenciadas, posiblemente involucrado en el mantenimiento de las propiedades de células neuro-progenitoras, y sugieren que Wnt estaría involucrado en la regulación de la expresión de Sox2 principalmente durante la regeneración.

Por otro lado, se analizó la expresión de BDNF en el sistema olfatorio en condiciones fisiológicas normales, así como durante una regeneración forzada inducida por la destrucción química del epitelio olfatorio en larvas de *X. laevis*. Hemos descripto la presencia y los patrones de expresión de BDNF tanto en el EO como en el bulbo. En condiciones fisiológicas normales, células sustentaculares (gliales) y algunas células basales dispersas expresan BDNF en el EO, así como las células granulares en el bulbo olfatorio. Por otra parte, durante la regeneración masiva, hemos demostrado un aumento drástico de las células basales que expresan BDNF, así como un aumento de BDNF en el bulbo

y nervio olfatorio. En conjunto, estos resultados sugieren un papel importante de BDNF en el mantenimiento y la regeneración del sistema olfatorio.

En conclusión, nuestro trabajo pone de manifiesto la importancia del epitelio olfatorio de larvas de anfibios como modelo de estudios de procesos de neurogénesis. Así también hemos demostrado que la vía Wnt/β-catenina y la expresión de Sox2 juegan un rol fundamental en procesos de diferenciación de neuronas olfatorias. Por último, el análisis de la regeneración del EO muestra un significativo aumento en la expresión de BDNF y su importancia en procesos regenerativos neurales.

Palabras clave: Epitelio Olfatorio, Células madre neurales, Neurogénesis, Neuronas Receptoras Olfatorias, Wnt, Sox2, BDNF.

Role of BDNF and the Wnt signaling pathway and Sox2 in differentiation of neural progenitors in the olfactory epithelium.

Abstract

The vertebrate olfactory epithelium (OE) has been known for its remarkable property of olfactory receptor neurons renewal actively throughout life due to the presence of neural stem cells. The OE of *Xenopus laevis* larvae show all the characteristics of an adult vertebrate with a robust regenerative capacity, offering an ideal system for the study of neural stem cells in adults and the factors involved in tissue regeneration and differentiation of neuronal lineage.

The identity and specific characteristics of olfactory neural stem cells are still poorly understood. Previous studies in other systems as the retina of Xenopus, have suggested that Wnt signaling may be necessary for expression of Sox2, which in turn activates expression of proneural genes, and blocked neuronal differentiation through the activation of Notch.

In this study, we analyzed the expression of neural stem cells markers in the OE of *X. laevis*. We also describe a significant increase in the number of proliferating basal cells and the number of basal cells that express Sox2, during massive regeneration after partial destruction of OE by treatment with $ZnSO_4$. Moreover, we found that the Wnt/β-catenin signaling pathway is required for Sox2 expression in basal cells of the OE mainly during the massive

regeneration. However, under normal physiological conditions Sox2 expression may be regulated by other factors. However, no activation of non-canonical Wnt pathways, such as Wnt/JNK and Wnt/Ca^{++} in basal cells was observed under normal conditions. These results suggest an important role of Sox2 in undifferentiated proliferating cells, possibly involved in the maintenance of the properties of neural progenitor cells, suggesting that Wnt be involved in the regulation of Sox2 expression mainly during regeneration.

Furthermore, the expression of BDNF was analyzed in the olfactory system under normal physiological conditions, and during forced regeneration induced chemical destruction of the olfactory epithelium in *X. laevis* larvae. We have described the presence and expression patterns of BDNF in both the OE and the bulb. Under normal physiological conditions, supporting cells (glial) and some scattered basal cells express BDNF in the OE and granule cells in the olfactory bulb. Moreover we have shown a dramatic increase of basal cells expressing BDNF and BDNF increase in the bulb and olfactory nerve during regeneration. Together these results suggest an important role of BDNF in the maintenance and regeneration of the olfactory system.

In conclusion, our study shows the importance of the olfactory epithelium of larval amphibians as model for the study of neurogenesis process. Moreover, we have also shown that Wnt/β-catenin and Sox2 pathway play a critical role in differentiation processes of olfactory neurons. Finally, analysis of OE

regeneration showed a significant increase in the expression of BDNF and its importance in neural regeneration processes.

Keywords: Olfactory Epithelium, Neural Stem Cells, Neurogenesis, Olfactory Receptor Neurons, Wnt, Sox2, BDNF.

Publicaciones

- Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en el siguiente trabajo:

Frontera, J.L., Cervino, A.S., Jungblut, L.D., Paz, D.A., 2014. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in normal and regenerating olfactory epithelium of *Xenopus laevis*. Ann Anat. doi:10.1016/j.aanat.2014.10.010.

- Otros trabajos se encuentran en proceso:

The Wnt Signaling Pathway Induces Sox2 Expression during Neuronal Differentiation and Regeneration of the Olfactory Epithelium. (En revisión).

Neural regeneration dynamics after Zinc sulphate lesion in the olfactory epithelium of *Xenopus laevis*. (en preparación)

Agradecimientos

Antes que nada, le agradezco a la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Exactas y Ciencias Naturales por la educación que me brindó desde la carrera de grado, y durante la formación de posgrado y la financiación de la primer etapa del doctorado.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, el cual financió mi trabajo de tesis con la beca de posgrado tipo II.

Gracias Dante por todos estos años de apoyo, por ayudarme y confiar en mí, por alentarme a seguir y arriesgarme. Gracias por darme el espacio para trabajar, para equivocarme y aprender. Por enseñarme tanto en lo académico, en lo profesional y sobre todo en lo personal.

Gracias a todos lo del lab, que son como una segunda familia. Gracias Andre por tanto, por tu ayuda, tus consejos, por bancarme y preocuparte con mis risas y llantos. Gracias a Maru, Len, Eve, Lucas, Vick, Carito, Ceci. A los que estuvieron y siguieron rumbo en el transcurso de estos años, Carolina, Carola, Mijal, Kot, son muchos… Por la ayuda y el aguante, por todo lo que me enseñaron, por las risas, por los mates y por los momentos de distracción compartidos.

Gracias Len y Maru por bancarme taaaaaanto, por preocuparse, por ayudarme en el día a día y por los momentos lindos que viví con ustedes.

Gracias a José por la compañía, por los mates, por las charlas, por la preocupación y la ayuda en todo lo que fui pidiendo.

Gracias a Clarita, Leti, Eleo, Flor, Nadia, por ser un apoyo y por hacer el día a día más lindo en el trabajo. A la gente de los labs vecinos. Clari gracias por la ayuda y paciencia con la "real time"!

Gracias a Mede, que ya con cruzarte por los pasillos o saludarte desde el otro extremo del pabellón me sacas una sonrisa! Bueno, y gracias por todas las cosas en las que me ayudaste y socorriste.

Gracias a Roberto Fernández, por su paciencia y ayuda con el confocal.

Gracias a todos los de la facu que ayudaron de muchas maneras distintas. A todos los que aportan al día a día, con unos minutos te alegran la jornada. A Caro Tropea, Vero, Marcos, Mat, etc.

Gracias a Itzick, que desde la distancia siempre es un apoyo incondicional, por preocuparse, por estar siempre presente…

Gracias a mi mamá, por darme fuerzas, por alentarme, por darme el apoyo y confianza de que todo es posible.

A mi papá, que a pesar de la distancia siempre está presente, por toda la ayuda y por alentarnos siempre a más. Gracias a Dani también por el apoyo y la alegría que contagia.

Gracias a mis hermanas y hermanitos. Naty y Pao, gracias por ayudarme siempre, por preocuparse, por los consejos, por ser un gran ejemplo. Y a toda la familia, a mi tía Bibi, mi tía Nora, a la abuela, a mis primitas queridas, a mis cuñados, a mis sobris y hermanitos que siempre fueron la mejor excusa para distraerme. Gracias a todos, porque todos me dieron fuerzas y aliento.

A los amigos, los que estuvieron y los que siguen estando. Gracias Mica, Nanu, Mech, Josef, Yanyi, Andy, Lau, Tani, Tanji, Jule, Fede, Sergis, Dan, Shoshi, Lili, Gabby, al grupo IMBS y a todos los demás. Gracias por estar o haber estado, por acompañarme en este proceso, por el apoyo y por todo lo que me han dejado…

y gracias a Nahuel, por hacer muchísimo más llevadera esta última etapa, por escucharme, darme fuerzas y acompañarme.

Índice

Resumen i

Abstract iv

Publicaciones vii

Agradecimientos viii

Índice xi

Introducción 1

Epitelio olfatorio 2

Xenopus laevis como modelo 8

Células madre neurales (Neural Stem Cells "NSC") 11

Regulación de la transcripción y auto renovación de NSC en el sistema nervioso central 12

Wnt: múltiples funciones en el desarrollo neural 13

Vía de Wnt/β-catenin y NSC 15

La vía de señalización de Wnt/β-catenina 16

Señalización de Wnt/β-catenina en la proliferación de células madre neurales y neurogenésis adulta 20

Rol de Wnt/β-catenin en la diferenciación neuronal 21

Vias no canónicas de Wnt 23

Vía de señalización de Wnt/JNK o Wnt/PCP 23

Vía de señalización Wnt/ Calcio 25

Sox2 y células madre 26

Neurotrofinas en el sistema olfatorio 30

Importancia y aplicabilidad de la investigación 35

Objetivos e Hipótesis 36

Objetivos específicos 36

Hipótesis 37

Materiales y métodos 39

Animales 39

Destrucción del epitelio olfatorio y regeneración:

Tratamiento de ZnSO4 40

Experimentos de comportamiento 41

Inhibición de la vía de señalización de Wnt/β-catenina:

tratamiento con Norcantaridina (NCTD, un inhibidor específico) 44

Incorporación de BrdU 44

Procesamiento para obtención de cortes histológicos 45

Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia 45

Western blotting 49

Aislamiento del ARN total 51

Transcripción reversa de ARN total 51

RT-PCR 52

RT-PCR a tiempo real (RT-qPCR) 54

Análisis estadísticos 56

Resultados 57

Capítulo I 57

Estructura y organización del sistema olfatorio en larvas de *Xenopus laevis* 57

Auto-renovación y capacidad regenerativa del EO 60

Recuperación de la funcionalidad olfativa 68

Capítilo II **70**

Rol de la vía de señalización Wnt y la expresión de Sox2 durante la diferenciación neural en el EO 70

Expresión de Sox2 en las células basales del EO 70

Aumento de la expresión de Sox2 durante la regeneración del epitelio olfatorio 74

Regulación de Sox2 por la vía de señalización de Wnt 76

Vía de señalización canónica de Wnt presente en células basales del EO 79

Activación de la vía de señalización de Wnt/ β-catenina en células proliferativas 81

La vía de la polaridad celular planar Wnt/JNK en el OE 82

Capítulo III **85**

Expresión y rol del Factor neurotrófico derivado del cerebro "BDNF" en el EO de *Xenopus laevis* 85

BDNF en el EO durante la regeneración 87

BDNF en el BO en condiciones fisiológicas normales y durante la regeneración del EO 88

Identidad de las células que expresan BDNF en condiciones fisiológicas normales y durante la regeneración del EO 89

Discusión **96**

Auto-renovación y capacidad regenerativa del EO 97

Rol de Sox2 y la señalización de Wnt en la proliferación y neurogénesis de progenitores neurales 102

Expresión de BDNF en el sistema olfatorio en condiciones normales y durante la regeneración del EO 111

Conclusión **116**

Referencias bibliográficas **118**

Introducción

Introducción

En la mayoría de las especies, la detección de estímulos químicos ambientales, desencadena o modula comportamientos específicos relacionados con aspectos fundamentales de la vida de los animales como la reproducción, la búsqueda de alimento o bien, respuestas de escape frente a depredadores (Prasad and Reed, 1999).

El sistema olfatorio está especializado en detectar moléculas odoríferas mediante procesos fisiológicos y químicos que involucran el reconocimiento de las mismas y su transformación con señales eléctricas que pueden ser interpretadas por el sistema nervioso.

En vertebrados, el olfato reside en un par de órganos olfatorios localizados en las cavidades nasales de la región anterior del cráneo. Estos órganos olfatorios están formados por un epitelio sensorial en donde se encuentran las neuronas receptoras olfatorias (NRO). Estas neuronas, emiten cortas dendritas que se proyectan hacia anterior a la cavidad nasal en donde receptan los estímulos olfatorios y un largo axón que, junto con los axones de todas las NRO, conforman los nervios olfatorios. Estos nervios, atravesando la placa cribiforme del hueso etmoides, llegan a la región más anterior del cerebro: el bulbo olfatorio (BO), conformando lo que se ha dado a llamar el "circuito olfatorio primario" (Figura 1). Desde el BO, se emiten proyecciones

hacia los centros de integración superiores en el sistema nervioso central (SNC).

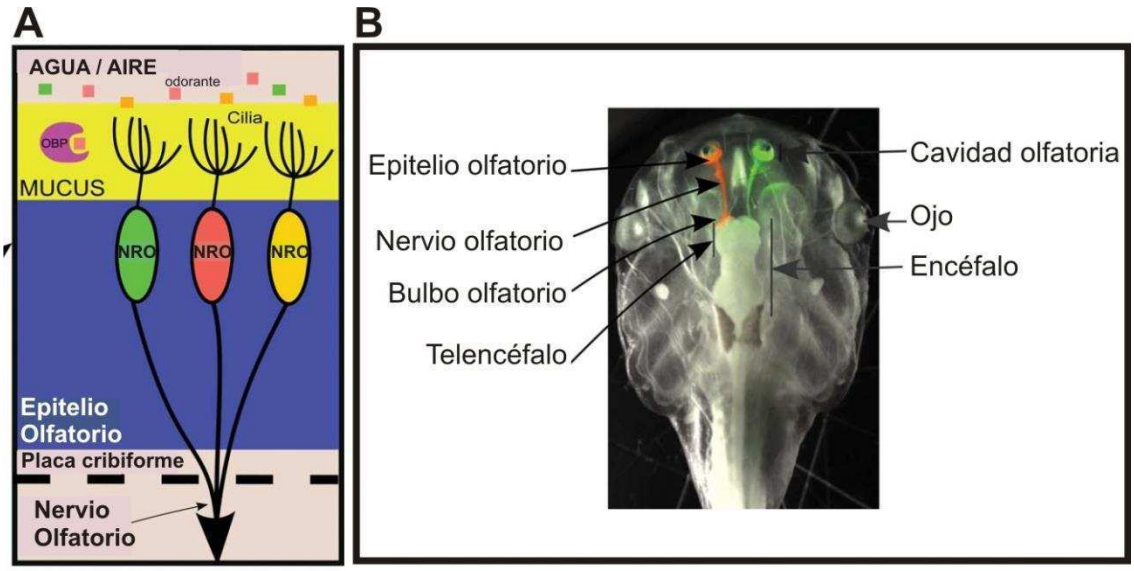

Figura 1. Organización general del sistema olfatorio.A, la molécula odorante en el aire o agua penetra el mucus en donde se encuentran las cilias de las NRO con receptores específicos. La señal olfatoria es transducida por la NRO y transferida al Bulbo olfatorio a través de los axones que atraviesan la placa cribiforme. **B**, vista general de la cabeza de un renacuajo de *X. laevis*. El sistema olfatorio es visible a través de la epidermis translucida. Por medio de la inyección de Dil (rojo) en la cavidad izquierda y DiO (verde) en la cavidad derecha, se puede observar las proyecciones de las NRO hacia el Bulbo olfatorio. Modificado de (Gascuel and Amano, 2013).

Epitelio olfatorio

El epitelio olfatorio (EO) de vertebrados es un epitelio pseudoestratificado conformado por células Sustentaculares (SUS) o de sostén,

NRO y células basales o progenitoras. Cada uno de estos tipos celulares ocupa una franja definida del epitelio, como se esquematiza en la Figura 2.

En el BO, las NRO convergen en glomérulos donde sinaptan con células mitrales y células granulares, donde se realiza el relevo y procesamiento de la información (Tozaki et al., 2004).

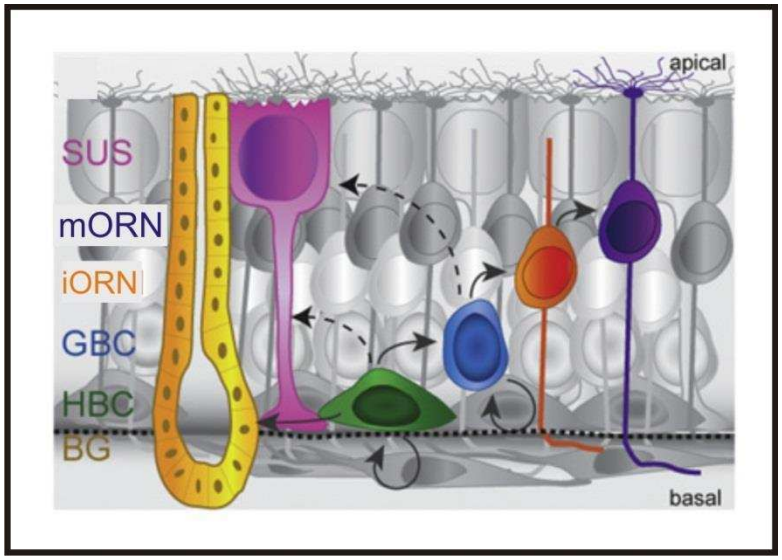

Figura 2. Esquema de los tipos celulares que conforman el EO y su linaje. Células Horizontales Basales (HBC) y Células Globosas Basales (GBC) ambas multipotentes, dan origen a Neuronas Receptoras Olfatorias inmaduras (iORN) que terminan de diferenciarse en ORN maduras (mORN), a células Sustentaculares (SUS), y a células de la glándula de Bowman (BG). Las HBC residen adyacentes a la lámina basal, indicada por la línea punteada. De (Fletcher et al., 2011).

La neurogénesis adulta y la regeneración de tejido nervioso son las características principales del sistema olfatorio postnatal de vertebrados. Es

por ello que el EO proporciona un modelo efectivo para el estudio de los principios de la renovación y diferenciación de células madre neurales ("neural stem cells", NSC). A diferencia de otras regiones del sistema nervioso, en el EO la neurogénesis procede a lo largo de la vida adulta, permitiendo el estudio del comportamiento de las NSC para conducir la regeneración del sistema nervioso adulto, así como durante el desarrollo (Murray and Calof, 1999). Además, la ubicación del EO en el sistema nervioso periférico y su constitución celular lo hacen accesible y fácil de manejar.

Estudios del EO de ratón han demostrado que las NRO son productos de un linaje que contiene distintos tipos de células proliferantes: las NSC, que dan lugar a progenitores transitorios amplificantes que expresan el gen proneural: Achaete Scute 1 de mamífero (Mash1); estas células Mash1 positivas dan lugar a un segundo progenitor amplificador transitorio, el precursor neuronal inmediato, que se distingue por la expresión del gen proneural Neurogenin1 (Ngn1). Este precursor neuronal se divide para dar lugar a células hijas que se diferencian en NRO (Beites et al., 2005; Calof et al., 2002). El EO también contiene células de soporte o SUS, análogas a las células gliales del encéfalo. Cada uno de estos tipos celulares ocupa una posición diferente dentro del neuroepitelio: las NSC y las células amplificantes transitorias se encuentran entre las células basales (CB), cerca de la lámina basal del epitelio, mientras que las células SUS forman la capa apical de la EO, adyacente a la cavidad nasal (Fig. 2). Las NRO están situadas en una zona intermedia entre estas capas basales y apicales, y conforman el grueso del EO. Estructuralmente, el EO se asemeja al neuroepitelio germinativo del embrión que da origen al SNC, pero

es mucho más simple ya que produce un único tipo de neurona (Smart, 1971). Esta característica hace posible estudiar la regulación molecular de la neurogénesis en el EO, pero también ha facilitado la identificación de las células en las distintas etapas en el linaje neuronal, así como las interacciones moleculares necesarias para generar las NRO manteniendo un número apropiado de éstas (Kawauchi et al., 2004).

En contraste, el orígen del desarrollo de las células SUS, así como su importancia en el camino neurogénico del EO, no se ha descripto totalmente. Las células SUS se encuentran en una sola capa en la superficie apical del EO y poseen las proyecciones citoplásmicas delgadas que terminan como "endfeet" (pie de anclaje) en la lámina basal (Fig. 2). Estas células no-neuronales y auto-renovantes expresan enzimas implicadas en la metabolización de compuestos ajenos al animal, como citocromo p450, glutatión-S-transferasa mu 2, y reductasa carbonilo 2 (Yu et al., 2005), sugiriendo un papel desintoxicante para las células SUS. Por otro lado, también se ha reportado que las células SUS fagocitan NRO muertas (Suzuki et al., 1996), y así como la glia del cerebro, probablemente proporcionan soporte estructural a las NRO. Puesto que las células SUS parecen tener algunas de las características de las células gliales, se sostiene que comparten un linaje común con las NRO, como parece ser el caso para muchos tipos de células neuronales del encéfalo (Doetsch, 2003).

Las NSC sufren divisiones celulares asimétricas y lentas, que resultan en la generación de un conjunto de progenitores de división rápida,

comprometidos con un destino neuronal (Mackay-Sim and Kittel, 1991), y en el mantenimiento de la población de células madre. Estudios realizados durante el desarrollo y regeneración del EO indican que hay dos poblaciones distintas de progenitores transitorios, una de las cuales deriva de las NSC y expresa el gen proneural, Mash1; y la segunda, que expresa el gen proneural Ngn1, es hija de progenitores que expresan Mash1, y que también podrían someterse a una o dos rondas de divisiones celulares simétricas (Calof et al., 2002; DeHamer et al., 1994). La progenie de esta segunda célula amplificante transitoria, a veces referida como el "precursor inmediato neuronal", se diferencia a NRO, que puede ser distinguida por diversos marcadores, como la molécula de adhesión celular neural NCAM, tubulina específica neuronal y la proteína marcadora olfatoria ("Olfactory Marker Protein", OMP) (Calof et al., 2002; Margolis, 1982).

Estas poblaciones de células mitóticas permanecen en el compartimiento basal del EO durante toda la vida postnatal. En roedores, este compartimiento contiene dos tipos celulares morfológicamente distintos, células basales horizontales (HBC) y células basales globosas (GBC) (Fig. 2). Sin embargo, ha habido dificultad en cuanto a la identificación de la población de NSC en base solo a la ubicación y actividad mitótica en algunas especies, y esto ha motivado la búsqueda de marcadores moleculares únicos para las NSC (Calof et al., 1998).

Experimentos en cultivos han proporcionado evidencias que sugieren que una subpoblación de HBC reside en un microambiente reminiscente de otros nichos de células madre; esto combinado con un análisis retrospectivo de

su capacidad proliferativa, ha sido utilizado para argumentar que estas HBC representan una población de NSC (Carter et al., 2004). Sin embargo, las HBC no parecen expresar ningún marcador de progenitor neuronal como tampoco marcadores conocidos de células multipotenciales (Calof et al., 2002). Las HBC también parecen ser una población relativamente quiescente, como ocurre con las células madre (Carter et al., 2004), aunque esto puede reflejar un alto nivel de diferenciación en lugar de las propiedades multipotenciales de célula madre. Por otro lado, la población en la capa adyacente (GBC) difiere de la de HBC en que tienen forma redondeada, citoqueratina-negativa y se sabe que contienen las dos subpoblaciones de progenitores transitorios del linaje de NRO: progenitores que expresan Mash1 y precursores neuronales que expresan Ngn1 (Gordon et al., 1995; Wu et al., 2003). Otras evidencias sugieren que las NSC del EO se encuentran entre la población de GBC. A partir del análisis de linajes retrovirales y algunos de los modelos de regeneración del EO inducida por lesión, apoyan la idea de que una subpoblación de GBC son progenitores multipotentes (Beites et al., 2005).

Resulta interesante que, a pesar de la controversia que existe con respecto a la identidad morfológica de las NSC del EO de ratón, en el EO humano no hay distinción morfológica entre HBC y GBC (Hahn et al., 2005). Tanto las células en la capa inmediatamente adyacente a la lámina basal, así como las células directamente por encima de ellos, son células "globosas", que se asemejan a las GBC de roedor (Gascuel and Amano, 2013). Además, las células en ambas capas expresan citoqueratinas, normalmente sólo encontradas en HBC de roedor. Por lo tanto, las células en el compartimiento

basal del EO humano parecen poseer ambas características de GBC y HBC observadas en roedores (Beites et al., 2005).

Por otro lado, en larvas de *X. laevis* la capa de células basales del EO se compone de tres a cuatro subcapas de células. En dichas capas pueden distinguirse dos tipos celulares principales: Las CB alargadas que están en estrecho contacto con la lámina basal y CB poliédricas sin contacto aparente a la lámina basal que residen directamente encima de las CB alargadas. Esta observación basada en la morfología de las células se halla en concordancia con lo descripto anteriormente sobre las poblaciones de HBC y GBC del EO murino (Beites et al., 2005; Hansen et al., 1998; Murdoch and Roskams, 2007). Sin embargo, con la excepción de los marcadores de división celular, trabajos anteriores no han podido identificar marcadores específicos de células basales ni subpoblaciones de éstas en el EO de *Xenopus laevis*(Hassenklover et al., 2009).

***Xenopus laevis* como modelo**

El sistema olfatorio de larvas de anfibios representa un modelo excelente para estudiar estructuras neurales regeneradas, tanto naturalmente como en respuesta a una lesión, ya que tienen un sistema olfatorio totalmente diferenciado y funcional, con todos los tipos de células y conexiones que

constituyen el sistema maduro (Nezlin et al., 2003; Taniguchi et al., 1996). Esto significa que puede ser considerado como un modelo válido para el estudio del sistema olfatorio, como lo han demostrado ser los anfibios adultos (Graziadei and DeHan, 1973). Por otro lado, los renacuajos son organismos en desarrollo en los que todos los mecanismos implicados en la proliferación y diferenciación celular, y en el desarrollo de nuevas estructuras, están particularmente activos. Además, el potencial regenerativo de varias áreas del encéfalo es mayor en las larvas que en anfibios adultos y otros vertebrados (Kaslin et al., 2008). Por otro lado, la posibilidad de colocar los animales en contacto con xenobióticos directamente en el medio acuático en el cual viven, supera los problemas asociados con la descarga de soluciones líquidas en la cavidad nasal en animales terrestres, es decir, problemas como el daño mecánico, trauma anestésico, estrés por manipulación y administración de la dosis efectiva.

La rana africana *Xenopus laevis* es un anfibio de la orden Anura, tiene su origen en el África subsahariana, pero como una especie invasora ahora ocupa zonas de agua dulce en todo el mundo. Vive en estanques de pastizales cálidos, así como en los arroyos en las regiones áridas y semiáridas.

Xenopus laevis es un excelente modelo animal para estudiar el sistema olfativo. La cría y reproducción de esta especie es relativamente fácil, las larvas se alimentan de pequeñas partículas orgánicas, tales como las algas y, ya que es un animal poiquilotermo, todos los experimentos se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente. Las larvas *X. laevis* no tienen una lámina cribosa y por lo tanto la mucosa olfativa no se separa del BO por una estructura ósea.

Además, los anfibios representan un intermediario evolutivo entre los peces y especies de mamíferos con respecto al estilo de vida, la especialización anatómica de su sistema olfatorio, y la evolución de las familias de genes de receptores olfatorios.

El sistema olfatorio de larvas de *X. laevis* está conformado por tres epitelios especializados en sensar diferentes tipos de moléculas, el epitelio olfatorio principal (EO) en la cavidad principal (PC) encargado de reconocer odorantes en agua durante la vida larval, la cavidad olfatoria media (MC) que comienza a desarrollarse en la premetamorfosis y encargada de responder ante odorantes presentes en el agua en la vida adulta, y el órgano vomeronasal (OVN) (Nezlin and Schild, 2000). El EO de larvas de *X. laevis* está organizado básicamente como el EO postnatal de otros vertebrados. Es un epitelio pseudoestratificado compuesto principalmente de NRO, SUS y BC. Como otros vertebrados, *X. laevis* posee al menos dos tipos de NRO, un tipo que tiene cilios y el otro tipo que tiene microvellosidades. Las terminales axónicas de las NRO sinaptan directamente sobre las neuronas de segundo orden en el BO formando estructuras esféricas llamadas glomérulos. De este modo, las NRO de la PC y MC proyectan a los glomérulos en el BO principal, mientras que las células receptoras del OVN proyectan a glomérulos en el BO accesorio. Las neuronas de segundo orden en el BO se llaman células mitrales, las cuales dan salida a la información olfativa a los mayores centros olfatorios. Además de las células mitrales, existen numerosos tipos de interneuronas en el BO, incluyendo las células periglomerulares que sinaptan dentro y entre los glomérulos, y las células granulares que hacen sinapsis con las células

mitrales. Estas interneuronas modulan la información olfativa antes de que salga el BO (Manzini et al., 2007; Manzini and Schild, 2010; Reiss and Burd, 1997).

Durante las etapas larvales estudiadas en el presente trabajo, el sistema olfatorio de *X. laevis* es funcional y está en un estado de equilibrio. En etapas posteriores, durante la metamorfosis ocurre una reorganización completa del sistema olfatorio (Hansen et al., 1998; Hubrecht et al., 1975; Reiss and Burd, 1997).

Células madre neurales (Neural Stem Cells "NSC")

Una característica definitoria de las células madre es su capacidad de mantener continuamente una población multipotente (autorenovación) mientras que generan una progenie diferenciada, lo cual lo logran a través de la división celular asimétrica. Por lo tanto, las NSC deben evitar la salida del ciclo celular y diferenciación, pero a su vez deben evitar la proliferación incontrolada y formación tumoral. Cómo las NSC hacen para realizar esto es una pregunta muy interesante que es de importancia para nuestra comprensión de los procesos de diferenciación celular y cáncer, y de las enfermedades del desarrollo que resultan de la pérdida prematura de la fuente de NSC.

Diferentes marcadores de pluripotencia celular han sido descriptos dependiendo del grado de compromiso de linaje. Las células madre embrionarias (ESC) expresan marcadores de pluripotencia como Pou5f1 (también conocido como Oct4, Oct3, Oct3/4), Nanog, Sox2, Zfp42 (también conocido como Rex1) y fosfatasa alcalina (ALP). Sin embargo, algunos marcadores "Stem" son conocidos por ser expresados en linajes celulares diferentes, incluyendo linajes celulares embrionarios, germinativos y células somáticas (Boyer et al., 2005; Morrison and Brickman, 2006; Takeda et al., 1992).

Regulación de la transcripción y auto renovación de NSC en el sistema nervioso central

Al igual que en Drosophila, las proteínas proneurales Mash1 (Ascl1), Ngn1 y Ngn2 (Neurog2) se expresan en los mamíferos en poblaciones parcialmente superpuestas de células neuroepiteliales, donde son necesarias para la adquisición de propiedades de NSC. Posteriormente, estas proteínas se mantienen en los progenitores que se encuentran diferenciándose, donde inducen la diferenciación neuronal (Guillemot, 2007). Células neuroepiteliales y glía radial expresan estos genes proneurales debido al papel de los miembros de la familia SoxB1 (Sox1, 2, 3). Las proteínas de SoxB1 se expresan en las NSC embrionarias y adultas, así como en algunas neuronas postmitóticas en el SNC (Graham et al., 2003). Una reducción en los niveles de SoxB1

conduce a la diferenciación neural precoz y al agotamiento del "pool" de progenitores, mientras que la pérdida de la expresión de miembros de la familia SoxB1 pueden bloquear la diferenciación neuronal y mantener la población progenitora (Bylund et al., 2003; Ferri et al., 2004; Graham et al., 2003), aunque sin mantener la proliferación (Bylund et al., 2003). Factores de transcripción SoxB1 antagonizan la diferenciación neuronal que es inducida por las proteínas proneurales Mash1 y la Ngn en el SNC (Bertrand et al., 2002; Bylund et al., 2003), y las proteínas proneurales pueden enlazar directamente e inhibir la función de la proteína SoxB1. Por lo tanto, el balance de la actividad SoxB1 y genes proneurales determina el ritmo de la neurogénesis. Cómo se regula este equilibrio con el tiempo permanece sin ser dilucidado (Doe, 2008).

Wnt: múltiples funciones en el desarrollo neural

El nombre de la vía de Wnt deriva del gen Wingless de Drosophila y del gen INT-1 de ratón al que posteriormente llamaron Wnt1. Wnt1 fue clasificado como un proto-oncogen al encontrarse relacionado con la inducción de tumores de mama (Nusse and Varmus, 1982), y reveló ser una proteína secretada rica en cisteínas con el potencial de actuar como molécula de señalización. Sin embargo, el mayor progreso se hizo cuando se relacionó este gen a una vía de señalización al demostrarse que la contraparte de Wnt1 en Drosophila, Wingless era un componente crucial de una vía de traducción de

señales novedosa que controla el patrón corporal durante el desarrollo larval (Rijsewijk et al., 1987). Posteriormente, esta vía fue encontrada altamente conservada en ranas, donde induce la formación del eje corporal durante el desarrollo embrionario (McMahon and Moon, 1989). En la actualidad, se han encontrado alteraciones en la vía de señalización de Wnt involucradas en un gran rango de enfermedades en humanos, incluyendo cáncer, defectos óseos, esquizofrenia, artritis, etc (Barker and Clevers, 2006; Clevers, 2006).

Desde la identificación de Wnt1, la secuenciación del genoma ha revelado la existencia de otros 18 genes de Wnt en mamíferos, los cuales podrían separarse en 12 subfamilias altamente conservadas en base a su similitud en la secuencia. Todas las proteínas Wnt comparten características similares que las hacen esenciales para su función, incluyendo una señal peptídica para su secreción, muchos sitios potenciales de glicosilación y múltiples residuos de cisteínas responsables de asegurar el correcto plegado y secreción (Coudreuse and Korswagen, 2007; Miller, 2002).

Tres cascadas diferentes se han demostrado que pueden activarse después de la unión de Wnt con su receptor: la vía canónica de Wnt /β-catenina, y las vías no-canónicas de Wnt / JNK (polaridad planar) y la de Wnt /Ca^{++}. Cada una de estas vías desencadena una serie de sucesos intracelulares muy diferentes que activan diferentes conjuntos de genes diana (Barker, 2008; James et al., 2008).

Vía de Wnt/β-catenina y NSC

La vía canónica Wnt/β-catenina ha sido la vía más descripta y considerada de mayor relevancia en el desarrollo y en cáncer.

Un componente crucial de la vía canónica de Wnt es β-catenina, una proteína multifuncional que puede funcionar en la activación de la transcripción de genes y en la adherencia celular (Nelson and Nusse, 2004). β-catenina se aisló primero como una proteína asociada con el dominio intracelular de E-cadherina, un componente de la unión adherente (Aberle et al., 1996). En la vía de señalización canónica de Wnt, la interacción entre la proteína de Wnt y su receptor causa la acumulación de β-catenina y su translocación al núcleo (Cadigan and Liu, 2006; Huang and He, 2008), llevando a la activación de la expresión de genes diana (Stadeli et al., 2006; Willert and Jones, 2006).

La cascada de Wnt /β-catenina desempeña un papel vital en el desarrollo neural. Se ha demostrado que dicha señalización participa en la formación del eje, en el desarrollo del mesencéfalo y en oncogénesis, entre algunas de las funciones más reconocidas (Logan and Nusse, 2004; McMahon, 1993; McMahon and Bradley, 1990; Miller, 2002; Nusse, 2001; Polakis, 2007). La inactivación de β-catenina causa defectos específicos del desarrollo cerebral (Brault et al., 2001). En contraste, la activación de β-catenina lleva a la amplificación del "pool" de progenitores neurales (Chenn and Walsh, 2002; Megason and

McMahon, 2002). Por otra parte, el desorden en la vía de señalización tiene que ver con diversas patologías, como la enfermedad de Alzheimer (De Ferrari and Inestrosa, 2000; Inestrosa et al., 2000), esquizofrenia (Lovestone et al., 2007), autismo (De Ferrari and Moon, 2006) y cáncer (Polakis, 2007; Rubinfeld et al., 1993). Estas enfermedades tienen una relación con la neurogénesis en el adulto, por lo que Wnt/β-catenin desempeña un papel importante en ésta (Moon et al., 2004).

La vía de señalización de Wnt/β-catenina

La vía canónica de Wnt controla los niveles citoplasmáticos de β-catenina, la cual tiene un rol crucial en adhesión celular y activación de genes diana en el núcleo. En ausencia de señal, β-catenina es eficientemente capturada por una proteína Axin, la cual está presente dentro de un complejo de proteínas conocido como "complejo de destrucción" que también incluyen a APC (Adenomatous polyposis coli), CK1 (proteína quinasa caseína quinasa) y a GSK3 (quinasa glucógeno sintetasa 3). Este complejo de destrucción, recluta y fosforila a β-catenina en residuos serina y treonina (Zeng et al., 2005), generando un sitio de unión para la ubiquitinación de ésta, lo cual subsecuentemente marca a β-catenina para la degradación por el proteasoma (Aberle et al., 1997). Esta supresión de los niveles de β-catenina permite que las proteínas Groucho estén libres para unirse a proteínas TCF/LEF asociadas a promotores y enhancers de los genes diana de Wnt en el núcleo (Roose et al.,

1998), suprimiendo de esta manera la transcripción de estos genes, silenciando las respuestas biológicas e inclusive la proliferación celular (Barker, 2008).

El primer paso de la activación de la vía de Wnt /β-catenina es la interacción entre proteínas de Wnt y la proteína del receptor Frizzled (Fzd) y el co-receptor LRP5/6 (lipoproteína de baja densidad proteína relacionada con el receptor 5 / 6). La visión clásica de la vía canónica Wnt /β-catenina (Fig. 3) implica la presencia de ligandos Wnt secretados al espacio extracelular para posteriormente relacionarse con la proteína del receptor Fzd, que es un miembro de una familia de proteínas de siete pasos transmembrana. El complejo Wnt-Fzd forma un complejo con el co-receptor LRP5/6 (Tamai et al., 2000). Así, la señalización de Wnt se transforma en citoplasmática. Esto entonces activa a Dishevelled (Dvl) por fosforilación, que, por su parte, inactiva a GSK-3β, un modulador clave de este camino. La señalización de Wnt regula la actividad GSK-3β desplazando físicamente a GSK-3β del complejo de destrucción, por consiguiente previniendo la fosforilación y la degradación de β-catenina (Toledo et al., 2008). En consecuencia, al recibir una señal de Wnt, Dvl previene la fosforilación de β-catenin, la cual no es degradada y se encuentra estable, se acumula y se desplaza al núcleo.

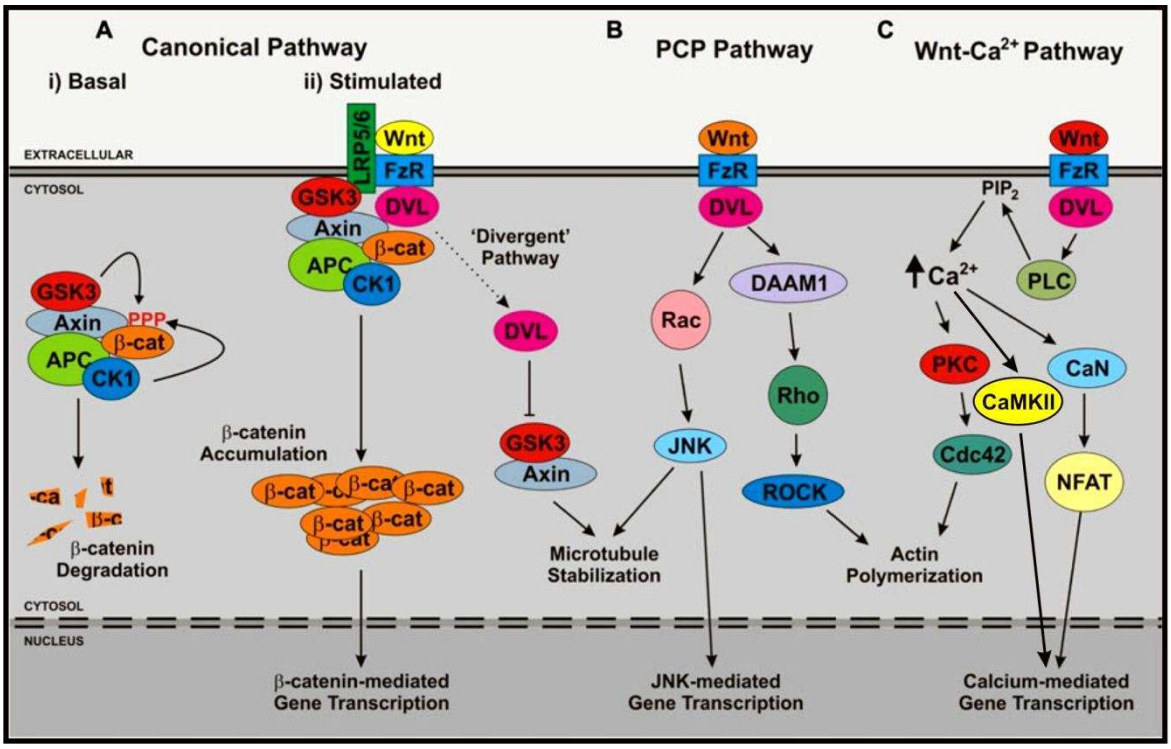

Figura 3. Vías de señalización de Wnt: Vía canónica Wnt/ β-catenina, y vías no canónicas Wnt/ PCP o Wnt/ JNK y Wnt/ Calcio. Ilustración de las tres principales ramas de la señalización de Wnt: (A) canónica, (B) "planar cell polarity" (PCP) y (C) Wnt-Ca2+. APC, adenomatous polyposis coli; CaMKII, Calcium/calmodulin-dependent kinase II; CaN, calcineurin; CK1, casein kinase1; DAAM, dishevelled-associated activator of morphogenesis; DVL, dishevelled; FzR, frizzled receptor; GSK3, glycogen synthase kinase 3; JNK, c-Jun n-terminal kinase; LRP5/6, low-density lipoprotein receptor- related protein 5/6; NFAT, nuclear factor of activated T cells; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; ROCK, Rho- associated protein kinase. Modificado de Berwick y Harvey (Berwick and Harvey, 2013).

La molécula de β-catenina estabilizada entra en el núcleo y se asocia con factores de transcripción TCF/LEF desplazando físicamente a Groucho de TCF/LEF (Daniels and Weis, 2005), llevando a la transcripción de genes diana de Wnt, como cyclin D1, PPARd y engrailed (Logan and Nusse, 2004), entre

muchos otros. En el sistema nervioso central, estos objetivos incluyen proteínas implicadas en el modelado de los nervios, como factores de transcripción CDX1 y engrailed-1 durante el desarrollo cerebral (Danielian and McMahon, 1996), EMX2 durante el desarrollo del telencefalo dorsal (Theil et al., 1999), y también puede incluir genes que promueven la proliferación como el c-myc y cyclin D1 (Coyle-Rink et al., 2002; He et al., 1998; Shtutman et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999).

Además, β-catenin también se puede transportar activamente de vuelta al citoplasma por una señal de exportación intrínseca o a cargo de Axin (Cong and Varmus, 2004) o APC (Rosin-Arbesfeld et al., 2000) que media entre citoplasma y núcleo (Clevers, 2006).

La translocación de β-catenina desde el citoplasma al núcleo es esencial para la alcanzar efectivamente la activación de la transcripción de los genes blanco de Wnt y asegurar la respuesta fisiológica apropiada. Sin embargo, cómo logra entrar al núcleo sigue sin ser elucidado. Su importación al núcleo parece ser independiente de la maquinaria de importación a través de la señal de localización nuclear (Nuclear Localization Signal, NLS), así también de otras proteínas que podrían interaccionar y permitir su entrada a través de su propia NLS (Stadeli et al., 2006).

Aunque el mecanismo de señalización de Wnt/β-catenina es detallado, la expresión subsecuente de los genes diana que hacen impacto en la biología es confusa, y la molécula implicada en este camino también requiere de investigación adicional.

Señalización de Wnt /β-catenina en la proliferación de células madre neurales y neurogenésis adulta

La neurogénesis adulta generalmente se considera un proceso activo que coordina la proliferación y la especificación del destino de la célula progenitora neural, y su diferenciación subsecuente, maduración, y su integración funcional en el circuito neuronal existente (Duan et al., 2008). En el SNC adulto, la neurogénesis activa ocurre en dos regiones "neurogénicas" distintas: la zona subgranular (SGZ) de la circunvolución de giro dentado en el hipocampo y la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales en el telencéfalo (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Lie et al., 2004).

Los efectos de la señalización de Wnt /β-catenina dependen de qué miembros de familia de Wnt estén implicados, así como el momento específico y la localización celular de la activación. En las etapas tempranas del desarrollo embrionario, la activación de Wnt /β-catenina mantiene células precursoras en un estado pluripotente y mantiene su autorenovación (Scholzke and Schwaninger, 2007). Es sabido que β-catenina es tanto un componente de la transmisión como un factor de transcripción en esta cascada. Sus acciones nucleares (transcripción) inducen la proliferación de células precursoras no diferenciadas haciéndolas entrar de nuevo en el ciclo celular en lugar de su diferenciación (Brembeck et al., 2006). Se ha indicado la activación de la vía Wnt /β-catenina en células BrdU-positivas con rasgos morfológicos de neuroblastos en proliferación (Lie et al., 2005). Además, se ha observado que

la activación β-catenina promueve la proliferación de las NSC, causando un aumento de la población celular, lo que sugiere que β-catenina promueve la proliferación de las NSC y su autorenovación (Qu et al., 2010). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el efecto de la señalización de Wnt /β-catenina desempeña un papel en la promoción de la proliferación de las NSC en el SNC adulto.

Rol de Wnt/β-catenin en la diferenciación neuronal

La diferenciación neuronal se controla tanto por reguladores intrínsecos como por extrínsecos. En cuanto a reguladores intrínsecos, Wnt /β-catenina es un regulador del desarrollo importante. Además de los ligandos de Wnt para regular este proceso, β-catenina desempeña un papel específico en la neurogénesis. Durante en desarrollo, la activación de β-catenina lleva a la proliferación del "pool" de progenitores neurales, causando la extensión de todo el tubo neural (Chenn and Walsh, 2002). Además, se encontró que un inhibidor de GSK-3β, que fosforila β-catenina, podía inducir la diferenciación selectiva de células madre en neuronas (Ding et al., 2003). A partir de esto, se ha propuesto que β-catenina podría inhibir la diferenciación neuronal en el proceso de neurogénesis adulta (Malaterre et al., 2007). Sin embargo, todavía es confuso cómo las células madre con β-catenina sobreexpresada son inhibidas a diferenciarse en células neurales maduras (Zhang et al., 2011).

La demarcación espaciotemporal de un acontecimiento señalado dentro de un organismo en vías de desarrollo a menudo da ideas de su papel biológico exacto. Sin embargo, la presencia de Wnts, los receptores Fzd o LRP-5/-6, no garantizan la activación del camino porque se conoce que muchos reguladores negativos se cruzan a niveles subcelulares diferentes (Logan and Nusse, 2004).

La expresión restringida en renacuajos de *X. laevis* transgénicos, reflejan dominios ya conocidos así como también nuevos dominios de vías de señalización de Wnt activas en el límite mesencéfalo–procencéfalo, los ojos, los oídos interiores, el epitelio olfatorio, el órgano vomeronasal, pronefros y estructuras del cartílago craniofacial y las branquias (Denayer et al., 2006).

Proteínas de la familia de Wnt como Wnt-1, Wnt-3a y Wnt-8b (Wolda et al., 1993) han sido descriptos en el límite entre el cerebro medio y posterior. La vía canónica de Wnt tiene papeles múltiples durante el desarrollo del ojo, como se ha observado por la expresión de muchas variantes de Wnt y receptores Frizzled en la lente, nervios de la retina o epitelio pigmentado retinal (Van Raay and Vetter, 2004). Varios Frizzled y Wnt se describieron en oído interno (Deardorff and Klein, 1999), aunque hasta ahora no se describe ninguna función específica en Xenopus. Embriones de Zebrafish tratados con LiCl (inhibidor del GSK-3β) carecieron de placodes olfatorios (van de Water et al., 2001), sin embargo no se ha descrito aún una función de la vía de Wnt en el epitelio olfatorio (Denayer et al., 2006).

Vias no canónicas de Wnt

La señalización de Wnt activa distintas vías intracelulares, las cuales son importantes para la proliferación, diferenciación, y la polaridad celular.

A diferencia de la vía de Wnt /β-catenina que sigue una cascada lineal de señalización, las vías de señalización independientes de β-catenina de Wnt tiene diferentes ramas. Uno de las ramas de estas vías es modulada por los niveles intracelulares de Ca^{++}, llamada comúnmente la vía Wnt/ Ca^{++}. Una segunda rama de esta vía independiente de β-catenina, conocida como la vía Wnt/ PCP ("Planar Cell Polarity") o Wnt/ JNK, direcciona los rearreglos citoesqueléticos a través de pequeñas GTPasas como también de la vía de señalización de c-Jun N-terminal kinasa (JNK).

Vía de señalización de Wnt/JNK o Wnt/PCP

La vía de PCP surgió de los estudios genéticos en Drosophila en los que se encontraron que mutaciones en los componentes de señalización Wnt incluyendo Frizzled y Dishevelled podían aleatorizar la orientación de las estructuras epiteliales incluyendo pelos de la cutícula y cerdas sensoriales (Seifert and Mlodzik, 2007). Por otro lado, es sabido que las células en los epitelios poseen una polaridad apical-basolateral definida, pero además también están polarizados a lo largo del plano de la capa epitelial. Esta

organización rígida gobierna la orientación de las estructuras incluyendo la orientación de los folículos pilosos, las cerdas sensoriales y disposición hexagonal de la ommatidia en el ojo (Mlodzik, 2002). En los vertebrados, esta organización se ha demostrado ser la base de la organización y orientación de estereocilios en el epitelio sensorial del oído interno, la organización de los folículos pilosos, y la morfología y el comportamiento migratorio de las células del mesodermo dorsal durante la gastrulación (Wang and Nathans, 2007). La característica definitoria de esta vía es la regulación del citoesqueleto de actina para generar dicha organización polarizada de las estructuras y la migración celular dirigida (Komiya and Habas, 2008).

En la vía no canónica, la señal de Wnt es mediada por receptores Fzd independientemente del co-receptor LRP5/6 (Gonzalez-Sancho et al., 2004). Wnt activa a Dvl promoviendo su fosforilación en serina-treoninas. Los dominios PDZ y DEP de Dvl son utilizados para activar dos vías paralelas que activan las pequeñas GTPasas Rho y Rac (Wallingford and Habas, 2005).

La activación de Rho GTPasa conduce a la activación de la quinasa asociada a Rho (ROCK) y miosina, lo que conduce a la modificación del citoesqueleto de actina y la reorganización del citoesqueleto (Marlow et al., 2002; Weiser et al., 2007). La segunda rama de la señalización requiere el dominio DEP de Dvl y activa a la Rac GTPasa (Li et al., 1999). Si bien Rho y Rac han estado implicados en la regulación transcripcional, aún se desconocen qué genes están regulando por esta vía. Separadamente Rac también activa la vía de señalización de JNK a través de la activación de las MAP quinasas (MAPK) y

su consecuente fosforilación, de esta manera se conduce a la regulación de la transcripción de los genes blanco de JNK (Komiya and Habas, 2008).

Vía de señalización Wnt/ Calcio

La vía de Wnt/ Ca^{++} es otra rama de la vía independiente de β-catenina, y además modula la señalización canónica de Wnt en la formación del eje dorsal y la vía Wnt/JNK en los movimientos celulares durante la gastrulación (Gilland et al., 1999; Wallingford et al., 2001). La vía Wnt / Ca^{++} surgió con el descubrimiento de que algunos receptores Fzd pueden estimular la liberación de Ca^{++} intracelular del retículo endoplasmático y es dependiente de proteínas G (Kohn and Moon, 2005). La liberación de calcio intracelular inducida por Wnt lleva a la activación de varias proteínas sensibles a Ca^{++}, incluyendo a la proteína quinasa C (PKC), la calcineurina y la calcio/calmodulina dependiente de quinasa II (CamKII) (Komiya and Habas, 2008). CaMKII es una molécula compleja compuesta por 8 a 12 subunidades. Cada subunidad tiene un dominio autoinhibitorio, un dominio catalítico y un dominio de asociación el cual es requerido para su multimerización. En ausencia de Ca^{++}/calmodulina, el dominio autoinhibitorio bloquea el sitio catalítico, y la enzima está inactiva. La unión de Ca^{++}/calmodulina induce un cambio conformacional de la subunidad y vuelve disponible el sitio activo para el sustrato, y se autofosforila (Kuhl and Pandur, 2008). Por otro lado, se ha demostrado que CaMKII activa al factor de transcripción NFAT, el cual parece ser un componente crucial en la vía de

señalización de Wnt/ Ca^{++} y la regulación de la expresión génica (Saneyoshi et al., 2002; Sheldahl et al., 2003).

El gran número de ligandos Wnt presentes en vertebrados, junto con las muchas ramas de la señalización que se activan por ligandos Wnt, han dado lugar a la cuestión de determinar qué rama particular de la señalización puede selectivamente activar un ligando Wnt específico. Sin embargo, la respuesta a esta cuestión sigue sin resolverse, ya que algunos ligandos Wnt puede activar ambas vías canónica y no canónica (Komiya and Habas, 2008).

Sox2 y células madre

El grupo B1 de los genes Sox (SoxB1), que incluyen Sox1-3 en vertebrados y dichaete y soxneuro (soxn) en Drosophila, desempeñan un papel crítico en la especificación neural y luego funcionan para mantener una población de precursores neurales no diferenciados (Buescher et al., 2002; Bylund et al., 2003; Cremazy et al., 2000; Graham et al., 2003; Kishi et al., 2000; Mizuseki et al., 1998; Overton et al., 2002; Sasai, 2001). Aunque los genes SoxB1 son ampliamente expresados en progenitores del sistema nervioso a lo largo del desarrollo, la expresión de los genes SoxB1 se inicia temprano en respuesta a señales de inducción neural desde el organizador, pero luego la expresión

génica en diferentes regiones del sistema nervioso parece estar bajo control de distintos elementos reguladores (Uchikawa et al., 2003).

Esto lleva a la posibilidad de que las vías de señalización específicas para cada región pudieran modular la expresión de los genes SoxB1 y así regionalmente regular el potencial neural. Aunque se han identificado muchas señales desde el organizador (Kuroda et al., 2004), las señales extrínsecas que regulan el potencial neural más tarde en el desarrollo del sistema nervioso no han sido descriptas (Van Raay et al., 2005).

La familia de genes SoxB1 pueden ser efectores clave de la vía de señalización de Wnt/β-catenin en el sistema nervioso en desarrollo (Lee et al., 2006; Van Raay et al., 2005). El requerimiento tanto de la señalización de Wnt/β-catenin como de Sox2 durante la neurogénesis parece deberse a que Wnt y Sox2 favorecen la proliferación y el mantenimiento de las células progenitoras.

En el SNC en desarrollo, los progenitores adquieren el potencial neural y proliferan para ampliar el "pool" de precursores competentes para someterse a la diferenciación neuronal. Hay pruebas de que su expresión es regionalmente regulada y sugiere que las señales específicas regulan el potencial neural en subdominios del sistema nervioso en desarrollo. En Xenopus, se ha demostrado que el receptor de transmembrana Frizzled "Xfz5" selectivamente gobierna el potencial neural en el desarrollo de la retina regulando la expresión de Sox2 (Van Raay et al., 2005). El bloqueo Xfz5 o la vía canónica de Wnt dentro de la retina en desarrollo se inhibe la expresión Sox2,

reduce la proliferación celular, inhibe el inicio de la expresión de los genes proneurales e influye en progenitores individuales hacia un destino no neural, sin cambiar la expresión de múltiples marcadores de los progenitores. El bloqueo de la función de Sox2 imita estos efectos y experimentos de rescate mostraron que Sox2 es posterior a Xfz5. Así, en la retina de Xenopus, la vía de señalización de Wnt/β-catenina a través de Fz5 es necesaria para la expresión Sox2, la que se requiere para la expresión de los genes proneurales y la transición de progenitores a neuronas (Van Raay et al., 2005; Van Raay and Vetter, 2004).

Además, se ha descrito que Wnt y Sox2 inhiben la diferenciación neural a través de la activación de Notch. Independientemente de Sox2, Wnt estimula la proliferación de progenitores en retina y esto, cuando se combina con el bloqueo en la diferenciación, mantiene los destinos de los progenitores retinales. La posterior inhibición por parte de Sox2 sobre la señalización de Wnt y por los factores de transcripción proneurales sobre Sox2, significa que cada elemento de la vía activa el siguiente elemento e inhibe el anterior, proporcionando una red direccional que asegura que las células retinales hagan la transición de progenitores a neuronas y glia (Agathocleous et al., 2009).

Los factores de transcripción Sox2 y Pax6 son característicos de células madre en muchos tejidos, incluso en el cerebro. Se ha descrito la expresión de Pax6 y Sox2 en el EO normal de ratas, y durante la regeneración epitelial después de la lesión del bromuro de metilo o bulbectomia olfatoria (Guo et al., 2010). Sox2 se encontró en múltiples tipos de células en el EO normal, incluso

en células SUS, células basales horizontales y algunas células basales globosas. Pax6 es co-expresado con Sox2 en todos éstos, pero también se encontró en células del conducto/glándula así como en NRO. La mayor parte de CB globosas Sox2/Pax6-positivas se encontraron cíclicamente activas. Su expresión en algunas GBC y HBC que se piensan que pueden ser NSC en este tejido sugiere que funcionan tanto como factores de transcripción claves al mantenimiento de neurogénesis como en la capacidad notable del neuroepitelio para la recuperación de la lesión durante la vida adulta (Guo et al., 2010).

Aunque la expresión de Sox2 en el EO de rata ha sido descrita, permanece confusa la relación entre la expresión de este factor de transcripción y la vía de señalización canónica de Wnt en este tejido, como su función en la recuperación.

Neurotrofinas en el sistema olfatorio

La neurogénesis se produce durante toda la vida en el EO de vertebrados, debido a la presencia de las NSC olfatorias en la capa basal de este epitelio. La expansión de NSC y la diferenciación implican etapas de la proliferación y la maduración que se rigen por la exposición secuencial y combinatoria de las células a los factores extrínsecos (Simpson et al., 2007). Hasta la fecha, se ha informado de numerosos factores de crecimiento que juegan un papel crítico en la proliferación de células progenitoras, la neurogénesis, la determinación de linaje, y el mantenimiento de las neuronas en el sistema olfatorio (Adachi et al., 2005; Calof et al., 1998; Cao et al., 2007; Clevenger et al., 2008; Feron et al., 2008; Newman et al., 2000; Uranagase et al., 2012; Yasuno et al., 2000).

El desarrollo del sistema nervioso es complejo. Desde la neurogénesis hasta la sinaptogénesis, las neuronas encuentran una gran variedad de factores en el ambiente que pueden influenciar y determinar su crecimiento, diferenciación y supervivencia (Huang and Reichardt, 2001). Entre estos factores, el rol de las neurotrofinas ha sido ampliamente estudiado.

Las neurotrofinas (NT) son una familia de proteínas estructuralmente relacionadas requeridas para el desarrollo y función del sistema nervioso de vertebrados, donde regulan supervivencia, diferenciación y plasticidad sináptica de poblaciones neuronales específicas. Los miembros de esta familia incluyen el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF, de sus siglas en inglés Nerve Growth Factor), el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF,

Brain-Derived Neurotrophic Factor), Neurotrofina-3 (NT-3) y Neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (Huang and Reichardt, 2001). Todos los genes de las neurotrofinas comparten una misma organización: codifican para una pre-pro-proteína la cual es translocada al retículo endoplásmico y procesada proteolíticamente para alcanzar la forma madura (Lanave et al., 2007; Seidah et al., 1996; Suter et al., 1991).

Para ejercer sus funciones biológicas, las NT se unen a receptores transmembrana pertenecientes a la familia de receptores tirosina quinasa (Trk). NGF se une a TrkA, BDNF y NT-4/5 se unen a TrkB y NT-3 de une TrkC principalmente pero también puede unirse con menor afinidad a TrkA y TrkB. Mientras que todas las neurotrofinas maduras se unen con menor afinidad al Receptor de neurotrofinas p75 (p75NTR) (Chao, 2003; Lei and Parada, 2007). Tanto las NT como sus respectivos receptores Trk han sido descriptos en vertebrados, incluyendo reptiles, anfibios, peces, aves y mamíferos (Lanave et al., 2007).

Entre las NT, BDNF es la que mayormente se ha estudiado y descripto, y se ha observado que modula tanto el desarrollo y la función de sinapsis en varios sistemas, desde la unión neuromuscular hasta la corteza, incluyendo el sistema olfatorio (Lewin and Barde, 1996).

Muchos factores involucrados en neurogenesis en el cerebro también están implicados en la neurogenesis pre y postnatal del EO. En los últimos años, distintos trabajos han presentado evidencias que sugieren la participación NT en el proceso de neurogénesis (Roskams et al., 1996).

Algunos autores han reportado su interacción con otros factores como el Óxido Nítrico en el establecimiento del balance entre proliferación y diferenciación neuronal (Cheng et al., 2003), así desempeñan estos factores durante la neurogénesis en el sistema olfatorio no está del todo clara; esto se debe a que ambos participan en gran cantidad de procesos relacionados con el desarrollo y el funcionamiento del sistema nervioso.

Dentro del Sistema Olfatorio, BDNF ha sido detectado en las células basales del EO de rata y en regiones discretas del bulbo olfatorio (BO), mientras que el receptor Trk-B es expresado por NRO maduras e inmaduras y se encuentra también en la capa nerviosa y las células periglomerulares del BO (Mackay-Sima and Chuahb, 2000). Por otro lado, BDNF y NGF fueron encontrados en neuronas inmaduras y en celúlas basales (Roskams et al., 1996).

En cuanto a su función, en trabajos en los que se utilizan cultivos primarios de NRO y ratones nulos para BDNF se ha demostrado que esta neurotrofina está involucrada en la proliferación de precursores neuronales (Simpson et al., 2002). Además, la expresión de BDNF mediada por un vector adenoviral previene la apoptosis de las NRO en respuesta a la ablación del BO (Isoyama et al., 2004). Asimismo se ha reportado una activación secuencial de los receptores de BDNF tanto a nivel del BO (Gascon et al., 2005) como del EO (Roskams et al., 1996) durante procesos regenerativos que se ponen en marcha en respuesta al daño producido por métodos químicos o quirúrgicos, así como durante el recambio neuronal periódico característico de este sistema. Además, NGF y BDNF aumentan la expresión de Ciclina D1 y Quinasa 4

dependiente de Ciclina (cdk4) afectando la cinética de proliferación de precursores neuronales olfatorios (Simpson et al., 2007). Los resultados presentados en estos trabajos indican que cada uno de los receptores de estas NT están involucrados en etapas específicas de la diferenciación y maduración neuronal, y que sus patrones de expresión se modifican en condiciones patológicas.

Aunque todos estos datos sugieren que BDNF y NGF desempeñan un papel importante en el desarrollo y recambio neuronal del EO, en otros artículos se han presentado evidencias que generan controversias al respecto.

Estos temas han sido analizados en algunos artículos en los que se menciona que las publicaciones acerca de la expresión de BDNF (tanto del ARN mensajero como del péptido) son inconsistentes, del transporte retrógrado desde el BO a través de los axones de las NRO hacia el EO, y que la utilización de distintos métodos de fijación y anticuerpos, así como de animales de diferentes especies y edades, dificultan la comparación de los resultados obtenidos y generan datos conflictivos (Feron et al., 2008).

En EO de roedores, Buckland and Cunningham (1999) reportan la expresión de BDNF en un grupo de células basales, Takami et al. (2005) localiza BDNF en NRO maduras, Feron et al. (2008) encontró BDNF en todas las capas celulares del EO excepto en células basales, y Clevenger et al. (2008) reporta la expresión tanto del mensajero como del péptido en el EO (Buckland and Cunningham, 1999; Clevenger et al., 2008; Feron et al., 2008; Takami et al., 2005). De esta forma, permanece en discusión si realmente ocurre la expresión

de estas NT en el OE, cuales son las células que las expresan, y si la presencia de BDNF en EO se debe al transporte retrogrado desde el BO.

Por otro lado, se ha descripto la presencia de BDNF en el EO de la especie de anuro *Rhinella arenarum*, solo durante el proceso de destrucción química del EO (Yovanovich et al., 2009). A pesar de esto, mucho esfuerzo ha sido realizado para analizar la expresión de BDNF en modelos murinos sin llegar a un consenso, y sin embargo no hay reportes de esta neurotrofina en el EO de *Xenopus laevis*.

Importancia y aplicabilidad de la investigación

La mayor parte de injurias del sistema nervioso central son acompañadas por una pérdida de la función que es con frecuencia devastadora y por lo general permanente. El descubrimiento de estrategias para la reparación regeneradora o promover la reorganización compensadora a fin de mitigar o compensar esta pérdida de la función permanece uno de los problemas más provocativos en la medicina regeneradora. El trasplante de células en regiones del SNC dañado representa un enfoque al problema. Las estrategias del trasplante celular han sido utilizadas para la sustitución de poblaciones neuronales específicas, como en la enfermedad de Parkinson, o para reconstruir estructuralmente y modificar el ambiente de la lesión como en el daño isquémico o traumático.

Actualmente, el tipo celular ideal para la reparación del sistema nervioso central no ha sido identificado, pero avances en la biología de células madre traen la opción cada vez más creciente de candidatos que incluyen a las ESC y SC adultas restringidas a un tipo de tejido. Varios tipos celulares primarios se han considerado, pero el tejido olfatorio, en parte debido a su capacidad para la regeneración, ha surgido como una de las fuentes más prometedoras de células madre (Lindsay et al., 2010).

Por lo tanto, se requiere un mejor entendimiento de la composición celular del tejido y las propiedades de las estas células si este tejido ha de ser usado como fuente de NSC para trasplante.

Objetivos e Hipótesis

Objetivos e Hipótesis

El objetivo principal de este trabajo consiste en el estudio y la caracterización de progenitores neurales y el proceso de neurogénesis en el epitelio olfatorio de *Xenopus laevis*. Para llevar a cabo esto, nos proponemos analizar la expresión y rol de Sox2 y la relación con la vía de señalización de Wnt/β-catenin en el mantenimiento de la multipotencialidad, proliferación y diferenciación de los progenitores neurales, como también la renovación de neuronas receptoras olfatorias en condiciones normales y durante la regeneración masiva del EO. Por otro lado, se propone comprender mejor los factores tróficos implicados en la neurogénesis olfatoria, a través del análisis y determinación de la expresión de neurotrofinas como BDNF en el EO y el BO en condiciones fisiológicas normales y durante el proceso de regeneración del EO en larvas de *Xenopus laevis*.

Objetivos específicos:

- Analizar la dinámica de regeneración del EO de larvas de *X. laevis*.

- Analizar la implicancia de Sox2 y la vía de señalización de Wnt/β-catenina en la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales bajo condiciones fisiológicas normales y durante la regeneración del EO.

- Estudiar la expresión de la neurotrofina BDNF en el sistema olfatorio de *X. laevis*, en condiciones fisiológicas normales y durante la regeneración.

Hipótesis

La diferenciación neural en el EO de larvas de *X. laevis* involucra la participación de BDNF y de la expresión de Sox2 por progenitores neurales a través de la activación de vías de señalización de Wnt, tanto en condiciones fisiológicas normales como durante la regeneración masiva del neuroepitelio.

Materiales y Métodos

- *Animales*

Para llevar a cabo la mayor parte de esta tesis se utilizaron renacuajos de *Xenopus laevis*, obtenidos en el laboratorio. Se indujeron sexualmente a hembras y machos adultos de *Xenopus laevis* por medio de la inyección intraperitoneal de hormona Gonadotrofina Coriónica Humana para inducir la ovulación y el amplexo por parte del macho (Sive et al., 2000). Los huevos fecundados fueron transferidos a placas de petri conteniendo la solución buffer de Ringer Modificada (NaCl, 0.1M; KCl, 1.8 mM; CaCl2, 2.0 mM; Mg2Cl, 1.0 mM; HEPES-NaOH, 5.0 mM; pH 7.6).

Una vez alcanzado el estadio 40 (según Nieuwkoop & Farber, 1967; (Hubrecht et al., 1975), las larvas de Xenopus se criaron en acuarios de vidrio con 3 L de agua corriente filtrada y declorada, realizándose tres cambios parciales por semana. Los renacuajos se mantuvieron en una densidad de 5 larvas por litro, bajo la temperatura controlada y fotoperíodo, 20-25°C y 12L:12O, respectivamente; y se alimentaron *ad libitum* con espirulina y comida equilibrada para el pescado (VitaFish®).

Los procedimientos que implican animales se hicieron de acuerdo con el Guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio (la Publicación núm. 86-23 del NIH, 1996 revisado). Una vez alcanzado el estadio de pre-

metamorfosis (estadio 52-54; Nieuwkoop & Farber, 1967; Hubrecht et al. 1975) se asignaron aleatoriamente a los distintos grupos experimentales.

Los animales de cada grupo se fijaron con la solución de Bouin durante 24hs a 4°C para inmunohistoquímica o se disecaron para aislar el tejido epitelial y se homogeneizaron con el buffer de lisis para la electroforesis (Western blot), o con TRIzol® para el aislamiento del ARN.

- Destrucción del epitelio olfatorio y regeneración: Tratamiento de $ZnSO_4$

Para inducir la regeneración masiva del EO, los renacuajos se expusieron individualmente durante 24hs a 250ml de una solución de $ZnSO_4$ (20mg/l) preparada con agua corriente filtrada y declorada. El tratamiento induce la degeneración del tejido del EO y la activación sincrónica de mecanismos de regeneración (Yovanovich et al., 2009). El grupo control se manejó del mismo modo, pero se expuso al agua declorada sin Sulfato de zinc. El proceso de regeneración fue analizado a diferentes tiempos de la recuperación después de la destrucción periférica por el tratamiento $ZnSO_4$, a fin de determinar el daño y el nivel de recuperación en función del tiempo. El periodo de 24hs de recuperación se eligió como el periodo principal para los análisis subsecuentes.

- *Experimentos de comportamiento*

Para analizar la capacidad olfativa en los animales antes y después de la destrucción del EO con el tratamiento con $ZnSO_4$, se evaluó la respuesta ante un estímulo químico alimenticio a través del cambio en la frecuencia de bombeo bucal, ya que estos animales son filtradores obligados que generan con el bombeo bucal continuo la entrada de agua a la cavidad bucal y luego a la cavidad olfatoria y branquias (Ryerson and Deban).

El estímulo de alimento se obtuvo a partir de la suspensión resultante en el agua luego de diluir espirulina en polvo con la que se alimenta a los animales en condiciones de cautiverio. Para controlar y estandarizar la concentración de estímulo utilizado en los diferentes ensayos el mismo se preparó una solución 0.002 gr/ml de espirulina y se sumergió 15min en un baño a 50°C para lograr una dilución completa y homogénea. El agua resultante de este proceso se filtró para remover partículas pequeñas en suspensión. Este líquido fue utilizado como estímulo químico de alimento.

Todas las pruebas comportamentales se realizaron en un cuarto acondicionado para tal fin y en una franja horaria restringida de 10 a 14 hs para evitar posibles efectos circadianos sobre el comportamiento. Cada sujeto experimental fue testeado sólo una vez y de forma individual. Las larvas de *X. laevis* (St. 54) de todos los grupos experimentales fueron hambreadas por 4 días previos al testeo.

Se utilizaron cristalizadores de vidrio de 15cm de diámetro, conteniendo 500 mL de agua declorada a 21° C. El esquema de la Figura 4 resume las condiciones y el protocolo de estimulación utilizados. Al momento del testeo, los renacuajos fueron transferidos desde su estanque de cría a la arena experimental donde se les permitió aclimatarse durante 10 min. Luego de este tiempo de aclimatación comenzó a registrarse con un contador el número de bombeos de la cavidad bucal observados en cada renacuajo. Cada ensayo tuvo una duración de 8 min, y consistió en un período de 4 min pre- y 4 min post-estímulo. El agregado de 400µl de estímulo o de control H2O (agua declorada) se realizó con pipeta automática durante un lapso temporal de 4 seg, (a una tasa aproximada de 100 µl/seg) y recorriendo suavemente la longitud de la arena para maximizar su difusión. La pipeta fue posicionada a 45° para evitar hacer sombra sobre el agua y con la punta apenas tocando la superficie del agua. Con estos datos se calculó la variable "cambio en la frecuencia de bombeo" (frecuencia de bombeo bucal post-estímulo / frecuencia de bombeo bucal pre-estímulo) la cual se utilizó para comparar los diferentes grupos: control H_2O (n= 4), control (n= 4), 0hs (n= 4), 24hs (n= 4), 120hs (n= 6), 168hs de recuperación (n= 5).

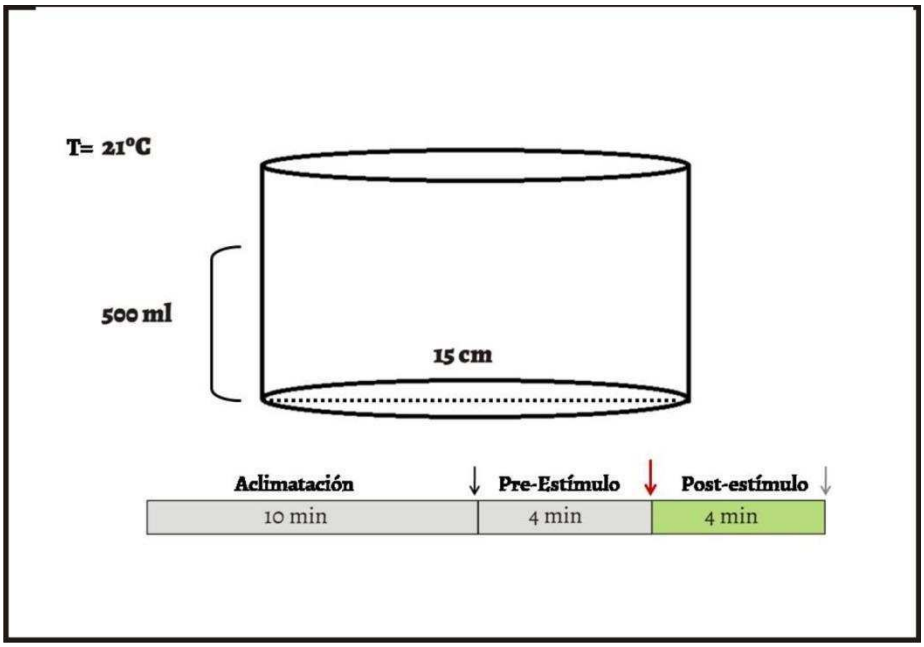

Figura 4. Diseño de la arena experimental para el desarrollo de los experimentos de comportamiento de olfación, condiciones y protocolo de estimulación. El registro de la actividad de bombeo bucal se realizó a lo largo del intervalo Pre-Estímulo y Post-Estímulo. La flecha roja indica el momento de agregado del estímulo alimenticio.

El diseño experimental requirió testear un grupo control propio del experimento al que se lo denominó "control H_2O". Dicho grupo consiste en renacuajos expuestos en las mismas condiciones experimentales pero en lugar del estímulo alimenticio con espirulina, se les colocó de manera similar el agregado de agua declorada. Este grupo nos permitió descartar algún cambio en la frecuencia de bombeo ocasionado por otros motivos ajenos al estímulo químico, como el modo de aplicación, perturbación del agua, etc, que pudieran alterar el comportamiento del animal.

- Inhibición de la vía de señalización de Wnt/β-catenina: tratamiento con Norcantaridina (NCTD, un inhibidor específico)

A fin de inducir la inhibición de la vía señalización de Wnt/β-catenina, se procedió a la aplicación de Norcantaridina (NCTD) según se ha descrito en trabajos anteriores (Zhang et al., 2004; Chuang et al., 2010; Cimmino et al., 2011; Wang et al., 2011). Los renacuajos del grupo control y grupos de tratamiento con $ZnSO_4$ se anestesiaron en agua con hielo y se inyectaron en la zona comprendida entre el BO y el EO, con 2 µl de NCTD(Sigma Aldrich) 150 µg/ml disuelta en emulsión preparada con PBS y aceite (el 80% y el 20%, respectivamente). La dosis administrada de NCTD se siguió según el protocolo probado in vivo en ratas por Cimmino et al. (2011). Después de la inyección, se colocaron en agua declorada durante 24hs para comparar los efectos de la inhibición de esta vía en la regeneración del EO.

- Incorporación de BrdU

A fin de identificar la proliferación de progenitores neurales, se indujo la incorporación de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). Para este fin, los renacuajos se sumergieron individualmente en 250 ml de solución de BrdU (10 mM), preparados con el agua corriente declorada, durante una hora. Posteriormente, los renacuajos fueron devueltos al agua corriente declorada

sin BrdU durante 2hs (Quick and Serrano, 2007; Yovanovich et al., 2009), y luego se fijaron con solución de Bouin.

- Procesamiento para obtención de cortes histológicos

Los animales fijados en Bouin por 24hs a 4°C se los conservó en Etanol (EtOH) 70. Posteriormente se procedió a la deshidratación del material fijado por una secuencia creciente del grado de alcohol: EtOH 70 – 90 – 95 – 100 (20 min en cada uno y en agitación). Seguido del proceso de aclaración e inclusión en parafina, para lo cual se realizó el pasaje por EtOH 100:Xilol (20 min) – Xilol (40 min) – Xilol:Parafina (60°C, 40 min) – 2 x Parafina (60°C, 40 min); se prepararon los tacos para realizar los cortes histológicos en micrótomo. Se realizaron cortes de 5 um de espesor de los animales en orientación horizontal y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio cargados. En el momento de ser utilizados se los desparafinó con xilol x 2 (10 min), e hidrató en una serie descendente de alcoholes: EtOH 100x2 – 95 – 90 – 70 (10 min en cada uno).

- Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Luego de la re-hidratación, las secciones se lavaron en PBS 0,5%, pre-trataron con agua oxigenada al 5% durante 20 minutos para el bloqueo de

peroxidasas, cuando este paso fue requerido, y luego se lavaron con PBS brevemente antes de incubar con la solución de bloqueo de sitios inespecíficos (leche descremada en polvo al 5%) durante 50 minutos a temperatura ambiente.

En todos los casos, las secciones se incubaron con anticuerpos primarios específicos detallados en Tabla 1, durante la noche (overnight, ON) a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron amplificados y detectados por la incubación con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado, seguido de streptavidin-bHRP conjugado (1/500 PBS, ZyMed) y luego revelado con 3,3-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, o con uno de varios anticuerpos secundarios específicos asociados a fluorósforo o Streptavidin conjugado con fluorósforo (Alexa 488, eFluor 680). En algunos casos, se realizó en los cortes de inmunohistoquímica una contra-coloración con hematoxilina diluída 1/5 por 30 segundos, previa a la deshidratación y montaje. En inmunofluorescencia, se usaron marcadores fluorescentes que se unen a ADN, como Yoduro de propidio (IP) o DAPI (4 ',6-diamino-2-fenilindol).El pre-tratamiento con agua oxigenada se evitó para la inmunofluorescencia.

En la puesta a punto de la inmunohistoquímica de cada anticuerpo primario, se probaron distintas condiciones como diferentes bloqueos inespecíficos, recuperación antigénica (20 min en Buffer Citrato pH=6,0), distintas concentraciones del anticuerpo primario en diferentes soluciones, para encontrar la marca específica óptima y disminuir el "background". En general se usó el protocolo ya mencionado pero en ciertos casos fue necesario cambiar algunas condiciones. Para la inmunohistoquímica de BDNF se realizó

el bloqueo inespecífico usando 2% de BSA y el anticuerpo se incubó durante la noche diluido en 2% de BSA. Se probaron dos anticuerpos diferentes para BDNF, uno de Santa Cruz y otro de Milipore. Ambos anticuerpos anti- BDNF probados produjeron resultados similares (datos no mostrados). Se continuó utilizando el de Santa Cruz para las siguientes inmunomarcaciones.

Para la inmunohistoquímica de E7 se realizó el bloqueo inespecífico con BSA5%: leche 5% y se incubó el anticuerpo en BSA 5%; para OMP se bloqueó con leche 5% y se incubó con BSA 2%.

	Dilución	Condiciones	Incubación
Anti-Sox2 (Abcam, rabbit, polyclonal)	1/100 en PBS	Bloq Inesp: Leche Desc 5%	ON, 4°C
Anti-β catenina (Cell Signaling, rabbit, monoclonal)	1/200 en PBS	Bloq Inesp: Leche Desc 5%	ON, 4°C
Anti-GAP43 (Santa Cruz, goat, polyclonal)	1/100 en PBS	Bloq Inesp: Leche Desc 5%	ON, 4°C
Anti-NCAM (DSHB, mouse, monoclonal)	1/50 en PBS	Bloq Inesp: Leche Desc 5%	ON, 4°C
Anti-β-tubulin (E7, DSHB, mouse, monoclonal)	1/2000 en BSA 5%	Bloq Inesp: BSA 5% : Leche Desc 5%	ON, 4°C
Anti-OMP (Sigma, rabbit, polyclonal)	1/500 en BSA 2%	Bloq Inesp: Leche Desc 5%	ON, 4°C
Anti-Cytokeratin II (DSHB, 1h5c, mouse, monoclonal)	1/200 en PBS	+ Recuperación antigénica Bloq Inesp: Leche Desc 5%	ON, 4°C
Anti-BrdU (GE, mouse, monoclonal)	1/200 en sol. de nucleasas	+ Recuperación antigénica Bloq Inesp: Leche Desc 5%	ON, 4°C
Anti-PCNA (Chemicon, mouse, monoclonal)	1/100 en PBS	+ Recuperación antigénica Bloq Inesp: Leche Desc 5%	ON, 4°C

Anti- BDNF (Santa Cruz, rabbit, polyclonal)	1/80 en BSA 2%	Bloq Inesp: BSA 2%	ON, 4°C
Anti-pJNK(Santa Cruz,mouse, monoclonal)	1/90 en PBS	Bloq Inesp: BSA 2%	ON, 4°C
Anti-.pCamKII (Cell Signaling, rabbit, polyclonal)	1/50 en PBS	Bloq Inesp. Leche Desc 5%	ON, 4°C
Anti-rabbit biotinilado	1/2000 en PBS	-	1h, T. Amb
Anti-mouse biotinilado	1/300 en PBS	-	1h, T. Amb
Anti-mouse-rhodamine	1/250 en PBS	-	1h, T. Amb
Anti-mouse-eFluor 660	1/250 en PBS	-	1h, T. Amb
Anti-goat-eFluor 488	1/200 en PBS		1h, T. Amb

Tabla1.Anticuerpos, diluciones ycondicionesde incubaciónpara inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.ON:durante la noche; T.Amb: temperatura ambiente. DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank; GE: General Electric.

Los cortes utilizados para inmunohistoquímica, revelados con DAB, se deshidrataron y montaron en medio definitivo DPX, se analizaron y fotografiaron posteriormente utilizando un microscopio de campo claro Leica Reichert Polyvar acoplado a una cámara Sony Cybershot DSC P-200.

Los cortes utilizados para inmunofluorescencia, se montaron en glicerol: PBS. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio láser confocal Olympus FV-300 conectado a un microscopio Olympus BX-61. Para el análisis de la inmunofluorescencia con DAPI se requirió otro equipo para visualizar en

el espectro correspondiente, por lo que se hizo uso del microscopio láser confocal (Nikon) cortesía de la Universidad Maimónides.

- *Western blotting*

A fin de determinar la especificidad de los anticuerpos usados y el peso molecular de las proteínas inmunomarcadas, se realizó la electroforesis en geles de 15% dodecyl sulfato poliacrilamida (SDS-PAGE).

El análisis de Western blot se realizó usando dos sistemas de revelados diferentes, quimioluminiscencia y reacción colorimétrica, empleando luminol y DAB, respectivamente.

Los sistemas olfatorios (OE y VNO) y ojos (O) de 13 renacuajos del grupo de control se disecaron y se homogeneizaron en Buffer-Tris (NaCl de 100 mm, 10 mM Tris, pH 7.4, EDTA de 1 mm, NP40 del 0.5%, Tritón del 1%, PMSF de 1 mm) con 1× del inhibidor del proteasas (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, los EE. UU), y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Previo al ensayo de Western blot, se realizó la medición de la concentración de proteínas totales de cada muestra por medio del ensayo de Bradford.

Para el análisis de Western blot, 100 μg de la proteína de cada muestra fueron sujetas a electroforesis SDS-PAGE, junto al marcador de peso molecular (Estándar de SeeBlue Plus2 PreStained, Invitrogen). Posteriormente, se transfirieron en la membrana PVDF (Amersham Biosciences, Alturas de

Arlington, Illinois, los EE. UU), antes activada con metanol, como fue previamente descrito (Pozzi et al., 2006).

El bloqueo inespecífico de la membrana se realizó durante una hora en la temperatura ambiente con la leche descremada en polvo al 5% (las proteínas de leche ligan a cualquier sitio pegajoso restante en la membrana). Después del bloqueo inespecífico, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario específico, seguido de la incubación durante una hora en la temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado y finalmente se incubaron durante una hora en la temperatura ambiente con Streptavidin- peroxidasa-conjugada (1/5000 TTBS). Los anticuerpos primarios utilizados fueron Oct4, Sox2, BDNF y GAPDH (Chemicon, mouse, monoclonal), en concentración diez veces más diluida que la de inmunohistoquímica. Las membranas se lavaron entre cada paso de la incubación con buffer salino de Tris- Tween (TBST).

Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas usando la reacción colorimétrica con DAB (DAKO), o revelado por quimioluminiscencia para visualizar la actividad peroxidasa (Chemicon) y las imágenes se capturaron con un Analizador de Imagen Luminiscente LAS-1000 Plus (Fuji Photo Film).

- *Aislamiento del ARN total*

Animales de diferentes grupos (control, tratados con $ZnSO_4$ e inyectados con NCTD) se colocaron en hielo y se aislaron ambos EO de cada renacuajo, y se homogeneizaron con el reactivo de TRIzol® (Invitrogen).

El ARN total se separó del ADN, los lípidos y las proteínas por lavado con cloroformo e incubaron 5 minutos a 30°C y centrifugación a 12000 g, 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo con isopropanol, luego se incubó 10 minutos a 30°C y centrifugó a 12000 g, 10 minutos a 4°C, a fin de precipitar el ARN. El precipitado se lavó con el etanol 75% preparado con agua tratada con DEPC (libre de RNasas) y centrifugado a 7500g, 5 minutos a 4°C, y secada sobre papel absorbente.

Finalmente, el precipitado se disolvió de nuevo con agua DEPC e incubó a 55°C, 10 minutos, y se almacenó el ARN Total a -80°C hasta su uso.

- *Transcripción reversa de ARN total*

La concentración y la pureza del ARN se determinaron midiendo absorbancia a 260 nm (A260) y 280 nm (A280) con la utilización de NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Delaware, los EE. UU). Una proporción de A260/A280 ≈ 2.0 generalmente se acepta como el ARN

puro.La calidad de ARN fue probada por electroforesis en 1% gel de agarosa para confirmar la presencia integra de las subunidades ribosomales 18S y 28S, lo cual implicaría que el ARN no fue degradado.La transcripción reversa (RT) se llevó a cabo con 1 µg del ARN total aislado del EO de cada renacuajo, según el protocolo puesto a punto en el laboratorio utilizando 0.3µl Oligo (dT), 4.5µl de Buffer, 2µl dNTPs (10 mm cada uno), 0.2 µl AMV transcriptasa reversa (10U/µl; del avian myeloblastosis virus), y llevado a volumen final con agua libre de RNasas de 20 µl. La mezcla de reacción fue incubada durante 10 minutos a 70°C, 50 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C, obteniendo el ADN complementario (cDNA) de cada muestra.

- *RT-PCR*

RT-PCR se realizó usando el ARN total extraído del par de EO de 8 renacuajos y cDNA se generó usando Oligo (dT) y AMV transcriptasa reversa (como fue descrito antes).

Posteriormente, el cDNA de Sox2 y GAPDH fueron amplificados por PCR con la utilización de Taq polimerasa (Invitrogen) y primers específicos (Invitrogen). Se realizó el diseño de primers de Sox2 específicos para *Xenopus laevis* en función de la secuencia de los RNA mensajeros publicados en http://www.xenbase.org/geneExpression/geneExpressionSearch

Sox2 Forward: 5'-CTT ACA TGA ACG GCT CGC C-3' y Reverse: 5'-CCC CAG GTA GGT ACA TGC-3'. Temperatura óptima de apareamiento: 54°C.

BDNF Forward: 5'-AAG CTG CCC CCA TGA AAG AA-3' y Reverse: 5'-TAT TGC TTC AGT TGG CCT TTG-3'. Temperatura óptima de apareamiento: 60°C.

NGF Forward: 5'-TGT TTA GCA CCC AGC CTC-3' y Reverse: 5'-CCA ACC CAC ATA CTG ACA CTG T-3'. Temperatura óptima de apareamiento: 56°C.

GAPDH (Park et al. 2006): Forward: 5'-GCTCCTCTCGCAAAGGTCAT-3' y Reverse: 5´-GGGCCATCCACTGTCTTCTG-3'

Condiciones generales de PCR: 40 ciclos de 94 °C por 30 s para desnaturalizar, Temperatura específica por 30 s para el apareamiento de primers y 72 extensión °C por 30 s para la extensión por la Taq polimerasa.

El producto de RT-PCR fue sujeto a electroforesis en gel 2% agarosa a fin de evaluar la precisión y la calidad de la amplificación.

De esta forma se corroboró la presencia de expresión de estos genes en el EO de *X. laevis*.

- *RT-PCR a tiempo real (RT-qPCR)*

La amplificación por RT-qPCR se realizó con muestras del sistema olfatorio extraídas de animales control y recuperados 24hs luego de ser tratados con $ZnSO_4$ (detallado antes), usando el equipo Opticon 2 del Motor del ADN Cycler de Tiempo real. RT-qPCR mastermix fue preparado añadiendo 5 l FastStart Green Mastermix SYBR Universal ROX (ROCHE, Alemania), 1,25 µl de cada uno de los primers específicos, y 2,5 µl cDNA (previamente diluido 1/2). El volumen total para cada reacción de PCR de tiempo real fue de 10 µl. El programa PCR se estableció con un paso de activación de calor inicial a 95°C durante 5 minutos. Luego, se realizaron 40 ciclos de termociclación con un paso de desnaturalización a 95°C por 15 s, un paso de apareamiento de primers a 54°C por 20 s y un paso de extensión de la reacción a 72°C por 30 s. La fluorescencia se midió al final de cada paso de extensión. Después de la amplificación, una curva de "melting" se adquirió calentando el producto en 65°C/s a 95°C, y la fluorescencia se midió cada 1°C. Las curvas de "melting" fueron usadas para determinar la especificidad de los productos de PCR que luego fueron corridos por electroforesis en geles de 2% de agarosa.

Cada primer se probó previamente para comprobar que no hubiera dimerización ni inespecificidad. Por lo que tuvo que optarse por cambiar los primers de Sox2 utilizados previamente en la PCR semicuantitativa ya que presentaban dimerización. Se recurrió a trabajos publicados y se seleccionaron los siguientes primers:

Primers Sox2 (Perry et al., 2013):

Forward 5'-CCC CGG GCA TGT CTC TGG GA-3' y Reverse 5'-GTT GCG ACA TGT GCA GTC TGC TTT GC-3'.

Los primers para BDNF fueron (Kramer et al 2002.):

Forward 5'-CGT GGA GAG CTG AGT GTG TGT GAC-3' y Reverse 5'-GTT GGC CTT TGG ATA CTG GGA CTT-3';

y los primers para GAPDH fueron (Park et al. 2006):

Forward 5'-GCT CCT CTC GCA AAG GTC AT-3' y Reverse: 5'-GGG CCA TCC ACT GTC TTC TG-3'.

El perfil térmico consistió en 40 ciclos de desnaturalización durante 15 s a 95 ° C, durante 30 s recocido a 60 ° C y la extensión durante 30 s a 72 ° C. Se realizó análisis de la curva de fusión para cada muestra. Los niveles de expresión de mRNA de BDNF y de Sox2 se normalizaron a los de GAPDH propios de cada muestra, como un gen de control interno. Los datos fueron procesados usando el MJ Opticon monitor ™ Software y analizados según el método de curva standard.

- *Análisis estadísticos*

Para determinar diferencias significativas entre grupos, se realizaron análisis cuantitativos como el número de células OMP-positivas (OMP+), basales Sox2- positivas (Sox2+), células basales BDNF inmunoreactivas (BDNF+) y las células BrdU-marcadas (BrdU+), como también el análisis de la respuesta comportamental y los datos para la proporción de Ct obtenido por RT-qPCR. Los valores están expresados como la media ± error estándar de la muestra, el número de réplicas por grupo se detalla en los epígrafes de las Figuras. Las cuantificaciones fueron analizadas estadísticamente por el test de t de Student o el análisis de varianza de un factor (ANOVA), seguidos por comparación entre grupos por test de Tukey, considerando diferencias significativas con $p < 0,05$, y corroborando que se cumplieran los supuestos de cada análisis. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando los softwares Infostat y Graph Prism.

Resultados

Capítulo I

Estructura y organización del sistema olfatorio en larvas de *Xenopus laevis*

Se analizó la estructura y los cambios del sistema olfatorio durante el desarrollo y metamorfosis a fin de determinar el estadio (St.;(Hubrecht et al., 1975) más conveniente para nuestro posterior estudio sobre la diferenciación neuronal.

Como ya ha sido descripto, durante la metamorfosis, las larvas de *X. laevis* van adquiriendo nuevas estructuras y perdiendo otras como una forma de adaptación a la vida adulta (Hansen et al., 1998). El sistema olfatorio del renacuajo durante el desarrollo (ej. St. 50; Fig. 1.1) está compuesto por la cavidad principal (PC, de sus siglas en inglés) donde se encuentra el EO con sus respectivas NRO, cuyas dendritas están en contacto con el agua, y sus axones salen de esta estructura epitelial agrupándose en nervios y conectándose dorsal y posteriormente con el BO (Hansen et al., 1998; Higgs and Burd, 1999). El EO de la PC es el encargado de la olfación acuática durante las etapas larvales de *X. laevis*. En la región antero-medial al EO se abre otra estructura sensorial, el órgano vomeronasal (VNO, de sus siglas en inglés), cuyas neuronas proyectan al BO accesorio, pero del cual se conoce muy poco

sobre los estímulos que percibe y la función en este animal (Jungblut et al., 2012).

En la pre-metamorfosis (St.53-54; Fig. 1.1), el EO de la PC tiene un mayor tamaño y longitud. Adyacente a éste, comienza a desarrollarse en la zona antero-medial una nueva estructura, la cámara media (MC, por sus siglas en inglés), que adquirirá la función de olfativa acuática en el adulto.

Durante la metamorfosis (St. 56-66; Fig. 1.1), entre los muchos cambios que se verifican, a nivel morfológico se destaca la contracción de la cabeza que es acompañada con el acortamiento de la cola. A nivel de la cavidad nasal, terminan de formarse las dos cámaras, la MC que se encargará de la olfación acuática y la PC que pasará a dedicarse a la olfación aérea desde la forma juvenil de la rana. En el climax de la metamorfosis (ej. St. 60; climax St. 58-66 según Weiss, 1986), ya se encuentra desarrollada la MC, la PC tiene un gran tamaño y el EO adquiere una nueva organización con unas pocas capas de células a diferencia del EO durante los estadios de pre-metamorfosis.

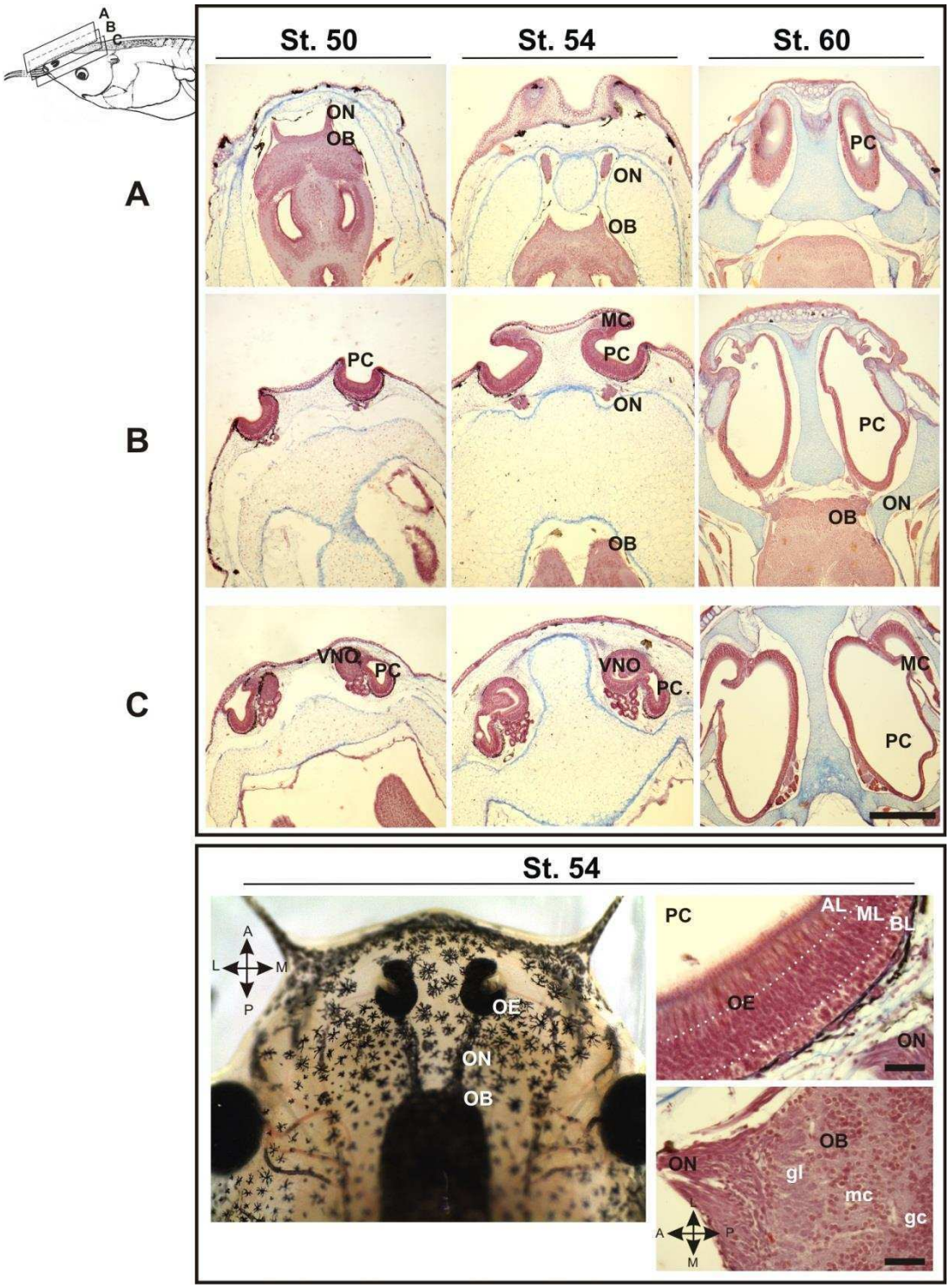

Figura 1.1. Estructura y organización del sistema olfatorio en larvas de *Xenopus laevis* durante el desarrollo. Panel superior: secciones longitudinales de larvas de estadios (St.) 50, St. 54, y en metamorfosis St. 60. Coloración: Tricrómico de Masson. Secciones de dorsal a ventral (A-C). Barra A-C: 100 µm. El sistema olfatorio está compuesto por la cavidad principal (PC), cámara media (MC), el órgano vomeronasal

(VNO), el nervio olfatorio (ON) y el bulbo olfatorio (OB).Panel inferior: A la izquierda, fotografía de vista dorsal de larva en pre-metamorfosis St. 54. El epitelio olfatorio (OE) se encuentra en la PC en la región anterior (A), conectado por el ON al OB en la región posterior (P). A la derecha, detalles de secciones de OE y OB en larvas St. 54. El OE organizado en tres capas celulares: capa basal (BL), capa media (ML) y capa apical (AL). El OB está organizado por tres capas, la capa glomerular (gl), la capa de células mitrales (mc) y la capa de células granulares (gc). Barras en detalle de PC y OB: 50 μm.

Por la organización y tamaño de las capas del EO de la PC, y además, evaluando la sensibilidad al tratamiento con $ZnSO_4$ de los animales, se prosiguió el estudio de neurogénesis y regeneración del EO utilizando renacuajos de *X. laevis* en estadio de pre-metamorfosis (St.53-54).

Auto-renovación y capacidad regenerativa del EO

Para analizar la capacidad regenerativa del EO, se indujo la degeneración parcial de este tejido a través del tratamiento $ZnSO_4$ (Yovanovich et al., 2009). Los animales tratados con $ZnSO_4$ durante 24hs mostraron una extensa destrucción del EO, con la capa de células basales como el componente principal restante. Después de un período de recuperación de 24hs, la regeneración del tejido presentó un aumento en la proliferación de las células basales entre las cuales se encuentran las NSC y los progenitores neurales (Fig. 1.2). Estos resultados demuestran que bajo condiciones fisiológicas normales hay una constante reposición de las células propias del neuroepitelio

a partir de células progenitoras próximas a la membrana basal; y ante la inducción de una regeneración masiva luego de la destrucción severa del EO, ocurre un aumento significativo en la proliferación de los progenitores neurales (Fig. 1.2 C).

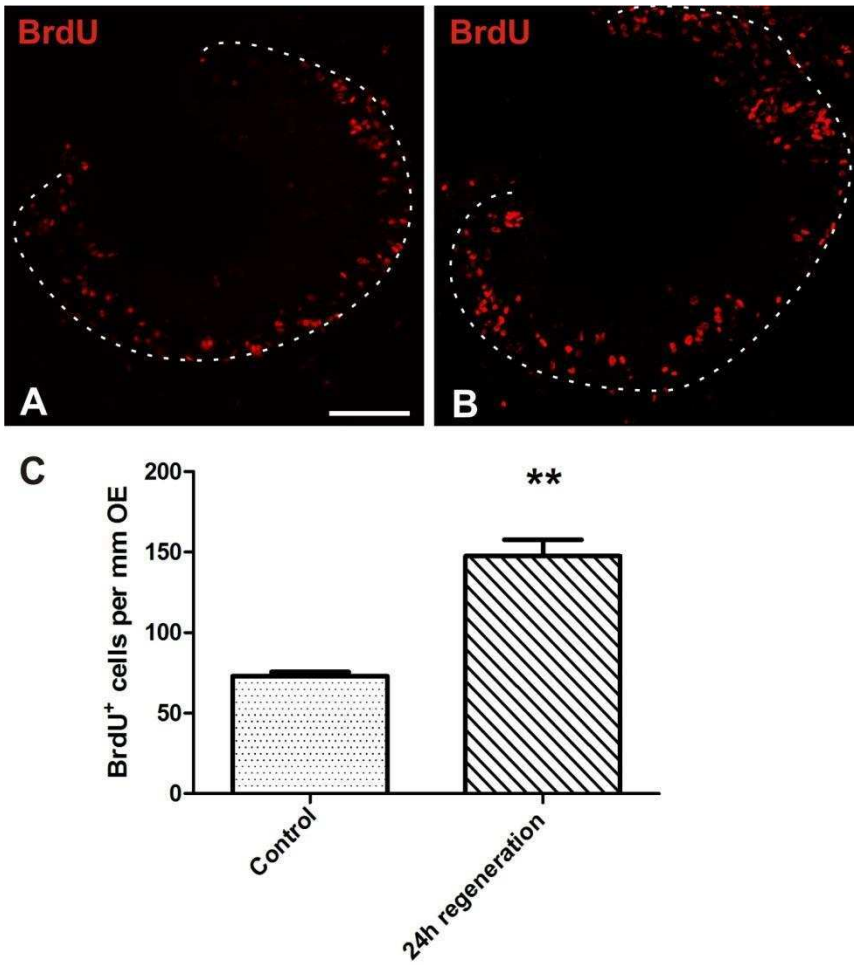

Figura 1.2. Aumento de células en proliferación en la capa basal del EO de larvas de *X. laevis* durante la regeneración. Población de células en proliferación (BrdU+) en la capa basal del EO en condiciones fisiológicas normales (**A**) y durante 24hs de regeneración (**B**). **C**, Aumento de células en proliferación en el área basal del EO durante la regeneración. Análisis estadístico de t de Student, n= 5 para cada grupo, **P<0,01. Barra: 100 µm.

Si bien se observó una gran variabilidad en el potencial regenerativo entre los animales tratados, debiéndose también a la variabilidad del nivel de destrucción generado, se puede observar que a 24hs posteriores a la destrucción parcial del EO, comienza a recuperarse la inmunorreactividad a E7 (marcador de β-tubulina neuronal, identificando tanto neuronas maduras como inmaduras (Heer et al., 2008); Fig. 1.3). Además, se identificaron neuronas maduras con OMP (Fig. 1.4), como también de células SUS por Citoqueratina II (CytKII) (Fig. 1.5). A las 72hs posteriores a la destrucción química, se observa una mayor proporción de tejido recuperado, con sus respectivos marcadores celulares específicos.

El tratamiento con $ZnSO_4$ provoca una destrucción del EO no específica, afectando tanto a células SUS como a las NRO maduras e inmaduras. La inmunomarcación de β-tubulina específica de neuronas (E7) muestra la distribución de las neuronas en la capa medio apical del EO, con proyecciones axónicas que se agrupan en la base formando nervios que convergen para conectar con el BO (Fig. 1.3 A). Por otro lado, las NRO proyectan las dendritas hacia la luz de la PC para ponerse en contacto con el medio externo y captar moléculas odorantes. Luego del tratamiento con $ZnSO_4$, se observa la pérdida de la organización natural del EO, pocas capas de células restantes y restos celulares en la luz de la PC próximos al tejido (Fig. 1.3 B). A las 12hs de regeneración, se observa una reorganización del EO, sin bien permanece sin reponer capas celulares (Fig. 1.3 C). Ya a las 24hs de regeneración, el EO va reponiendo NRO con somas ubicados en la región apical (Fig. 1.3 D). Luego de 72hs, se observa una mayor renovación de NRO con proyecciones dendríticas

más largas y un aumento en las capas celulares asemejándose más al control (Fig. 1.3 E). Tras un periodo de 7 días (168hs) de recuperación al tratamiento químico, el EO presenta una distribución homogénea de las NRO a lo largo de todo el epitelio, y las capas celulares han sido repuestas luego de la destrucción (Fig. 1.3 F).

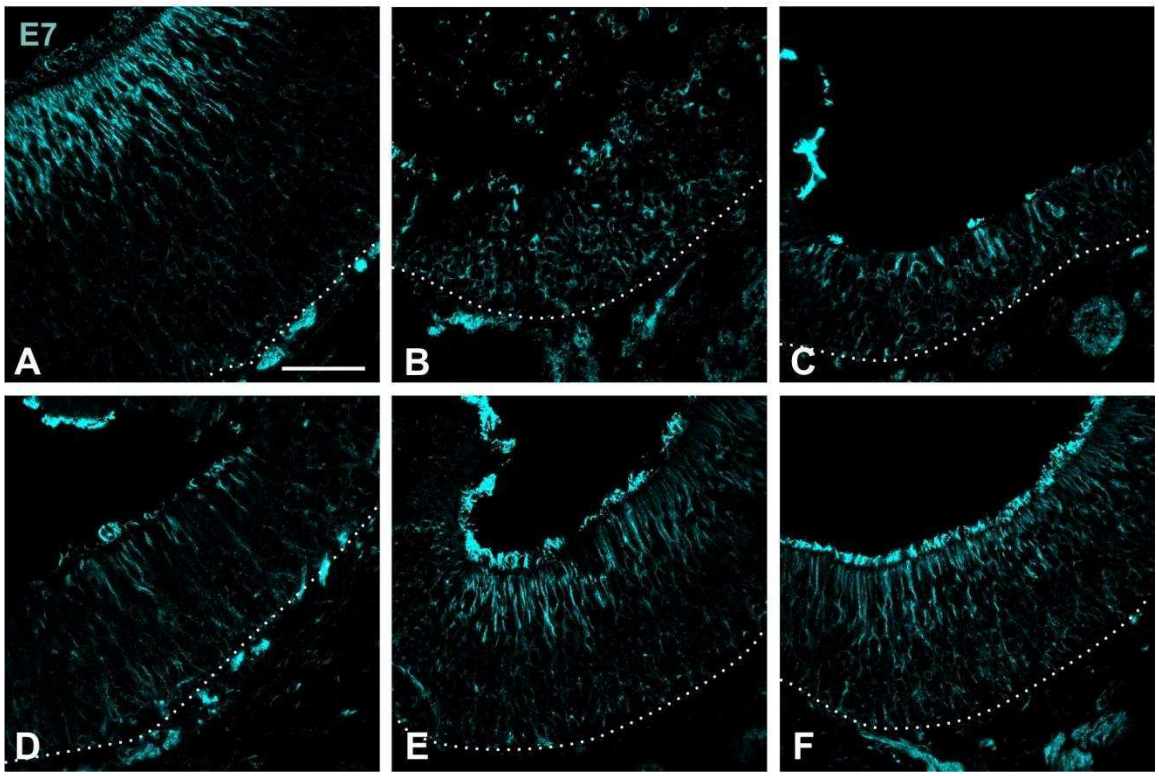

Figura 1.3. Organización de neuronas receptoras olfatorias (NRO) y dinámica de regeneración del EO tras el daño severo por tratamiento con Sulfato de zinc. Imágenes confocales de la inmunodetección de β-tubulina neuronal (E7) como marcador de NRO en el EO. **A**, EO en condiciones fisiológicas normales; **B**, luego del tratamiento con Sulfato de zinc sin recuperación (0hs); **C**, 12hs de regeneración post destrucción; **D**, 24hs de regeneración; **E**, 72hs de regeneración; **F**, 168hs de regeneración. Barra: 50 μm.

Las NRO maduras se ubican en la capa media y se distinguen por la expresión de OMP. El tratamiento con $ZnSO_4$ provoca la destrucción de NRO maduras como se puede apreciar por la disminución en la inmunomarca de OMP (Fig. 1.4 A-B). Inmediatamente posterior a la exposición con $ZnSO_4$ (regeneración t=0), sólo se observan unas pocas células OMP+, las cuales pueden haber resultado resistentes al tratamiento o bien haberse diferenciado durante las 24hs de duración del tratamiento donde el EO está siendo degenerado pero a su vez se está induciendo la regeneración. A las 12hs posteriores a la destrucción masiva del EO, aproximadamente un tercio de células OMP+ con respecto al control fueron detectadas (Fig.1.4 C).

Durante las primeras 24hs de regeneración se observa que comienza a recuperarse el número de NRO maduras, aunque el EO aún permanece sin la organización natural, donde se observan sectores con más capas de células y más expresión de marcadores celulares que en otros (Fig. 1.4 D). Luego de 72hs de regeneración, se recupera la organización de las distintas capas celulares (Fig. 1.4 E).

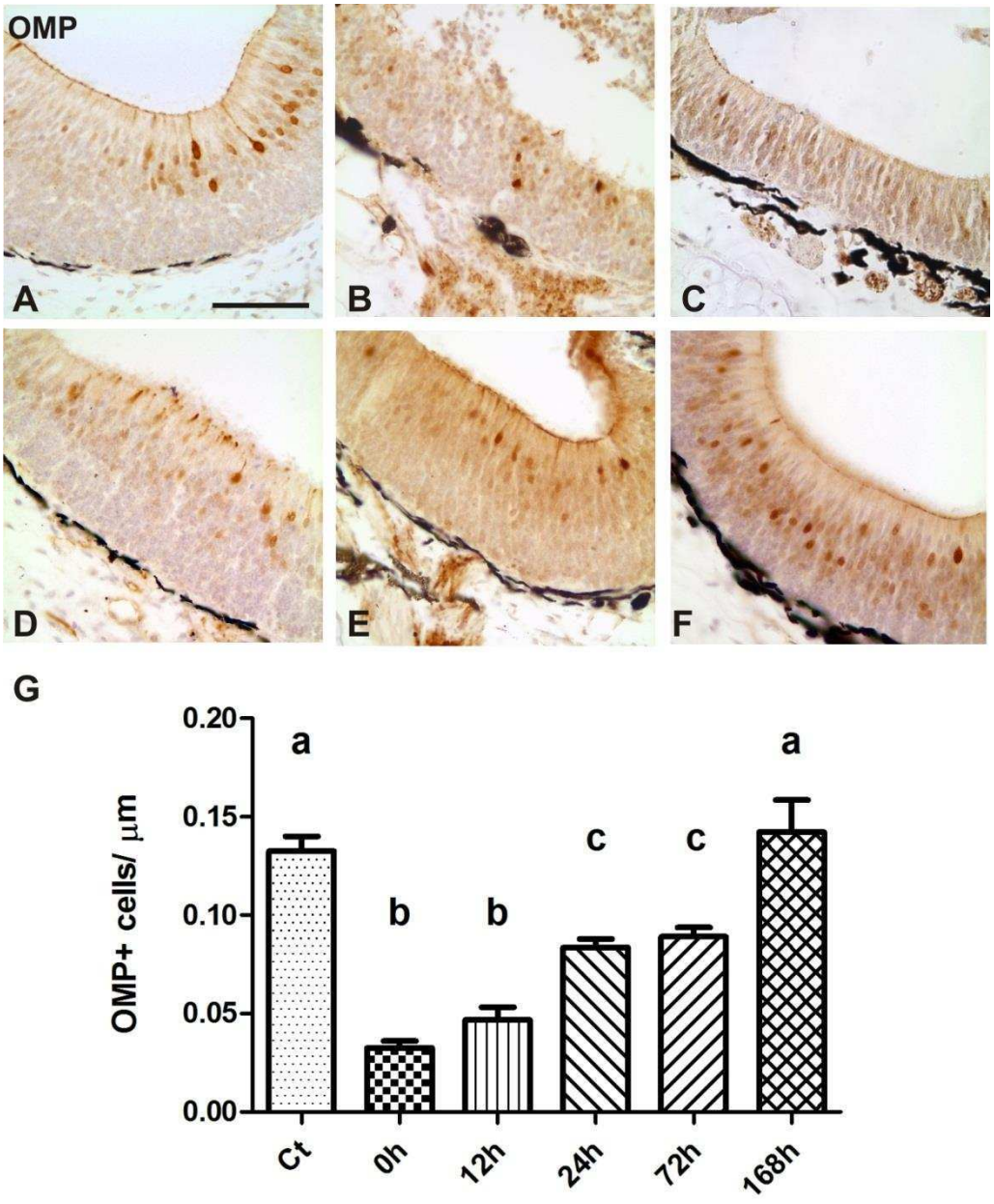

Figura 1.4. Localización y dinámica de regeneración de NRO maduras en el EO de *X. laevis*. Inmunomarcación de NRO maduras con el marcador específico OMP. **A**, EO en condiciones fisiológicas normales; **B**, destrucción del EO con el tratamiento con Sulfato de zinc (0hs); **C**, 12hs de regeneración post tratamiento; **D**, 24hs de regeneración; **E**, 72hs de regeneración; **F**, 168hs de regeneración. Barra: 50 µm. **G**, NRO OMP+ por µm de EO en animales control (Ct) y distintos periodos de regeneración. Diferencias significativas entre grupos está representado por letras distintas (a-c), n= 6 para cada grupo, ANOVA y test de Tukey, $p<0,05$.

Finalmente, a los 7 días (168hs) se observa un aumento significativo del número de células OMP+ correspondientes a NRO maduras en la capa media del EO, similar al EO de animales control (Fig. 1.4 F). Esto sugiere que con un periodo de 7 días posterior a la destrucción química del EO, se completa la regeneración y el tejido vuelve a la estructura y organización natural.

En el EO, las células SUS son células de sostén que se encuentran ancladas en la base del EO y cuyos somas se ubican en la capa más apical del EO (Fig. 1.5), y entre los cuales se ubican las proyecciones dendríticas de las NRO.

Luego de la destrucción química, se observa que el EO pierde las capas medias y apicales, en donde se ubicaban principalmente las NRO maduras y células SUS, quedando restos celulares desprendidos hacia la luz de la PC (Fig. 1.5 B). Durante la regeneración, las células SUS comienzan a diferenciarse y ubicarse en la región más apical del epitelio a medida que éste recupera las capas celulares. Pasadas 24hs de recuperación, se observan algunas células SUS con el soma celular en posición apical (Fig. 1.5 D). No obstante, la mayor parte del EO permanece sin reponer las células SUS en este periodo de regeneración. A los 3 días (72hs) post destrucción del EO, se observa una recuperación casi completa de los tipos celulares (Fig. 1.5 E). Las células SUS están distribuidas a lo largo del EO y en posición mayoritariamente apical. Sin embargo, es a los 7 días (168hs; Fig. 1.5 F) donde se observa una distribución celular y morfología similar a las de los animales control.

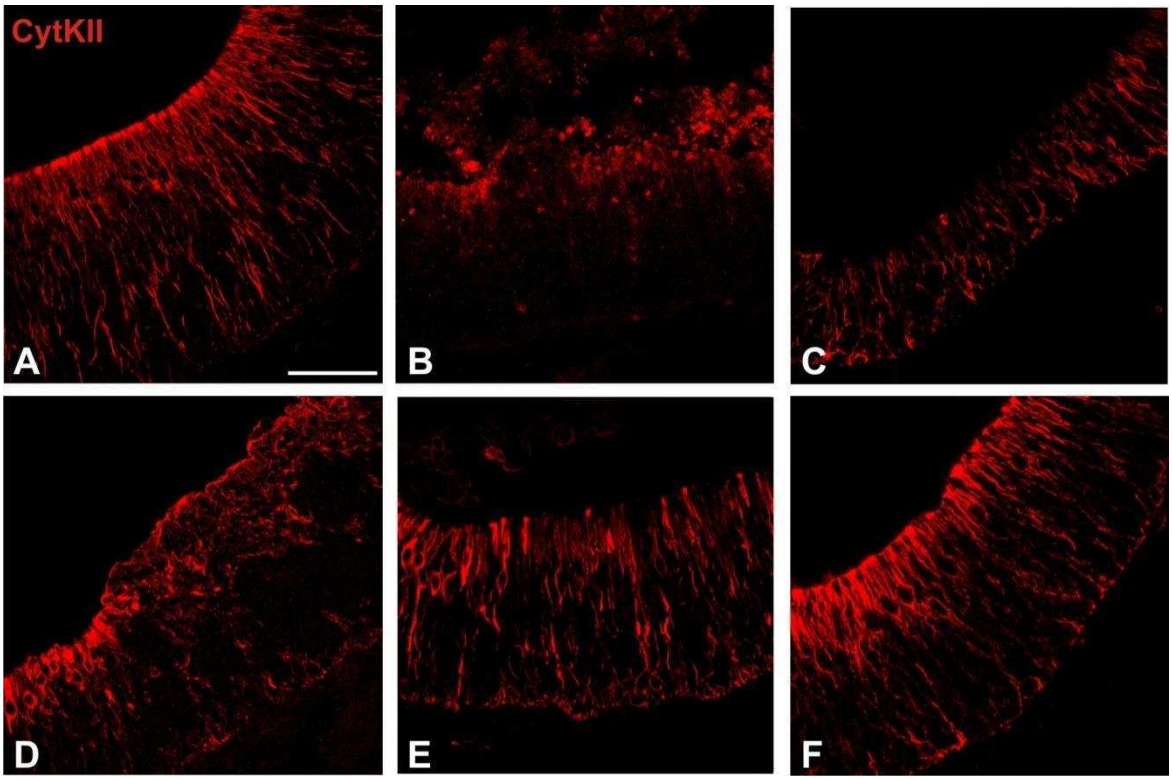

Figura 1.5. Organización y regeneración de células sustentaculares (SUS) en el EO de larvas de *X. laevis* luego de la lesión por Sulfato de zinc. Imágenes de microscopía confocal, inmunodetección de células SUS por el marcador específico Citoqueratina II (CytKII). **A**, células SUS en el EO bajo condiciones fisiológicas normales; **B**, EO luego de la lesión sin periodo de recuperación (0hs); **C**, 12hs de regeneración; **D**, 24hs de regeneración, **E**, 72hs de regeneración; **F**, 168hs de regeneración. Barra: 50 μm.

En conjunto, estos resultados indican que la neurogénesis se produce en el EO debido a la proliferación y diferenciación de células basales. A las 24hs posteriores al tratamiento, el EO se encuentra en plena etapa de proliferación, seguido por la diferenciación celular, las células SUS se van ubicando en la

zona más apical y las NRO en la capa media donde terminan de diferenciarse y madurar luego de 7 días posteriores a la destrucción parcial.

Recuperación de la funcionalidad olfativa

Para analizar la correlación de lo observado histológicamente con la funcionalidad del EO, se realizó una medición de la capacidad olfativa a través de un test comportamental. Tras evaluar distintas alternativas y arenas experimentales, observamos que la frecuencia de bombeo bucal cuando perciben el estímulo químico alimenticio podría ser un buen indicador de la capacidad olfativa en larvas de *X. laevis*.

Se analizaron animales bajo condiciones fisiológicas normales (control) y a distintos tiempos de regeneración post-tratamiento con $ZnSO_4$ (0hs, 24hs, 120hs y 168hs). Como se observa en la Figura 1.6, los animales control aumentan a más del doble la frecuencia de bombeo bucal cuando se les presenta el estímulo químico alimenticio (espirulina), indicando que perciben el estímulo.

Las larvas tratadas con $ZnSO_4$ y sin periodo de recuperación (0hs) no presentaron cambio en la frecuencia de bombeo ante la presencia del estímulo alimenticio, como tampoco a las 24hs de regeneración.

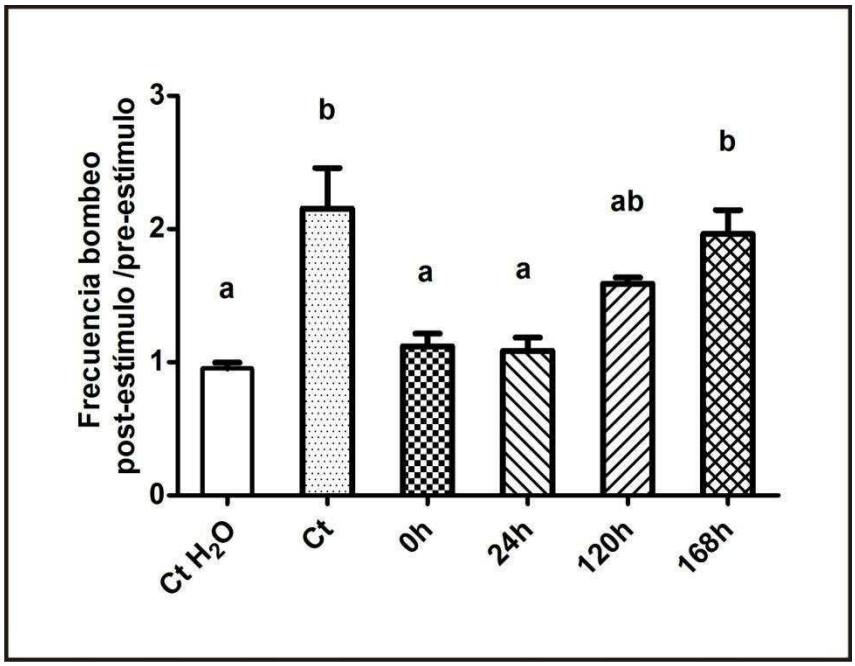

Figura 1.6. Experimentos de percepción del estímulo químico a través del olfato. Se analizó la respuesta ante la presencia de un estímulo alimenticio (espirulina) en el agua a través del cambio en la frecuencia de bombeo bucal (cambio en frecuencia post-estímulo/ pre-estímulo) (ver en Materiales y métodos). En animales control (Ct) y a distintos periodos de regeneración post destrucción parcial del EO (0hs, 24hs, 120hs y 168hs). Las diferentes letras en las barras indican diferencias significativas entre grupos, n= 6 para cada grupo, ANOVA y test de Tukey, $p< 0,05$.

A los 5 días (120hs) posteriores al tratamiento, las larvas mostraron un aumento en la respuesta, estadísticamente similar con respecto al control (Ct) pero no difiere tampoco de los que no presentaron cambio en la frecuencia de bombeo. Finalmente, a los 7 días (168hs) de regeneración, las larvas presentaron un aumento en la frecuencia de bombeo similar al grupo control, sugiriendo una recuperación de la funcionalidad olfativa luego del periodo de regeneración.

Capítulo II

Rol de la vía de señalización Wnt y la expresión de Sox2 durante la diferenciación neural en el EO

Expresión de Sox2 en las células basales del EO

En el sistema nervioso central, la expresión de Sox2 persiste en células madre neurales multipotentes desde el embrión al adulto. Además, ha sido descripto que este factor de transcripción se expresa intensamente en las células SUS y en ambos tipos de células basales HBC y GBC en el EO murino normal y durante su regeneración (Guo et al., 2010). Por lo tanto, para determinar el posible papel de Sox2 en la regeneración neural del EO de *X. laevis*, analizamos tanto su expresión temporal como también la identidad celular de las células que lo expresan.

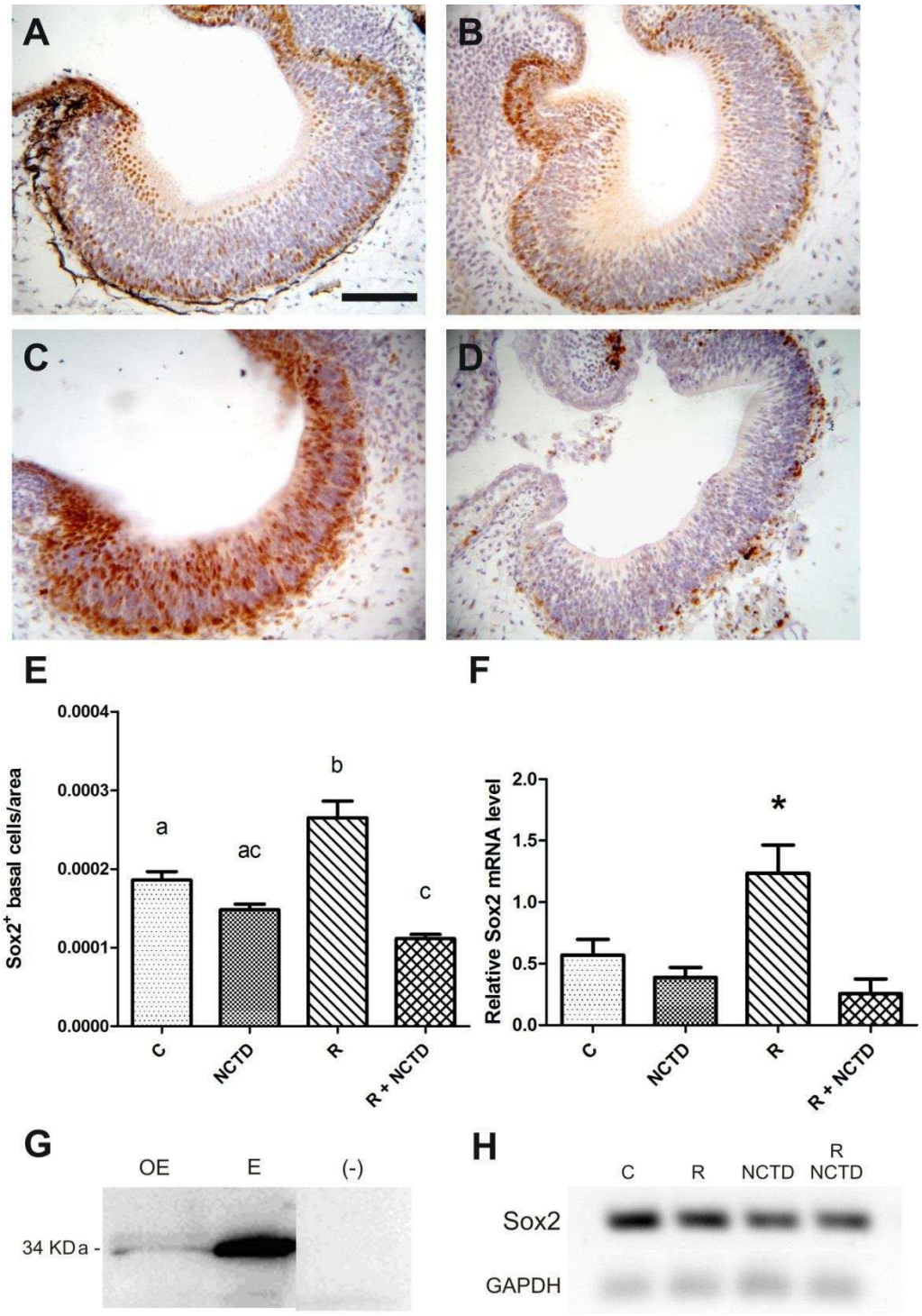

Figura 2.1. El factor de transcripción Sox2 es expresado en células basales y células SUS del EO de larvas de *X. laevis*. Sox2 aumenta durante la regeneración del EO y su expresión es regulada por la vía Wnt/ β-catenina. Inmunohistoquímica revela la presencia de Sox2 en células basales del EO de animales control (**A**), bajo condiciones fisiológicas normales (c); **B**, 24hs post inhibición de la vía Wnt/β-catenina por el inhibidor Norcantaridina (NCTD); **C**, 24hs de regeneración post destrucción

parcial del EO por tratamiento con Sulfato de zinc (R); **D**, durante regeneración (24hs) con inhibición de la vía Wnt/β-catenina (R+NCTD). Barra: 100 μm. **E**, cuantificación de células basales Sox2+ relativizado al área basal del EO, letras distintas representan diferencias significativas entre grupos (n=8). ANOVA, test de Tukey ($p<0,05$). **F**, niveles de expresión del ARNm de Sox2 normalizado al gen de referencia GAPDH, medido por RT-qPCR. n=5 para cada grupo, ANOVA, test de Tukey, *$p<0,05$. **G**, la especificidad del anticuerpo primario anti-Sox2 fue testeada por Western blot, en homogenato de EO, ojo (E) como control positivo, y en ausencia del anticuerpo primario como control negativo (-). El peso molecular corresponde con el descripto para Sox2, 34 KDa. **H**, la electroforesis del producto de RT-qPCR demuestra la especificidad de los primers.

La inmunohistoquímica del EO demostró la presencia de Sox2 en las células basales y en la capa apical correspondiente a células SUS (Fig. 2.1 A-D). La especificidad del anticuerpo contra Sox2 se confirmó mediante análisis de Western blot (Fig. 2.1 G), mostrando la banda de peso molecular de 34KDa correspondiente a Sox2, y la presencia de ARNm de Sox2 en el sistema olfatorio se demostró por RT-PCR (Fig. 2.1 H).

Se analizó la identidad de estas células Sox2+ por medio de doble inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra citoqueratina II como un marcador para las células SUS (Hassenklover et al., 2009), NCAM como marcadores para NRO inmaduras, E7 para ambos tipos (neuronas maduras e inmaduras), y OMP como un marcador para NRO maduras (Margolis, 1982; Verhaagen et al., 1990). Sin embargo, con ninguno de estos marcadores

celulares utilizados se observó co-localización con la expresión de Sox2 en la capa basal. No obstante, con el marcador de neuronas inmaduras GAP43, se encontró marca en núcleos de células basales, algunas de las cuales co-localizan con Sox2 (Fig. 2.2).

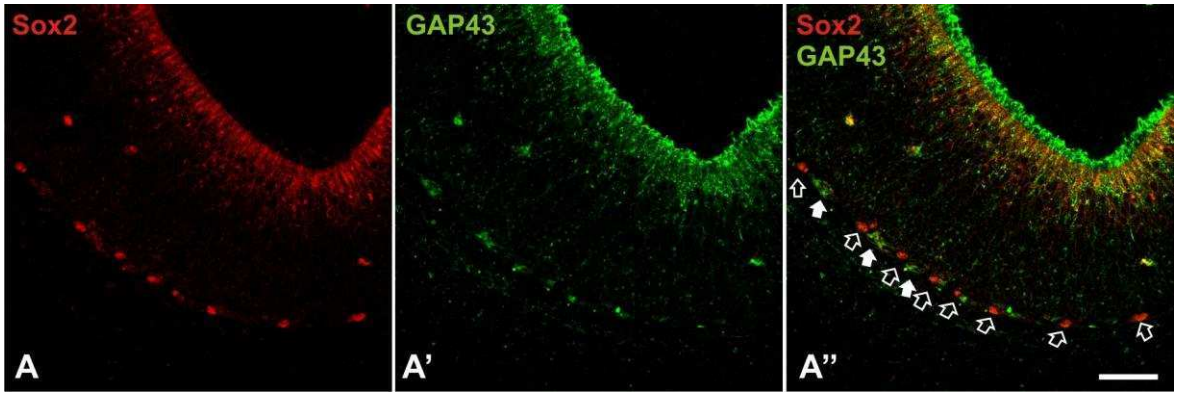

Figura 2.2. Sox2 en células basales del EO se expresa en progenitores neurales y persiste en los primeros estadios de diferenciación neuronal. Análisis de imágenes confocales. En condiciones fisiológicas normales, las células basales Sox2+ se encuentran sobre la membrana basal del EO (flechas vacías) y algunas comienzan a expresar el marcador de neuronas inmaduras GAP43 (flechas blancas). Barra: 50 μm.

Por otro lado, sólo algunas células Sox2+ presentaron inmunomarca para GAP43, sugiriendo que la expresión de Sox2 comienza en células que aún no expresan estos marcadores neuronales, pero la expresión de esta proteína perduraría en los precursores que se encuentran en camino de diferenciación neuronal, identificados con GAP43. Por lo que sugiere que las células basales

Sox2 positivas deben ser células progenitoras que se encuentran comprometiéndose en un linaje neuronal.

Aumento de la expresión de Sox2 durante la regeneración del epitelio olfatorio

Durante la neurogénesis, diversos autores han descripto que Sox2 antagoniza genes proneurales y puede mantener progenitores en otras áreas del sistema nervioso (Agathocleous et al., 2009; Bylund et al., 2003; Graham et al., 2003). Además, Sox2 se ha identificado en células basales multipotentes en el EO de ratones (Guo et al., 2010). Por lo tanto, evaluamos el papel de Sox2 en la proliferación y neurogénesis del EO normal y durante su regeneración luego del tratamiento $ZnSO_4$.

La inmunohistoquímica demostró un aumento en el número de células basales Sox2+ después de 24hs de recuperación posteriores a la destrucción severa del EO (Fig. 2.1 C). Además, por medio de RT-qPCR se demostró que dicho aumento de proteína Sox2 ocurre junto con un aumento en los niveles del mRNA de Sox2 (Fig. 2.1 H), por lo que su expresión génica estaría siendo regulada positivamente.

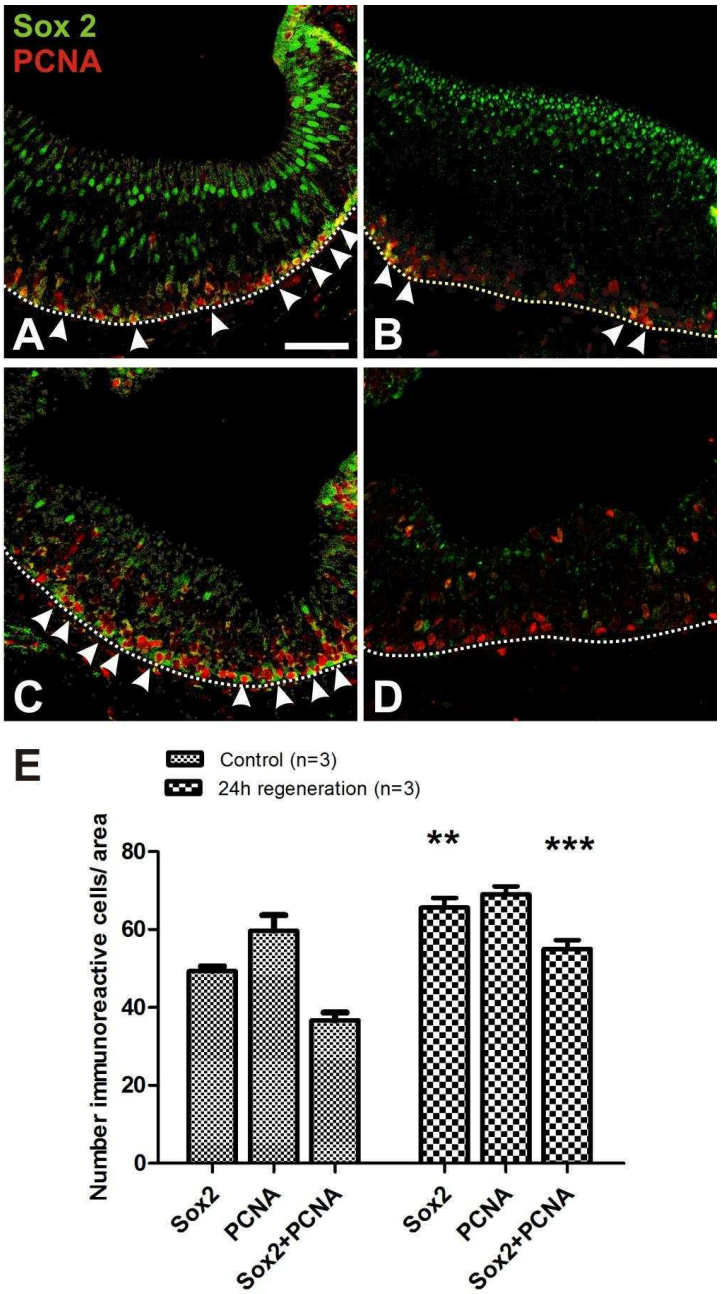

Figura 2.3. Células basales Sox2+ tienen capacidad proliferativa. A, en condiciones normales, las células Sox2+ co-localizan con el marcador de proliferación PCNA; **B**, ante la inhibición de Wnt/ β-catenina, permanecen células basales Sox2+ co-localizando con PCNA; **C**, durante la regeneración, el aumento de células basales Sox2+ corresponden mayormente a células en proliferación PCNA+; **D**, durante la regeneración y bajo inhibición de Wnt/ β-catenina disminuye Sox2+ basal. La línea punteada representa la lámina basal. Barra: 50 μm. **E**, cuantificación de células basales inmunoreactivas en animales control y a las 24hs de regeneración. Test de t de Student; **p<0,01; ***p<0,0001.

Por otro lado, la co-localización de Sox2 en células basales PCNA-positivas indica que estas células tienen potencialidad proliferativa, propia de NSC y progenitores neurales (Fig. 2.3). Estos resultados sugieren que la expresión de Sox2 juega un papel importante en la neurogénesis en condiciones normales y durante la inducción de una regeneración extensa. El aumento en los niveles de Sox2 podría contribuir en la reposición de las NRO funcionales y en el mantenimiento del "pool" de progenitores neurales no diferenciados en la capa basal del EO.

Regulación de Sox2 por la vía de señalización de Wnt

Las vías de señalización de Wnt están implicadas en la promoción de la proliferación celular y la inhibición de la diferenciación neuronal en múltiples tejidos (Michaelidis and Lie, 2008; Mulligan and Cheyette, 2012). Una vía direccional *Wnt/β-catenina - Sox2 – genes proneurales* ha sido descripta como la vía de regulación de transición desde la proliferación a la diferenciación, en la retina de Xenopus y en el sistema nervioso en desarrollo (Agathocleous et al., 2009; Lee et al., 2006; Van Raay et al., 2005). Además, se requiere la señalización de Wnt para la neurogénesis hipotalámica y olfativa (Lee et al., 2006; Wang et al., 2011b). Por lo tanto, se estudió el papel de Wnt en la regulación de la expresión de Sox2 en el EO.

La inhibición de la vía canónica de Wnt/β-catenina, por medio del tratamiento con NCTD, reveló una disminución significativa en el número de células basales Sox2+ durante la regeneración, incluso por debajo de la expresión en condiciones fisiológicas normales (Fig. 2.3 D). Sin embargo, no se ha observado que esta inhibición de Wnt/β-catenina cambie significativamente el número de células Sox2+ basales en animales control (sin inducción de regeneración, Fig. 2.3 B). Por lo tanto, la inhibición de la vía de Wnt/β-catenina por NCTD sólo disminuyó significativamente el número de células basales Sox2+ durante la regeneración.

En concordancia con estos resultados, y mediante el uso de RT-PCR cuantitativa en tiempo real, hemos demostrado un aumento los niveles de ARNm de Sox2 en el EO durante la regeneración en comparación con los animales del grupo control (Fig. 2.3). Además, los animales tratados con inhibidor de Wnt/β-catenina mostraron una disminución significativa en la expresión del ARNm de Sox2 en la regeneración de EO. Sin embargo, la inhibición de la vía Wnt/β-catenina tampoco resultó en una disminución significativa de Sox2 ARNm en EO sin inducción de regeneración (no tratados con $ZnSO_4$) (Fig. 2.3).

Por otro lado, el análisis inmunohistoquímico demuestra que luego de 24hs de regeneración bajo inhibición de la vía canónica de Wnt, no se restituyen las NRO maduras, evidenciado por la falta de inmunomarcación de OMP (Fig. 2.4).

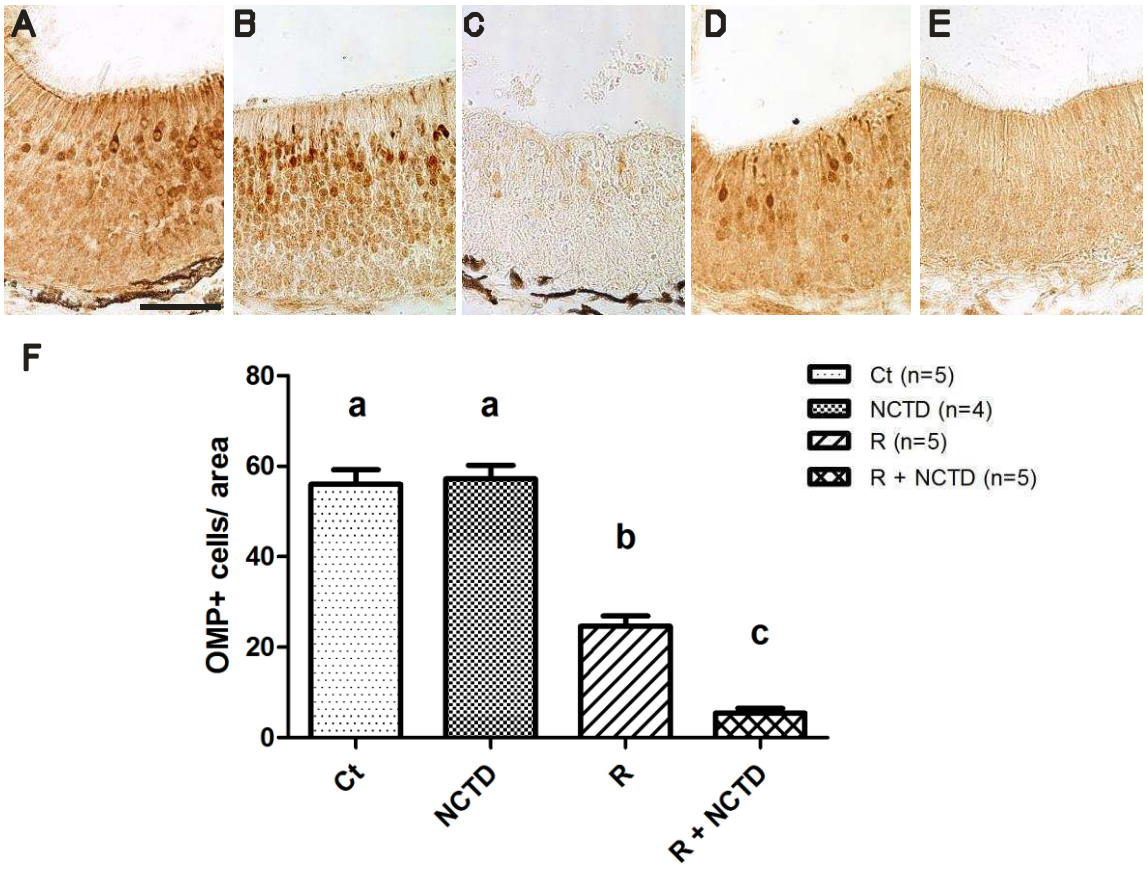

Figura 2.4. La regeneración de NRO maduras requiere de la via Wnt/ β-catenina. **A**, en condiciones fisiológicas normales las NRO se localizan en la capa media-apical del EO; **B**, las NRO maduras permanecen ante la inhibición de Wnt/ β-catenina en condiciones normales; **C**, luego de del tratamiento con Sulfato de zinc (0hs) se destruyen las NRO maduras del EO; **D**, durante la regeneración masiva (24hs) se generan nuevas NRO maduras; **E**, durante la regeneración, la inhibición de la vía canónica de Wnt con NCTD disminuye la formación de nuevas NRO maduras. Barra: 50 µm. **F**, Cuantificación de células OMP+ en el área comprendida en 300 µm de perímetro de EO. ANOVA, test de Tukey; letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la vía de señalización Wnt/β-catenina juega un papel importante en la regulación de la expresión de

Sox2 durante la regeneración masiva del EO; y que ambos estarían involucrados en el mantenimiento de progenitores neurales y el proceso de neurogénesis.

Vía de señalización canónica de Wnt presente en células basales del EO

Trabajos recientes han descrito que la señalización canónica de Wnt promueve la proliferación y la neurogénesis de células madre periféricas olfatorias en ratón durante el desarrollo y la regeneración postnatal de adultos (Wang et al., 2011b). Sin embargo, existen distintos miembros de la familia de los péptidos Wnt que pueden activar diferentes vías, como la vía canónica y las no canónicas, Wnt/JNK y Wnt/Ca^{++}. Por lo tanto, para determinar las vías de Wnt que pudieran estar involucradas en la expresión de Sox2 en las células basales del EO, se analizó la activación de la vía canónica de Wnt a través de los niveles y localización subcelular de β-catenina y la vía de la polaridad celular planar a través de la detección y localización de un efector clave, JNK fosforilado (pJNK).

Nuestros resultados muestran que bajo condiciones fisiológicas normales (animales control) β-catenina se encuentra distribuido principalmente en la capa basal EO, de todas formas también se encuentra a lo largo de todo el EO más homogéneamente que en los tratados. Sin embargo, se observa un notable aumento en las células basales durante la inducción de la regeneración del EO.

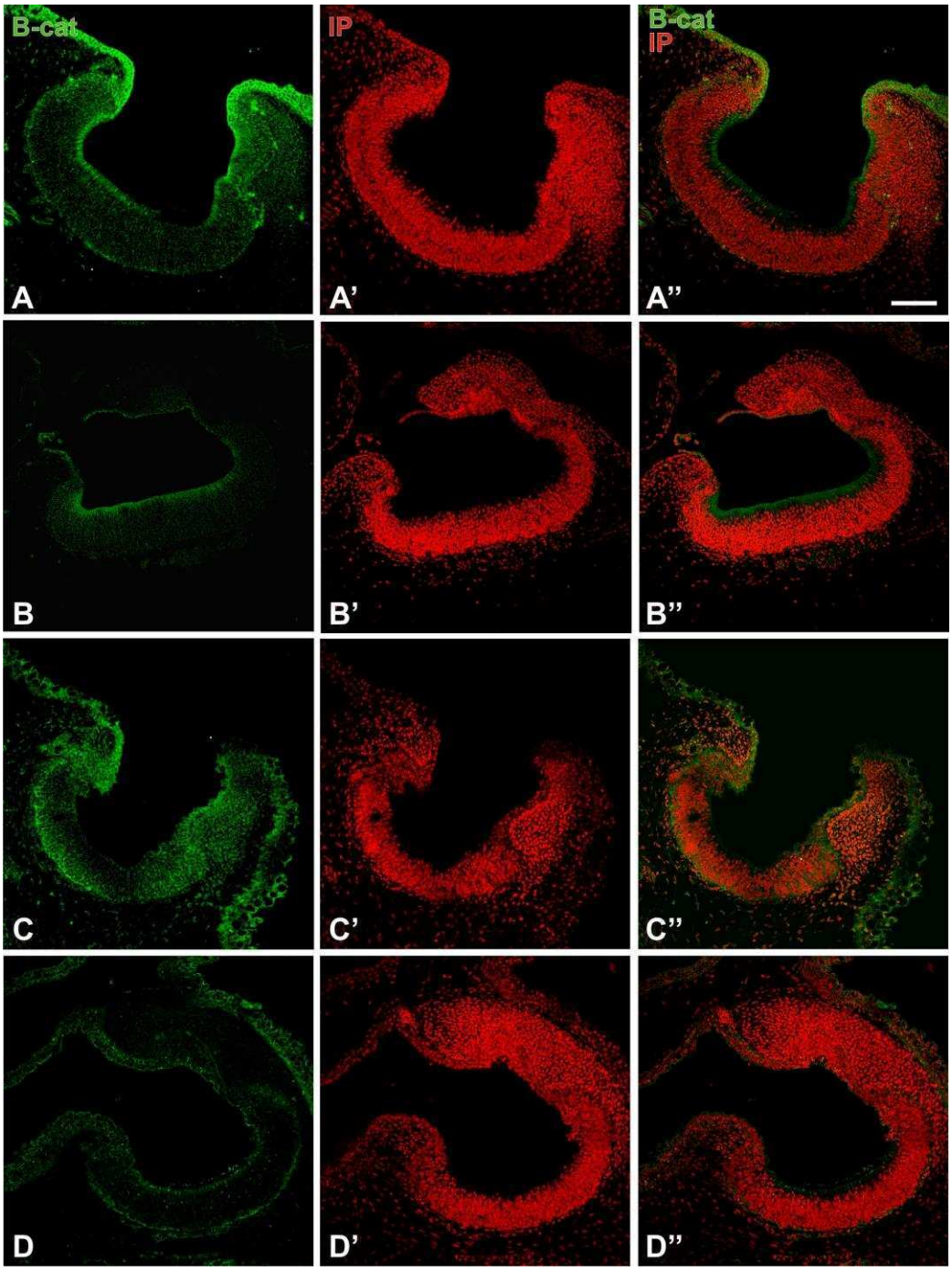

Figura 2.5. Activación de la vía de señalización Wnt/ β-catenina en células del EO de larvas de *X. laevis.* Análisis de imágenes confocales, inmunodetección de β-catenina y Yoduro de propidio (IP) como marcador nuclear. **A**, en condiciones fisiológicas normales; **B**, bajo la inhibición de la vía Wnt/ β-catenina con NCTD; **C**, durante la regeneración del EO tras un daño severo por tratamiento con Sulfato de zinc; **D**, durante la regeneración y la inhibición de la vía Wnt/ β-catenina. Barra: 100 μm.

El tratamiento con NCTD, inhibió el aumento generado durante la regeneración (Fig. 2.5). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la señalización canónica de Wnt, donde el componente principal de esta vía está dado por el aumento de los niveles de β-catenina en citoplasma y su posterior entrada al núcleo, estaría activada principalmente en las células basales durante la inducción de la regeneración. Por lo tanto, Wnt/β-catenina podría ser la vía de señalización implicada en la expresión de Sox2, al menos durante la regeneración.

Activación de la vía de señalización de Wnt/ β-catenina en células proliferativas

Algunas pocas células basales en proliferación (PCNA+) en el EO parecen presentar la activación de la vía canónica de Wnt evidenciado por una mayor inmunomarca para β-catenina e incluso detectándose en el compartimiento nuclear, en condiciones normales. Si bien no se pudo detectar un aumento de células con β-catenina nuclear durante la regeneración, se observa una mayor proporción de células basales con alta inmudetección de β-catenina citoplasmática (Fig. 2.6).

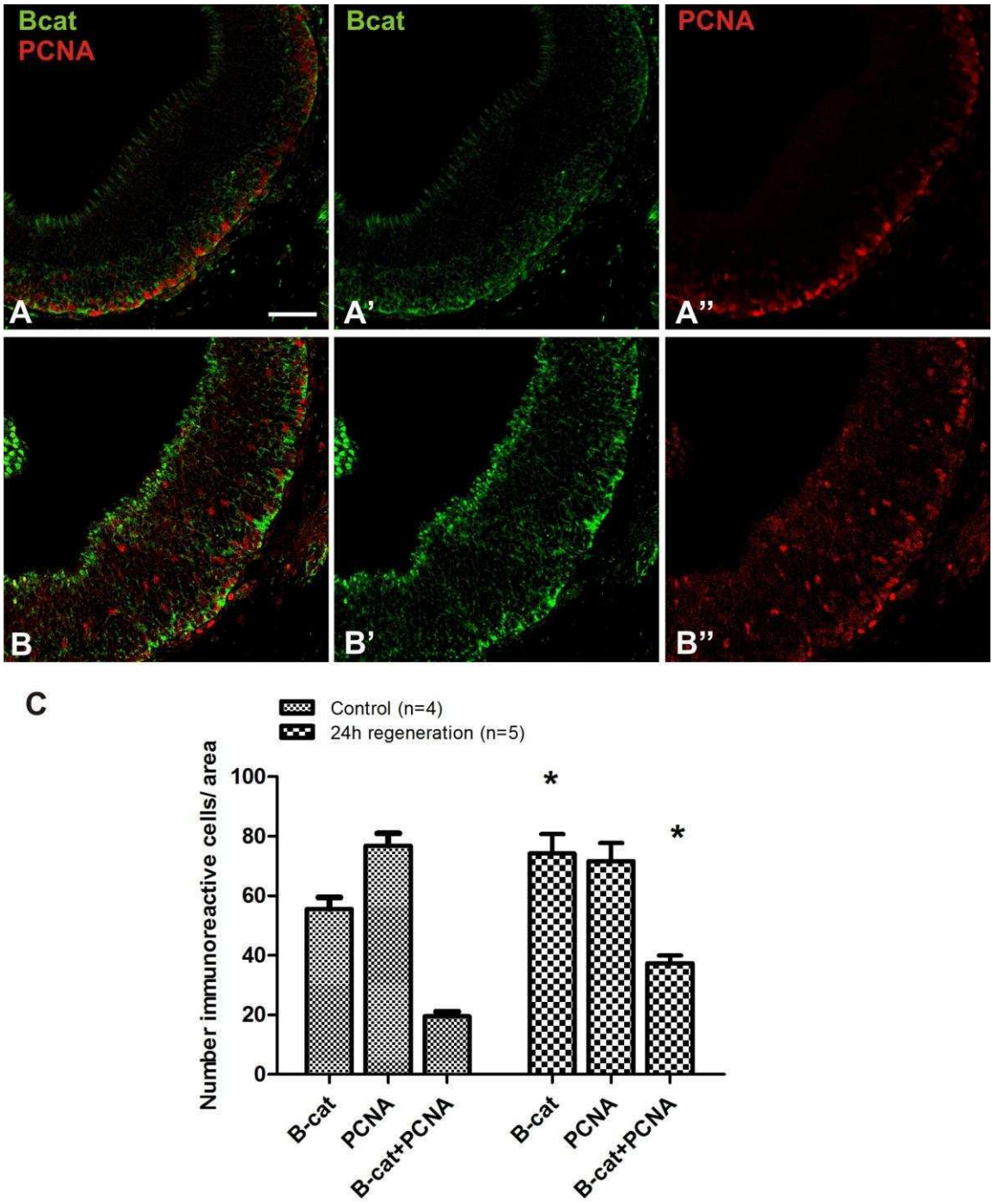

Figura 2.6. Aumento de β-catenina en células basales proliferativas durante la regeneración del EO. Imágenes de microscopía confocal. Inmunodetección de β-catenina y células proliferativas por PCNA. **A**, en condiciones fisiológicas normales; **B**, durante la regeneración del EO inducida tras el daño severo por tratamiento con Sulfato de zinc. Barra: 50 µm. **C**, cuantificación de células basales inmunoreactivas en animales control y a las 24hs de regeneración. Test de t de Student; *p<0,05.

La vía de la polaridad celular planar Wnt/JNK en el OE

La inmunodetección de pJNK por inmunofluorescencia reveló que las células con activación de vías en los que está implicada la fosforilación de JNK se encuentran principalmente en la capa medio-apical del EO, la capa correspondiente a la ubicación de las células neuronales (Fig. 2.7). Por lo que, las células Sox2+ basales e incluso las apicales, no co-localizarían con pJNK. Estos resultados sugieren que la expresión de Sox2 en las células basales no está mediada a través de la fosforilación de la proteína JNK y que la expresión de Sox2 no está regulado a través de la activación de la vía Wnt/JNK.

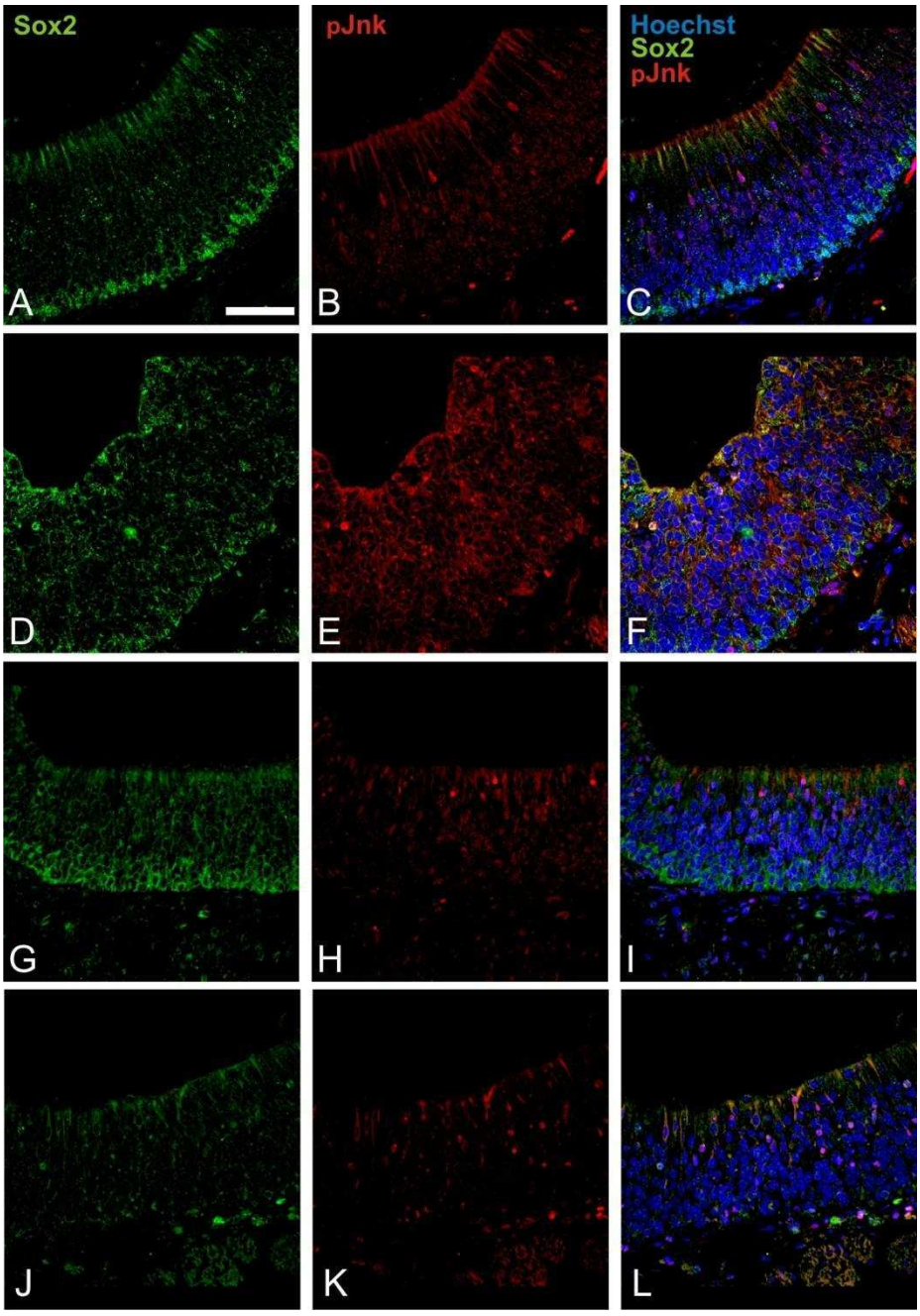

Figura 2.7. La expresión de Sox2 en el EO es independiente de la vía de señalización Wnt/JNK. Imágenes de microscopía confocal, inmunodetección de Sox2 y JNK fosforilado (pJNK), efector clave de la vía Wnt/JNK, y DAPI como marcador nuclear. Análisis confocal de la inmunofluorescencia revela la presencia de pJNK en células de la capa media y apical sin co-localización con células Sox2+ basales. **A**, en condiciones fisiológicas normales; **B**, con la aplicación de NCTD, inhibidor de Wnt/ β-catenina; **C**, durante la regeneración tras el daño severo por Sulfato de zinc; **D**, durante la regeneración y la inhibición por NCTD. Barra: 50 μm.

CAPÍTULO III

Expresión y rol del Factor neurotrófico derivado del cerebro "BDNF" en el EO de *Xenopus laevis*

Para analizar otros factores tróficos implicados en la neurogénesis olfativa, llevamos a cabo un análisis de la expresión de neurotrofinas como BDNF en el EO y el BO en condiciones fisiológicas normales y durante el proceso de regeneración masiva. Con el fin de determinar la presencia de BDNF en el EO en condiciones fisiológicas normales se realizó un estudio inmunohistoquímico en diferentes etapas de renacuajos *X. laevis*. Los resultados mostraron la presencia de la proteína BDNF en la capa apical delEO, así como en unas pocas células dispersas que descansan sobre la membrana basal (Fig. 3.1 A).

Se corroboró la especificidad del anticuerpo contra BDNF por medio de Western blot (Fig. 3.1G). La inmunotransferencia reveló la presencia de dos bandas inmunomarcadas, una de peso molecular de 14 kDa y otra de 35 kDa, que corresponden al péptido de BDNF y el precursor de BDNF de *X. laevis*, respectivamente (Kramer et al., 2002).

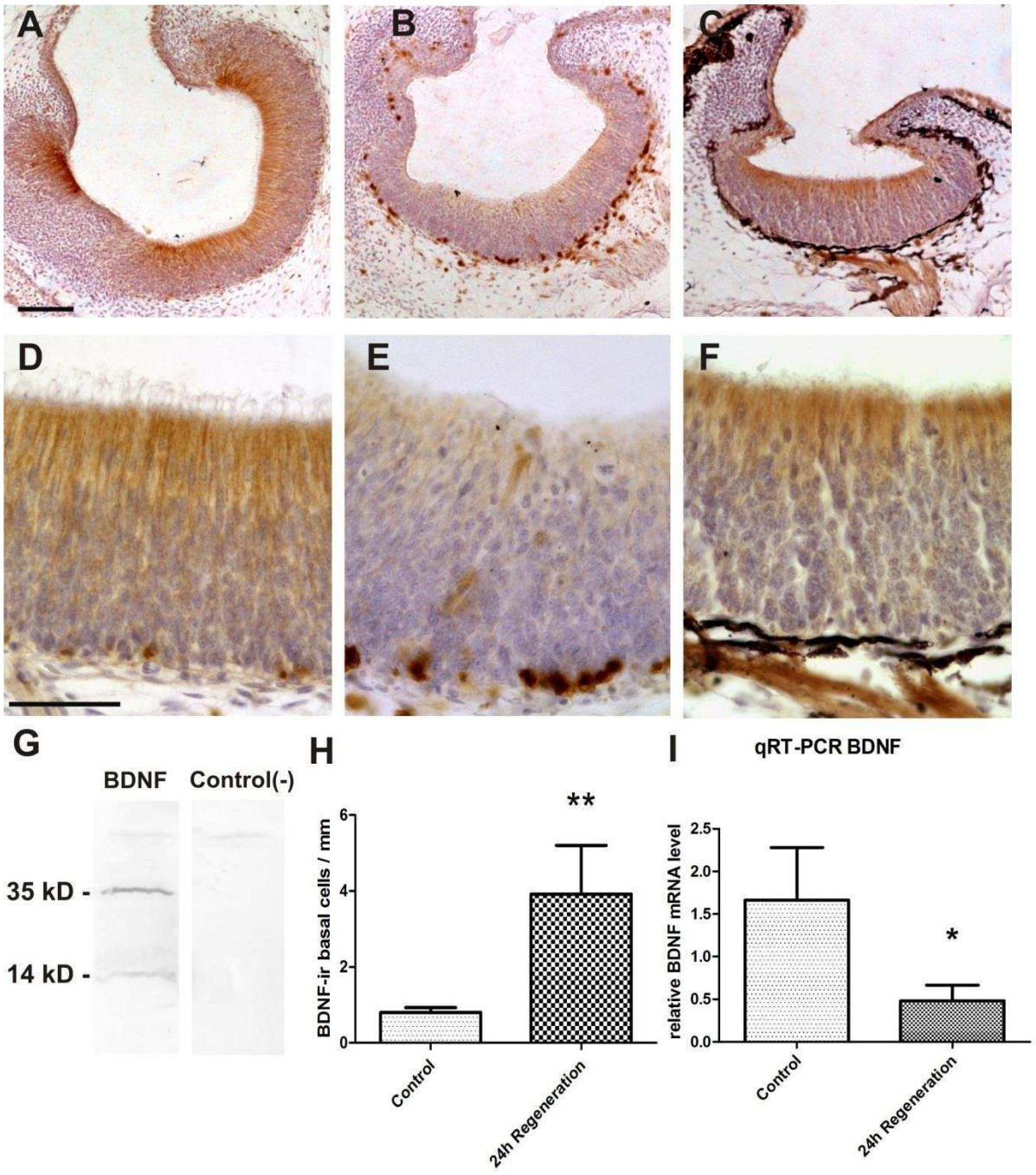

Figura 3.1. Expresión de BDNF en el EO de *X. laevis*. A, el EO en condiciones fisiológicas normales exhibe células BDNF+ en la capa apical y algunas células basales aisladas. **B**, luego de 24hs de regeneración post tratamiento con Sulfato de zinc, el EO presenta un incremento de células basales BDNF+ y una pérdida de la marca apical. **C**, luego de 72hs de regeneración muestra células BDNF+ en la capa apical y una disminución de las células basales. Barra:100 µm. **D-F**, detalles de A-C, respectivamente. Barra: 50 µm. **G**, Ensayo de Western blot de homogenato de sistema olfatorio, bandas inmunoreactivas corresponden a BDNF y al precursor de BDNF. **H**,

cuantificación de células basales BDNF+ por mm de EO, n=5 por grupo. **I**, RT-qPCR para BDNF normalizado al gen de referencia GAPDH, n=8 por grupo. Test de t de Student, *P<0.05; **P<0.01.

BDNF en el EO durante la regeneración

Con la intención de verificar un aumento en la expresión de BDNF que se puede relacionar con un rol de esta neurotrofina en la regeneración del EO, se realizó el análisis durante la regeneración masiva del EO inducida por el tratamiento con ZnSO4 y seguido por 24hs o 72hsde recuperación. Durante las 24hs de regeneración del EO, se encontró mayor inmunorreactividad para BDNF en la capa de células basales, demostrado por un aumento significativo en el número de células positivas (Fig. 3.1 B). Durante la regeneración, el EO exhibió un aumento significativo de las células basales BDNF+, (3,9 ± 1,3) células/mm (Fig. 3.1 B, E), con respecto al EO bajo condiciones fisiológicas normales, (0,8 ± 0,1) células basales/mm del perímetro del OE (Fig. 3.1 A, D); lo que representa un incremento de 4,88 veces con respecto al control (Fig. 3.1 H). Por lo contrario, la inmunorreactividad de BDNF en la capa apical del EO disminuye marcadamente después del tratamiento debido a la pérdida de esta capa de células (Fig. 3.1 B). A las 72hs post-tratamiento, la inmunorreactividad de BDNF en la capa apical se reconstituye junto con la restauración del EO,

mientras que el número de células basales BDNF+ disminuye notablemente (Fig. 3.1 C, F).

El análisis mediante RT-qPCR demostró que, efectivamente, el gen de BDNF se expresa en las células del EO en condiciones fisiológicas normales. Por otra parte, durante la regeneración del EO también hay transcripción de BDNF aunque menor expresión que en los controles (Fig. 3.1 I).

BDNF en el BO en condiciones fisiológicas normales y durante la regeneración del EO

Se corroboró la presencia de una población de células inmunoreactivas para BDNF en la zona posterior del BO, inmediatamente delante de los ventrículos laterales, donde se encuentra la capa de células granulares (Nezlin and Schild, 2000) (Fig. 3.2). Por otro lado, durante la regeneración del EO, el BO exhibió un aumento de las células BDNF+ en comparación con el control (Fig. 3.2 A, B). Además, se observó un aumento en la expresión de BDNF en una red de fibras situadas por delante de las células granulares, así como en el nervio olfatorio (Fig. 3.2 B).

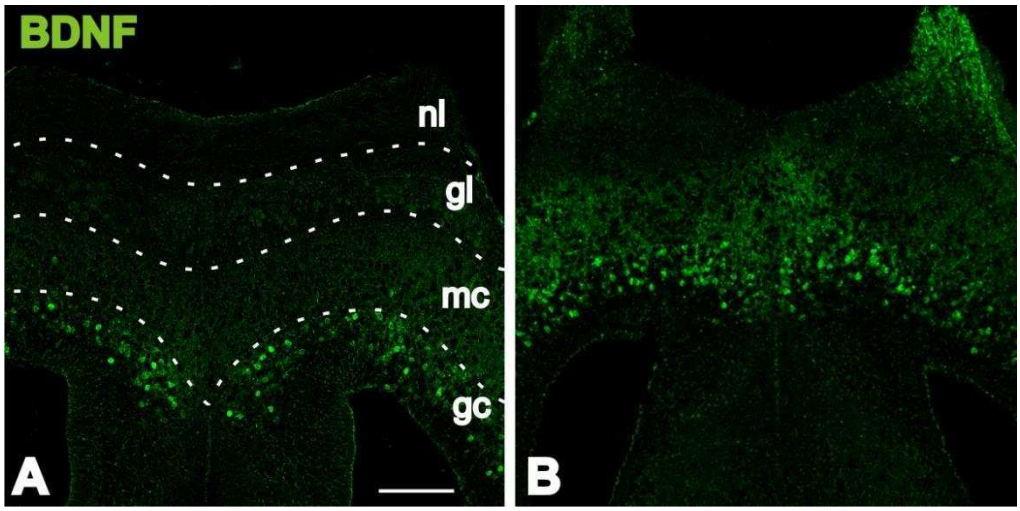

Figura 3.2. Expresión de BDNF en el BO principal de larvas de *X. laevis*. A, en el BO en condiciones normales, células BDNF+ se localizaron en la capa de células granulares (gc) por encima de los ventrículos laterales. **B**, durante la regeneración del EO, el BO presentó un aumento en células BDNF+, principalmente en la capa de céulas granulosas. nl, capa nerviosa; gl, capa glomerular; mc, células mitrales. Barra: 100 µm

Identidad de las células que expresan BDNF en condiciones fisiológicas normales y durante la regeneración del EO

Debido a que las NSC se encuentran en la capa basal del EO, se analizó si las células basales BDNF+ correspondían a células en proliferación. Para comparar la actividad mitótica después de la exposición ZnSO4, se utilizó un anticuerpo contra PCNA. La inmunoreactividad de PCNA se encontró en gran número y principalmente en la capa basal del EO de renacuajos control no tratados (Fig. 3.3 A). A las 24hs de regeneración post destrucción con ZnSO4, el

EO muestra una degradación significativa con la pérdida de la mayor parte de la región apical y células PCNA+ que se distribuyen a lo largo de todo el EO (Fig. 3.3 B). La doble inmunomarcación con PCNA mostró que las células BDNF+ están expresando PCNA a las 24hs de regeneración (Fig. 3.3 B), lo que confirma que el aumento observado de las células BDNF+ en la capa basal corresponde a progenitores neurales en proliferación.

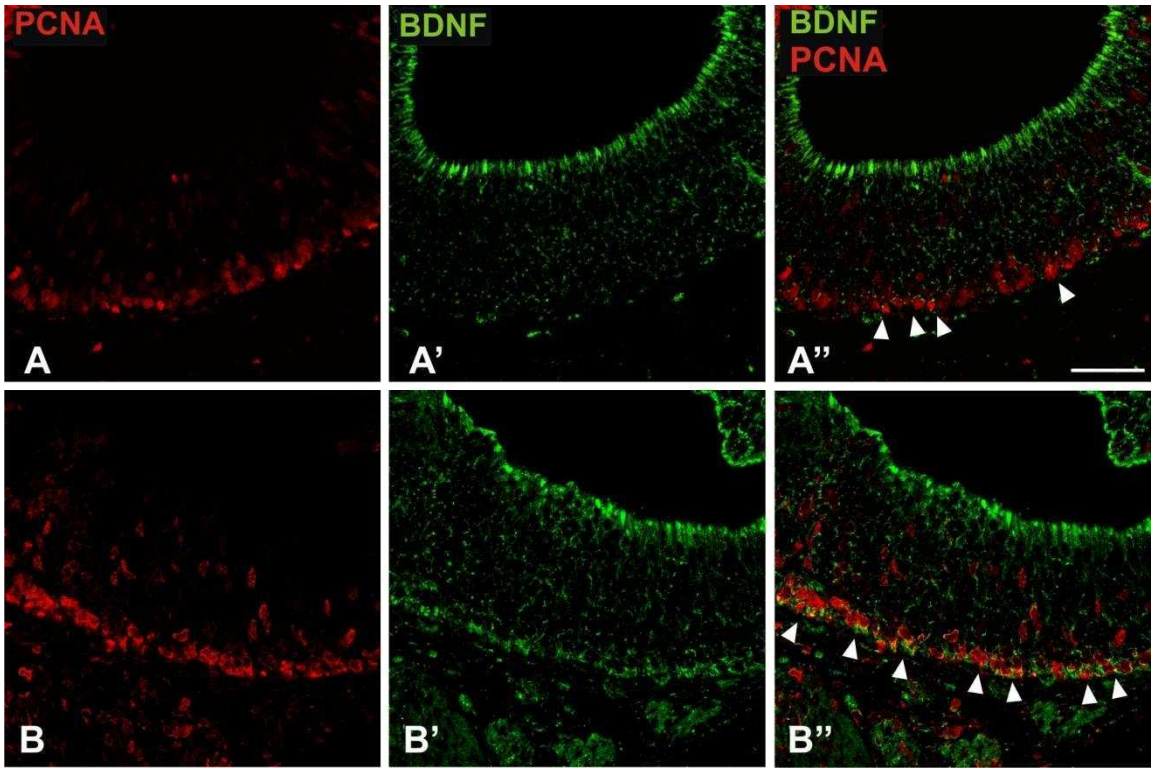

Figura 3.3. Expresión de BDNF en células basales proliferativas. Imágenes de microscopía confocal. **A**, en condiciones normales, algunas células PCNA+ en la capa basal del EO co-localizan con BDNF (cabeza de flecha). B, durante la regeneración forzada del EO, el aumento de células basales BDNF+ muestran co-localización con el marcador de células proliferativas PCNA. Escala: 50 µm

La capa apical del EO está formada por las dendritas de NRO y el soma de las células SUS (Hansen et al., 1998). Para lograr una localización celular más precisa de BDNF en el OE se determinó por doble inmunofluorescencia la expresión de la neurotrofina y β-tubulina (E7). Los resultados en animales control no muestran una clara co-localización de BDNF y β-tubulina (Fig. 3.4 A-A"). Por otra parte, después del tratamiento con $ZnSO_4$ se observó una recuperación gradual de las NRO, pero no la co-localización con BDNF (Fig. 3.4 B-C") que confirma que las NRO no son el principal tipo celular que expresa esta neurotrofina en el EO.

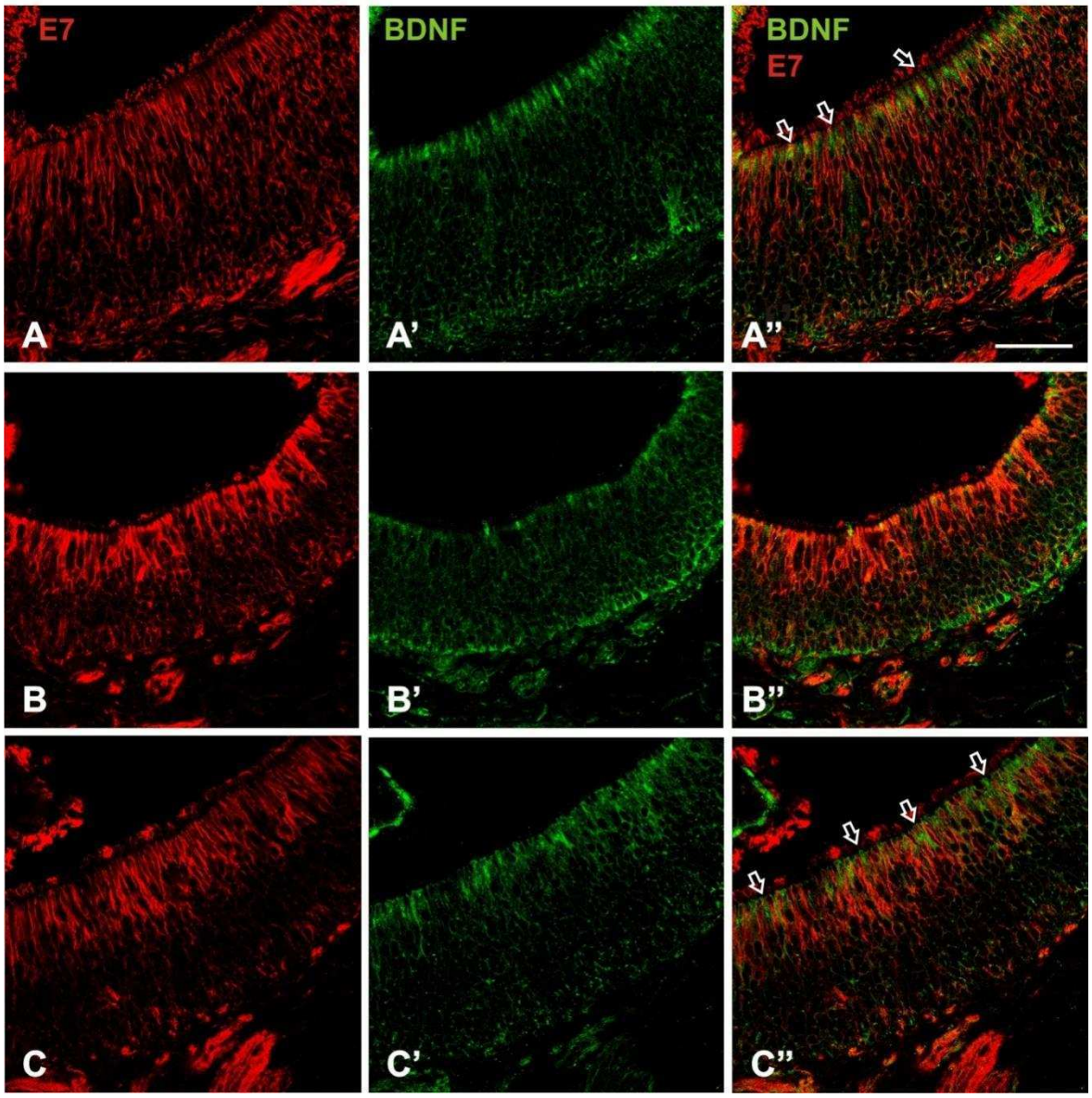

Figura 3.4. Las NRO no son la fuente principal de BDNF en el EO de *X. laevis*. Imágenes de microscopía confocal. **A**, en animales control, la inmunodetección de β-tubulina neuronal (E7), marcador de NRO, no co-localiza en la región dendrítica con BDNF (indicado por flechas vacías). **B**, a las 24hs de regeneración, células BDNF+ localizadas en la capa basal y apical no-colocalizan con la marca de NRO. **C**, 72hs de regeneración muestra un aumento en la marca apical de BDNF y de E7, sin embargo no se observa co-localización en el EO. Escala 50 μm

Con el fin de analizar la presencia de BDNF en las células SUS, se realizó la doble inmunomarcación con anti-BDNF y anti-CytKII, un marcador específico de las células SUS de renacuajos de *X. laevis*(Hassenklover et al., 2009). Citoqueratina II se observa en el compartimento citoplasmático principal de las células SUS adyacentes al lumen de la cavidad. La co-localización de este marcador celular con BDNF en la capa apical demuestra que las células SUS expresan BDNF en el EO normal (Fig. 3.5 A-A ").

A las 24hs de regeneración, se observa que las células SUS no fueron repuestas aún, lo que se puede apreciar por la falta de inmunorreactividad para CytKII y BDNF en la capa apical de la EO (Fig. 3.5 B-B "). Mientras que, las 72hs de recuperación son suficientes para reponer gran parte de las células SUS, evidenciado por la reaparición de la inmunomarca de CytKII restaurada en la región apical y su co-localización con BDNF (Fig. 3.5 C-C "). Por lo tanto, la clara co-localización de BDNF y CytKII observada en la capa apical del EO apoya la hipótesis de que las células SUS son la principal fuente de BDNF en el EO en condiciones fisiológicas; mientras que las células basales son al menos la principal fuente durante la regeneración hasta que las células SUS son repuestas.

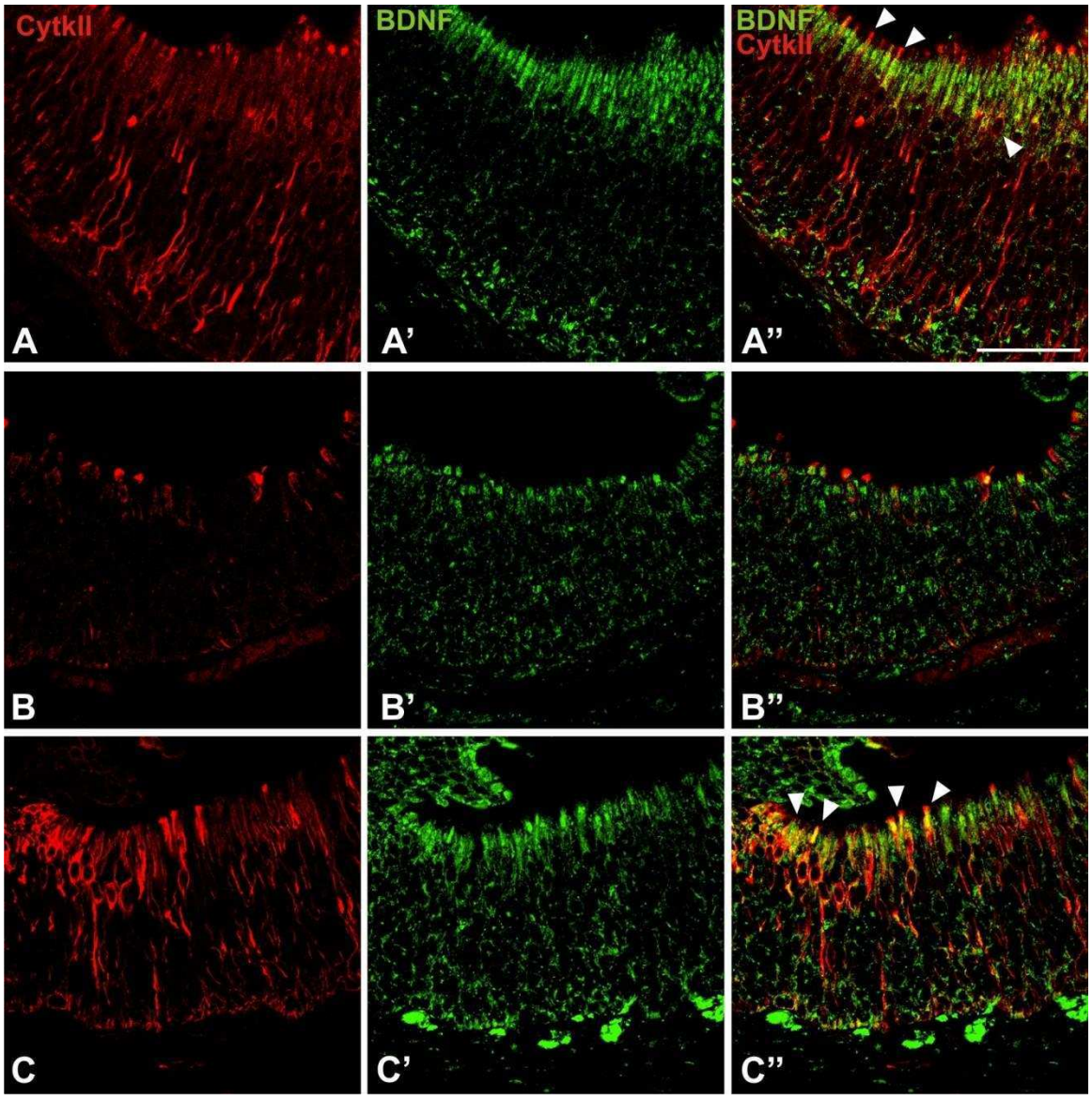

Figura 3.5. Células SUS expresan BDNF en la capa apical del EO. Imágenes de microscopía confocal. **A**, en condiciones normales, las células SUS identificadas por el marcador específico CytKII se localizan en la capa apical del EO y muestran co-localización con BDNF (cabeza de flecha). **B**, durante las 24hs de regeneración no se observa células SUS como tampoco co-localización con BDNF. **C**, a las 72hs de regeneración, se observa la reposición de células SUS del EO por la restauración de la inmunomarca de CytKII y co-localización con la arca de BDNF en la capa apical. Escala: 50 µm

Por lo que tomados en conjunto, estos resultados sugieren un importante rol de BDNF en la neurogénesis del EO tanto durante la homeostasis como durante una regeneración severa. La expresión de esta neurotrofina sería local en el EO normal por parte de las células SUS principalmente, aunque no se descarta la contribución por parte del BO a través de un transporte retrógrado. Además, durante la regeneración, la expresión de BDNF por células basales aumentaría a fin de promover la diferenciación neuronal.

Discusión

Discusión

Noxas y patógenos afectan constantemente a las neuronas receptoras olfatorias en la cavidad nasal. Estos agentes ambientales pueden dañar las neuronas, lo cual en última instancia resulta en la pérdida del sentido de olfato. Sin embargo, el sistema olfatorio tiene la capacidad distintiva de generar nuevas neuronas durante toda la vida de un organismo. Las células madre olfatorias en la parte basal del EO dan lugar a nuevas neuronas sensoriales que extienden sus axones hacia el BO, donde deben integrarse en los circuitos existentes de forma continua. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares que controlan la formación y mantenimiento del sistema olfatorio están lejos de ser completamente entendidos. Debido a esta característica particular, el sistema olfatorio representa una oportunidad única para estudiar el circuito y la guía axonal, la formación de conexiones sinápticas, como también investigar los mecanismos moleculares implicados en la especificación neural y diferenciación neuronal.

Nuestro trabajo se ha enfocado en el análisis de los factores y mecanismos involucrados en la homeostasis y capacidad regenerativa neural del EO. Se llevó a cabo el análisis de la dinámica de regeneración de los distintos tipos celulares, la implicancia del factor de transcripción Sox2 y la regulación de su expresión a través de las vías de Wnt. Por otro lado se estudió el posible rol de neurotrofinas en la neurogénesis enfocándonos específicamente en dilucidar la

expresión de BDNF en el EO tanto en condiciones normales como durante la regeneración del neuroepitelio.

Auto-renovación y capacidad regenerativa del EO

Para estudiar la autorenovación de NRO y células SUS en el EO, se decidió trabajar con larvas de *X. laevis* st. 53-54, correspondiente a estadios pre-metamórficos, dado a las características morfológicas del EO (Fig. 1.1). En estos estadios, las larvas tienen la PC desarrollada con las capas celulares bien diferenciadas y descriptas, la MC está en desarrollo, por lo cual la PC sigue con funcionalidad acuática. Además, el hecho de que la PC se encuentre en contacto directo con el agua nos ha permitido exponer a los renacuajos a Sulfato de zinc disuelto en el agua y de esta manera provocar la degeneración y destrucción parcial del EO e inducir la posterior regeneración masiva del EO, sin dañar el sistema respiratorio comprendido por las branquias durante el estadio larval.

Otros trabajos han aplicado distintas técnicas para inducir injurias de diferentes grados de severidad. Por ejemplo, bulbectomía y axotomía, donde se remueve el BO o se corta el NO, respectivamente; generan una injuria leve donde solo las NRO son ablacionadas (Iwai et al., 2008; Leung et al., 2007). Otros tratamientos, como la exposición al gas bromuro de metilo genera un

daño severo provocando la degeneración tanto de NRO como de células SUS (Jang et al., 2003), al igual que el tratamiento químico con Sulfato de zinc (Herzog and Otto, 1999; Yovanovich et al., 2009). Por lo tanto, estas técnicas diferentes proporcionan información que debe ser integrada, ya que plantea diferentes escenarios. Se puede estudiar la regeneración neuronal exclusivamente, en el caso de la bulbectomía y axotomía; mientras que otros permiten analizar la diferenciación neural, tanto en el linaje neuronal como el de células tipo gliales, como ocurre con el tratamiento con sulfato de zinc.

En el presente trabajo, se optimizó la técnica de tratamiento con Sulfato de zinc para el uso en *X. laevis* st. 53-54, encontrando que una concentración sub-letal de Sulfato de zinc (20 mg/L) provoca un daño severo en el EO sin afectar la morfología de otros tejidos y órganos. Estas observaciones están en concordancia con estudios previos sobre los efectos del Sulfato de zinc en el EO de otro anuro, *Rhinella arenarum* (Yovanovich et al., 2009). La destrucción del EO por este tratamiento fue evidenciada por el desarreglo morfológico del EO, la pérdida de NRO (Fig. 1.3; 1.4) y de células SUS (Fig. 1.5). Además, esta destrucción parcial del EO es acompañada por la pérdida de la funcionalidad olfatoria, dado que animales tratados con Sulfato de zinc no mostraron respuesta comportamental ante un estímulo odorífico (Fig. 1.6), lo cual sería consecuencia de la disminución significativa de NRO maduras por el tratamiento químico.

Nuestros resultados demuestran que, en condiciones fisiológicas normales, existe un estado de equilibrio en la homeostasis que involucra una renovación constante de células del EO gracias a la proliferación principalmente de células basales (Fig. 1.2 A), evidenciado por la incorporación de BrdU por células en división celular. Un pequeño número de células en división fueron localizadas en la capa apical correspondiente a las células SUS, lo cual se corresponde con lo observado en mamíferos donde algunas células SUS serían capaces de duplicarse (Calof and Chikaraishi, 1989; Graziadei and Graziadei, 1979). Sin embargo, la fuente principal de progenitores celulares se encuentra en la capa basal. Entre las células de la capa basal del EO se encuentran las NSC (HBC y GBC), progenitores neurales y puede incluir los estadios más inmaduros de las nuevas NRO en diferenciación (Beites et al., 2005; Calof et al., 2002). No sólo puede observarse la capacidad de renovación constante, sino que también, al inducirse una regeneración masiva del EO por la destrucción parcial con Sulfato de zinc, se produce un aumento de la tasa de proliferación de células basales del EO (Fig. 1.2 B, C). Dicho aumento en la proliferación podría ser consecuencia de factores tróficos y mecanismos moleculares activados y/o aumentados que estarían promoviendo la rápida renovación de las NRO y células SUS para recuperar la funcionalidad del sistema olfatorio. Justamente, la neurogénesis en el EO para la auto-renovación en la homeostasis y la neurogénesis requerida para regenerar el tejido luego de una injuria comprende factores y procesos distintos (Brann and Firestein, 2014). Las GBC, que se encuentran entre las células basales del EO murino, se consideran como los progenitores

neuronales durante la auto-renovación en condiciones normales y durante la regeneración luego de un daño leve al EO. Estas GBC presentan una alta tasa de división celular e incorporación de BrdU (Huard and Schwob, 1995). Mientras que, las HBC, podrían ser consideradas NSC quiescentes, ya que se ha observado que presentan una tasa de división baja, que responderían ante una injuria severa del EO (Brann and Firestein, 2014; Wang et al., 2011a). Si bien en *X. laevis* no se ha determinado de manera precisa la existencia de HBC y GBC entre las células basales del EO, se ha postulado por características morfológicas que podrían ser dos tipos celulares presentes en la capa basal (Hassenklover et al., 2009).

Hemos observado una gran variabilidad en cuanto a la magnitud del daño generado por el tratamiento con Sulfato de zinc entre larvas del mismo estadio de *X. laevis*, generando como consecuencia una mayor variabilidad en cuanto a la cinética de regeneración del tejido dañado. Sin embargo, se puede observar que luego de la injuria, el aumento del número de células basales en proliferación va acompañado con la restauración paulatina de los diferentes marcadores celulares. A las 12hs posteriores al tratamiento, no se observan los restos celulares presentes en la luz de la PC al término del tratamiento (0hs) y el EO conserva sólo la capa basal de células. A las 24hs de regeneración, se observa un aumento en el número de capas celulares junto con el aumento significativo de NRO maduras. Se distinguen neuronas en formación por β-tubulina localizándose en la capa media, con sus proyecciones axónicas hacia la región basal y las proyecciones dendríticas hacia la luz junto con sus cilias, y células SUS que comienzan a extender sus somas hacia la capa apical del EO

(Fig. 1.3). Debido a que en este periodo de recuperación es cuando se determinó un aumento significativo en la tasa de proliferación, un aumento significativo del NRO maduras con respecto al termino del tratamiento, pero aun siendo significativamente menor al de animales control, se decidió utilizar como periodo principal en el análisis de diferenciación neural. Dicho periodo de recuperación lo hemos planteado como una ventana temporal en la cual el EO se haya en pleno proceso de regeneración y activación de la diferenciación neuronal.

A partir de las 72hs se distinguen la recuperación de todos los tipos celulares y las respectivas capas celulares, no obstante, no alcanza a recuperar completamente la morfología y organización natural del EO. A las 120hs se asemeja al EO control y parece recuperar parte de la función olfativa, aunque la respuesta de olfación de los animales se mantuvo inferior a la de los animales control. Pasados 7 días del daño al EO, se observa una morfología del tejido similar al control, se recupera el número de NRO maduras y presentan una respuesta al estímulo odorífico similar a los animales control, lo que sugiere que pasadas 168hs de la injuria el EO se encuentra completamente regenerado y las NRO reinervadas con el BO. Por lo tanto, larvas de *X. laevis* parecen presentar una mayor capacidad regenerativa que roedores adultos, en los que la recuperación del EO toma tres semanas después de la infusión intranasal de Sulfato de zinc (Herzog and Otto, 1999; Schwob, 2002; Williams et al., 2004). Esta diferencia podría deberse a que la proliferación celular y los procesos de diferenciación son más rápidos durante el desarrollo de los animales que en la vida adulta.

Rol de Sox2 y la señalización de Wnt en la proliferación y neurogénesis de progenitores neurales

Los resultados presentados en este trabajo de tesis sobre la expresión de Sox2 en progenitores neurales y la implicancia de la vía de señalización de Wnt/β-catenina, sugieren que ambos tienen una participación importante en la proliferación y neurogénesis del EO. Estos resultados concuerdan con estudios previos que muestran que la expresión de Sox2 se mantiene en los progenitores que se encuentran diferenciándose, donde inducen la diferenciación neural (Guillemot, 2007). Hemos encontrado que en el EO de larvas de *X. laevis*, Sox2 se expresa en células basales y células SUS ubicadas en la capa apical, como fue descripto anteriormente (Guo et al., 2010). Aunque la presencia de Sox2 en el OE se ha descrito previamente, no queda claro qué mecanismos regulan la expresión génica Sox2 como tampoco la identidad de las células basales que lo expresan. En nuestro estudio, no hemos encontrado co-localización en las células basales Sox2+ con marcadores de células SUS, como tampoco con marcadores de neuronas maduras. La expresión en neuronas inmaduras de GAP43 precede la expresión de NCAM en el camino de diferenciación (Verhaagen et al., 1990). Por lo que, si bien ambas se expresan en neuronas postmitóticas inmaduras, con GAP43 se identifican neuronas en un estadio de menor diferenciación neuronal (Jia et al., 2009). Con respecto a esto, observamos co-localización de algunas células basales Sox2+ con GAP43, pero no se encontró con NCAM (no se muestra en resultados). En condiciones fisiológicas normales, las células basales Sox2+ se encuentran

junto a la membrana basal, de las cuales se observó que sólo algunas expresan GAP43. Sin embargo, se encontró otro grupo de neuronas inmaduras GAP43+ que no expresan Sox2+, las cuales notoriamente se encuentran adyacentes a otras células Sox2+ en contacto con la membrana basal. Esto sugiere que, progenitores neurales en la capa basal del EO expresan el factor de transcripción Sox2, y que la expresión de esta proteína se mantiene hasta los primeros estadios en la diferenciación neuronal, por lo que está presente en neuronas inmaduras (GAP43) y deja de expresarse antes de pasar a otro estadio de mayor diferenciación. Además, se pudo determinar que en condiciones normales las células basales Sox2+ son células con potencial de proliferación ya que co-expresan PCNA.

Estos resultados están en concordancia con lo que ha sido descripto en trabajos previos, en donde se sostiene que el factor de transcripción Sox2 promueve la proliferación celular e induce el inicio de la expresión de los genes proneurales, y antagoniza la diferenciación neuronal que es inducida por las proteínas proneurales Mash1 y la Ngn en el SNC (Bertrand et al., 2002; Bylund et al., 2003). De esta manera, durante la neurogenesis, Sox2 mantiene el "pool" de progenitores. Por lo tanto, el balance de la actividad Sox2 y genes proneurales determinaría el ritmo de la neurogénesis (Doe, 2008).

Durante la regeneración forzada del EO, hemos determinado un aumento de la expresión génica de Sox2+ y un aumento de células basales Sox2+. Dichas células tienen potencialidad proliferativa, por lo que sugiere que las

células basales que expresan Sox2+ son progenitores neurales y estarían contribuyendo a la reposición de las células propias del EO.

En la vía canónica de Wnt, el principal efecto de la unión del ligando Wnt a su receptor Frizzled es la estabilización de β-catenina citoplásmica, y luego β-catenina es libre de entrar en el núcleo y activar genes regulados por Wnt (Harland and Gerhart, 1997; Huang and He, 2008; Willert and Jones, 2006; Willert and Nusse, 1998). Por lo tanto, para evaluar la implicancia de esta vía en la regulación de la expresión de Sox2, se provocó la inhibición de la vía Wnt/β-catenina mediante la aplicación Norcantaridina, una pequeña molécula de derivado sintético de la cantaridina natural con potenciales aplicaciones terapéuticas y contra el cáncer (Cimmino et al., 2011; Chuang et al., 2010; Hsieh et al., 2013; Zhang et al., 2004). De esta manera, se determinó un marcado descenso de la expresión del ARNm de Sox2 así como del número de células basales Sox2+ del EO durante la regeneración, pero no se observó un efecto directo sobre Sox2 en condiciones normales. Estos resultados nos sugieren que la vía de señalización deWnt/β-catenina estaría implicada en la regulación de la expresión de Sox2 principalmente bajo condiciones de regeneración.

Además, en animales forzados a la regeneración por el tratamiento con Sulfato de zinc, y con inhibición de la vía Wnt/β-catenina por administración de NCTD, mostraron una disminución significativa del número de NRO maduras a las 24hs de regeneración, determinado por el marcador específico OMP. No obstante, tampoco se observó un descenso de las NRO que expresan OMP en animales con el EO intacto y expuestos al inhibidor de la vía Wnt/β-catenina.

Por lo que, durante la regeneración la expresión de Sox2 parece ser inducida por la vía de señalización de Wnt dependiente de β-catenina, y a su vez esta activación sería necesaria para la diferenciación neuronal de las NRO del EO. Este requerimiento de Sox2 en NSC y progenitores neurales, para la diferenciación neuronal, ha sido descripto en múltiples áreas del SNC de roedores (Cavallaro et al., 2008).

Al analizar la activación de la vía de Wnt/β-catenina mediante la determinación de la presencia de β-catenina por inmunohistoquímica, se encontró que células basales muestran mayor intensidad de inmunomarca para β-catenina citoplasmática que en otras zonas del EO. Por otro lado, durante la regeneración, se observa un aumento en el número de células con de β-catenina en la capa basal del EO. Por lo que, bajo condiciones de regeneración ante un daño extenso, dicho aumento podría explicarse por la presencia de ligandos Wnt que activen la vía canónica provocando la estabilidad de la molécula de β-catenina en el citoplasma y su posterior entrada al núcleo. Sin embargo, no hemos podido establecer precisamente la localización de β-catenina en núcleo por inmunocitoquímica, para lo cual sería necesario corroborarlo por otra técnica como el fraccionamiento nuclear seguido del ensayo de Western blot.

En animales donde se indujo la inhibición de la vía Wnt/β-catenina, se determinaron niveles disminuidos de β-catenina en todo el EO, pero lo más notable fue la ausencia del aumento en las células basales que se observó durante el proceso de regeneración. Corroborando de esta manera que, efectivamente, la administración de NCTD estuviera inhibiendo esta vía al no

permitir la estabilización de la molécula de β-catenina y por ende el aumento de los niveles citoplasmáticos. Además, en condiciones fisiológicas normales, sólo algunas de las células proliferativas se encontraron con niveles altos de β-catenina. Mientras que durante la regeneración, gran parte de las células basales que activarían la vía de Wnt/β-catenina también serían células proliferativas, similar a lo observado con las células basales que expresan Sox2.

En el SNC, la expresión de Sox2 se restringe a las NSC y los precursores neurales no diferenciados, y aunque se retiene en algunas poblaciones de neuronas en diferenciación, la expresión generalmente se regula negativamente con la diferenciación (Cavallaro et al., 2008; Pevny and Nicolis, 2010). En Xenopus, Sox2 se requiere para las células neuroectodermo para mantener su identidad neural (Kishi et al., 2000). Por otro lado, en la retina de Xenopus, el bloqueo del receptor Frizzled5 inhibió la expresión de Sox2, y también la proliferación de células progenitoras neurales y la neurogénesis (Van Raay et al., 2005). Por lo tanto, nuestros resultados en el EO están en concordancia con trabajos previos que sostienen que en otros tejidos, Sox2 se expresa en precursores neurales no diferenciados, el requerimiento de la activación de la vía de señalización Wnt para la expresión de Sox2 en esas células, y que Sox2 tiene un rol importante en la neurogénesis, potencialmente por la regulación negativa de los genes relacionados con el destino de diferenciación neuronal.

No obstante, un trabajo reciente determinó la activación de la señalización canónica de Wnt en células basales olfatorias Sox2 + cultivadas a

partir del EO de ratón, y se determinó que Wnt promueve la proliferación de células Sox2 + disociadas de neuroesferas generadas a partir del EO (Wang et al., 2011b). Sin embargo, estos resultados no demuestran el requerimiento de la activación de Wnt/β-catenina para la expresión de Sox2 en esas células, como tampoco determinan necesariamente el mecanismo fisiológico/ homeostático in vivo, sino más bien un estado de regeneración in vivo e in vitro. De acuerdo con nuestros resultados, los estudios en condiciones de regeneración demuestran un rol importante de Wnt y Sox2 en la proliferación y neurogénesis en precursores neurales del EO. Sin embargo, en condiciones fisiológicas normales, la activación de la vía de señalización Wnt/β-catenina no explica la expresión de Sox2 observada en las células basales de OE.

Múltiples miembros de la familia de Wnt y receptores Fzd han sido descriptos que se expresan selectivamente en el desarrollo del EO de ratones: diez ligandos Wnt (incluyendo Wnt 1-7, Wnt 9a y Wnt11) y siete receptores Fzd (Fzd1, Fzd3, Fzd4, Fzd, Fzd7, Fzd10, Fzdb), entre otros componentes de señalización de Wnt (Rodriguez-Gil and Greer, 2008; Wang et al., 2008; Wang et al., 2011b; Zaghetto et al., 2007). Por lo tanto, diferentes vías de señalización de Wnt podrían estar siendo activadas dependiendo de la señal.

A fin de determinar si otra vía de señalización de Wnt estuviera implicada en la regulación de Sox2, principalmente debido a que en condiciones normales no se produjo una disminución de Sox2 con el inhibidor de Wnt/β-catenina; se analizó la presencia de JNK fosforilado y CamKII fosforilado, como indicadores de las víasde señalización no canónicas Wnt/ JNK y Wnt/ Calcio, respectivamente (Fig. 3).

La fosforilación de JNK es uno de los pasos necesarios para la activación de la vía de señalización Wnt/ JNK y su posterior regulación de la expresión génica. Aunque se observó pJNK en algunas células de EO en la capa media correspondiente a las células neuronales, no hemos encontrado pJNK presente en células basales donde Sox2 se expresa. Por otra parte, se analizó la presencia de CaMKII fosforilado (pCamKII), correspondiente a su forma activada, en condiciones normales y durante la regeneración por inmunohistoquímica (los resultados no se muestran). Sólo algunas células aisladas en la capa media presentaron inmunomarcación, no correspondiéndose con la marca de Sox2. De todas formas, un análisis más exhaustivo debería realizarse para completar dicho estudio y poder concluir más precisamente la implicancia de estas vías en la regulación de Sox2 en precursores neurales del EO.

Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que la activación de la vía de señalización Wnt/β-catenina es necesaria para la expresión Sox2 en precursores neurales olfatorios y para la diferenciación posterior de NRO maduras, avalando la vía direccional *Wnt/β-catenina - Sox2 – genes proneurales*(Agathocleous et al., 2009), en condiciones de regeneración tras una injuria severa del EO. Sin embargo, en condiciones fisiológicas normales, otros factores estarían involucrados y serían responsables de la regulación de la expresión de Sox2 en las células basales.

La idea de que las NSC habitan en la capa basal del EO reside en la localización basal de las células en proliferación, así como también en la progresión de la maduración neuronal desde la capa basal hacia la apical. Sin

embargo, la identificación de estas NSC como precursores multipotentes del EO sigue en discusión. Últimos trabajos y análisis sobre esta cuestión postulan a las GBC como precursores ya comprometidos en el linaje neuronal, mientras que las HBC serían las verdaderas NSC, ya que son quiescentes bajo condiciones normales y multipotentes (Duggan and Ngai, 2007; Leung et al., 2007). Cambios extremos en el nicho de las NSC olfatorias pueden causar que las HBC se sometan a un programa anormal de dediferenciación que no es representativo de los procesos fisiológicos que involucran la auto-renovación constante del EO (Duggan and Ngai, 2007). Por lo que, un modelo que explicaría estas observaciones es que, bajo condiciones normales o injurias leves donde sólo se ven afectadas las NRO, las GBC tienen la capacidad suficiente de auto-renovar y reponer las neuronas olfatorias. Mientras que, bajo condiciones de un daño severo donde se vean afectados más tipos celulares del EO, las HBC multipotentes son estimuladas a proliferar y diferenciarse para dar origen a los distintos tipos celulares del EO (Brann and Firestein, 2014; Duggan and Ngai, 2007). Este modelo a su vez, nos sirve para explicar en parte lo obtenido en nuestros resultados, donde frente a un daño severo y posterior regeneración del EO fueron determinados diferentes factores que en condiciones normales, que regulan la proliferación y expresión génica de células basales, que podrían incluir tanto precursores como NSC, o GBC como HBC en el caso de que efectivamente se distingan ambos tipos celulares en el EO de *X. laevis*.

Expresión de BDNF en el sistema olfatorio en condiciones normales y durante la regeneración del EO

Nuestro trabajo demuestra por primera vez que la expresión de BDNF se produce tanto en el EO como también en el BO de *Xenopus laevis* en condiciones fisiológicas normales, como se observa por la presencia de la proteína BDNF en ambos tejidos y confirmando la expresión de ARNm en el EO. Por otra parte, durante la regeneración del EO, existe también la expresión génica de BDNF en el EO y BO. Estos resultados no están en completa concordancia con la hipótesis de otros trabajos en los que se plantea que en el EO normal, la proteína BDNF se produce sólo en el BO y luego sería transportada retrógradamente a través de los axones de las NRO, con el fin de promover la maduración de las neuronas recién generadas (Feron et al., 2008; Uranagase et al., 2012).

Los niveles de expresión de BDNF en los animales control pueden sugerir que esta neurotrofina promueve la renovación celular natural en el EO. Después de la lesión con Sulfato de zinc, es necesaria una importante onda proliferativa y por lo tanto una mayor síntesis de BDNF. Es de particular interés el aumento de las células BDNF+ en la capa basal del EO donde se encuentran las NSC olfatorias (Hassenklover et al., 2009). Estos resultados están de acuerdo con los informes sobre el EO de mamífero, donde BDNF se limita a las HBC del neuroepitelio olfatorio (Buckland and Cunningham, 1999), lo cual confirmaría que la renovación normal de las células del EO es controlada por

esta neurotrofina. Sin embargo, otros informes no encuentran BDNF en el EO (Clevenger et al., 2008), dejando abierto el debate sobre la presencia de BDNF en el sistema olfatorio.

En efecto, la presencia y el papel de BDNF en el sistema olfatorio sigue siendo controvertido debido a las discrepancias encontradas en los informes anteriores. Diferentes hipótesis se han propuesto basadas en la dificultad para detectar la molécula BDNF. Los problemas con las diferentes técnicas que se utilizan como herramientas se han superado con el mejorar de cada técnica y el avance de la investigación. Anticuerpos novedosos y RT-PCR en tiempo real son capaces de dilucidar si la expresión de BDNF se está produciendo tanto en la EO y BO.

Por otra parte, la tasa de recambio celular del EO en condiciones fisiológicas normales es más baja que la inducida durante la regeneración masiva. Los factores, señales y respuestas biológicas pueden ser diferentes en ambos escenarios. La regeneración inducida por el tratamiento químico nos ha permitido el análisis de genes y factores de crecimiento implicados en la regulación de la neurogénesis olfatoria.

Nuestro análisis de BDNF muestra diferencias notables entre el EO intacto y dañado. Hemos observado una baja expresión en el EO y BO de los animales no tratados. Sin embargo, durante la regeneración del EO, después del tratamiento con Sulfato de zinc, se observó una fuerte inmunoreactividad en la capa apical y basal del EO, así como en el BO principal y NO. A pesar de esto, la cantidad de ARNm de BDNF en el EO en regeneración es significativamente

menor que en el EO normal, a pesar del aumento de las células BDNF+ basales observado (Fig. 3.1). Estos niveles más bajos de ARNm de BDNF a las 24hs de regeneración podrían ser la consecuencia de la pérdida de células SUS que expresan BDNF (Fig. 3.5), aunque una caída en la expresión génica no podría ser descartada. Esto avala la posibilidad de que BDNF está actuando sobre la homeostasis neuronal: se ha demostrado recientemente que BDNF es sintetizado por astrocitos del hipocampo para actuar de manera paracrina sobre las neuronas adyacentes (Quesseveur et al., 2013). Juntos, estos resultados apoyan la idea de que el BO podría suministrar al menos una parte de la proteína BDNF al EO a través del transporte axonal de las NRO durante una regeneración masiva (Uranagase et al., 2012), promoviendo la diferenciación y maduración de NRO debido a la pérdida de células del SUS productoras de BDNF. No obstante, nuestros resultados no están en concordancia con los informes anteriores que plantean la expresión de BDNF por parte de las neuronas olfatorias en ratones bajo condiciones fisiológicas normales (Clevenger et al., 2008; Takami et al., 2005). De lo contrario, Feron et al. (2008) y Takami et al. (2005) también encontraron que en ratas normales BDNF se expresa en las células de sostén (sustentaculares), mientras que su receptor específico TrkB se limita a células globosas basales en la capa basal del EO.

El EO de larvas de *X. laevis* se organiza básicamente como el EO postnatal de otros vertebrados. Las NRO están conectadas a los objetivos glomerulares en el BO, y responden a odorantes en el agua (Hassenklover et al., 2009). En nuestros resultados, la clara co-localización de BDNF y CytKII observada en la

capa apical del EO apoya la hipótesis de que las células SUS son la principal fuente de BDNF en el EO en condiciones fisiológicas mientras que las células basales lo son al menos durante la regeneración, hasta que las células SUS sean repuestas. Teniendo en cuenta que las HBC han sido identificadas como las células madre progenitoras del linaje neuronal y glial (sustentacular), y las GBC como precursores neuronales(Iwai et al., 2008; Mackay-Sim and Kittel, 1991), otros estudios sobre este aspecto son necesarios para establecer la identidad de estas células progenitoras que expresan BDNF en el EO.

La presencia de BDNF en el BO también se ha mantenido en controversia (Buckland and Cunningham, 1999; Phillips et al., 1990). Clevenger et al. (2008) reportaron la presencia de BDNF en el BO con discrepancias en cuanto a la identidad de las células responsables de la síntesis de BDNF. Hemos localizado células que expresan BDNF en la capa granular del BO de animales control (Fig. 2). Por otra parte, durante la regeneración un aumento de BDNF+ se observó en el NO, así como en el BO. No obstante, Yovanovich et al. (2009) informó la presencia de BDNF en NO y EO sólo durante la inducción de la destrucción química en larvas del anuro *R. arenarum*, y no en el BO ni en animales control. Además, BDNF en el BO ha sido relacionado con la regulación de la competencia dependiente de actividad en la ramificación de los axones de las NRO dentro del glomérulo, donde hacen sinapsis con las dendritas de las células mitrales y periglomerulares (Cao et al., 2007).

Los factores neurotróficos influyen en todos los procesos asociados con neuroregeneración tanto in vitro como in vivo(Logan et al., 2006; Mansoor et al., 2012). Como consecuencia, la aplicación de factores neurotróficos en el tejido lesionado puede resultar en efectos beneficiosos a diferentes niveles. En un estudio reciente sobre la expresión génica en el BO después de la destrucción química del EO con metilmazol, Uranagase et al. (2012) observaron que los niveles de expresión de diversos genes cambiaron drásticamente como consecuencia del tratamiento químico. Entre ellos, la expresión del ARNm de BDNF se incrementó marcadamente en el EO durante el período de regeneración, pero se observó una disminución en la expresión de BDNF a nivel BO. En consecuencia, sugirieron que BDNF en el EO contribuye a las primeras etapas de la regeneración del epitelio y más tarde en el cableado preciso en el BO.

En conclusión, nuestros resultados proporcionan evidencias de la presencia de BDNF tanto en las células SUS como en células progenitoras neurales basales del EO, y el efecto de esta neurotrofina sobre la proliferación neuronal. Hemos demostrado que el gen BDNF se expresa tanto en el BO como en EO, en condiciones normales y durante el proceso de regeneración inducida por tratamiento con sulfato de zinc. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar el papel específico de BDNF en la diferenciación neuronal del EO y BO.

Conclusión

Conclusión

Es este trabajo de tesis hemos encontrado una relación entre la vía de activación de Wnt/β-catenina con la expresión de Sox2 en precursores neurales, y su implicancia en la diferenciación neuronal del EO de *X. laevis*. Por otro lado, pudimos describir a las células SUS como fuente principal de BDNF en el EO en condiones fisiológicas normales; mientras que durante la regeneración neural, BDNF es producido por células basales. Por lo tanto, BDNF tendría un rol importante como factor trófico en el mantenimiento y la regeneración neural del EO.

No obstante, permanece sin ser dilucidada la presencia de distintos tipos de precursores neurales multipotentes como las HBC y GBC en el EO de *X. laevis*. Más estudios son necesarios para aportar a esta cuestión. Por otro lado, continuamos el estudio de las vías de señalización de Wnt presentes en el EO, y se pretende estudiar la identidad de los ligandos de Wnt que estarían implicados en la expresión de Sox2 y la diferenciación neuronal, tanto en condiciones normales como durante la regeneración.

En este contexto, el EO de *X. laevis* provee un sistema excelente para el estudio de diferenciación de los distintos linajes neurales, ya sea en un escenario de condiciones fisiológicas normales, que implica un equilibrio de renovación neural, o bien durante una importante actividad regenerativa del tejido. Además, el EO es una importante fuente de células madre para ser

usada en el transplante autologo y la reparación de tejido nervioso, por lo que una mayor caracterización de las NSC y los factores involucrados podrían ser utilizados para estudios clínicos en este campo.

Referencias bibliográficas

Referencias Bibliográficas

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J 16(13):3797-3804.

Aberle H, Schwartz H, Kemler R. 1996. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. J Cell Biochem 61(4):514-523.

Adachi N, Kohara K, Tsumoto T. 2005. Difference in trafficking of brain-derived neurotrophic factor between axons and dendrites of cortical neurons, revealed by live-cell imaging. BMC Neurosci 6:42.

Agathocleous M, Iordanova I, Willardsen MI, Xue XY, Vetter ML, Harris WA, Moore KB. 2009. A directional Wnt/beta-catenin-Sox2-proneural pathway regulates the transition from proliferation to differentiation in the Xenopus retina. Development 136(19):3289-3299.

Alvarez-Buylla A, Lim DA. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron 41(5):683-686.

Barker N. 2008. The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway. Methods Mol Biol 468:5-15.

Barker N, Clevers H. 2006. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov 5(12):997-1014.

Beites CL, Kawauchi S, Crocker CE, Calof AL. 2005. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. Exp Cell Res 306(2):309-316.

Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. Nat Rev Neurosci 3(7):517-530.

Berwick DC, Harvey K. 2013. LRRK2: an eminence grise of Wnt-mediated neurogenesis? Front Cell Neurosci 7:82.

Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 122(6):947-956.

Brann JH, Firestein SJ. 2014. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. Front Neurosci 8:182.

Brault V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, Sommer L, Boussadia O, Kemler R. 2001. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. Development 128(8):1253-1264.

Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. 2006. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. Curr Opin Genet Dev 16(1):51-59.

Buckland ME, Cunningham AM. 1999. Alterations in expression of the neurotrophic factors glial cell line-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor, in the target-deprived olfactory neuroepithelium. Neuroscience 90(1):333-347.

Buescher M, Hing FS, Chia W. 2002. Formation of neuroblasts in the embryonic central nervous system of Drosophila melanogaster is controlled by SoxNeuro. Development 129(18):4193-4203.

Bylund M, Andersson E, Novitch BG, Muhr J. 2003. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. Nat Neurosci 6(11):1162-1168.

Cadigan KM, Liu YI. 2006. Wnt signaling: complexity at the surface. J Cell Sci 119(Pt 3):395-402.

Calof AL, Bonnin A, Crocker C, Kawauchi S, Murray RC, Shou J, Wu HH. 2002. Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. Microsc Res Tech 58(3):176-188.

Calof AL, Chikaraishi DM. 1989. Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro. Neuron 3(1):115-127.

Calof AL, Rim PC, Askins KJ, Mumm JS, Gordon MK, Iannuzzelli P, Shou J. 1998. Factors Regulating Neurogenesis and Programmed Cell Death in Mouse Olfactory Epitheliuma. Annals of the New York Academy of Sciences 855(1):226-229.

Cao L, Dhilla A, Mukai J, Blazeski R, Lodovichi C, Mason CA, Gogos JA. 2007. Genetic modulation of BDNF signaling affects the outcome of axonal competition in vivo. Curr Biol 17(11):911-921.

Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ. 2004. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. J Neurosci 24(25):5670-5683.

Cavallaro M, Mariani J, Lancini C, Latorre E, Caccia R, Gullo F, Valotta M, DeBiasi S, Spinardi L, Ronchi A, Wanke E, Brunelli S, Favaro R, Ottolenghi S, Nicolis SK. 2008. Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. Development 135(3):541-557.

Cimmino F, Scoppettuolo MN, Carotenuto M, De Antonellis P, Dato VD, De Vita G, Zollo M. 2011. Norcantharidin impairs medulloblastoma growth by inhibition of Wnt/beta-catenin signaling. J Neurooncol 106(1):59-70.

Clevenger AC, Salcedo E, Jones KR, Restrepo D. 2008. BDNF Promoter-Mediated Beta-Galactosidase Expression in the Olfactory Epithelium and Bulb. Chemical Senses 33(6):531-539.

Clevers H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell 127(3):469-480.

Cong F, Varmus H. 2004. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. Proc Natl Acad Sci U S A 101(9):2882-2887.

Coudreuse D, Korswagen HC. 2007. The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. Development 134(1):3-12.

Coyle-Rink J, Del Valle L, Sweet T, Khalili K, Amini S. 2002. Developmental expression of Wnt signaling factors in mouse brain. Cancer Biol Ther 1(6):640-645.

Cremazy F, Berta P, Girard F. 2000. Sox neuro, a new Drosophila Sox gene expressed in the developing central nervous system. Mech Dev 93(1-2):215-219.

Chao MV. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. Nat Rev Neurosci 4(4):299-309.

Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP. 2003. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. Dev Biol 258(2):319-333.

Chenn A, Walsh CA. 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. Science 297(5580):365-369.

Chuang KA, Lieu CH, Tsai WJ, Wu MH, Chen YC, Liao JF, Wang CC, Kuo YC. 2010. Evaluation of anti-Wnt/Beta-catenin signaling agents by pGL4-TOP transfected stable cells with a luciferase reporter system. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 43:931-941.

Danielian PS, McMahon AP. 1996. Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. Nature 383(6598):332-334.

Daniels DL, Weis WI. 2005. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. Nat Struct Mol Biol 12(4):364-371.

De Ferrari GV, Inestrosa NC. 2000. Wnt signaling function in Alzheimer's disease. Brain Res Brain Res Rev 33(1):1-12.

De Ferrari GV, Moon RT. 2006. The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders. Oncogene 25(57):7545-7553.

Deardorff MA, Klein PS. 1999. Xenopus frizzled-2 is expressed highly in the developing eye, otic vesicle and somites. Mech Dev 87(1-2):229-233.

DeHamer MK, Guevara JL, Hannon K, Olwin BB, Calof AL. 1994. Genesis of olfactory receptor neurons in vitro: regulation of progenitor cell divisions by fibroblast growth factors. Neuron 13(5):1083-1097.

Denayer T, Van Roy F, Vleminckx K. 2006. In vivo tracing of canonical Wnt signaling in Xenopus tadpoles by means of an inducible transgenic reporter tool. FEBS Lett 580(2):393-398.

Ding S, Wu TY, Brinker A, Peters EC, Hur W, Gray NS, Schultz PG. 2003. Synthetic small molecules that control stem cell fate. Proc Natl Acad Sci U S A 100(13):7632-7637.

Doe CQ. 2008. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. Development 135(9):1575-1587.

Doetsch F. 2003. The glial identity of neural stem cells. Nat Neurosci 6(11):1127-1134.

Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. 2008. Development of neural stem cell in the adult brain. Curr Opin Neurobiol 18(1):108-115.

Duggan CD, Ngai J. 2007. Scent of a stem cell. Nat Neurosci 10(6):673-674.

Feron F, Bianco J, Ferguson I, Mackay-Sim A. 2008. Neurotrophin expression in the adult olfactory epithelium. Brain Res 1196:13-21.

Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S, Nicolis SK. 2004. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. Development 131(15):3805-3819.

Fletcher RB, Prasol MS, Estrada J, Baudhuin A, Vranizan K, Choi YG, Ngai J. 2011. p63 regulates olfactory stem cell self-renewal and differentiation. Neuron 72(5):748-759.

Gascon E, Vutskits L, Zhang H, Barral-Moran MJ, Kiss PJ, Mas C, Kiss JZ. 2005. Sequential activation of p75 and TrkB is involved in dendritic development of subventricular zone-derived neuronal progenitors in vitro. Eur J Neurosci 21(1):69-80.

Gascuel J, Amano T. 2013. Exotic models may offer unique opportunities to decipher specific scientific question: the case of Xenopus olfactory system. Anat Rec (Hoboken) 296(9):1453-1461.

Gilland E, Miller AL, Karplus E, Baker R, Webb SE. 1999. Imaging of multicellular large-scale rhythmic calcium waves during zebrafish gastrulation. Proc Natl Acad Sci U S A 96(1):157-161.

Gonzalez-Sancho JM, Brennan KR, Castelo-Soccio LA, Brown AM. 2004. Wnt proteins induce dishevelled phosphorylation via an LRP5/6- independent mechanism, irrespective of their ability to stabilize beta-catenin. Mol Cell Biol 24(11):4757-4768.

Gordon MK, Mumm JS, Davis RA, Holcomb JD, Calof AL. 1995. Dynamics of MASH1 expression in vitro and in vivo suggest a non-stem cell site of MASH1 action in the olfactory receptor neuron lineage. Mol Cell Neurosci 6(4):363-379.

Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. Neuron 39(5):749-765.

Graziadei GA, Graziadei PP. 1979. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. J Neurocytol 8(2):197-213.

Graziadei PP, DeHan RS. 1973. Neuronal regeneration in frog olfactory system. J Cell Biol 59(2 Pt 1):525-530.

Guillemot F. 2007. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. Development 134(21):3771-3780.

Guo Z, Packard A, Krolewski RC, Harris MT, Manglapus GL, Schwob JE. 2010. Expression of pax6 and sox2 in adult olfactory epithelium. J Comp Neurol 518(21):4395-4418.

Hansen A, Reiss JO, Gentry CL, Burd GD. 1998. Ultrastructure of the olfactory organ in the clawed frog, Xenopus laevis, during larval development and metamorphosis. The Journal of Comparative Neurology 398(2):273-288.

Harland R, Gerhart J. 1997. Formation and function of Spemann's organizer. Annu Rev Cell Dev Biol 13:611-667.

Hassenklover T, Schwartz P, Schild D, Manzini I. 2009. Purinergic signaling regulates cell proliferation of olfactory epithelium progenitors. Stem Cells 27(8):2022-2031.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science 281(5382):1509-1512.

Heer T, Yovanovich CA, Pozzi AG, Paz DA. 2008. Galanin: presence and distribution in the brain and pituitary of Rhinella arenarum (Amphibia: Anura) during development. Tissue Cell 40(5):333-342.

Herzog C, Otto T. 1999. Regeneration of olfactory receptor neurons following chemical lesion: time course and enhancement with growth factor administration. Brain Research 849(1â€“2):155-161.

Higgs DM, Burd GD. 1999. The role of the brain in metamorphosis of the olfactory epithelium in the frog, Xenopus laevis. Brain Res Dev Brain Res 118(1-2):185-195.

Hsieh CH, Chao KS, Liao HF, Chen YJ. 2013. Norcantharidin, derivative of cantharidin, for cancer stem cells. Evid Based Complement Alternat Med 2013:838651.

Huang EJ, Reichardt LF. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. Annu Rev Neurosci 24:677-736.

Huang H, He X. 2008. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. Curr Opin Cell Biol 20(2):119-125.

Huard JM, Schwob JE. 1995. Cell cycle of globose basal cells in rat olfactory epithelium. Dev Dyn 203(1):17-26.

Hubrecht L, Nieuwkoop PD, Faber J. 1975. Normal table of Xenopus laevis (Daudin).: A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis: North-Holland Pub. Co.

Inestrosa NC, Alvarez A, Godoy J, Reyes A, De Ferrari GV. 2000. Acetylcholinesterase-amyloid-beta-peptide interaction and Wnt signaling involvement in Abeta neurotoxicity. Acta Neurol Scand Suppl 176:53-59.

Isoyama K, Nagata H, Shino Y, Isegawa N, Arimoto Y, Koda M, Kumahara K, Okamoto Y, Shirasawa H. 2004. Effects of adenoviral vector-mediated BDNF expression on the bulbectomy-induced apoptosis of olfactory receptor neurons. Brain Res Mol Brain Res 129(1-2):88-95.

Iwai N, Zhou Z, Roop DR, Behringer RR. 2008. Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. Stem Cells 26(5):1298-1306.

James RG, Conrad WH, Moon RT. 2008. Beta-catenin-independent Wnt pathways: signals, core proteins, and effectors. Methods Mol Biol 468:131-144.

Jang W, Youngentob SL, Schwob JE. 2003. Globose basal cells are required for reconstitution of olfactory epithelium after methyl bromide lesion. J Comp Neurol 460(1):123-140.

Jia C, Doherty JP, Crudgington S, Hegg CC. 2009. Activation of purinergic receptors induces proliferation and neuronal differentiation in Swiss Webster mouse olfactory epithelium. Neuroscience 163(1):120-128.

Jungblut LD, Pozzi AG, Paz DA. 2012. A putative functional vomeronasal system in anuran tadpoles. J Anat 221(4):364-372.

Kaslin J, Ganz J, Brand M. 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 363(1489):101-122.

Kawauchi S, Beites CL, Crocker CE, Wu HH, Bonnin A, Murray R, Calof AL. 2004. Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium. Dev Neurosci 26(2-4):166-180.

Kishi M, Mizuseki K, Sasai N, Yamazaki H, Shiota K, Nakanishi S, Sasai Y. 2000. Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early Xenopus neuroectoderm. Development 127(4):791-800.

Kohn AD, Moon RT. 2005. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. Cell Calcium 38(3-4):439-446.

Komiya Y, Habas R. 2008. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis 4(2):68-75.

Kramer BM, Cruijsen PM, Ouwens DT, Coolen MW, Martens GJ, Roubos EW, Jenks BG. 2002. Evidence that brain-derived neurotrophic factor acts as an autocrine factor on pituitary melanotrope cells of Xenopus laevis. Endocrinology 143(4):1337-1345.

Kuhl M, Pandur P. 2008. Measuring CamKII activity in Xenopus embryos as a read-out for non-canonical Wnt signaling. Methods Mol Biol 468:173-186.

Kuroda H, Wessely O, De Robertis EM. 2004. Neural induction in Xenopus: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus. PLoS Biol 2(5):E92.

Lanave C, Colangelo AM, Saccone C, Alberghina L. 2007. Molecular evolution of the neurotrophin family members and their Trk receptors. Gene 394(1-2):1-12.

Lee JE, Wu SF, Goering LM, Dorsky RI. 2006. Canonical Wnt signaling through Lef1 is required for hypothalamic neurogenesis. Development 133(22):4451-4461.

Lei L, Parada LF. 2007. Transcriptional regulation of Trk family neurotrophin receptors. Cell Mol Life Sci 64(5):522-532.

Leung CT, Coulombe PA, Reed RR. 2007. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. Nat Neurosci 10(6):720-726.

Lewin GR, Barde YA. 1996. Physiology of the neurotrophins. Annu Rev Neurosci 19:289-317.

Li L, Yuan H, Xie W, Mao J, Caruso AM, McMahon A, Sussman DJ, Wu D. 1999. Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. J Biol Chem 274(1):129-134.

Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH. 2005. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. Nature 437(7063):1370-1375.

Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. 2004. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 44:399-421.

Lindsay SL, Riddell JS, Barnett SC. 2010. Olfactory mucosa for transplant-mediated repair: A complex tissue for a complex injury? Glia 58(2):125-134.

Logan A, Ahmed Z, Baird A, Gonzalez AM, Berry M. 2006. Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury. Brain 129(Pt 2):490-502.

Logan CY, Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 20:781-810.

Lovestone S, Killick R, Di Forti M, Murray R. 2007. Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder. Trends Neurosci 30(4):142-149.

Mackay-Sim A, Kittel P. 1991. Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. J Neurosci 11(4):979-984.

Mackay-Sima A, Chuahb MI. 2000. Neurotrophic factors in the primary olfactory pathway. Prog Neurobiol 62(5):527-559.

Malaterre J, Ramsay RG, Mantamadiotis T. 2007. Wnt-Frizzled signalling and the many paths to neural development and adult brain homeostasis. Front Biosci 12:492-506.

Mansoor AK, Thomas S, Sinha JK, Alladi PA, Ravi V, Raju TR. 2012. Olfactory tract transection reveals robust tissue-level plasticity by cellular numbers and neurotrophic factor expression in olfactory bulb. Indian J Exp Biol 50(11):765-770.

Manzini I, Heermann S, Czesnik D, Brase C, Schild D, Rössler W. 2007. Presynaptic protein distribution and odour mapping in glomeruli of the olfactory bulb of Xenopus laevis tadpoles. European Journal of Neuroscience 26(4):925-934.

Manzini I, Schild D. 2010. Olfactory Coding in Larvae of the African Clawed Frog Xenopus laevis. In: Menini A, editor. The Neurobiology of Olfaction. 2011/09/02 ed: Boca Raton (FL): CRC Press.

Margolis FL. 1982. Olfactory marker protein (OMP). Scand J Immunol Suppl 9:181-199.

Marlow F, Topczewski J, Sepich D, Solnica-Krezel L. 2002. Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. Curr Biol 12(11):876-884.

McMahon AP. 1993. Cell signalling in induction and anterior-posterior patterning of the vertebrate central nervous system. Curr Opin Neurobiol 3(1):4-7.

McMahon AP, Bradley A. 1990. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. Cell 62(6):1073-1085.

McMahon AP, Moon RT. 1989. Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in Xenopus embryos leads to duplication of the embryonic axis. Cell 58(6):1075-1084.

Megason SG, McMahon AP. 2002. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. Development 129(9):2087-2098.

Michaelidis T, Lie DC. 2008. Wnt signaling and neural stem cells: caught in the Wnt web. Cell and Tissue Research 331(1):193-210.

Miller JR. 2002. The Wnts. Genome Biol 3(1):REVIEWS3001.

Mizuseki K, Kishi M, Matsui M, Nakanishi S, Sasai Y. 1998. Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. Development 125(4):579-587.

Mlodzik M. 2002. Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate Drosophila tissue polarity and vertebrate gastrulation? Trends Genet 18(11):564-571.

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. 2004. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. Nat Rev Genet 5(9):691-701.

Morrison GM, Brickman JM. 2006. Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. Development 133(10):2011-2022.

Mulligan K, Cheyette BR. 2012. Wnt Signaling in Vertebrate Neural Development and Function. Journal of Neuroimmune Pharmacology 7(4):774-787.

Murdoch B, Roskams AJ. 2007. Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology. Journal of molecular histology 38(6):581-599.

Murray RC, Calof AL. 1999. Neuronal regeneration: lessons from the olfactory system. Semin Cell Dev Biol 10(4):421-431.

Nelson WJ, Nusse R. 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. Science 303(5663):1483-1487.

Newman MP, Feron F, Mackay-Sim A. 2000. Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. Neuroscience 99(2):343-350.

Nezlin LP, Heermann S, Schild D, Rossler W. 2003. Organization of glomeruli in the main olfactory bulb of Xenopus laevis tadpoles. J Comp Neurol 464(3):257-268.

Nezlin LP, Schild D. 2000. Structure of the olfactory bulb in tadpoles of Xenopus laevis. Cell Tissue Res 302(1):21-29.

Nusse R. 2001. An ancient cluster of Wnt paralogues. Trends Genet 17(8):443.

Nusse R, Varmus HE. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell 31(1):99-109.

Overton PM, Meadows LA, Urban J, Russell S. 2002. Evidence for differential and redundant function of the Sox genes Dichaete and SoxN during CNS development in Drosophila. Development 129(18):4219-4228.

Pevny LH, Nicolis SK. 2010. Sox2 roles in neural stem cells. Int J Biochem Cell Biol 42(3):421-424.

Phillips HS, Hains JM, Laramee GR, Rosenthal A, Winslow JW. 1990. Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. Science 250(4978):290-294.

Polakis P. 2007. The many ways of Wnt in cancer. Curr Opin Genet Dev 17(1):45-51.

Pozzi AG, Yovanovich CA, Jungblut L, Heer T, Paz DA. 2006. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1 in the amphibian developing principal and accessory olfactory system. Anat Embryol (Berl) 211(5):549-557.

Prasad BC, Reed RR. 1999. Chemosensation: molecular mechanisms in worms and mammals. Trends Genet 15(4):150-153.

Qu Q, Sun G, Li W, Yang S, Ye P, Zhao C, Yu RT, Gage FH, Evans RM, Shi Y. 2010. Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. Nat Cell Biol 12(1):31-40; sup pp 31-39.

Quesseveur G, David DJ, Gaillard MC, Pla P, Wu MV, Nguyen HT, Nicolas V, Auregan G, David I, Dranovsky A, Hantraye P, Hen R, Gardier AM, Deglon N, Guiard BP. 2013. BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. Transl Psychiatry 3:e253.

Quick QA, Serrano EE. 2007. Cell proliferation during the early compartmentalization of the Xenopus laevis inner ear. Int J Dev Biol 51(3):201-209.

Reiss JO, Burd GD. 1997. Cellular and molecular interactions in the development of theXenopusolfactory system. Seminars in Cell & Developmental Biology 8(2):171-179.

Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. 1987. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. Cell 50(4):649-657.

Rodriguez-Gil DJ, Greer CA. 2008. Wnt/Frizzled family members mediate olfactory sensory neuron axon extension. J Comp Neurol 511(3):301-317.

Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de Wetering M, Destree O, Clevers H. 1998. The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. Nature 395(6702):608-612.

Rosin-Arbesfeld R, Townsley F, Bienz M. 2000. The APC tumour suppressor has a nuclear export function. Nature 406(6799):1009-1012.

Roskams AJ, Bethel MA, Hurt KJ, Ronnett GV. 1996. Sequential expression of Trks A, B, and C in the regenerating olfactory neuroepithelium. J Neurosci 16(4):1294-1307.

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. 1993. Association of the APC gene product with beta-catenin. Science 262(5140):1731-1734.

Ryerson WG, Deban SM. Buccal pumping mechanics of Xenopus laevis tadpoles: effects of biotic and abiotic factors. J Exp Biol 213(Pt 14):2444-2452.

Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, Mikoshiba K. 2002. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos. Nature 417(6886):295-299.

Sasai Y. 2001. Roles of Sox factors in neural determination: conserved signaling in evolution? Int J Dev Biol 45(1):321-326.

Scholzke MN, Schwaninger M. 2007. Transcriptional regulation of neurogenesis: potential mechanisms in cerebral ischemia. J Mol Med (Berl) 85(6):577-588.

Schwob JE. 2002. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. The Anatomical Record 269(1):33-49.

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Chretien M, Murphy RA. 1996. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. FEBS Lett 379(3):247-250.

Seifert JR, Mlodzik M. 2007. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. Nat Rev Genet 8(2):126-138.

Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kuhl M, Moon RT. 2003. Dishevelled activates Ca2+ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. J Cell Biol 161(4):769-777.

Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 96(10):5522-5527.

Simpson PJ, Miller I, Moon C, Hanlon AL, Liebl DJ, Ronnett GV. 2002. Atrial natriuretic peptide type C induces a cell-cycle switch from proliferation to differentiation in brain-derived neurotrophic factor- or nerve growth factor-primed olfactory receptor neurons. J Neurosci 22(13):5536-5551.

Simpson PJ, Moon C, Kleman AM, Connolly EL, Ronnett GV. 2007. Progressive and Inhibitory Cell Cycle Proteins Act Simultaneously to Regulate Neurotrophin-mediated Proliferation and Maturation of Neuronal Precursors. Cell Cycle 6(9):1077-1089.

Sive HL, Grainger RM, Harland RM. 2000. Early Development of Xenopus Laevis: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Smart IH. 1971. Location and orientation of mitotic figures in the developing mouse olfactory epithelium. J Anat 109(Pt 2):243-251.

Stadeli R, Hoffmans R, Basler K. 2006. Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. Curr Biol 16(10):R378-385.

Suter U, Heymach JV, Jr., Shooter EM. 1991. Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. EMBO J 10(9):2395-2400.

Suzuki Y, Takeda M, Farbman AI. 1996. Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy. J Comp Neurol 376(4):509-517.

Takami S, Hasegawa R, Nishiyama F. 2005. The roles of brain-derived neurotrophic factor in the development of nasal chemoreceptor neurons. Chem Senses 30 Suppl 1:i121-122.

Takeda J, Seino S, Bell GI. 1992. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. Nucleic Acids Research 20(17):4613-4620.

Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. Nature 407(6803):530-535.

Taniguchi K, Toshima Y, Saito TR. 1996. Development of the olfactory epithelium and vomeronasal organ in the Japanese reddish frog, Rana japonica. J Vet Med Sci 58(1):7-15.

Tetsu O, McCormick F. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature 398(6726):422-426.

Theil T, Alvarez-Bolado G, Walter A, Ruther U. 1999. Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development. Development 126(16):3561-3571.

Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC. 2008. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. Prog Neurobiol 86(3):281-296.

Tozaki H, Tanaka S, Hirata T. 2004. Theoretical consideration of olfactory axon projection with an activity-dependent neural network model. Mol Cell Neurosci 26(4):503-517.

Uchikawa M, Ishida Y, Takemoto T, Kamachi Y, Kondoh H. 2003. Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. Dev Cell 4(4):509-519.

Uranagase A, Katsunuma S, Doi K, Nibu K. 2012. BDNF expression in olfactory bulb and epithelium during regeneration of olfactory epithelium. Neurosci Lett 516(1):45-49.

van de Water S, van de Wetering M, Joore J, Esseling J, Bink R, Clevers H, Zivkovic D. 2001. Ectopic Wnt signal determines the eyeless phenotype of zebrafish masterblind mutant. Development 128(20):3877-3888.

Van Raay TJ, Moore KB, Iordanova I, Steele M, Jamrich M, Harris WA, Vetter ML. 2005. Frizzled 5 Signaling Governs the Neural Potential of Progenitors in the Developing Xenopus Retina. Neuron 46(1):23-36.

Van Raay TJ, Vetter ML. 2004. Wnt/frizzled signaling during vertebrate retinal development. Dev Neurosci 26(5-6):352-358.

Verhaagen J, Oestreicher AB, Grillo M, Khew-Goodall YS, Gispen WH, Margolis FL. 1990. Neuroplasticity in the olfactory system: differential effects of central and peripheral lesions of the primary olfactory pathway on the expression of B-50/GAP43 and the olfactory marker protein. J Neurosci Res 26(1):31-44.

Wallingford JB, Ewald AJ, Harland RM, Fraser SE. 2001. Calcium signaling during convergent extension in Xenopus. Curr Biol 11(9):652-661.

Wallingford JB, Habas R. 2005. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. Development 132(20):4421-4436.

Wang Y, Nathans J. 2007. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. Development 134(4):647-658.

Wang YZ, Molotkov A, Song L, Li Y, Pleasure DE, Zhou CJ. 2008. Activation of the Wnt/beta-catenin signaling reporter in developing mouse olfactory nerve layer marks a specialized subgroup of olfactory ensheathing cells. Dev Dyn 237(11):3157-3168.

Wang YZ, Plane JM, Jiang P, Zhou CJ, Deng W. 2011a. Concise review: Quiescent and active states of endogenous adult neural stem cells: identification and characterization. Stem Cells 29(6):907-912.

Wang YZ, Yamagami T, Gan Q, Wang Y, Zhao T, Hamad S, Lott P, Schnittke N, Schwob JE, Zhou CJ. 2011b. Canonical Wnt signaling promotes the proliferation and neurogenesis of peripheral olfactory stem cells during postnatal development and adult regeneration. J Cell Sci 124(Pt 9):1553-1563.

Weiser DC, Pyati UJ, Kimelman D. 2007. Gravin regulates mesodermal cell behavior changes required for axis elongation during zebrafish gastrulation. Genes Dev 21(12):1559-1571.

Willert K, Jones KA. 2006. Wnt signaling: is the party in the nucleus? Genes Dev 20(11):1394-1404.

Willert K, Nusse R. 1998. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. Curr Opin Genet Dev 8(1):95-102.

Williams SK, Franklin RJM, Barnett SC. 2004. Response of olfactory ensheathing cells to the degeneration and regeneration of the peripheral olfactory system and the involvement of the neuregulins. The Journal of Comparative Neurology 470(1):50-62.

Wolda SL, Moody CJ, Moon RT. 1993. Overlapping expression of Xwnt-3A and Xwnt-1 in neural tissue of Xenopus laevis embryos. Dev Biol 155(1):46-57.

Wu HH, Ivkovic S, Murray RC, Jaramillo S, Lyons KM, Johnson JE, Calof AL. 2003. Autoregulation of neurogenesis by GDF11. Neuron 37(2):197-207.

Yasuno H, Fukazawa K, Fukuoka T, Kondo E, Sakagami M, Noguchi K. 2000. Nerve growth factor applied onto the olfactory epithelium alleviates degenerative changes of the olfactory receptor neurons following axotomy. Brain Res 887(1):53-62.

Yovanovich CA, Jungblut LD, Heer T, Pozzi AG, Paz DA. 2009. Amphibian larvae and zinc sulphate: a suitable model to study the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the neuronal turnover of the olfactory epithelium. Cell Tissue Res 336(1):1-9.

Yu TT, McIntyre JC, Bose SC, Hardin D, Owen MC, McClintock TS. 2005. Differentially expressed transcripts from phenotypically identified olfactory sensory neurons. J Comp Neurol 483(3):251-262.

Zaghetto AA, Paina S, Mantero S, Platonova N, Peretto P, Bovetti S, Puche A, Piccolo S, Merlo GR. 2007. Activation of the Wnt-beta catenin pathway in a cell population on the surface of the forebrain is essential for the establishment of olfactory axon connections. J Neurosci 27(36):9757-9768.

Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X. 2005. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. Nature 438(7069):873-877.

Zhang L, Xiang D, Hong Z, Zhang ZR. 2004. Studies on the liver targeting of norcantharindin microemulsion. Yao Xue Xue Bao 39(8):650-655.
Zhang L, Yang X, Yang S, Zhang J. 2011. The Wnt /beta-catenin signaling pathway in the adult neurogenesis. Eur J Neurosci 33(1):1-8.