



Trabajo de Fin de Grado:

Bases Moleculares y Celulares en el desarrollo del Cerebelo.

**Facultad de Farmacia de la Universidad Miguel Hernández,
Junio 2015.**

Modalidad TFG: Experimental.

Autora: Lidia Algara Soriano.

Tutor: Diego Echevarría Aza.

ÍNDICE.

1. Resumen	1
2. Introducción	1
2.1. Anatomía del cerebelo.....	2
2.2. Desarrollo embrionario del cerebelo y del tubo neural.....	4
2.2.1. Regionalización del tubo neural y origen del cerebelo.....	5
2.2.2. Regiones transversales (subdivisión anteroposterior).....	8
2.2.3. Morfogénesis secundaria del cerebelo.....	10
2.2.4. Origen de las poblaciones cerebelosas corticales.....	12
2.2.5. Mecanismos moleculares para la especificación del desarrollo del Cerebelo. El organizador ístmico.....	13
2.3. Funciones del Cerebelo.....	17
2.3.1. Funciones cognitivas del cerebelo.....	18
2.4. Objetivos.....	20
3. Materiales y métodos	20
3.1. Modelos animales.....	20
3.2. Obtención y procesamiento de embriones.....	22
3.2.1. Extracción y fijación de embriones.....	22
3.2.2. Inclusión y sección de embriones.....	23
3.3. Técnicas histológicas.....	23
3.3.1. Inmunohistoquímica en cortes de parafina.....	23
3.4. Montaje y microscopía.....	25
4. Resultados y Discusión	26
4.1. Análisis macroscópico.....	27
4.2. Análisis microscópico.....	29
5. Conclusiones	35

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

FGF8: factor de crecimiento de fibroblástico 8.

En1 y En2: factores de transcripción homeodominio de la familia Engrailed 1 y 2.

PCL: capa células de Purkinje.

MCL: capa externa o molecular.

GCL: capa granulosa.

VZ: zona ventricular.

RL: labio rómbico.

AP: anteroposterior.

DV: dorsoventral.

ANR: cresta neural anterior.

ZLI: zona limitans intratálámica.

ISO: organizador ístmico.

SHH: Sonic Hedgehog.

(*TGF*) $-\beta$: familia del factor de crecimiento.

PBS: buffer fosfato salino.

PFA: paraformaldehído.

KO-knockout.

BSA: albúmina de suero bovino.

OB: bulbo olfatorio.

D: dorsal.

V: ventral.

R: rostral.

C: caudal.

VC: cresil violeta.

Calb1- calbindina.

M: mesencéfalo.

IC: colículo inferior.

SC: colículo superior.

PT: pretectum.

Th: tálamo.

PrTh: pretálamo

Cx: corteza.

V: vermis.

Hy: hipotálamo

Ahy: hipotálamo anterior.

PHy: hipotálamo posterior.

AH: adenohipófisis.

NH: neurohipófisis.

Me: médula espinal.

Cb: cerebelo.

och: quiasma óptico.

ac: comisura anterior.

HC: hipocampo.

EP: epitálamo.

VL: ventrículo lateral.

Inf: infundíbulo.

chp: plexo coroideo.

Is: istmo.

pc: comisura posterior.

p: puente.

1. RESUMEN.

Numerosos estudios han demostrado que el mesencéfalo y el cerebelo se desarrollan a partir de una región del tubo neural limitante entre ambos. Esta región es un centro de señalización denominado organizador ístmico. Entre otros genes, el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) ha sido implicado como componente clave de la actividad de señalización para otros territorios.

En este Trabajo de Fin de Grado se ha estudiado la función de FGF8 en el desarrollo del istmo de ratón utilizando diferentes enfoques. Por un lado, se ha utilizado un enfoque de inactivación condicional de FGF8 en el istmo, utilizando mutantes knockout condicionales en los que FGF8 sólo está ausente en la región ístmica, y por otro lado, se han estudiado mutantes *Fgf8^{neo/neo}* en los que la cantidad de FGF8 se ha visto reducida hasta un 40% de la actividad normal en todo el encéfalo. En ambos mutantes se observó cambios drásticos en las estructuras mesencefálicas (colículo superior e inferior) y rombencefálicas (cerebelo), pudiendo así concluir que FGF8 forma parte de una compleja red reguladora de genes que es esencial para la supervivencia celular en la región del istmo.

2. INTRODUCCIÓN

El Sistema Nervioso es, junto con el Sistema Endocrino, el rector y coordinador de todas las actividades conscientes e inconscientes del organismo. Está formado por el sistema nervioso central o SNC (encéfalo y médula espinal) y los nervios (el conjunto de nervios es el sistema nervioso periférico o SNP). El Sistema Nervioso permite la relación entre nuestro cuerpo y el exterior, además regula y dirige el funcionamiento de todos los órganos del cuerpo.

Durante el desarrollo temprano del cerebro se produce una serie de combinaciones de factores de transcripción y moléculas secretadas al espacio extracelular, que actúan de forma orquestada para dar lugar a la morfología y función del cerebro como lo entendemos. La carencia de alguna de estas informaciones lleva consigo alteraciones que bien pueden ser sutiles o

importantes y que provocan que nuestro cerebro desencadene una serie de malfuncionamientos y neuropatologías que van desde crisis nerviosas esporádicas a epilepsias crónicas, trastornos bipolares, esquizofrenias, autismos, Parkinson o Alzheimer entre otras.

Es por tanto fundamental entender cómo se relacionan entre sí estas moléculas y qué importancia tienen durante las fases tempranas de desarrollo embrionario. Entre ellas, se encuentra el morfógeno FGF8 (factor de crecimiento fibroblástico 8), el cual tiene un papel fundamental en la especificación y desarrollo del tubo neural.

En concreto mi proyecto experimental de Trabajo de Fin de Grado se ha basado en entender el papel de este morfógeno en la región que divide el mesencéfalo y rombencéfalo, prestando más atención a la región dorsal rombencefálica que constituye el cerebelo.

El interés por este proyecto del estudio de la embriología experimental radica en la prevalencia de las enfermedades del SNC relacionadas con la alteración de movimientos y los procesos cognitivos, a la dificultad para tratar dichas enfermedades y al elevado coste que supone para la sociedad los medicamentos existentes para paliar la sintomatología de estas patologías.

Por ello, el estudio de cómo se desarrollan inicialmente el cerebro y de las moléculas que intervienen en este proceso es de gran importancia. El cerebelo se encuentra implicado en estos trastornos y es por tanto, la estructura elegida y de interés para este trabajo.

2.1. ANATOMÍA DEL CEREBELO.

El encéfalo está formado de rostral a caudal por las siguientes subdivisiones: prosencéfalo secundario, diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (ver Figura 1).

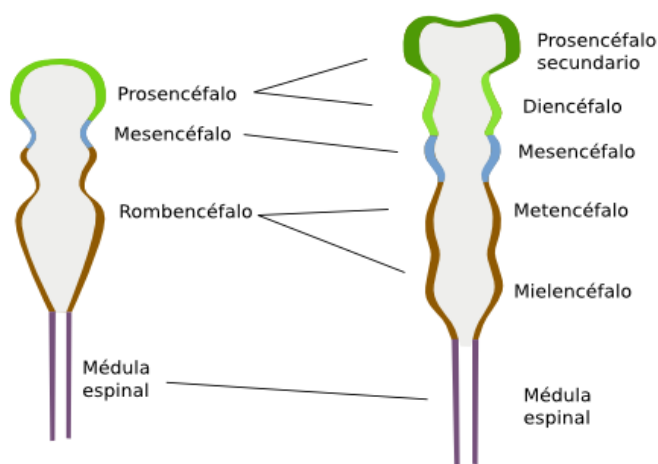


Figura 1. Formación de las vesículas encefálicas a partir del tubo neural rostral.

El rombencéfalo está formado por el **cerebelo** (objeto de estudio de este Trabajo de Fin de Grado), el puente y el bulbo raquídeo.

El cerebelo adulto es una estructura del sistema nervioso central que está localizada en la fosa craneal posterior y se encuentra cubierto en la parte superior por la tienda del cerebelo. Subyace al lóbulo occipital y temporal de la corteza cerebral. Es la parte más grande del rombencéfalo y ocupa una posición anterior al cuarto ventrículo, dorsal al puente (o protuberancia) y a la médula oblongada (o bulbo raquídeo). El cerebelo tiene forma oval y está constreñido en su parte media. Consiste en dos hemisferios cerebelosos unidos por el vermis estrecho y medial. Está conectado al tronco del encéfalo por pedúnculos cerebelosos (superiores, medios e inferiores) y está dividido en tres lóbulos principales: anterior, medio y floclonodular.

El cerebelo se compone de una cobertura externa de sustancia gris denominada corteza, y de sustancia blanca

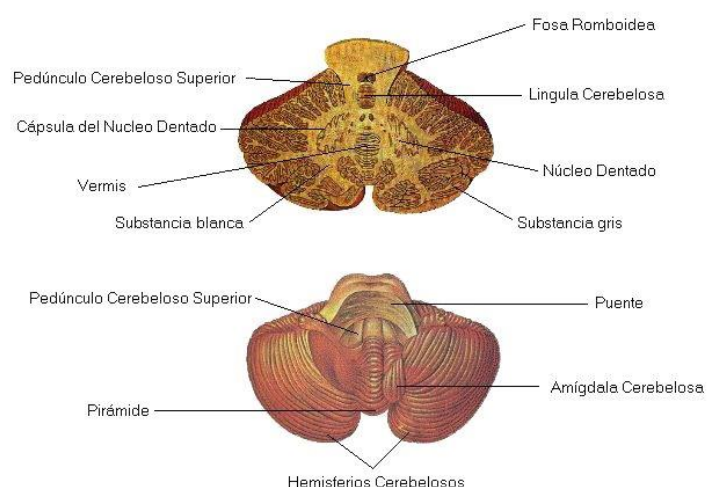


Figura 2. Anatomía exterior del cerebelo humano.

interna (ver figura 2). Incluidas en la sustancia blanca de cada hemisferio existen tres masas de sustancia gris que forman los núcleos profundos del cerebelo (de medial a lateral: núcleo del fastigio, globoso, emboliforme y dentado). La sustancia gris se puede dividir en tres capas: capa externa o molecular, capa media o de células de Purkinje y capa interna o granulosa.

Aunque el cerebelo representa aproximadamente el 10% del volumen del cerebro contiene más del 50% del número total de neuronas en el cerebro⁽¹⁾.

2.2. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL CEREBELO Y DEL TUBO NEURAL.

La organización del sistema nervioso central (SNC) en vertebrados surge de la acción concertada de señales morfogénicas durante la etapa de gastrulación temprana de los embriones en desarrollo. La gastrulación avanza rostrocaudalmente, mantenida por su centro proliferativo en el extremo anterior de la línea primitiva, nudo de Hensen, considerado como el organizador embrionario, ya que libera señales morfogénicas fundamentales para el destino que adoptarán los componentes de las tres hojillas embrionarias. En esta etapa el embrión consta de tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo.

Durante el proceso de neurulación se produce la elevación progresiva de las crestas neurales, formando primero un canal neural y luego llegando a cerrarse por adhesión y fusión de los dos bordes que se encuentran mutuamente en la línea media dorsal (ver figura 3). La neurulación debe culminar con la transformación del canal neural en un tubo neural completamente cerrado, ya que de lo contrario no resultará compatible con la vida, al quedar expuesto su interior a efectos tóxicos del líquido amniótico (existen anomalías congénitas

¹ Kandel E.R, Schwartz J.H, Jessell T.M. Principios de neurociencia. 4ª Edición. Madrid, España; Editorial McGraw-Hill; 2001.

por fallo de la neurulación, como la espina bífida o la anencefalia)⁽²⁾. Los bordes del canal neural elevados se encuentran y fusionan primero en una zona media, prospectivamente mesencefálica. Quedan por tanto zonas abiertas transitoriamente al exterior- por delante y por detrás- que son los neuroporos anterior y posterior, respectivamente. El cierre del tubo neural progresa en ambas direcciones hasta completarse, primero rostralmente (hacia el día 25 del desarrollo) y algo más tarde caudalmente.

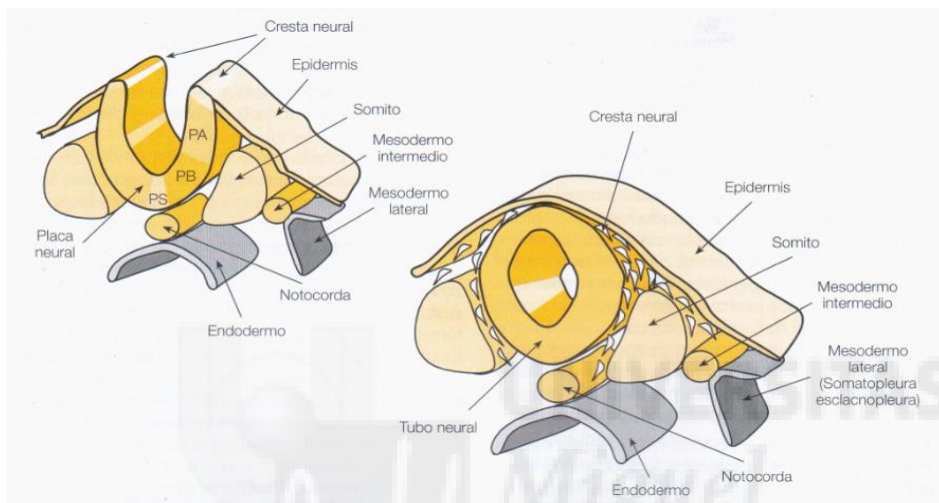


Figura 3. Neurulación: fases de canal y tubo neural⁽²⁾.

2.2.1. REGIONALIZACIÓN DEL TUBO NEURAL Y ORIGEN DEL CEREBELO.

La inducción de los diferentes territorios rostrocaudales del tubo neural lleva a una especificación génica diferencial de la identidad regional. Antes del cierre completo del neuroporo anterior aparecen ya las vesículas ópticas. Poco después de la primera aparición de las vesículas ópticas, se distinguen las tres vesículas primarias cerebrales:

1. El prosencéfalo primario, que comprende toda la porción anterior dilatada del tubo, incluyendo a las vesículas ópticas como divertículos laterales.
2. El mesencéfalo o vesícula intermedia.

² Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Neuroanatomía. Madrid, España; Editorial Médica Panamericana; 2008.

3. El **rombencéfalo** o región más caudal del encéfalo, que consta desde un principio de 3 vesiculaciones independientes, 2 hemisferios cerebelosos y una vesícula impar, el vermis (ver figura 1).

El avance de los procesos de crecimiento y especificación genética de las partes del tubo neural conduce a la subdivisión de las vesículas primarias en segmentos o neurómeros, particularmente en el prosencéfalo (prosómeros) y en el rombencéfalo (rombómeros).

En el rombencéfalo, los segmentos se denominan rombómeros (R) que desde la región anterior hacia la posterior se conocen como R0 (el istmo) y R1-R7, seguidos por los pseudorombómeros R8-R11. Los pseudorombómeros no están visiblemente delimitados, como ocurre con los rombómeros, pero comparten otras propiedades de delimitación molecular e histogénica con ellos. En estos elementos se producen poblaciones neuronales que aparecen de forma más o menos repetitiva en cada uno de ellos, lo cual nos indica la organización metamérica clara de esta parte del sistema nervioso central. Sin embargo, cada uno de estos rombómeros va a presentar un desarrollo propio y diferenciado de los restantes, debido a su particular identidad molecular. Este proceso de segmentación rombencefálica está regulado por la expresión de genes llamados *Hox* que codifican información posicional a lo largo del eje anteroposterior⁽³⁾.

El istmo y los rombómeros 1 y 2, darán lugar a la región prepontina o istmocerebelosa del tronco encefálico adulto (incluye al cerebelo, formado a partir de la placa cerebelosa dorsal en istmo, R1 y R2). Los rombómeros 3 y 4 formarán estrictamente la protuberancia o región pontina. Los últimos rombómeros R5-R7 y los pseudorombómeros formarán el bulbo raquídeo adulto⁽⁴⁾ (ver figura 4).

³ Le Douarin NM, Grapin-Botton A. Genetic control of rhombencephalon development by Hox genes studied in bird embryo by the quail-chick chimera method. C R Seances Soc Biol Fil. 1997; 191(1):29-42.

⁴ Marín F, Puelles L. Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. Eur J. Neurosci. 1995; 7(8): 1714-38.

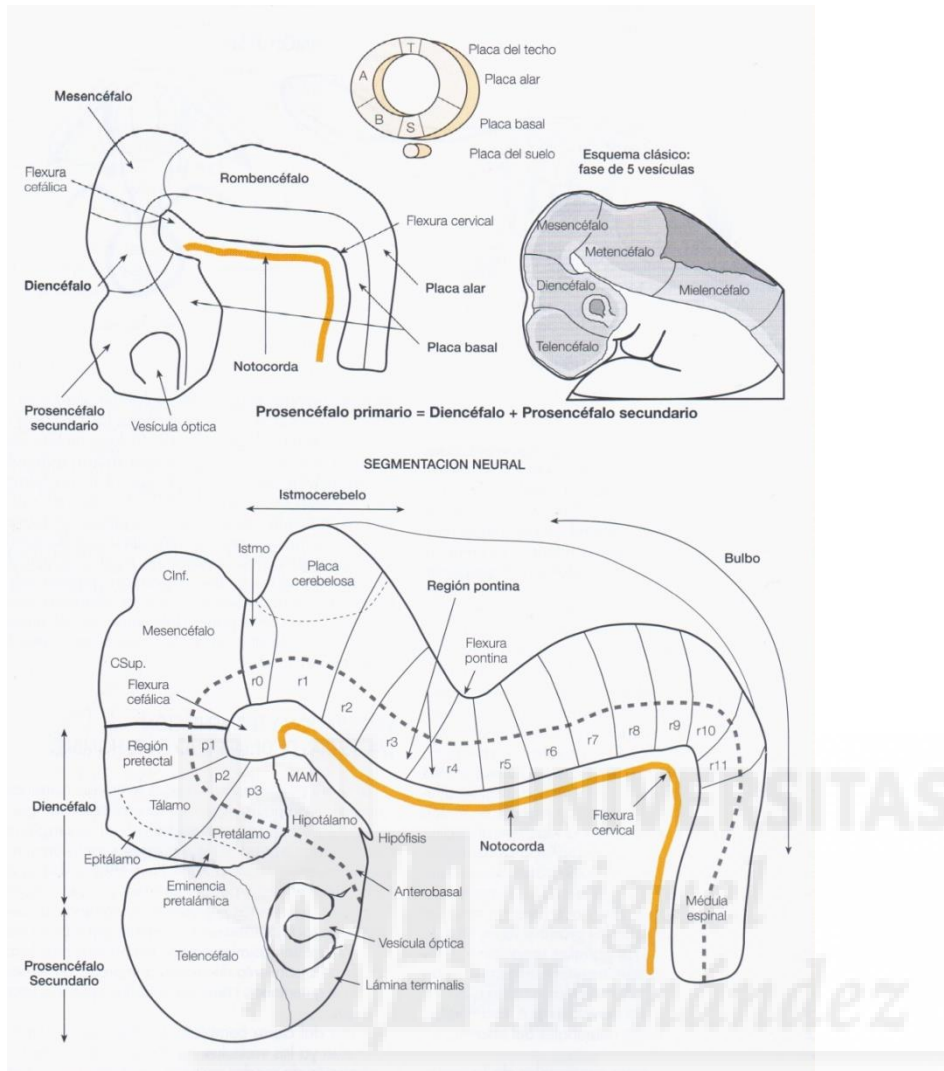


Figura 4. Flexuras cerebrales y partición dorsoventral y anteroposterior del encéfalo⁽²⁾.

Como hemos visto anteriormente, el cerebelo maduro se compone de dos hemisferios cerebelosos y el vermis situado entre estos hemisferios. El vermis es parte de la placa alar R0 y la placa del techo de R0 y R1, mientras que los hemisferios pertenecen a la placa alar R1⁽⁵⁾.

El límite topográfico entre el mesencéfalo y el rombencéfalo es la constricción ístmica o istmo. Co-localiza con el territorio ístmico prospectivo (R0), tal como se define desde el principio por la expresión de la molécula secretada conocida

⁵ Dastjerdi F.V, Consalez G.G, Hawkes R. Pattern formation during development of the embryonic cerebellum. *Front.Neuroanat.* 2012; 6 (10).

como **factor de crecimiento de fibroblasto 8** (*Fgf8*)⁽⁶⁾. Por otra parte, factores de transcripción homeodominio de la familia Engrailed *En1* y *En2* se expresan desde el principio en el neuroepitelio primordial del cerebelo y del mesencéfalo y ambos están implicados en la formación del tectum del mesencéfalo y el cerebelo⁽⁷⁾.

2.2.2. REGIONES TRANSVERSALES (SUBDIVISIÓN ANTEROPOSTERIOR)

La regionalización transversa o anteroposterior del neuroeje comienza temprano, desencadenada por el **organizador primario** y prosigue mediante la aparición de sucesivos organizadores secundarios y terciarios a nivel de las fronteras entre los territorios neuroepiteliales molecularmente contrastados que se van especificando. Así, la regionalización avanza por subdivisiones sucesivas de territorios iniciales más amplios, regulada por mecanismos de información posicional, señalización difusible, interacciones intercelulares y proliferación diferencial. Se explica así la aparición inicial de protovesículas que luego se subdividen en neurómeros⁽⁸⁾.

La progresiva caudalización de la placa neural puede seguirse a través de la expresión del gen *Otx2* (Figura 5), el cual codifica un destino neural rostral (prosencefalo y mesencefalo)⁽⁹⁾. En fases muy tempranas, este gen aparece expresado prácticamente en la totalidad de la placa neural. Más tarde, su dominio de expresión parece irse reduciendo progresivamente hacia delante, al especificarse y desarrollarse las porciones prospectivamente más caudales del neuroeje (rombencefalo y médula espinal), codificadas por la expresión de genes homeobox como *Gbx2* y la familia de los genes *Hox*³. Por tanto, las áreas de subdivisión anteroposterior de la placa neural más tempranas conocidas comprenden por un lado el bloque de prosencefalo y mesencefalo

⁶ Chi C.L, Martinez S, Wurst W, Martin G. R. The Isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum development. *Front.Neuroanat.* 2003; 130: 2633–44.

⁷ Shamim H, Mahmood R, Logan C, Doherty P, Lumsden A, Mason I. Sequential roles for *Fgf4*, *En1* and *Fgf8* in specification and regionalisation of the midbrain. *Development.* 1999; 126: 945–59.

⁸ Martínez S, Puellas E, Puellas L, Echevarría D (2012). Molecular regionalization of the developing neural tube in the mouse nervous system. *Front.Neuroanat.* 2012: 2–18.

⁹ Hidalgo-Sánchez M, Millet S, Bloch- Gallego E, Alvarado-Mallart R. M. Specification of the meso-isthmo-cerebellar region: the *Otx2/Gbx2* boundary. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005; 49(2):134-49.

prospectivos, y, por otro, el rombencéfalo y la médula espinal prospectivos (Figura 4).

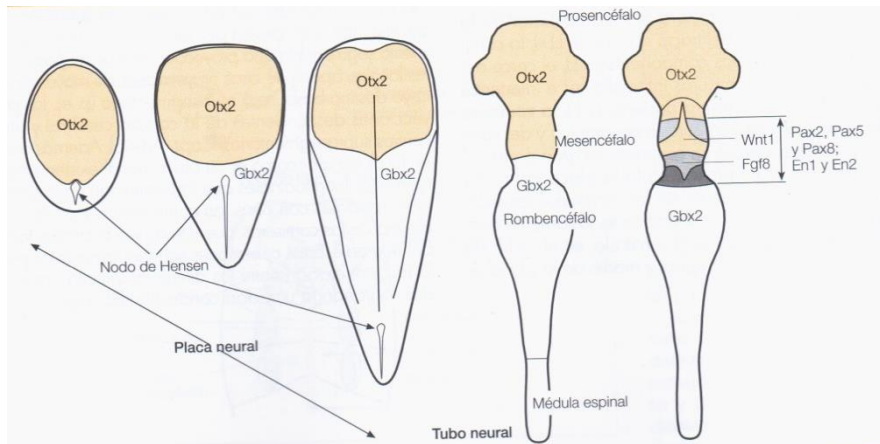


Figura 5. Aparición temprana de límites moleculares transversales en placa y tubo neural⁽²⁾.

Se piensa que el diálogo intercelular en la frontera entre los territorios iniciales *Otx2* y *Gbx2* positivos desencadena la aparición de un organizador neural secundario⁽¹⁰⁾, conocido como el **organizador ístmico** del que se hablará más adelante. La presencia continuada de estas diversas bandas de expresión génica a través de la neurulación y de la morfogénesis secundaria del tubo neural (aunque las bandas se van estrechando progresivamente) indica la permanencia de la actividad organizadora durante largo tiempo. Dicho organizador incluye fuentes de señales difusibles que pasarán a los territorios vecinos rostrales y caudales, afectando inductivamente su desarrollo ulterior. Estas señales se establecen de forma gradiental espaciotemporal, en correlación con la actividad proliferativa del organizador. El análisis de la secuencia de efectos inductivos iniciada por FGF8 indica que esta molécula en primer lugar desencadena la formación de un pequeño organizador ístmico ectópico (ver figura 6), el cual luego desarrolla su efecto habitual, crecimiento y determinación del destino histogénico según localización⁽⁶⁾.

¹⁰ Katahira T, Sato T, Sugiyama S, Okafuji T, Araki I, Funahashi J; et al. Interaction between *Otx2* and *Gbx2* defines the organizing center for the optic tectum. *Mech.Dev.* 2000; 91: 43–52.

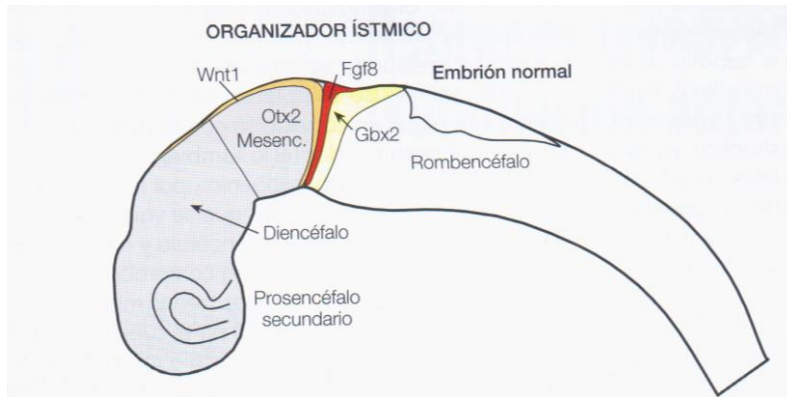


Figura 6. Estructura molecular del organizador ístmico⁽²⁾.

2.2.3. MORFOGÉNESIS SECUNDARIA DEL CEREBELO.

A partir de la forma segmentada del tubo neural se llega a la forma adulta del SNC. Uno de los motores básicos de estas transformaciones tardías es la progresiva restricción de la capacidad proliferativa del tubo neural a los territorios dorsales y, en menor medida, en ciertas regiones ventrales paramedianas. Como resultado general, las estructuras de origen dorsal crecen mucho más y llegan a formar una parte desproporcionadamente grande del cerebro adulto. El crecimiento tardío ventromedial produce gran parte del hipotálamo. A este efecto de proliferación diferencial se suma la migración tangencial de grandes poblaciones neuronales desde el labio róbico⁽¹¹⁾ (el borde dorsal de la pared neural del rombencéfalo, donde se inserta la tela coroidea), las cuales se desplazan activamente a varias posiciones secundarias en la región ventral del tubo neural, donde generan sendos relieves (núcleos pontinos, oliva bulbar). Finalmente, el crecimiento de grandes paquetes de fibras cerca de la superficie contribuye igualmente a moldear la forma final del cerebro. Se produce también el adelgazamiento de la pared del tubo neural en ciertos lugares, formando telas coroideas.

¹¹ Fink A.J, Englund C, Daza R.A, Pham D, Lau C, Nivison M; et al. Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. J. Neurosci. 2006; 26 (11): 3066–76.

Las telas coroideas a la larga se diferencian en los plexos coroideos, donde se segrega el líquido cefalorraquídeo. En el **rombencéfalo**, se forma tela coroidea en el techo de todos los rombómeros, así como en los pseudorombómeros que participan en la formación del bulbo raquídeo. La tela coroidea rombencefálica tiene forma romboidea presentando su parte más ancha aproximadamente a nivel de los rombómeros 2 y 3⁽¹²⁾.

En el borde de la tela coroidea rombencefálica con el resto de la pared del rombencéfalo aparece una zona intensamente proliferativa que es conocida como **labio rómbico**. Es característico de las neuronas producidas aquí en gran número el que migran tangencialmente bajo la superficie del tubo neural (los granos del cerebelo).

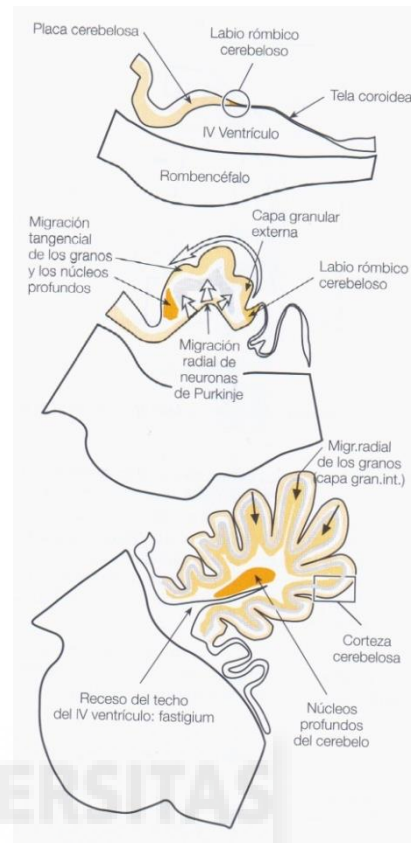


Figura 7. Morfogénesis secundaria del cerebelo (crecimiento diferencial y migraciones)⁽²⁾.

La morfogénesis del cerebelo se representa en la figura 7. En cortes sagitales medios vemos cómo la delgada placa cerebelosa que forma el techo del istmo caudal y de los rombómeros R1 y R2 (salvando la tela coroidea) se engruesa paulatinamente, al mismo tiempo que queda cubierta por la capa granular externa. La acumulación de neuronas en los núcleos del cerebro y particularmente en la corteza del cerebelo causa su lobulación progresiva hasta que adopta al corte la forma característica de «árbol de la vida». En la misma figura vemos que la inserción de la tela coroidea en el primitivo borde de la placa cerebelosa permanece sin modificación, aunque queda cada vez más oculta por los lóbulos caudales del cerebelo y el pliegue de la flexura pontina.

¹² Puelles L. Morfogénesis temprana del SNC: inducción neural y neurulación. Cresta neural. Vesiculación y segmentación. Incurvación del eje neural. En: Puelles L, Martínez P, Martínez de la Torre M. Neuroanatomía. Madrid, España; Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 50-8.

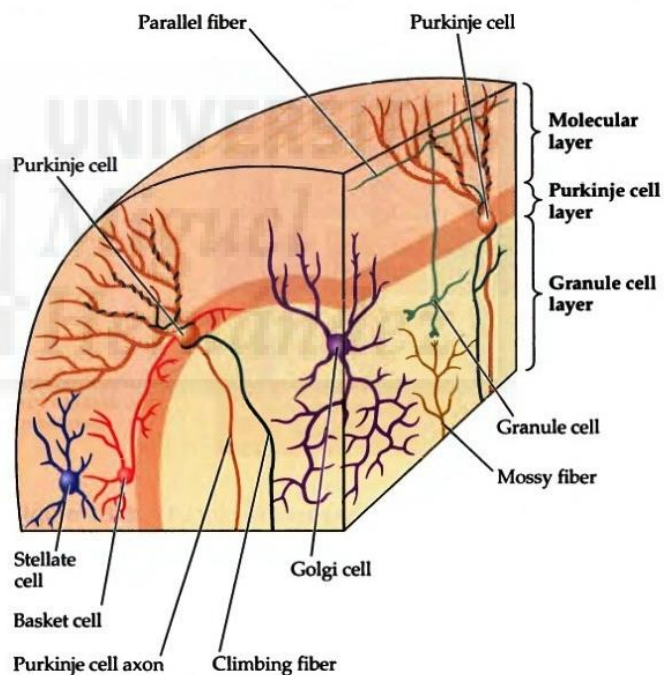
2.2.4. ORIGEN DE LAS POBLACIONES CEREBELOSAS CORTICALES.

El cerebelo es una estructura cerebral única dependiente de la señal de *Fgf8* y de la expresión de genes homeobox *Gbx2*⁽¹³⁾.

Un aspecto interesante de la corteza cerebelosa es su citoarquitectura bastante estereotipada. Los subtipos neuronales están conectados el uno al otro de la misma manera, construyendo un microcircuito cerebeloso.

La corteza cerebelosa adulta se lamina en tres capas⁽⁵⁾. La **capa externa o molecular** (MCL), está formada por numerosas fibras (fibras paralelas; axones bifurcados de los granos cerebelosos).

Entre estas fibras se encuentran las células en cesta, así llamadas porque emiten ramas colaterales que descienden hacia las células de Purkinje y se ramifican a su alrededor, formando una especie de nido o cesta. A la capa molecular llegan numerosas fibras trepadoras (entre



otras), procedentes, a través de la sustancia

Figura 8. Esquema capas de la corteza cerebelosa: capa molecular, capa de células de Purkinje y capa granular.

blanca, de la oliva bulbar, y que terminan adhiriéndose íntimamente a las dendritas de las células de Purkinje. La capa media, o de las **células de Purkinje** (PCL), se caracteriza por sus notables dimensiones y por el aspecto de sus células. Se compone de una monocapa de PCs positivas para

¹³ Hidalgo-Sánchez M, Simeone A, Alvarado-Mallart R.M. *Fgf8* and *Gbx2* induction concomitant with *Otx2* repression is correlated with midbrain-hindbrain fate of caudal prosencephalon. *Development*. 1999; 126 (14): 3191–203.

calbindina. La capa final y más profunda es la **capa granulosa** (GCL) y es la capa más amplia cerebelosa, compuesta principalmente de células granulares, así como de Golgi, Lugaro, y células cepillo unipolares (ver figura 8).

Neuroquímicamente la corteza cerebelosa contiene dos subtipos de neuronas: glutamatergicas (granulares y células de cepillo unipolar) y cinco subtipos de GABAérgicas (Purkinje, Golgi, Lugaro, estrelladas y células de cesta). Los núcleos profundos del cerebelo contienen tanto interneuronas GABAérgicas y neuronas de proyección glutamatergicas⁽¹⁴⁾. Existen estudios de mapeado de destino del cerebelo en desarrollo que han descubierto cuándo y dónde nacen las células y qué rutas migratorias siguen para alcanzar su posición final. Las neuronas del cerebelo se generan a partir de dos grandes centros germinales: la capa externa granular (EGL) y la zona ventricular (VZ). En las últimas décadas se ha demostrado que las células granulares son producidas por los precursores tempranos de células granulares situados en la EGL que se originan desde el labio rómbico (RL), en la interfase del tubo neural dorsal y la placa de techo extendida del cuarto ventrículo (el plexo coroideo)⁽¹⁵⁾.

2.2.5. MECANISMOS MOLECULARES PARA LA ESPECIFICACIÓN DEL DESARROLLO DEL CEREBELO. EL ORGANIZADOR ÍSTMICO.

La evidencia de procesos de regulación morfogenéticos en lugares específicos del primordio neural en desarrollo ha dado lugar al concepto de organizadores secundarios, que regulan la identidad y la polaridad regional de las regiones neuroepiteliales vecinas. Estos organizadores, secundarios a los que operan en todo el embrión durante la gastrulación, generalmente se desarrollan dentro del neuroectodermo previamente regionalizado en los límites genéticos dados. Su actividad posterior refina identidades neuronales locales a lo largo del eje

¹⁴ Hoshino M. Molecular machinery governing GABAergic neuron specification in the cerebellum. *Cerebellum*. 2006; 5(3): 193–8.

¹⁵ Martínez S, Andreu A, Mecklenburg N, Echevarría D. Cellular and molecular basis of cerebellar development. *Front Neuroanat*. 2013; 7:18.

anteroposterior (AP) o eje dorsoventral (DV) y produce la regionalización de la placa neural anterior y del tubo neural⁽¹⁶⁾.

Tres regiones de la placa neural y del tubo han sido identificadas como organizadores secundarios putativos: la cresta neural anterior (ANR) en el extremo anterior de la placa neural, la zona limitante intratálámica (ZLI) en el diencéfalo, y el **organizador ístmico (ISO)** en la frontera mesencéfalo-rombencéfalo.

La constricción ístmica contiene el ISO que está implicado en el mantenimiento del límite mesencéfalo-rombencéfalo y proporciona la polaridad estructural a las regiones adyacentes a fin de orquestar la diversidad celular compleja del mesencéfalo (rostral) y el cerebelo (caudal).

El evento molecular más temprano para la especificación del ISO es la expresión diferencial en la placa neural de *Otx2* en el epitelio rostral y *Gbx2* en el dominio posterior⁽¹⁷⁾. Un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), *Fgf8*, es altamente expresado en la parte más anterior del rombencéfalo. Además, los miembros de la subfamilia FGF8 han demostrado ser señales morfogenéticas que regulan aspectos estructurales del mesencéfalo, istmo y el desarrollo de R1.

El límite caudal de expresión *Otx2* y el límite rostral de *Gbx2*, por lo tanto, marcan el límite molecular mesencéfalo-rombencéfalo, contribuyendo así a mantener el límite rostral de *Fgf8* en el istmo y por lo tanto siendo esencial para los pasos iniciales del desarrollo del límite mesencéfalo-rombencéfalo.

Por otra parte, la señal FGF8 podría actuar en el ISO en concierto con otras moléculas de señalización, como WNT1, Sonic Hedgehog (SHH) y miembros de la familia del factor de crecimiento (*TGF*) $-\beta$. La actividad morfogenética del ISO es una consecuencia de una expresión específica temporo-espacial de las

¹⁶ Echevarría D, Vieira C, Gimeno L, Martínez S. Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 2003; 43 (2): 179–91.

¹⁷ Joyner A.L, Liu A, Millet S. *Otx2*, *Gbx2* and *Fgf8* interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr Opin Cell Biol.* 2000; 12 (6): 736–41.

señales moleculares que regulan la especificación y el desarrollo estructural de los territorios neuroepiteliales del mesencéfalo y del cerebelo⁽¹⁸⁾.

En el presente trabajo se ha estudiado la morfología cerebelosa tras las alteraciones de la expresión génica de *Fgf8*. La literatura describe que un gradiente decreciente de concentración de la proteína FGF8 en la placa alar del istmo y R1 es fundamental para la supervivencia celular y el desarrollo diferencial de las regiones del cerebelo. En la placa basal, un gradiente de FGF8 es crucial para la supervivencia celular.

➤ **Función FGF8.**

La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Miembros de la familia FGF poseen actividades mitogénicas y de supervivencia celular, y están involucrados en una variedad de procesos biológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis, la reparación de tejidos, el crecimiento de tumores e invasión⁽¹⁹⁾.

Como se ha dicho anteriormente, FGF8 es importante y necesario para la creación y el mantenimiento del istmo, que desempeña el papel vital de "organizador" en el desarrollo. FGF8 se expresa en la región donde *Otx2* y *Gbx2* se inhiben el uno al otro y se mantiene la expresión por esta interacción.

En el humano adulto, FGF8 se expresa en el riñón, testículo, próstata, mama, en los leucocitos de sangre periférica y en la médula ósea⁽²⁰⁾. Sin embargo, durante el desarrollo embrionario, su expresión es más amplia. El patrón de expresión de FGF8 durante el desarrollo embrionario de ratón sugiere que la

¹⁸ Garda A.L, Echevarría D, Martínez S. Neuroepithelial co-expression of *Gbx2* and *Otx2* precedes *Fgf8* expression in the isthmus organizer. *Mech Dev.*2001; 101 (1-2): 111–8.

¹⁹ Finklestein S.P, Plomaritoglou A. Growth factors. En: Miller L.P, Hayes R.L. *Head Trauma: Basic, Preclinical, and Clinical Directions*. New York.; co-edited by Newcomb J.K: 2001. p.165–87.

²⁰ Tanaka A, Furuya A, Yamasaki M, Hanai N, Kuriki K, Kamiakito T, et al. High frequency of fibroblast growth factor (FGF) 8 expression in clinical prostate cancers and breast tissues, immunohistochemically demonstrated by a newly established neutralizing monoclonal antibody against FGF8. *Cancer Res.* 1998 May 15; 58(10):2053-6.

función de FGF8 es importante en la morfogénesis de las extremidades, en el sistema nervioso central y la cara faríngea, y sistemas cardiacos, y los órganos urogenitales⁽²¹⁾. Es importante destacar que la expresión de FGF8 es esencial en la gastrulación ya que la pérdida homocigótica de FGF8 conduce a la letalidad embrionaria temprana⁽²²⁾.

La expresión de FGF8 durante el desarrollo embrionario se puede ver con más detalle en las Figuras 9A y 9B, que muestran en azul las regiones positivas en FGF8 en un embrión de ratón de E.9.5. Como se observa en la imagen, los niveles más altos de FGF8 se encuentran en la línea primitiva posterior, en el istmo (límite entre mesencéfalo y rombencéfalo) y en el corazón en desarrollo. La expresión de FGF8 también se observa en la placa comisural del telencéfalo prospectivo y en el infundíbulo del hipotálamo.

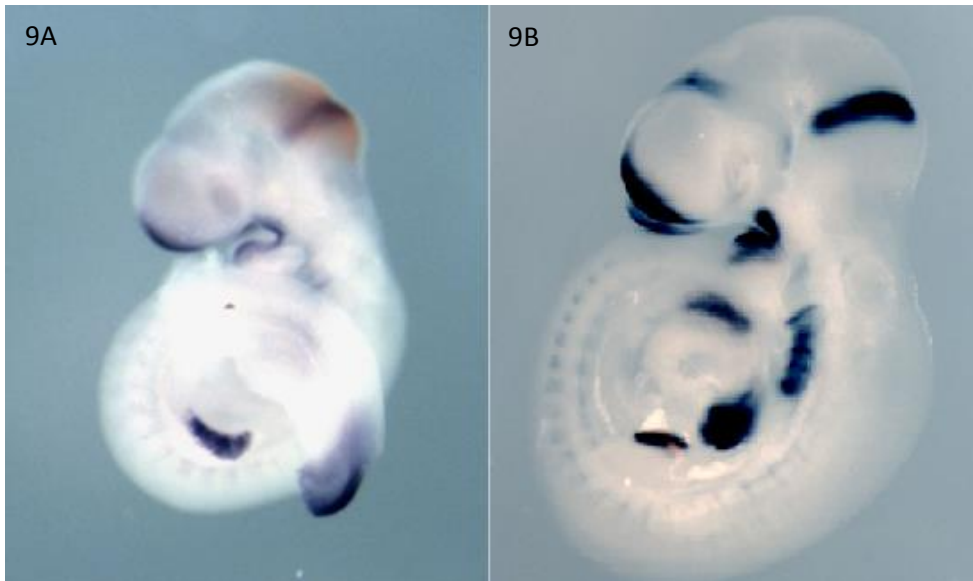
Una vez expresado, FGF8 induce otros factores de transcripción para formar bucles regulatorios cruzados entre las células, por lo que establece la frontera. A través del desarrollo, FGF8 va a regular el crecimiento y diferenciación de células progenitoras en esta región para producir la estructura final de mesencéfalo y rombencéfalo.

Por otra parte, *Engrailed* (*En*) 1 es un gen homeobox que ayuda principalmente a regular el desarrollo del mesencéfalo dorsal y del rombencéfalo anterior (cerebelo y colículo) de los seres humanos⁽²³⁾. La expresión de *En1* durante el desarrollo embrionario de ratón de E9.5 se representa en la figura 9A en rojo. Como se observa en la imagen, la zona de expresión predominante para este gen es el istmo.

²¹ Crossley PH, Martin GR. The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*. 1995; 121 (2): 439–51.

²² Trumpp A, Depew M.J, Rubenstein J.L.R, Bishop J.M, Martin G.R. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes Dev*. 1999; 13(23): 3136–48.

²³ Davis C.A, Joyner A.L. Expression patterns of the homeo box-containing genes *En-1* and *En-2* and the proto-oncogene *int-1* diverge during mouse development. *Genes & Dev*. 1988; 2: 1736-44.



Figuras 9Ay 9B. Expresión génica de FGF8 y En1 en embrión de ratón E9.5. La figura 9A muestra en azul las zonas de expresión de FGF8 y en rojo la zona de expresión de En1. La figura 9B muestra en azul las regiones de expresión de FGF8.

2.3. FUNCIONES DEL CEREBELO.

El cerebelo y sus circuitos estereotipados, contribuyen no sólo al aprendizaje motor y a la corrección de los actos motores, sino también a las funciones cognitivas y emocionales. La torpeza y el comportamiento motor anormal han sido bien documentados en trastornos como el autismo y el síndrome de Asperger, en la dislexia y en la esquizofrenia⁽²⁴⁾. El cerebelo es genéticamente y funcionalmente heterogéneo, con zonas cerebelares de diferentes dominios precursores (vermis R0 / R1 o hemisferios cerebelosos R1) que interconectan selectivamente con diferentes subsistemas cerebrales. Además, los principales procesos celulares y moleculares en la histogénesis del cerebelo están regulados por las mismas señales morfogenéticas que operan en otras regiones del cerebro. Por lo tanto, no es sorprendente encontrar trastornos del desarrollo que afectan a los diferentes sistemas funcionales tanto el prosencéfalo y el cerebelo.

²⁴ Rogers T.D, McKimm E, Dickinson P.E, Goldowitz D, Blaha C.D, Mittleman G. Is autism a disease of the cerebellum? An integration of clinical and preclinical research. *Front Syst Neurosci.* 2013; 7:15.

El cerebelo está involucrado en las siguientes funciones:

- ❖ Mantenimiento del **equilibrio** y la postura. El cerebelo está implicado en realizar ajustes posturales con el fin de mantener el equilibrio. A través de la entrada de los receptores vestibulares y propioceptores modula comandos a las neuronas motoras para compensar los cambios en la posición del cuerpo o cambios en la carga sobre los músculos.
- ❖ Coordinación de los **movimientos voluntarios**. Una de las principales funciones del cerebelo es la coordinación de la sincronización y la fuerza de diferentes grupos musculares para producir movimientos fluidos de las extremidades o del cuerpo.
- ❖ **Aprendizaje motor**. El cerebelo desempeña un papel importante en la adaptación y programas motores de ajuste fino para realizar movimientos precisos a través de un proceso de ensayo y error.
- ❖ **Funciones cognitivas**. Aunque el cerebelo es más entendido en términos de su contribución al control motor, también está implicado en ciertas funciones cognitivas, como el procesamiento del lenguaje, aunque se desconoce casi totalmente como funciona este circuito.

2.3.1. FUNCIONES COGNITIVAS DEL CEREBELO.

Tradicionalmente, se ha considerado al cerebelo como un sistema neuronal que participaba esencialmente en la coordinación y el control motor. Sin embargo, en las últimas décadas ha cobrado fuerza el concepto del cerebelo como un órgano relacionado con procesos cognitivos de alto nivel. Se sabe que el cerebelo posee una extensa red de conexiones eferentes y aferentes tanto corticales como subcorticales. Filogenéticamente, se cree que el cerebelo inicialmente participaba en actividades relacionadas con la coordinación del movimiento y el tono muscular para conservar el equilibrio, y que, a lo largo de la evolución, ha ido contribuyendo a procesos cognitivos cada vez más complejos: funciones ejecutivas, aprendizaje, memoria procedimental y

declarativa, procesamiento del lenguaje y funciones visuoespaciales y afectivas⁽²⁵⁾.

Distintos autores apuntan que en las funciones motoras estarían implicados el arquicerebelo, (el vermis) y el núcleo fastigial (control del equilibrio y la postura), el paravermis (postura del tronco y caminar), las regiones neocorticales y el núcleo dentado (movimientos rápidos de las extremidades)⁽²⁶⁾.

En el caso de la cognición y emoción, las regiones cerebelosas más antiguas (lóbulo floculonodular, vermis, núcleo fastigial y globoso) serían responsables de los primitivos mecanismos de defensa, entre los que destacan las manifestaciones de lucha, la emoción, el afecto, la sexualidad y, posiblemente, la memoria emocional. Esto sería congruente con las anomalías del vermis y núcleos profundos cerebelosos informados en algunos casos de autismo y esquizofrenia. Por otro lado, los hemisferios laterales cerebelosos y los núcleos dentado (principalmente el área ventrolateral o neodentada) y emboliforme pueden ser moduladores del pensamiento, la planificación, la formulación de estrategias, el aprendizaje, la memoria y el lenguaje.

Las funciones cognitivas que quedan afectadas tras una lesión cerebelosa son muchas y muy variadas; sin embargo, los mecanismos concretos por los cuales el cerebelo afecta a la cognición aún no se conocen. Existen diversos planteamientos que sugieren que la lesión cerebelosa no anula la función cognitiva, sino que altera su desarrollo normal. La función del cerebelo en la cognición, al igual que en el movimiento, es la de prevenir, detectar y corregir errores.

²⁵ Noroozian M. The role of the cerebellum in cognition: beyond coordination in the central nervous system. *Neurol Clin.* 2014; 32(4): 1081-104.

²⁶ Kim SK. Recent update of autism spectrum disorders. *Korean J Pediatr.* 2015 Jan; 58(1):8-14.

2.4. OBJETIVOS.

Los objetivos de este Trabajo de Fin de Grado son los siguientes:

- Identificar las distintas estructuras del encéfalo mediante una inmunohistoquímica contra calbindina, centrándose en las regiones mesencéfalicas y rombencefálicas.
- Estudiar la función de *Fgf8* en el desarrollo del istmo de ratón utilizando un enfoque de inactivación condicional para *Fgf8* en el istmo y de inactivación de la actividad de esta proteína hasta el 40% de la actividad normal.
- Comparar las estructuras de un embrión de ratón silvestre con respecto al mutante de ratón KO condicional y *Fgf8^{neo/neo}*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MODELOS ANIMALES.

Para el estudio llevado a cabo en este Trabajo de Fin de Grado, se han empleado dos líneas de ratones transgénicos obtenidas del animalario del Instituto de Neurociencias.

Una de ellas se obtuvo mediante el sistema de recombinación Cre-LoxP. El sistema de recombinación Cre-LoxP es una herramienta genética que permite generar animales mutantes condicionales eliminando selectivamente un área específica (Figura 10); estos ratones se denominan genéricamente *knock-in*⁽²⁷⁾. Este método se ha utilizado principalmente para estudiar la carencia de un gen de forma específica en una región porque si se desactivan totalmente en el organismo durante los primeros estadios del desarrollo los embriones mueren o no se desarrollan.

²⁷ Bäckman CM, Malik N, Zhang Y, Shan L, Grinberg A, Hoffer BJ, et al. Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *Genesis*. 2006; 44(8):383-90.

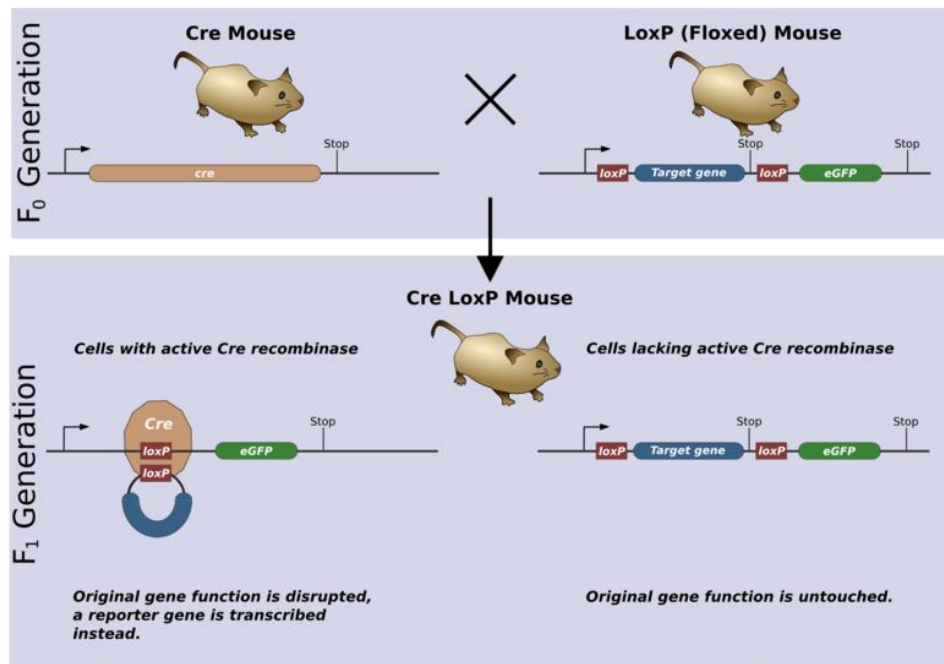


Figura 10. Esquema de modelo de recombinación genética utilizando el sistema Cre – loxP. Para poder utilizar este método, es necesario contar con dos cepas especiales de ratones, una que exprese Cre en un grupo determinado de células y otra que tenga el gen de interés flanqueado por dos sitios LoxP.

El Laboratorio posee una línea de ratones Cre para Engrailed 1 ($En1^{Cre/+}$) que se cruzó con otra línea *Fgf8* Floxed ($Fgf8^{Floxed/Floxed}$)⁽²⁸⁾. En estos embriones, *Fgf8^{flox}*, un alelo con la actividad de tipo silvestre, se convierte por recombinación mediada por Cre en *Fgf8^{null}* resultando en homocigosis para *Fgf8^{null}* en las células que producen Cre y todos sus descendientes. La inactivación de *Fgf8* en mutantes knock out (KO) depende de que la proteína Cre sea producida en el dominio de expresión de Engrailed 1 ($En1^{Cre/+}$), un alelo nulo en el que el gen Cre reemplaza parcialmente la secuencia de codificación EN1⁽²⁹⁾. $En1^{Cre/+}$ puede producir suficiente proteína Cre en todo el límite de la región del istmo para eliminar la función de *Fgf8* en la etapa inicial de formación de somitas, cuando la expresión de *Fgf8* comienza en un subconjunto de células que expresan En1.

²⁸ Meyers E.N, Lewandoski M, Martin G.R. An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* 1998; 18: 136-41.

²⁹ Kimmel R.A, Turnbull D.H, Blanquet V, Wurst W, Loomis C.A, Joyner A.L. Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev.* 2000; 14: 1377-89.

El resultado de este cruce fue mutantes condicionales knockout (KO) para FGF8, en los que se ha suprimido la expresión de FGF8 sólo en la región del istmo, sin afectar a las otras regiones del cerebro que necesitan de esta proteína para su desarrollo.

Por otra parte, se ha utilizado otra línea de ratones mutantes en los que se ha introducido un cassette neo (secuencia de resistencia a la neomicina) en un intrón de la secuencia de *Fgf8*⁽²⁸⁾. El resultado del cruce entre sí de esta ingeniería genética de ratones (*Fgf8*^{neo/+} X *Fgf8*^{neo/+}) produjo un ratón hipomorfo leve o moderado (*Fgf8*^{neo/neo}) en el que las dosis de *Fgf8* en el organismo es de un 40%.

En resumen, para la realización de este TFG se han utilizado dos líneas de ratón genéticamente modificadas para FGF8 y se han seleccionado aleatoriamente 3 embriones de cada línea para su estudio (n=3), por un lado, *Fgf8*^{neo/neo} en el que las dosis de *Fgf8* en el organismo es de un 40% y de mutante de *Fgf8* KO condicional en el istmo en el que no se expresa *Fgf8* sólo en esta región (n=3).

3.2. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE EMBRIONES.

3.2.1. EXTRACCIÓN Y FIJACIÓN DE EMBRIONES.

Los embriones empleados ya se encontraban en el laboratorio. Ya habían sido extraídos y fijados. Para la fijación, los embriones se aislaron del útero en el estadio E17.5 con la ayuda de una lupa estereoscópica y se fijaron en buffer fosfato salino (PBS) 1x (NaCl 13mM, Sigma S3014; KCl 0.3mM, Sigma P9541; Na₂HPO₄ 1mM, Sigma S3264 y KH₂PO₄ 0.2mM, Sigma P9791) con paraformaldehído (PFA) al 4% durante una noche a 4 °C. Una vez fijados, los embriones se lavaron con PBS 1x y fueron deshidratados de forma gradual con etanoles crecientes (25%, 50%, 75% y 100%) y almacenados en este último etanol a -20 °C hasta su posterior uso.

3.2.2. INCLUSIÓN Y SECCIÓN DE EMBRIONES.

3.2.2.1. MICROTOMO DE PARAFINA.

Esta técnica consiste en incluir los embriones en parafina (Gemcut emerald paraffin, Spiele no. 24364-1) para realizar secciones en el micrótopo. Para ello, los embriones han de ser previamente lavados un par de veces con butanol 100% (Panreac 14.682.1211) un tiempo variable según el estadio, sin sobrepasar nunca las 2 horas. El butanol, miscible en parafina, sustituirá al etanol 100% en el que estaban almacenados.

Posteriormente, los embriones se pasan a parafina líquida a 56°C y se realizan al menos, 6 cambios de 30 minutos, que nos permiten eliminar por completo el butanol y que se produzca una buena inclusión del tejido. Después de los sucesivos cambios, los embriones se orientan dentro de un molde según el plano a estudiar (en este caso el plano a estudiar es el sagital) y se dejan a temperatura ambiente para que la parafina solidifique. Así pues, los embriones quedan dentro de un bloque de parafina sólida que nos permite hacer secciones con el micrótopo.

Las secciones de 12.0µm se montan en portas (Superfrost plus, Thermo Scientific, J1800AMNZ) de forma seriada con una dilución de etanol al 17,5% a unos 40°C para que el tejido se extendiera de forma correcta. Una vez el tejido queda perfectamente estirado, el etanol es eliminado y los portas se dejan secar una noche a 37°C y se almacenan a temperatura ambiente para su posterior estudio.

3.3. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.

3.3.1. INMUNOHISTOQUÍMICA EN CORTES DE PARAFINA.

Esta técnica nos permite detectar la expresión de proteínas (Figura 11). Para ello, las secciones de tejido se desparafinan y rehidratan. Para desparafinar las secciones de tejido se incuban a 65°C durante 25 minutos para fundir la parafina, y se hacen dos pases de xilol de 25 minutos cada uno para acabar de eliminarla por completo. Después, el tejido se rehidrata en alcoholes decrecientes empezando por 2 pases de etanol 100%, 2 de etanol 96%, 1 de

etanol 70% y 1 de agua, durando 10 minutos cada pase. Las secciones se lavan con PBS 1x, se fijan con PFA 4% durante 10 minutos y se lavan 10 minutos con PBS 1x y con PBS-T (PBS 1x con 0.1% tween 20, Sigma P7949). Una vez hidratadas, se hacen tres lavados con PBT (PB ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.08M, Panreac 141678.1214 y NaCl 0.15M, Panreac 121659.1211 con 0.075% Triton-X100, Sigma X100) de 10 minutos y se hierven en un microondas 4 veces a 750W de potencia durante 3 minutos con citrato sódico pH 6 0.01M para facilitar la exposición del epítipo de interés. Después del hervido, se hacen 3 lavados con PBT de 10 minutos y se inactiva la peroxidasa

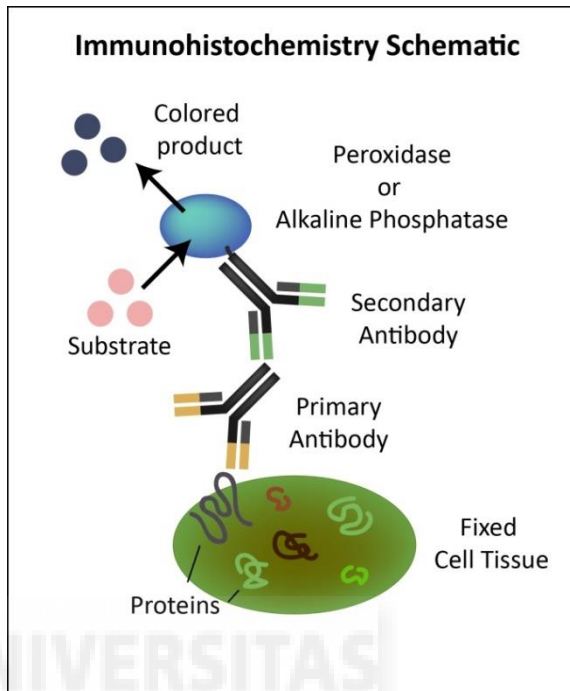


Figura 11. Esquema de la técnica de inmunohistoquímica.

endógena incubando con H_2O (Normapur 23619.297) al 1.5% en PBT durante 30 minutos. Una vez inactivada, se lava de nuevo con PBT y se bloquea durante 1 hora en PBT con 0.1% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma A2153) y 10% de lisina 1M (Sigma L5626). Por último, las secciones se incuban con el anticuerpo deseado en PBT con 0.1% BSA y 0.01% azida (Sigma S2002) durante toda la noche. A la mañana siguiente, se hacen 3 lavados con PBT de 10 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incuba durante 1 hora con un anticuerpo secundario conjugado con biotina a 1:200 en PBT. El exceso de secundario se elimina con otros 3 lavados de PBT durante 10 minutos y se incuba durante 1 hora con el complejo ABC (Vectastain PK-4000) a 1:500 en PBT. Este complejo está formado por peroxidasa bitoinilada y por avidina, una glicoproteína que se unirá a la biotina de la peroxidasa y a la del anticuerpo secundario. El último paso, consiste en añadir una solución de Tris pH7 0.01M con 1% de 3-3'Diaminobenzidine

tetrahydroc (DAB, Acros Organics W0572M) y 0.003% de H₂O₂ que nos permitirá la detección mediante un precipitado marrón.

El anticuerpo primario utilizado fue la α calbindina y el secundario un anticuerpo secundario anti-conejo producido en cabra (goat anti-rabbit Ig-G).

Anticuerpo	Dilución	Ac. Secundario	Referencia
α CALBINDINA	1:2000	ARabbit	Swant, CB-D28K

La calbindina es una proteína de unión al calcio que pertenece a la superfamilia de la troponina C. Funciona como tampón de calcio citosólico y se encuentra en el **cerebro**, el riñón, el intestino y los islotes pancreáticos.

Una característica única de esta técnica inmunohistoquímica contra calbindina es que permite estudiar las diferentes partes del cerebro como el hipocampo y cerebelo. En el caso del cerebelo es aún más favorable, ya que permite el estudio de la morfología de las células de Purkinje, altamente teñidas por esta proteína. Este método es usado para estudiar algunas características del desarrollo del cerebelo *in vitro*, así como para los experimentos electrofisiológicos y farmacológicos, tanto de tipo salvaje y ratones mutantes. Con esta técnica es posible evaluar las variaciones de las estructuras cerebrales cuando una mutación sea realizada comparando la falta o no de núcleos o estructuras positivas para calbindina (calb1).

3.4. MONTAJE Y MICROSCOPIA.

Una vez llevado a cabo el último paso de la inmunohistoquímica, que conduce a la obtención de un precipitado marrón, se procede a cubrir los portaobjetos empleando el medio de montaje Eukitt[®] y posteriormente se dejan secar. Para poder cubrir las muestras de tejido de cerebro de ratón se utilizan cubreobjetos, los cuales permiten proteger las muestras, además de proporcionar un cambio óptico claro. El medio de montaje anteriormente citado permite obtener una imagen más contrastada después de la tinción, lo que ayuda a enfocar mejor la

muestra y mejora por tanto la calidad del análisis. Además permite almacenar las muestras durante un largo período de tiempo.

Una vez preparadas las muestras el siguiente paso consistió en capturar imágenes digitales del tejido procesado. Para ello, se utilizó un microscopio Leica equipado con una cámara digital.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este trabajo de Fin de Grado se ha estudiado la función de *Fgf8* en el desarrollo del istmo (región que divide el mesencéfalo del rombencéfalo) de ratón, utilizando la genética y la neuroanatomía para describir las consecuencias de la inactivación condicional de *Fgf8* en el istmo y compararlo con la inactivación parcial moderada o leve de la actividad de esta proteína hasta el 40% de la normal, en todo el encéfalo.

Nuestros datos demuestran como veremos a continuación, que *Fgf8* es la molécula clave de una red compleja de genes reguladores, siendo su papel esencial para la especificación y supervivencia celular de los territorios adyacentes al istmo.

El papel de *Fgf8* en el desarrollo del istmo no puede ser investigado en embriones de ratón knockout para *Fgf8* (*Fgf8*^{-/-}) debido a que el embrión no llega a implantarse en el útero⁽³⁰⁾, pero puede ser estudiado en ratones hipomorfos *Fgf8* ya que sobreviven al nacimiento. Tanto estos últimos ratones (*Fgf8*^{neo/neo}), como los *Fgf8* condicionales knockout en el istmo (*En1*^{cre/+}; *Fgf8*^{floxed/floxed}) mueren neonatalmente⁽⁶⁾.

Estudios realizados anteriormente, han demostrado que cuando se reduce la expresión de la proteína FGF8 el SNC de estos animales queda altamente alterado⁽²⁸⁾. Es posible que los fenotipos cerebrales en estos embriones hipomorfos sean secundarios a defectos leves causados por la reducción de expresión de *Fgf8* durante la gastrulación.

³⁰ Sun X, Meyers E.N, Lewandoski M, Martin G.R. Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes & Dev.* 1999; 13: 1834– 46.

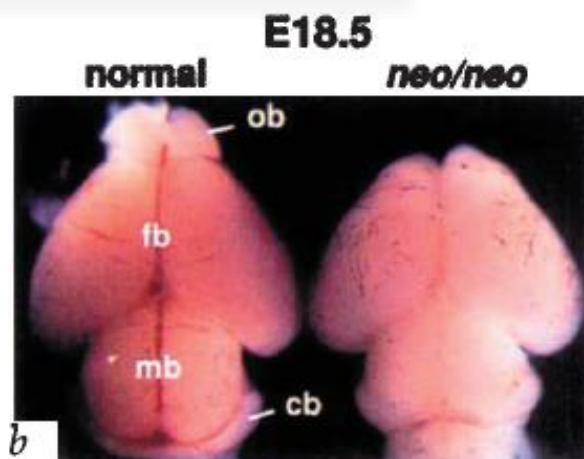
Por ello, para hacer frente a esta hipótesis, además de estudiar los efectos que se producen al reducir la actividad de *Fgf8* a un 40% en todo el encéfalo (ratón *Fgf8^{neo/neo}*), se ha utilizado un enfoque de inactivación total y condicional del gen en la región del istmo mediante la recombinación Cre-loxP, utilizando para ello la línea transgénica *Engrailed 1^{Cre/+}* y la línea *Fgf8^{Floxed/Floxed}* (ver Materiales y Métodos, apartado 3.1), con el fin de determinar los efectos que se producen por la ausencia de *Fgf8* en el istmo, sin perturbar el desarrollo de otras regiones del cerebro que también necesiten *Fgf8* para su correcto desarrollo.

4.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO.

Antes de procesar el tejido para la histología convencional que se ha realizado, se ha examinado macroscópicamente la anatomía de superficie de estos animales murinos, modificados genéticamente.

A) Comparación de un cerebro de embrión de ratón estadio E18.5 hipomorfo leve con un cerebro de embrión de ratón E18.5 silvestre.

En primer lugar, si se compara macroscópicamente la morfología del cerebro de un embrión de ratón silvestre (control) con el de un embrión hipomorfo leve para *Fgf8* (*Fgf8^{neo/neo}*) se puede observar que el del embrión *Fgf8^{neo/neo}* es ligeramente más pequeño que el del embrión



silvestre. Esto se muestra en la Figura 12. En general, se puede observar una reducción sutil en el

tamaño del cerebro. Particularmente, podemos observar los siguientes aspectos. Rostralmente se aprecia una reducción del tamaño de los bulbos

Figura 12. Comparación del tamaño del cerebro de embriones de ratón E18.5 silvestre y mutante (*Fgf8^{neo/neo}*)⁽²⁸⁾.

olfatorios. Caudalmente se observa una falta de tejido nervioso correspondiente a las subdivisiones del mesencéfalo y rombencéfalo.

La diferencia de tamaño del cerebro se debe a que en el ratón *Fgf8*^{neo/neo} existe una cantidad del 40% de la proteína FGF8 que es indispensable para la proliferación, supervivencia y especificación celular. Por ello, el ratón *Fgf8*^{neo/neo} tiene un menor tamaño. Sorprende, sin embargo, que estructuras como el cerebelo y el mesencéfalo se encuentren ausentes, indicando que la proteína tiene una función primordial en este tejido en particular. Todo esto se verá con más detalle en los resultados microscópicos.

B) Comparación de un cerebro de embrión de ratón estadio E17.5 KO condicional en el istmo con un cerebro de embrión de ratón silvestre.

En segundo lugar, si se comparan macroscópicamente el cerebro de un embrión de ratón silvestre (control) con uno de un mutante de *Fgf8* KO condicional en el istmo en el que no se expresa *Fgf8* sólo en esta región, puede observarse que rostralmente el cerebro del *Fgf8* KO condicional es prácticamente del mismo tamaño que el del control, pero caudalmente se encuentra reducido drásticamente no observándose estructuras dorsales mesencefálicas y rombencefálicas. Al ser un mutante condicional y no afectar al resto de estructuras del cerebro, el tamaño del cerebro no varía prácticamente en comparación con el cerebro de un ratón silvestre. Todo esto puede observarse en la figura 13.

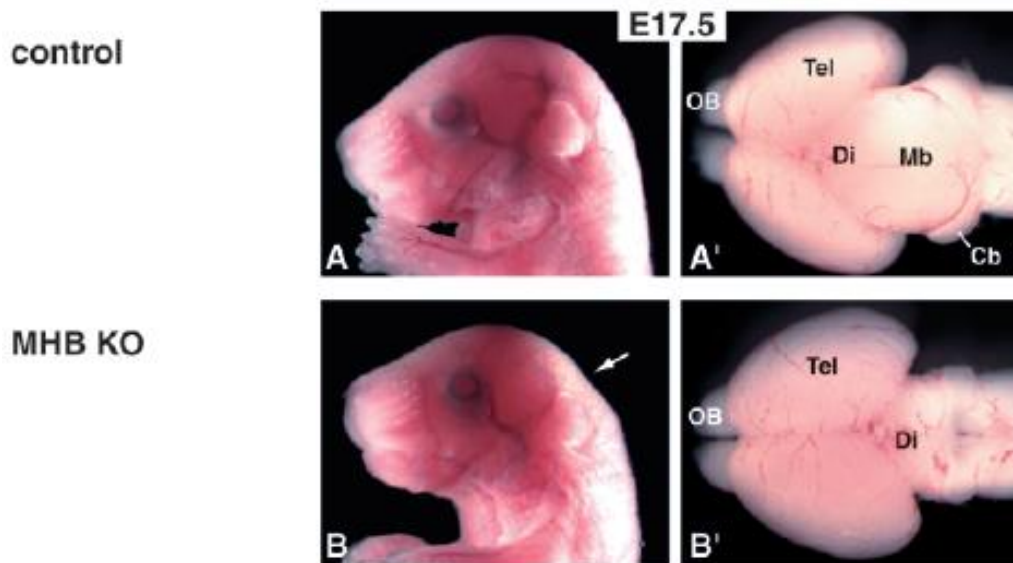


Figura 13. Comparación del tamaño y estructuras del cerebro de embrión de ratón E17.5 control y mutante KO (MHBKO)⁽⁶⁾.

4.2. ANÁLISIS MICROSCÓPICO.

A) Ratón silvestre (control).

En la figura 3 se observa un corte parasagital de un cerebro de embrión de ratón silvestre de estadio E17.5. La inmunohistoquímica realizada es contra la calbindina (calb1; ver materiales y métodos, apartado 3.3.1). El objetivo de esta inmunohistoquímica contra la calbindina es identificar las estructuras cerebrales.



Figura 14. Corte parasagital del cerebro de un embrión de ratón control, estadio E17.5 (tinción calbindina). Consultar abreviaturas en el índice. Representación de coordenadas: dorsal (D), ventral (V), rostral (R) y caudal (C). La línea naranja representa el límite entre el diencefalo y el mesencefalo que está marcado por el pretecho (PT). La línea blanca representa la región ístmica (Is) que establece el límite entre el mesencefalo y el rombencefalo.

Partiendo de la región más rostral del cerebro, se identifica el bulbo olfatorio (OB) que aparece ligeramente marcado por la calbindina. En el prosencefalo secundario (telencefalo e hipotálamo), el telencefalo se encuentra débilmente teñido para esta proteína en este estadio. Sin embargo, el subpallio y la región hipotalámica se encuentran más teñidos, junto con la fuerte tinción del diencefalo.

Las regiones más caudales del cerebro, las cuales son el objeto de estudio en este Trabajo de Fin de grado, están enmarcadas con un cuadro amarillo que corresponden con el mesencefalo y rombencefalo (Figura 14). En el mesencefalo las regiones dorsales están formadas por el colículo superior, que está delimitado rostralmente con el diencefalo por el pretecho (PT) y como límite nos encontramos con la comisura posterior (pc) y aparecen marcadas por la calbindina, mientras que las regiones caudales (colículo inferior) no lo están.

Por otra parte, la superficie del cerebelo (Cb) se encuentra intensamente teñida por este anticuerpo, marcando sus células de Purkinje entre otras estructuras y núcleos del SNC, sin embargo, el manto y el ventrículo no lo están. El plexo coroideo del cerebelo no se encuentra teñido por la calbindina.

Representado con una línea blanca, aparece la región ístmica (Is), la cual establece los límites entre el mesencéfalo y el rombencéfalo. Se observa que esta región se encuentra teñida también por la calbindina.

Asimismo, la línea naranja representa el límite entre el diencéfalo y el mesencéfalo, el cual está delimitado por el pretecho.

B) Ratón hipomorfo leve para *Fgf8* (*Fgf8*^{neo/neo}).

La figura 15 muestra un corte parasagital de un cerebro de embrión de ratón hipomorfo leve para *Fgf8* (*Fgf8*^{neo/neo}), en los que el nivel funcional de la proteína FGF8 se ha estimado más o menos en un 40% de la cantidad normal (28).

En estos embriones, el mesencéfalo se encuentra afectado. Rostralmente parece normal atendiendo a la comparación con el control, en concreto la detección contra la Calbindina en el colículo superior (sc). Sin embargo, en las regiones caudales del mesencéfalo, el colículo inferior que era negativo para Calbindina no se encuentra (*ic en la figura 15).

En cuanto al rombencéfalo la situación es incluso más drástica. El tejido dorsal anterior del rombencéfalo (cerebelo) se encuentra ausente en la región medial (el vermis), representado en la figura 15 como *Cb la zona en la que se situaría en un ratón control.

En secciones más laterales se observa, sin embargo, que existen los hemisferios cerebelosos aunque más reducidos en tamaño y número de folias. Ventralmente, el puente o protuberancia (p) parece que es de menor tamaño, aunque esta última descripción podría ser debido a que el cerebro de estos ratones es en general más pequeño.

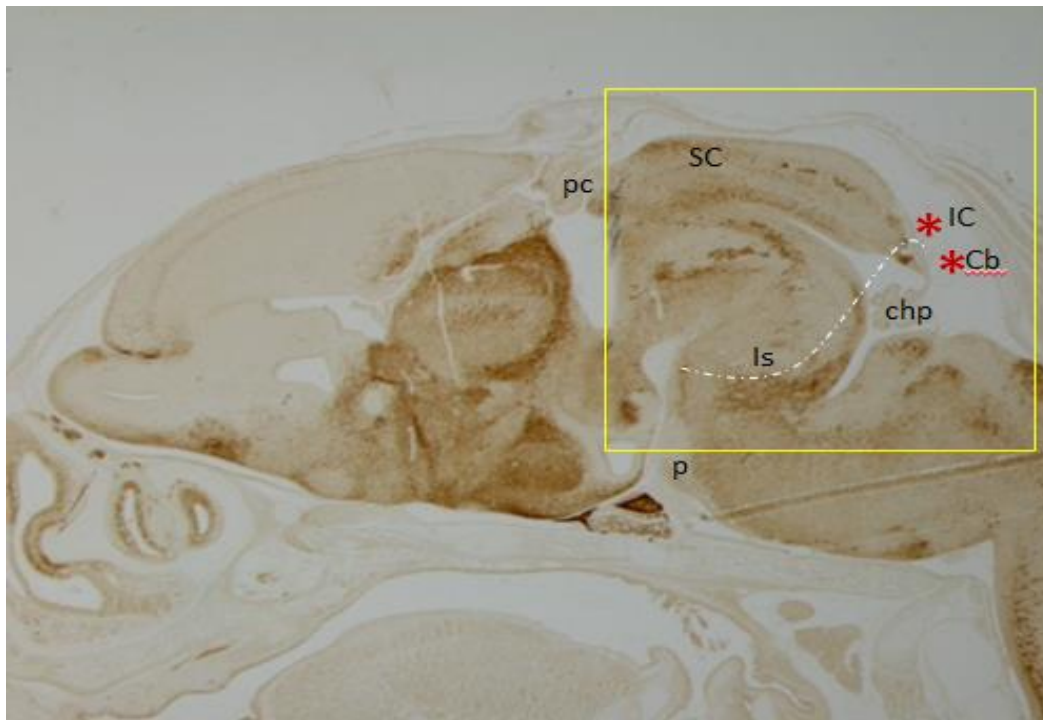
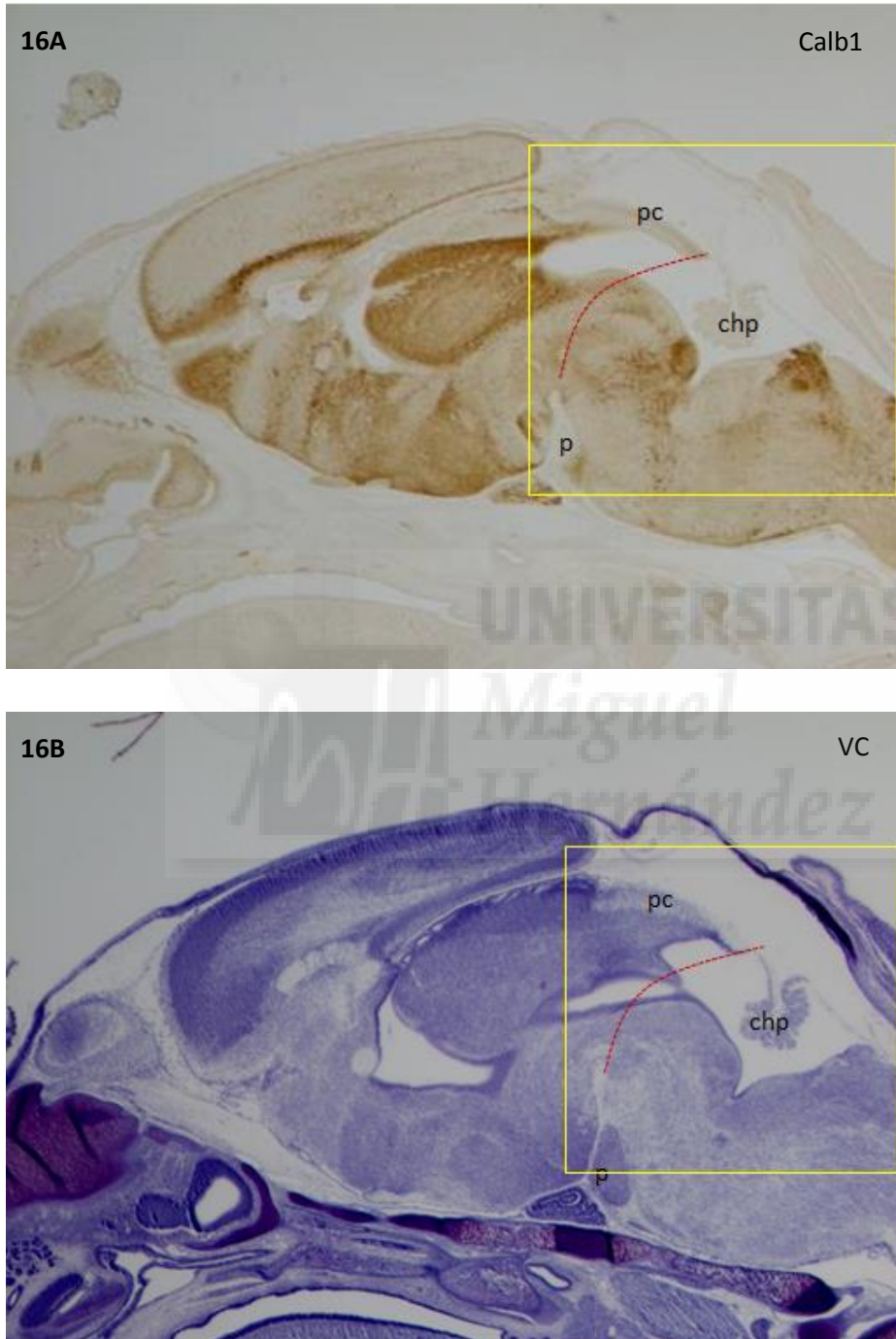


Figura 15. $Fgf8^{neo/neo}$. Corte parasagital de un cerebro de embrión de ratón hipomorfo leve para $Fgf8$ estadio 17.5 (tinción calbindina). El cerebelo (Cb) y el colículo inferior (IC) se encuentran ausentes, están representados en rojo y con un asterisco e indicada la zona donde se deberían encontrar. Consultar abreviaturas en índice.

Estos resultados nos demuestran que cuando la expresión de $Fgf8$ es moderadamente reducida, parte del mesencéfalo dorsal y caudal y parte del rombencéfalo (rostral y medio; el vermis) desaparecen.

C) Alteraciones del Mutante condicional para FGF8 en el Istmo.



Figuras 16A y 16B. Corte sagital del cerebro de un embrión de ratón *Fgf8* KO condicional estadio E17.5, tinción calbindina (16A) y cresil violeta (16B). La línea roja discontinua delimita los territorios diencefálicos de los rombencefálicos. Consultar abreviaturas en índice.

Las figuras 16A y 16B muestran el ejemplo de un corte sagital medio de un mutante condicional para *Fgf8* en el istmo. Recordemos que este tipo de mutación implica que no existe *Fgf8* en el istmo y por lo tanto carece de su proteína secretable.

Estos mutantes exhibieron el fenotipo más severo de los que se han estudiado. En este mutante se observa una alteración mucho más drástica del mesencéfalo. No se puede encontrar con la inmunohistoquímica contra la Calbindina ningún residuo de territorio mesencefálico, en este caso para el colículo superior. Sólo se puede advertir en un corte de la línea media que la comisura posterior (pc) se ha extendido en longitud hasta tocar el plexo coroideo. Para comprobar que lo que se está viendo es tejido diencefálico, se hizo una tinción con cresil violeta que distingue cuerpos neuronales con respecto a fibras y axones (mielina), pudiendo así observar las fibras de la comisura posterior, señalizada en la figura 16B como pc. Se asume que la razón de esta extensión caudal de esta comisura es debida a la intención del tejido nervioso de ocupar el espacio libre y no a un hiperdesarrollo de la misma. Sabiendo que la comisura posterior (pc) nos da el límite neuroanatómico entre diencefalo y mesencéfalo, los resultados de este mutante indican que al menos el mesencéfalo dorsal ha desaparecido por completo, incluyendo el núcleo pretectal posterior (PPT) y por supuesto también núcleos ventrales.

Por otra parte, en el rombencéfalo todo el cerebelo ha desaparecido incluyendo no solo el vermis como en el caso anterior, sino también los hemisferios cerebelosos. Sin embargo, el núcleo pontino parece normal (expresión negativa para Calbindina). Atendiendo al modelo prosomérico, esta estructura se encuentra entre los rombómeros 3 y 4. Con estos datos podemos decir casi con seguridad que rombómero cero (istmo), rombómero 1 y posiblemente parte del 2 están ausentes.

Estos datos muestran que *Fgf8* es esencial para el desarrollo de los territorios adyacentes al istmo meso-romboencefálicos y que dependiendo de la cantidad (efecto gradiente) tiene resultados drásticos en el desarrollo de subdivisiones cerebrales cercanas al istmo.

5. CONCLUSIONES.

En este estudio experimental, se ha analizado el papel de *Fgf8* en el desarrollo correcto del SNC. Después de la realización de esta descripción anatómica en los embriones de ratón afectados por los distintos niveles de *Fgf8*, se puede afirmar que el papel de la proteína *Fgf8* es crucial para la especificación y desarrollo correcto de estructuras ístmicas dorsales (cerebelo y mesencéfalo caudal). Como morfógeno se entiende también que las alteraciones entre el control y los dos mutantes analizados es gradienta. También concluir que las regiones afectadas, mesencéfalo y rombencéfalo, son muy sensibles a la función de FGF8 ya que en el caso de hipomorfo leve en el que se expresa el 40% de *Fgf8* desaparecen estos territorios. He de añadir que la literatura publicada afirma que un ratón mutante con el 50% de los niveles de FGF8 no muestra ningún fenotipo, por lo que puede vivir como un ratón silvestre⁽⁶⁾.

En el caso del mesencéfalo el papel de *Fgf8* también tiene una gran importancia funcional, ya que en el mutante *Fgf8*^{neo/neo} a pesar de expresarse el 40% de esta proteína desaparece el colículo inferior. El **colículo inferior** junto con los colículos superiores forman unas eminencias conocidas como los cuerpos o tubérculos cuadrigéminos, y forman parte de la región tectal del mesencéfalo. El colículo inferior es el principal núcleo del mesencéfalo en la ruta auditiva y recibe aferencias de varios núcleos periféricos del tronco encefálico en la ruta auditiva, así como aferencias del córtex auditivo³¹. El cuadrigémino superior forma parte de la vía visual interviniendo en el movimiento ocular ante el campo visual. Es decir, probablemente estos ratones sean sordos y posean una parálisis ocular que hace entre otras muchas alteraciones, que no puedan sobrevivir una vez que nacen.

³¹ Skottun, Bernt C. The ability of inferior colliculus neurons to signal differences in interaural delay. PNAS. 2001; 98 (24): 14050-54.