

IMPLICACIÓN DE FGF8 EN EL CORRECTO DESARROLLO DE LAS PROYECCIONES AFERENTES Y EFERENTES DEL HIPOTÁLAMO

Crespo Quiles, Carla

Tutor: Echevarría Aza, Diego

Embriología experimental

Unidad de Neurobiología del Desarrollo

Instituto de Neurociencias de Alicante

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Universidad Miguel Hernández

Curso académico: 2014/2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar he de darle las gracias a mi tutor, el Dr. Diego Echevarría, que me ha acogido en su laboratorio como una más, dándome todas las herramientas y facilidades para desarrollar mi trabajo, enseñándome tanto anatomía, técnicas de laboratorio, etc. como lo que significa la realización personal que supone un trabajo bien hecho. Durante el tiempo que he podido pasar trabajando con él he aprendido a admirarlo como científico y como persona. Su dedicación y su entrega hacen de él un verdadero ejemplo a seguir y un gran modelo de persona. Gracias Diego por todo lo que me has dado.

También quiero agradecer al Dr. Eduardo Echevarría toda su ayuda, todos esos momentos en los que me veía perdida, mirando un cerebro que para mí era una masa indiferenciada de tejido y en los que él, de manera totalmente desinteresada y dejando a un lado sus demás obligaciones se ha sentado a mi lado contándome todo lo que necesitaba saber.

Por supuesto también tengo que agradecer a Paqui... ¡todo! Porque, ¿qué haría el laboratorio sin ella? Esa persona que siempre está ahí para lo que necesites, alguien con mil manos y otras tantas cabezas, capaz de estar pendiente de no sé cuántas cosas a la vez. Sin embargo no es sólo su trabajo lo que tengo que agradecer, mucho más importante ha sido su amistad, a pesar de que al parecer empezamos con mal pie, me siento afortunada de contarla ahora entre mis amigas. Paqui, sabes que estaré siempre para lo que necesites.

A mis compañeras en el laboratorio, Elena, porque fue un gran apoyo cuando todo el mundo se iba de vacaciones y nos quedamos como reinas y señoras del lugar. Y por supuesto a Cristina, que no ha sido sólo una gran compañera si no que pronto se ha convertido en una buena amiga, ha sido para mí una de esas extrañas personas con las que conectas desde el primer momento, con las que tienes la confianza de mandarlas a paseo en un momento de estrés y que te la devuelven sacándote una sonrisa.

Y a todos los componentes del laboratorio de Salvador Martínez que me han ayudado a conseguir muestras cuando no salían tapones y a encontrar solución a esas PCRs imposibles.

A Fran, que con sus pequeñas visitas, con sus consejos y con su amistad ha hecho este camino a recorrer mucho más fácil y divertido, desde 1º de carrera hasta hoy en día, mi compañero de laboratorio y sobre todo mi amigo.

Gracias también a mis compañeros de los scouts, que me apoyaron durante todo este tiempo en el que estuve desaparecida para ellos y que a pesar de no entender mi trabajo, a pesar de

que la mayoría están en contra del trabajo con animales, a pesar de que los he abandonado durante meses, a pesar de todo, en ellos siempre he podido encontrar un respiro, una mano amiga y unos brazos tendidos a la espera de mi vuelta.

Entre ellos un agradecimiento especial a Bea y a María, dos grandes amigas a las que podía llamar sin importar la hora aunque por distintas razones, Bea porque ya me devolvería la llamada cuando se diera cuenta y María porque siempre ha estado al otro lado (del teléfono o del mundo) para escuchar mis llantos en los momentos en los que el estrés me superaba, para entretenerme cuando el sueño podía conmigo y despertarme a base de hacerme reír, para distraerme cuando me obcecaba y ayudarme aún sin darse cuenta a encontrar la vía correcta para encontrar la solución a alguno de los problemas con los que me topaba, sin ella no hubiera podido sobrellevar la carrera, el TFG o el simple día a día.

Por supuesto también tengo que darle las gracias a mi familia, que siempre han estado ahí. En primer lugar a mis padres, que siempre me han animado a perseguir mi sueño de llegar a ser científica y que lo siguen haciendo, que nunca me han puesto trabas a nada aunque para ellos supusiera un gran esfuerzo, si conllevaba mi felicidad ellos estaban dispuestos a darlo todo. Gracias, he tenido muchísima suerte por teneros de padres.

No podría faltar entre mis agradecimientos una mención especial a mi tía, que no sabe muy bien lo que hago (ella cree que abro ratas y me las estudio) y aun así sigue estando orgullosa. Que por muy estresada que estuviera, hablar con ella suponía para mí una bocanada de felicidad, porque la quiero por encima de todo y el simple hecho de que esté me da una razón para seguir adelante, porque su ejemplo ha supuesto mi afán de superación, si ella nunca se ha rendido yo tampoco.

Y por último y aunque no es estrictamente un agradecimiento, a la comunidad científica. Este trabajo ha supuesto para mí un gran paso, de los muchos que me quedan por dar. Aún me queda mucho camino por recorrer, pero poder hacer este TFG ha reafirmado mi sueño de dedicarme a esto. Sin importar las jornadas de 12 horas, los fines de semana en el laboratorio, sin importar el estrés y los experimentos fallidos que me llevaban a pensar que no acabaría nunca, aun así, sé que esto es lo que quiero hacer durante el resto de mi vida, es mi vocación.

Y acabaré con una frase que me resume mi primer contacto con la ciencia de verdad, "si es la paciencia la madre de la ciencia, sin duda Murphy es el padre".

Eternamente agradecida,

Carla

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
IMPLICACIÓN DE FGF8 EN EL CORRECTO DESARROLLO DE LAS PROYECCIONES AFERENTES Y EFERENTES DEL HIPOTÁLAMO	4
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA ELEGIDO	5
FGF8.....	8
EL HIPOTÁLAMO.....	9
FÓRNIX	11
TRACTO MAMILOTALÁMICO	12
TRACTO MAMILOTEGMENTAL	12
OBJETIVO.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES Y TAMPONES	13
OBTENCIÓN DE RATONES MUTANTES	14
OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE EMBRIONES	16
GENOTIPADO DE EMBRIONES.....	17
TINCIÓN DE NISSL.....	19
INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	19
RESULTADOS	22
FENOTIPO <i>WILD TYPE</i> :.....	22
FENOTIPO MUTANTE VS. <i>WT</i>	24
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES	30
PROYECCIONES FUTURAS.....	31
BIBLIOGRAFÍA	31

IMPLICACIÓN DE FGF8 EN EL CORRECTO DESARROLLO DE LAS PROYECCIONES AFERENTES Y EFERENTES DEL HIPOTÁLAMO

RESUMEN

Fgf8 juega un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) en distintos estadios embrionarios regulando la expresión de otros genes y modificando el destino celular dependiendo del territorio dentro del tubo neural. En concreto, como organizador secundario con una expresión centrada en el istmo cerebral, en la cresta neural anterior y en la zona limitans principalmente.

En este TFG se utilizan mutantes hipomorfos para *Fgf8*, que presentan una expresión reducida para este gen, para estudiar las posibles alteraciones de las proyecciones hacia y desde el hipotálamo (en particular de la región mamilar) que hayan podido ocurrir. Los resultados muestran que aunque no hay una implicación directa de *Fgf8* en el desarrollo de estos tractos y proyecciones, sí determina para la formación del cuerpo calloso y de la línea media dorsal prosencefálica e indirectamente estos tractos y proyecciones se ven anatómicamente afectados.

PALABRAS CLAVE: Hipotálamo, Fórnix, Tracto mamilotalámico, Tracto mamilotegmental, *Fgf8*, Factor de crecimiento fibroblástico 8.

ABSTRACT

Fgf8 plays an important role in the development of the central nervous system in different embryonic states, regulating the expression of other genes and modifying the fate of the cell groups depending on the neural domain within the neural tube. Particularly, as secondary organizer with an expression focused on the isthmus organizer, the anterior neural ridge and the zone limitans.

In this TFG we have used hypomorph mutants for *Fgf8*, which show a reduced expression for this gen, so as to study the possible alterations in the projections to and from the hypothalamus (especially in the mammillary bodies) that could have occurred. The results show that there is no direct implication of *Fgf8* in the development of these tracts and projections, but it determines for the formation of the corpus callosum and the dorsal medial forebrain bundle and indirectly, these projections and tracts are anatomically affected.

KEY WORDS: Hypothalamus, Fornix, Mammillothalamic tract, Mammillotegmental tract, *Fgf8*, Fibroblast Growth Factor.

INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA ELEGIDO

La formación del (SNC) es un proceso complejo que parte de unas pocas células que se dividirán y migrarán para poder dar lugar a lo que comúnmente llamamos cerebro y médula espinal.

Partimos desde el disco embrionario bilaminar, formado por dos capas diferenciadas de células, una sobre la otra, la más externa se denomina epiblasto y está formada por células cilíndricas, y una segunda capa de células cúbicas llamada hipoblasto.

Durante la gastrulación las células más caudales del epiblasto, bajo la influencia genética del hipoblasto primitivo comienzan su diferenciación hacia mesodermo presuntivo. Este proceso, conocido como inducción del mesodermo, está motivado por múltiples moléculas que funcionan como agentes efectores, entre las que cabe destacar: factor inductor mesodérmico (Vg1), activina, proteína morfogénica ósea (BMP, del inglés *Bone Morphogenic Protein*), factor de crecimiento de fibroblasto (FGF, del inglés *Fibroblast Growth Factor*), o productos codificados por los genes Wnt y Noggin (Puelles, Martínez Pérez y Martínez de la Torre, *Neuroanatomía*). Cualquier alteración en alguno de estos factores llevará a cambios en el desarrollo del cerebro, es decir, malformaciones.

Con la finalización de la gastrulación el embrión llegará a formar tres capas diferenciadas de células que más tarde originarán un organismo completo. De dentro afuera estas son: endodermo, mesodermo y ectodermo. Esta última dará lugar a la epidermis y al sistema nervioso (SN) a través del proceso llamado inducción neural. También en este proceso el embrión sabrá qué es rostral y caudal, por lo que la polaridad antero-posterior se establece definitivamente en esta etapa.

Casi paralelamente a la gastrulación comienza el proceso de neurulación. El neuroepitelio comienza a engrosarse desde la región media dorsal del ectodermo formando la placa neural, la cual sufrirá una invaginación y culminará en la formación del tubo neural, origen embrionario del SNC.

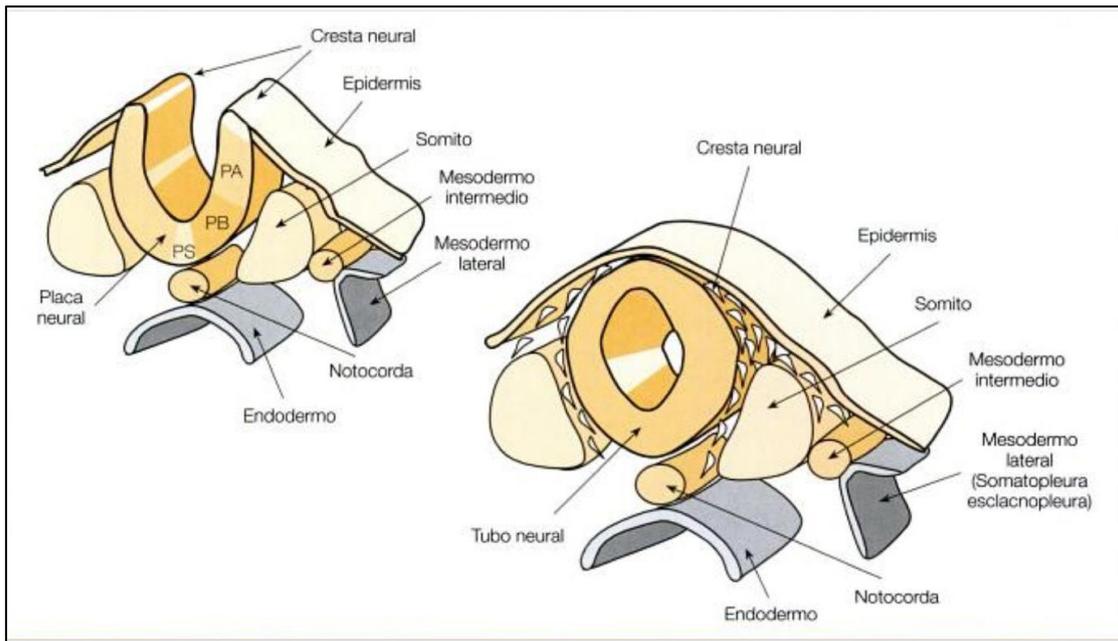


FIGURA 1: Neurulación: fases de canal y tubo neural (Puelles, Martínez Pérez y Martínez de la Torre, *Neuroanatomía*).

En este punto la polaridad medio-lateral original de la placa neural se convierte en la polaridad ventro-dorsal del tubo neural. Antes de la fusión definitiva de la cresta neural y la formación del tubo neural, el eje longitudinal de la placa neural se cruza con lo que más tarde se convertirá en el eje ventro-dorsal en el extremo apical anterior del tubo neural. Esta intersección representa el eje radial anterior de la placa neural (Rubenstein et al., 1994).

El eje ventro-dorsal está determinado por la interacción antagonista entre los factores de ventralización tales como SHH (*Sonic Hedgehog*) producidos en la notocorda y en la parte ventral de la línea media del neuroectodermo (i.e, la placa de piso) (Roelink et al., 1995) y los factores de dorsalización, como miembros de la familia BMP que emanan del ectodermo no neural adyacente (Lee y Jessell, 1999). Por lo tanto, el tubo neural se divide simétricamente en cuatro tipos de dominios longitudinales con distintos patrones de expresión génica y diferentes propiedades morfológicas: la placa de suelo, la placa basal, la placa alar y la placa de techo. Estos dominios se caracterizan por la expresión, entre otros, de *Shh* en placa de suelo, *Nkx2.2* en el dominio ventro-lateral del límite basal-alar y *Noggin* y *Wnt1* en la placa de techo (Shimamura, 1995).

Tras los estadios de la placa y el tubo neural son los centros de señalización del neuropitelio llamados organizadores secundarios los que toman importancia en la especificación de los tres dominios principales que se generan al dilatarse la región cefálica del tubo neural en forma de 3 vesículas primarias: el cerebro anterior o prosencéfalo, que posteriormente dará lugar al

prosencefalo secundario (telencéfalo e hipotálamo) y al diencéfalo; el cerebro medio o mesencefalo y el cerebro posterior o rombencéfalo, desde el que se formará el metencefalo y el mielencéfalo. Además, la actividad morfogenética de los organizadores secundarios controla la polaridad y la generación de sub-regiones neurales dentro de estas regiones principales (Echevarria et al., 2003).

Conjuntamente a este proceso de proliferación selectiva, el neuroporo, los extremos anterior y posterior del tubo neural, se cierran.

En la mayoría de los vertebrados el tubo neural es una estructura recta, pero antes de completarse la neurulación el tubo neural se curva considerablemente hacia la zona ventral para formar las flexuras cefálica y cervical del tubo neural (Fig. 2, Vieira et al., 2010). Posteriormente, el prosencefalo se divide en el prosencefalo secundario (el telencéfalo y el hipotálamo) y más caudalmente el diencéfalo (Pombero y Martínez, 2009).

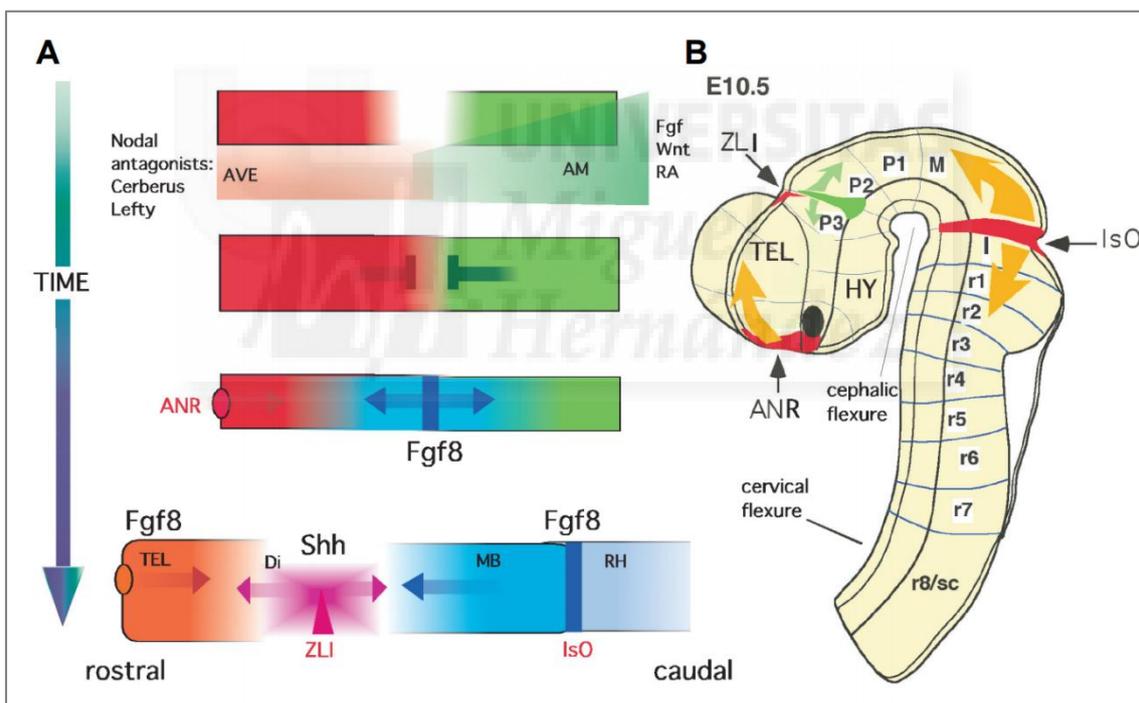


FIGURA 2: Organizadores secundarios y especificación del tubo neural.

El estudio de los genes reguladores que se expresan en patrones regionales restringidos durante el desarrollo del prosencefalo han proporcionado nuevas herramientas para definir los dominios histogenéticos y sus límites con una mejor resolución, partiendo del modelo segmentario conocido como “modelo prosomérico” descrito por His en 1893 y recuperado por Puelles en 1987, que continuó su trabajo junto a Rubenstein en 1993 (Fig.2).

FGF8

La especificación de los territorios del tubo neural son realizados por una combinación de factores de transcripción y moléculas de secreción que actúan desde centros organizadores a lo largo del eje antero-posterior del tubo y el eje dorso-ventral. Estas moléculas de secreción actúan como morfógenos.

Entre las moléculas que conocemos con actividad morfogénica, existe una clara evidencia de que la señalización de *Fgf8* es esencial para la formación del mesencéfalo y rombencéfalo de los vertebrados.

La proteína codificada por el gen *Fgf8* es un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Los miembros de la familia FGF poseen actividades de supervivencia celular e inducen la mitosis, y están involucrados en una gran variedad de procesos biológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis y la reparación de tejidos.

El gen *Fgf8* de ratón contiene 6 exones que se combinan de diferentes maneras para crear hasta ocho isoformas alternativas de la proteína, cada una de ellas con eficacias diferentes.

Se ha demostrado que FGF8 comprende diferentes funciones en cada uno de los estadios embrionarios en los que se expresa. En los estadios más tempranos FGF8 es necesaria para regular la correcta expresión de los genes que inducen a la formación del tubo neural durante la neurulación. Además es necesaria para la supervivencia celular, como se evidencia por el hallazgo de que la inactivación total de *Fgf8* desde estadios tempranos del desarrollo embrionario provoca la no implantación del cigoto.

Por otra parte, cuando la expresión de *Fgf8* se ve reducida en lugar de completamente eliminada la parte rostral del mesencéfalo es aparentemente normal, mientras que el resto del mesencéfalo, el istmo y el cerebelo se encuentran igualmente ausentes. Esto sugiere que existen diferencias en cuanto a la sensibilidad frente a FGF8 en las distintas regiones del mesencéfalo y rombencéfalo (Chi et al., 2003; Echevarria et al., 2005)

Fgf8 se expresa en el istmo encefálico, (Garda, Echavarría y Martínez, 2001). También se expresa en la placa comisural, cresta neural anterior, hipotálamo ventral, además de otras regiones fuera del tubo neural.

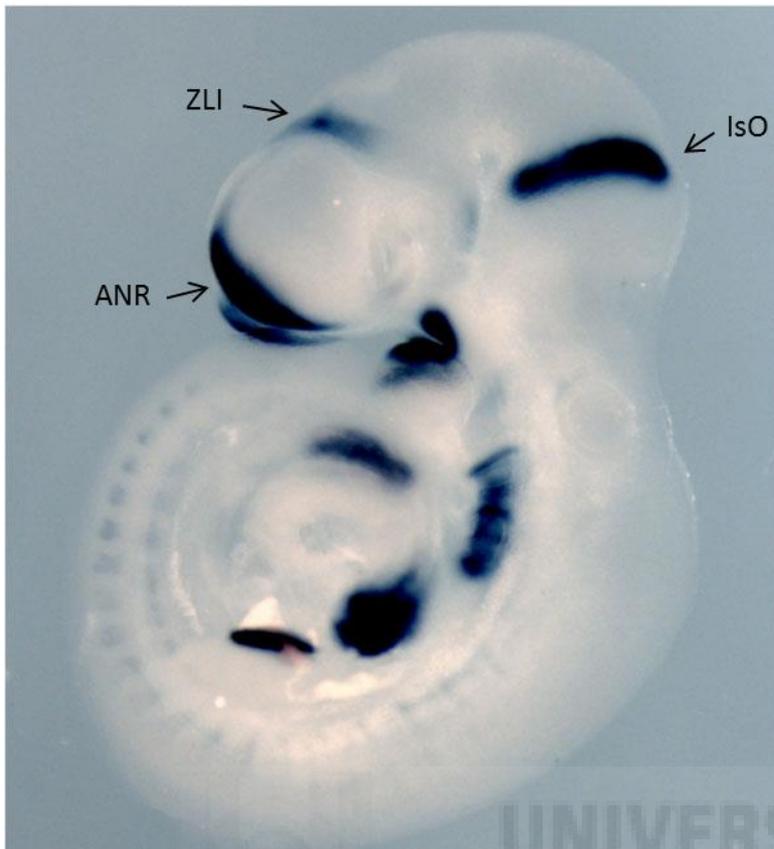


FIGURA 3: Patrón expresión de *Fgf8* en un embrión de E10.5 (día 10 de gestación, la gestación completa en ratón comprende un periodo de 21 días). Expresión en los organizadores secundarios: ANR (*Anterior Neural Ridge*, Cresta neural anterior); ZLI (*Zona limitans*); IsO (*Isthmic Organizer*, Organizador ístmico)

En el desarrollo del prosencéfalo, *Fgf8* y *Otx2* se coexpresan en el polo anterior del prosencéfalo durante los primeros estadios del desarrollo del tubo neural, posteriormente *Otx2* deja de expresarse pero se mantiene la expresión de *Fgf8* en un gradiente rostro-caudal regulando la expresión de otros genes como *Bmp* y *Wnt*, necesarios para la correcta formación de estas estructuras (Crossley et al., 2001; Grove y Fukuchi-Shimogori, 2003).

EL HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es una pequeña parte del cerebro localizada en la parte ventral del mismo, bajo el pretálamo y el tálamo, justo encima del tronco cerebral, compuesto por varios núcleos de sustancia gris y es el encargado de mantener la homeostasis en los vertebrados regulando la temperatura corporal, el hambre o la saciedad, el ciclo circadiano, tanto como las emociones y determinados comportamientos, entre otras cosas.

A lo largo de la historia se han cambiado numerosas veces las fronteras que marcan los límites del hipotálamo. Actualmente se define a la lámina terminalis o lámina supraóptica como límite

rostral del hipotálamo, mientras que el quiasma óptico, el tallo hipofisiario, los nervios ópticos y los cuerpos mamilares lo delimitarían ventralmente.

Dentro de la anatomía del hipotálamo los cuerpos mamilares son núcleos destacables por varias razones. Son claramente discernibles del resto del hipotálamo como dos estructuras esféricas, compuestas por unos pocos tipos celulares (Vann y Aggleton, 2004). Los cuerpos mamilares son los núcleos que más conexiones tienen con respecto a su tamaño. El patrón de las conexiones es muy similar entre primates y roedores, por lo que se deduce origen evolutivo primitivo y su importancia, puesto que se ha mantenido entre especies. Los cuerpos mamilares reciben una densa cantidad de información desde el hipocampo a través del fórnix (Vann y Nelson, 2015).

Los cuerpos mamilares se comunican a su vez con el núcleo talámico anterior a través del tracto mamilotalámico, que es unidireccional, es decir, la información únicamente fluye desde los cuerpos mamilares al tálamo en lo que esta vía se refiere y necesita de otras fibras para hacer el camino de vuelta. El núcleo anterior del tálamo se comunica con el hipocampo mediante el cíngulum, cerrando así este circuito. (Vann et al., 2007)

Esta red de fibras que atraviesan el cerebro comunicando hipotálamo con hipocampo, núcleo anterior del tálamo y córtex son de gran importancia en el proceso de la adquisición de la memoria.

Otra de las vías que nace desde los cuerpos mamilares es el tracto mamilotegmental, que comienza junto al mamilotalámico en una sola fibra aunque se separan casi inmediatamente. (Fig. 4) Esta vía comunica los cuerpos mamilares con la formación reticular del tegmento del mesencéfalo. A su vez, El núcleo mamilar lateral recibe estímulos desde la zona medial de la formación reticular mesencefálica a través del pedúnculo mamilar. (Puelles, Martínez Pérez y Martínez de la Torre, *Neuroanatomía*).

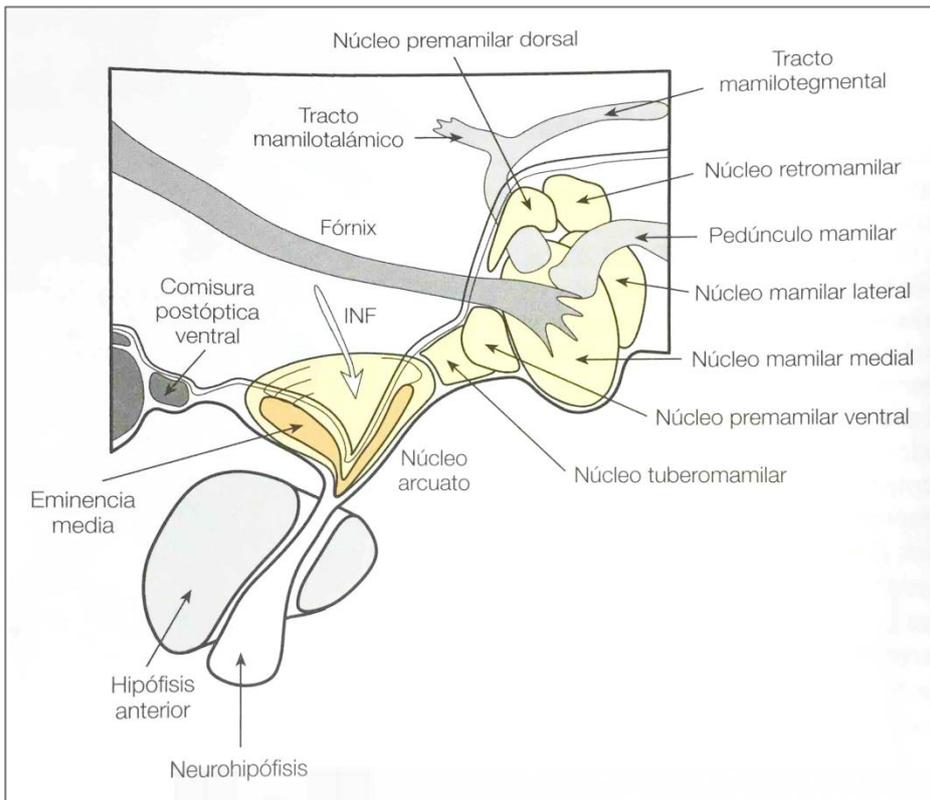


FIGURA 4: Hipotálamo: placa de suelo. Región mamilar y fibras aferentes y eferentes (Puelles, Martínez Pérez y Martínez de la Torre, *Neuroanatomía*).

FÓRNIX

El fórnix se compone por un conjunto de haces nerviosos en forma de "C" que comunica el hipocampo con los cuerpos mamilares, así como el núcleo anterior del tálamo. Las fibras comienzan en el hipocampo, en los núcleos del telencéfalo dispuestos en los sectores posterior e inferior llamados núcleos o cuerpos amigdalinos o amigdaloides en cada lado del cerebro como prolongaciones de los pilares del fórnix llamadas fimbria; los lados izquierdo y derecho se encuentran separados. Los haces de fibras se unen en la línea media del cerebro formando el cuerpo del fórnix. El cuerpo del fórnix viaja anteriormente y se divide de nuevo al llegar a la comisura anterior y continúa de manera separada hasta los cuerpos mamilares.

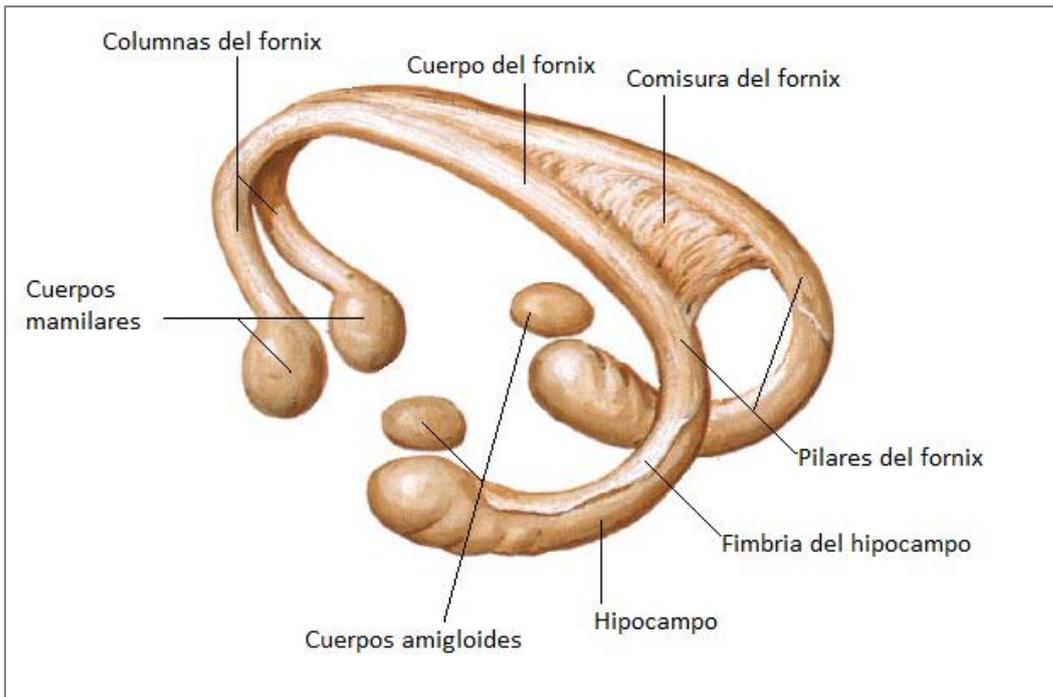


FIGURA 5: Anatomía del fórnix cerebral.

TRACTO MAMILOTALÁMICO

El tracto mamilotalámico es un haz de fibras nerviosas que viaja desde los cuerpos mamilares hasta el núcleo anterior del tálamo.

Los cuerpos mamilares son considerados núcleos de relevo de la información, pasando la información que le llega desde la formación hipocampal hasta el núcleo anterior del tálamo mediante el tracto mamilotalámico.

Si los cuerpos mamilares son estructuras de relevo y su función principal es transferir información al núcleo anterior del tálamo a través del tracto mamilotalámico, daños en este tracto equivaldrían funcionalmente a daños en los propios cuerpos mamilares (Vann y Nelson, 2015).

TRACTO MAMILOTEGMENTAL

El tracto mamilotegmental es una de las fibras eferentes más importantes que surgen de los cuerpos mamilares y una de las primeras en formarse durante el desarrollo (Alpeeva y Makarenko, 2007) y conectan los cuerpos mamilares con diferentes núcleos del mesencéfalo como el núcleo tegmental y los núcleos reticulares del puente del tegmento. Tiene una gran importancia en la regulación de la función visceral procesando la información espacial (Kwon et al., 2011).

OBJETIVO

El objeto de estudio de este Trabajo de Fin de Grado es estudiar las posibles alteraciones de las proyecciones hacia y desde el hipotálamo (en particular de la región mamilar) que hayan podido ocurrir tras la disminución severa de *Fgf8* en un embrión de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES Y TAMPONES

PBS 1X: Para preparar 1L de PBS 1X. Disolver 8g de NaCl, 0.2g de KCl y 0.24g de KH_2PO_4 en 800ml de H_2O destilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Añadir H_2O hasta alcanzar el volumen final de 1L. Atoclavar (20 minutos a $1\text{Kg}/\text{cm}^2$).

PBT: Para preparar 1L de PBT. Preparar 1L de PBS 1X. Añadir 1mL de Tritón. Remover con ayuda de un agitador magnético. Atoclavar (20 minutos a $1\text{Kg}/\text{cm}^2$).

BSA de bloqueo: Para preparar 100mL de solución BSA. Añadir 10mL de Lisina 1M a 90mL de PBS 1X + 0.075% de Tritón + Azida al 0.1%.

TRIS 1M (Ph 3.9): Para preparar 1L de TRIS 1M. Añadir 121.14g de Tris-HCl a 800mL de H_2O destilada. Remover con ayuda de un agitador magnético. Ajustar el pH hasta 3.9 con HCl. Añadir H_2O hasta alcanzar el volumen final de 1L. Atoclavar (20 minutos a $1\text{Kg}/\text{cm}^2$).

TRIS 0.05M: Para preparar 1L de TRIS 0.05M. Añadir 6.06g de Tris-HCl y 1.39g de Tris básico a 800mL de H_2O destilada. Remover con ayuda de un agitador magnético. Ajustar el pH hasta 7.6 con HCl. Añadir H_2O hasta alcanzar el volumen final de 1L. Atoclavar (20 minutos a $1\text{Kg}/\text{cm}^2$).

TAE 1X: Se prepara a partir de una disolución de TAE 50X (20mL de TAE 50X en H_2O destilada hasta un volumen final de 1L). Para preparar 1L de TAE 50X. Añadir 242g de Tris básico en 800mL de H_2O destilada. Remover con ayuda de un agitador magnético. Añadir 100mL de disolución de EDTA 0.5M y 57.1mL de ácido acético glacial. Ajustar el pH hasta 8.3. Añadir H_2O hasta alcanzar el volumen final de 1L. Atoclavar (20 minutos a $1\text{Kg}/\text{cm}^2$).

OBTENCIÓN DE RATONES MUTANTES

Los ratones de nuestro interés son hipomorfos severos para el *Fgf8*, albergando en su genoma 2 copias mutadas de este gen: *Fgf8 neo* y *Fgf8 Δ2,3* (Fig. 6, b y d)

En aras de obtener esta línea de ratones hemos de cruzar dos progenitores heterocigotos, uno de ellos *Fgf8 neo/+* y el otro *Fgf8 Δ2,3/+*, este cruce nos dará una descendencia de:

<i>Fgf8 neo/+</i> / <i>Fgf8 Δ2,3/+</i>	<i>Fgf8 neo</i>	<i>Fgf8 +</i>
<i>Fgf8 Δ2,3</i>	<i>Fgf8 neo/Δ2,3</i>	<i>Fgf8 Δ2,3/+</i>
<i>Fgf8 +</i>	<i>Fgf8 neo/+</i>	<i>Fgf8 +/+ (WT)</i>

25% Hipomorfos severos (*Fgf8 neo/ Δ2,3*)

25% Heterocigotos *Fgf8 neo/+*

25% Heterocigotos *Fgf8 Δ2,3/+*

25% Homocigotos *Wild-Type* (*Fgf8 +/+*)

Los progenitores por su parte los hemos obtenido inicialmente por recombinación mediada por Cre- para así obtener las deleciones deseadas de genes inducibles en células embrionarias por recombinación homóloga.

Primero construimos un vector de aproximadamente 10kb de ADN genómico alterado de *Fgf8* de la siguiente manera:

- Primero insertamos un sitio loxP en el intrón localizado aguas arriba del exón 2 y otro en la región 3'UTR para *flaxear* (*flank with loxP sites*; flanquear con sitios loxP) las secuencias codificantes de los exones 2 y 3 del gen *Fgf8*.
- En segundo lugar insertamos el gen de resistencia a la neomicina (*neo*) flanqueado por sitios *frt* inmediatamente aguas arriba del sitio loxP 5' insertado anteriormente.

Una característica importante del diseño de este vector es que ni los sitios loxP ni el gen de resistencia a la neomicina flanqueado por los sitios *frt* interrumpen ninguna secuencia codificante.

Los dos sitios loxP flanquean secuencias codificantes muy conservadas del gen *Fgf8*, las cuales son presumiblemente muy importantes para la funcionalidad del gen. Por lo tanto, la deleción

mediada por Cre- de estas secuencias flanqueadas por loxP lo convertirían en un alelo nulo de este gen.

Este vector lo utilizamos para producir una línea de ratones que contengan este alelo que llamamos *Fgf8 neo*. Los ratones *Fgf8 neo/+* son fenotípicamente indistinguibles de sus hermanos *wild-type* (Fig. 6, b).

Sin embargo, los ratones homocigotos para este alelo mutante (*Fgf8 neo/neo*), obtenido mediante cruce de los heterocigotos obtenidos anteriormente (*Fgf8 neo/+*), aunque no presentan defectos morfológicos graves a lo largo del eje principal del cuerpo ni en las extremidades, lo cual sugiere que la gastrulación y el desarrollo de extremidades se ha producido con normalidad, sí que resultan con malformaciones severas en el desarrollo del cerebro, véase, la delección de la parte posterior del mesencéfalo y de la parte anterior del cerebelo, así como la falta de bulbos olfatorios. Todas estas malformaciones llevan a los ratones *Fgf8 neo/neo* a no sobrevivir más allá de 24 horas tras el parto.

Estos datos nos llevan a pensar que el alelo *Fgf8 neo* es un alelo hipomorfo a pesar de conservar todos los exones intactos. Esto bien pudiera ser porque a pesar de que el gen de resistencia a la neomicina (*neo*), que se insertó para poder seleccionar el vector en primera instancia, haya provocado el truncamiento de la proteína resultante de la transcripción y traducción de este gen a causa de sitios de *splicing* encriptados que se activen durante la transcripción.

Seguidamente y con el objetivo de conseguir un alelo nulo de *Fgf8* (*Fgf8 Δ2,3*), cruzamos un ratón *Fgf8 neo/+* con un ratón mutante que exprese el gen *flp* bajo el control del promotor humano de la β -actina. De esta manera, por recombinación mediada por FIp obtenemos el alelo mutante *Fgf8 flox* (Fig. 6, c)

A continuación cruzamos un ratón *Fgf8 flox/+* con otro mutante que exprese esta vez Cre bajo el control del promotor humano de la β -actina para que, de manera análoga a como ocurría en la obtención del *Fgf8 flox*, por recombinación mediada por Cre, obtenemos el alelo *Fgf8 Δ2,3*, en el que los exones 2 y 3 del gen han sido eliminados y por lo tanto es un alelo nulo del gen en cuestión (Fig. 6, d) (Garel et al., 2003; Chi et al., 2003 y Meyers et al., 1998)

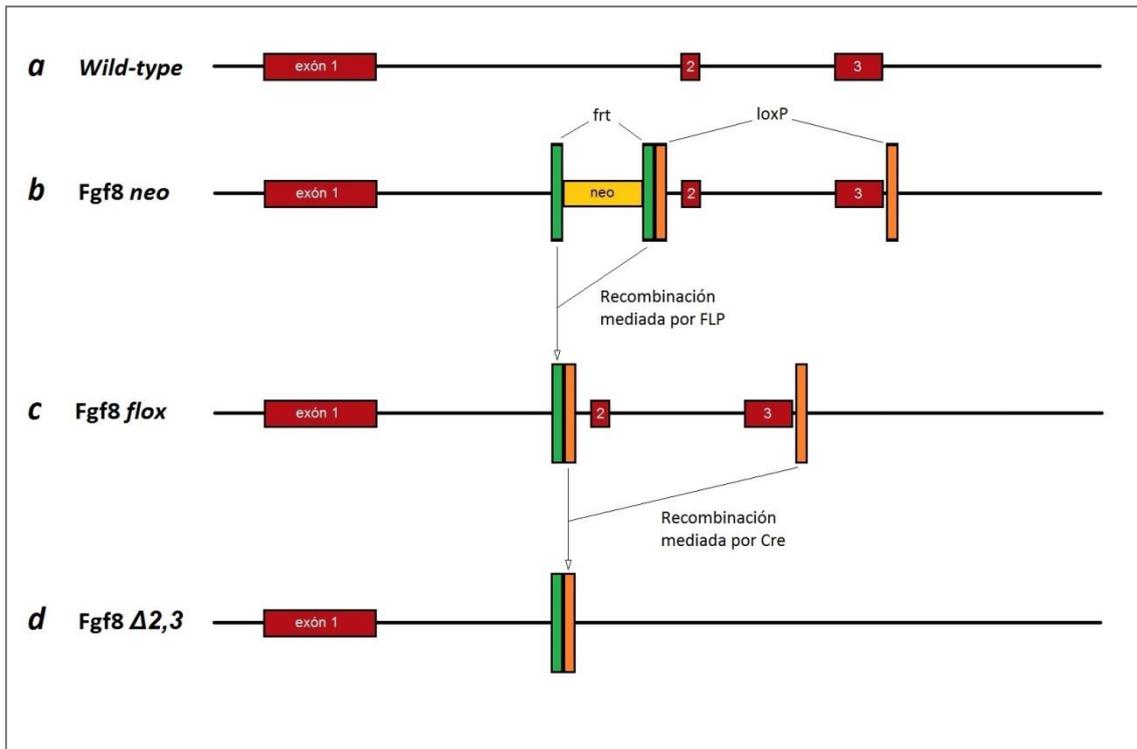


FIGURA 6: *a*, alelo *wild-type* del gen *Fgf8*, *b*, alelo *Fgf8 neo* producido por la sustitución de un fragmento del gen por una copia alterada mediante un vector, *c*, alelo *Fgf8 flox* obtenido por recombinação mediada por FLP, *d*, alelo *Fgf8 Δ2,3* obtenido por recombinação mediada por Cre.

Una vez obtenidos los mutantes heterocigotos nombrados anteriormente (*Fgf8 neo/+* y *Fgf8 Δ2,3/+*) y con el fin de obtener el doble mutante *Fgf8 neo/Δ2,3*, que es un mutante hipomorfo severo para el gen *Fgf8*, solo tenemos que llevar a cabo el cruce ya explicado, *Fgf8 neo/+* con *Fgf8 Δ2,3/+* y de acuerdo con la ley de Mendel, un 25% de la descendencia tendrá el genotipo deseado.

OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE EMBRIONES

Las ratonas preñadas y temporalizadas fueron sacrificadas por dislocación cervical y se disecó el útero para extraer los embriones a los 18.5 días de gestación (E18.5).

Toda la manipulación de los animales y los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a las directrices de los gobiernos de España y de la Unión Europea.

Los embriones fueron extraídos y disecados en PBS 1x frío. La cola fue seccionada y etiquetada para su posterior genotipado. Las cabezas fueron fijadas en PFA 4% durante 2 horas, después el cráneo fue abierto por la línea media desde el extremo caudal del hueso occipital hasta el frontal para que la disolución de fijación pudiera penetrar en él y se dejaron toda la noche en PFA al 4%. Después fueron lavadas en PBS para eliminar los restos de PFA. A continuación se deshidrataron las cabezas de los embriones en una batería ascendente de etanol (de 25% a

100%) y se almacenan en etanol 100% estéril a 4°C hasta su procesamiento (a -20°C para un almacenamiento de más tiempo).

Los embriones que se utilizaron posteriormente para inmunohistoquímica o para tinción de Nissl fueron puestos en butanol para extraer el etanol y luego se pasaron a parafina (GemCut® Emeral Paraffin, no. 24364-1) haciendo 6 lavados de 30 minutos y una noche en parafina fundida en una estufa a 57°C para finalmente colocar la cabeza en la orientación deseada (coronal o sagital) y dejar fraguar la parafina en un bloque a temperatura ambiente. Se cortaron en láminas de 12µm de espesor en orientaciones y se colocaron en portaobjetos. Finalmente se mantuvieron a 37°C durante la noche para que se secaran y los cortes se pegaran al portaobjetos.

GENOTIPADO DE EMBRIONES

Fueron utilizadas como muestra de tejido las colas de los embriones en fresco. Se les extrajo AND utilizando 100µL de NaOH 50mM a 95°C durante 25 minutos y luego se neutralizó añadiendo 100µL de solución TRIS 1M (pH 3.9). Finalmente se centrifugaron las muestras para obtener un sobrenadante en el que se encuentra el DNA.

Seguidamente se midió la concentración de DNA con el NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000) y se diluyeron las muestras con H₂O pura (320072 SIGMA-ALDRICH) para conseguir una concentración final de aproximadamente 150ng/µL.

Para el genotipado se utilizó la técnica de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena da la polimerasa). Con esta PCR se detectaron los 3 diferentes alelos de Fgf8 que podían albergar los embriones, Fgf8 neo, Fgf8 Δ2,3 o Fgf8 WT (Fig. 7). Como cebadores utilizamos:

SL1 EM99: 5'-CTTAGGGCTATCCAACCCATC -3'

SL2 EM40: 5'-CTGCAGAACGCCAAGTAG -3'

SL3 EM41: 5'-AGCTCCCGCTGGATTCTC -3'

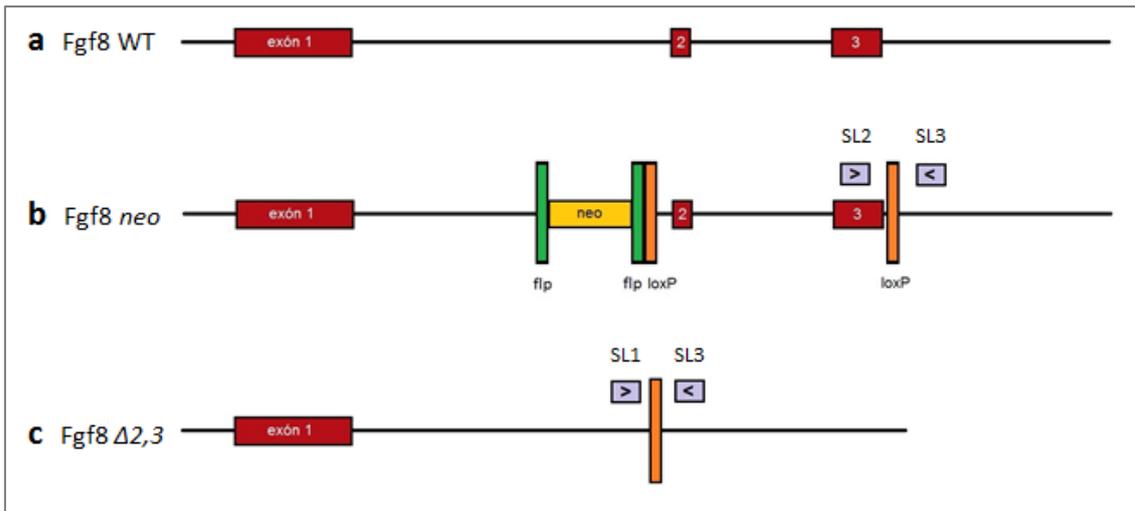


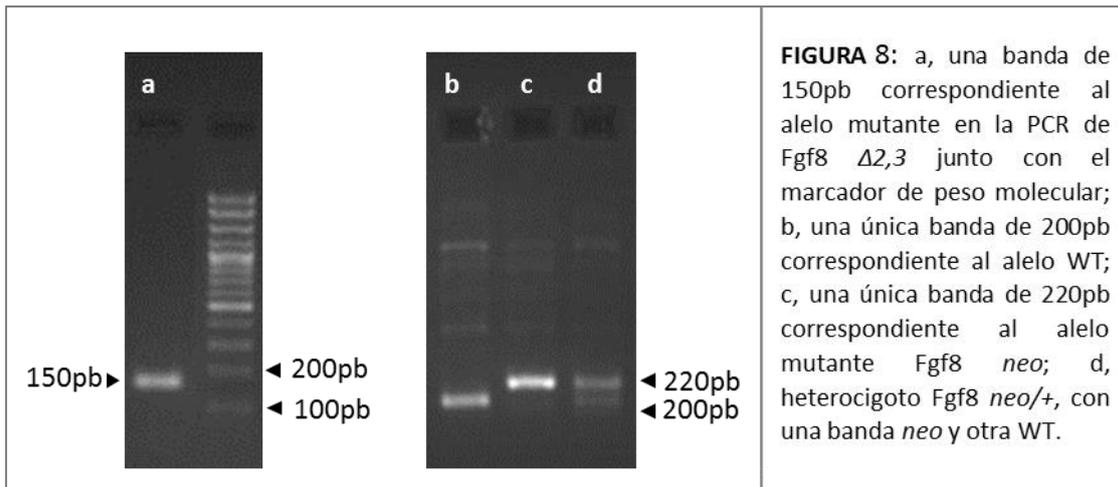
FIGURA 7: Vista esquemática de los alelos *Fgf8* WT (a), *Fgf8 neo* (b) y *Fgf8 Δ2,3* junto con la posición de los cebadores.

Y se utilizaron 2 programas diferentes con temperaturas de hibridación (T_h) diferentes, uno para *Fgf8 neo* con SL2 y SL3 (T_h : 54°C) y otro para *Fgf8 Δ2,3* con SL1 y SL3 (T_h : 58°C) y lo corremos en un gel de agarosa 2% en la solución TAE 1x de la siguiente manera:

- 95°C 5 minutos
- 35 ciclos de:

95°C	1 minuto
54/58°C	1 minuto
72°C	1 minuto
- 72°C 10 minutos

Obteniendo un resultado de una banda de 150pb (pares de bases) en la PCR de *Fgf8 Δ2,3* para el alelo mutante (Fig. 8, a) que corresponde al fragmento comprendido entre SL1 y SL3 (Fig. 7, c), como podemos observar, el fragmento que comprenderían estos cebadores en el alelo WT sería demasiado grande para ser amplificado. Por otro lado, en la PCR de *Fgf8 neo* obtenemos una banda de 200pb correspondiente al alelo WT y otra de 220pb que corresponde al alelo mutante *neo* (Fig. 8, b, c y d), contenidos entre los cebadores SL2 y SL3 (Fig. 7, b).



TINCIÓN DE NISSL

La técnica de la tinción de Nissl es utilizada principalmente para la tinción de tejido nervioso. Se utiliza cresil violeta, que tiñe los cuerpos de Nissl que son unos cúmulos de retículo endoplasmático rugoso.

Para llevar a cabo la tinción primero desparafinamos las muestras en la estufa a 95°C para que se derrita la parafina y después le hacemos 2 lavados de 10 minutos en xilol para quitar los restos de parafina. Después rehidratamos las muestras en una batería de alcoholes y finalmente dejamos las muestras en la solución de cresilo durante 10 minutos.

Una vez hecha la tinción volvimos a deshidratar las muestras rápidamente en la batería de alcoholes llegando finalmente hasta el xilol y montamos los cubreobjetos con Eukitt®.

INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

La IHQ es un proceso por el cual se detectan antígenos, normalmente proteínas, en un tejido mediante el uso de anticuerpos específicos contra el antígeno que se desea marcar. De esta manera podemos detectar dónde se expresa un gen localizando en el tejido la proteína que este codifica.

Con este fin se utilizan dos anticuerpos diferentes, uno primario que se une específicamente a la proteína de nuestro interés y otro secundario marcado con biotina o fluorescencia que se une al primario.

En el caso que nos compete lo primero que hicimos fue desparafinar y rehidratar utilizando la estufa y lavados de xilol de la misma manera que en la tinción de Nissl y desenmascarar los epítopes, que son las regiones de las moléculas a las que se une el anticuerpo, utilizando el

Autoestiner Link 48, en sus tanques de *PT Link*, sometemos las muestras a un aumento de temperatura progresivo hasta 95°C donde se mantiene 15 minutos, después lentamente vuelve a la temperatura ambiente, sumergidos en un tampón con un pH alto (*Target Retrieval Solution High pH*, Dako, DM828) que rompe los enlaces del paraformaldehído para desenmascarar el epítipo, dejarlo al descubierto y permitir adherirse el anticuerpo primario correctamente.

Después de desenmascarar se hacen 3 lavados de 10 minutos con PBT (PSB 1x + Tritón 1%) en agitación y se inactiva la peroxidasa endógena incubando las muestras con H₂O₂ (Normapur 23619.297) al 3% en PBT durante 30 minutos en oscuridad, lavamos los restos de H₂O₂ con 3 lavados de PBT de 10 minutos en agitación. Tras los lavados se bloquea con PBT con 0,1% de BSA (*Bovine serum albumin*, Albúmina de Suero Bovino) y 10% de lisina 1M incubándolo durante 1 hora a temperatura ambiente para que la unión antígeno-anticuerpo sea lo más específica posible, evitando así también que salga fondo durante el revelado.

Entonces pasamos a la incubación del anticuerpo primario, este se unirá específicamente a la proteína de nuestro interés. Diluimos el

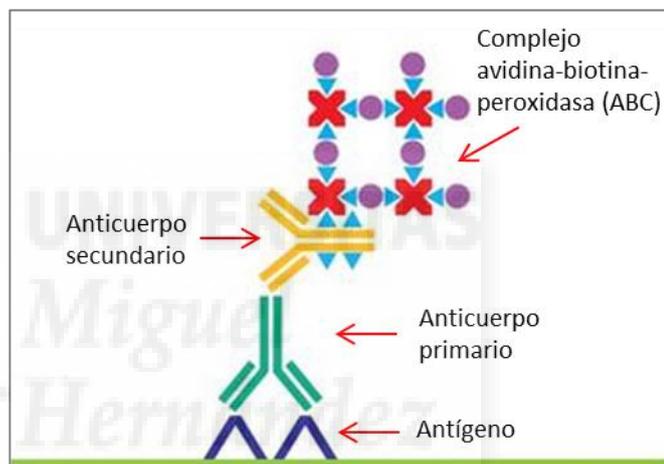


FIGURA 9: Esquema de la técnica de IHQ

anticuerpo a una concentración final de 1:100 en solución Dako (Antibody Diluent, DAKO, Ref. K8006) calculando un volumen final correspondiente a 250µL por cada portaobjetos. Colocamos los portaobjetos en posición horizontal en una caja con agua para que mantenga la humedad y no se evapore la dilución del anticuerpo y lo cubrimos con parafilm. Dejamos incubar el anticuerpo primario durante toda la noche.

A la mañana siguiente recuperamos el anticuerpo primario y volvemos a lavar con PBT, 3 lavados de 10 minutos en agitación. Entonces, de una manera similar a como se incubó el anticuerpo primario incubamos el secundario, esta vez con una dilución 1:200 en PBT, con 300µL por cada portaobjetos sin Parafilm durante una hora a temperatura ambiente. Este anticuerpo es contra el anticuerpo primario y está biotinizado, es decir, incluye biotina en su estructura (Fig. 9 en azul). Se recupera el anticuerpo secundario y de nuevo se hacen 3 lavados de 10 minutos con PBT para eliminar los restos. Entonces se pone el complejo ABC (complejo

avidina-biotina-peroxidasa, *Vectastain PK-4000*) a concentración 1:500 en PBT durante 1 hora del mismo modo que el anticuerpo secundario. El complejo ABC es conveniente prepararlo media hora antes de ponerlo para que se forme el complejo del reactivo "A" (la avidina) con el reactivo "B" (la biotina unida a la peroxidasa). Lavamos de nuevo con PBT y por último eliminamos el PBT con 2 lavados de 10 minutos de Tris pH7 0.05M.

Durante todo este proceso la proteína cuya expresión deseamos detectar ha sido marcada con un complejo incoloro, el siguiente paso es el revelado, durante el cual se le dará color a este complejo incubando las muestras en una disolución de Tris 0.05M + DAB 1% (3,3-Diaminobencidina) + 0.003% de H₂O₂, que dará un precipitado pardo mediante una reacción enzimática (Fig. 10).

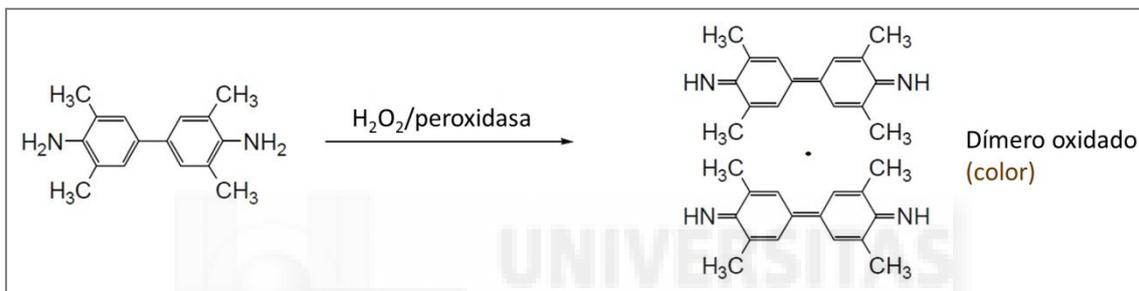


FIGURA 10. Reacción enzimática de la DAB

También se puede incluir níquel en la disolución de revelado dando una coloración más oscura. El revelado se hace en oscuridad y el tiempo necesario depende del anticuerpo utilizado. Una vez se obtiene el marcaje se ha de parar el revelado para que no salga fondo y eso se hace con 2 lavados de Tris 0.05M y 3 de PBS 1x de 10 minutos. Finalmente se deshidratan las muestras en la batería de alcoholes, después pasamos a xilol y montamos con Eukitt® igual que con la tinción de Nissl.

En este trabajo se hicieron 2 tipos de IHQ, una contra calbindina y otra contra DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*).

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

En el cerebro tiene una fuerte expresión en el hipocampo, el cerebelo, los cuerpos mamilares (dejando lo la región retromamilar sin marcar) entre otros (Grateron et al., 2003) y es muy útil para diferenciar determinadas estructuras.

La proteína DCC es una proteína transmembrana de la superfamilia de inmunoglobulina descubierta en 1990 por su implicación en el cáncer colorrectal (Fearon et al., 1990). Posteriormente se descubrió que es un receptor de netrina implicado en la formación del SNC, ya que los axones se extienden por estimulación de un gradiente de netrina-1 que es detectado por este receptor (Grady, 2007).

La IHQ contra esta proteína funciona como un marcador axonal específico, así pues dentro del cerebro permite la distinción de tractos tractos y fibras nerviosas que lo recorren.

RESULTADOS

FENOTIPO *WILD TYPE*:

El estudio de los ratones control se realizó con embriones con fenotipo *WT*, i.e., homocigotos *WT* o heterocigotos. Los únicos que presentan fenotipo mutante son los homocigotos mutantes (Meyers et al., 1998).

En las secciones sagitales del cerebro de un embrión de *Mus musculus* de E18.5 se pueden observar los diferentes tractos del interés de este trabajo. A partir de la fimbria, que se encuentra en la parte ventral del hipocampo (Fig. 11, A, C, E), nace el fórnix, ambos marcados positivamente con DCC (Fig. 11, E) y negativamente con Calbindina y tinción de Nissl (Fig. 11, A y C). El fórnix se une en la línea media del cerebro formando lo que se llama el cuerpo de fórnix (Fig. 11, B, D y F). Este continúa separándose en las columnas del fórnix que pasan rodeando el tercer ventrículo cerebral dorsalmente para aproximarse de nuevo por detrás de la comisura anterior, aunque sin llegar a unirse, hasta descender y llegar a los cuerpos mamilares, en la zona ventro-caudal del hipotálamo. Por lo tanto topográficamente realizan un semicírculo o "C" desde el hipocampo hasta los cuerpos mamilares.

Desde los mismo cuerpos mamilares nace un tracto que se separa casi inmediatamente después de salir en los tractos mamilotalámico y mamilotegmental, que van al tálamo y al tegmento respectivamente (Fig. 11, B, D y F). Por lo tanto la separación entre estos tractos en la región mamilar no está tan claramente delimitada.

También se pueden observar otros tractos como la estría medularis que nace en los núcleos septales y avanza dorsalmente al epitálamo diencefálico, justo por debajo del fórnix llegando hasta la Habénula, núcleo en el cual se origina el fascículo retroflexo, que desciende por el tálamo caudal (límite tálamo-pretectum) y termina en el núcleo interpeduncular y en los núcleos del rafe rombencefálico (Fig. 11).

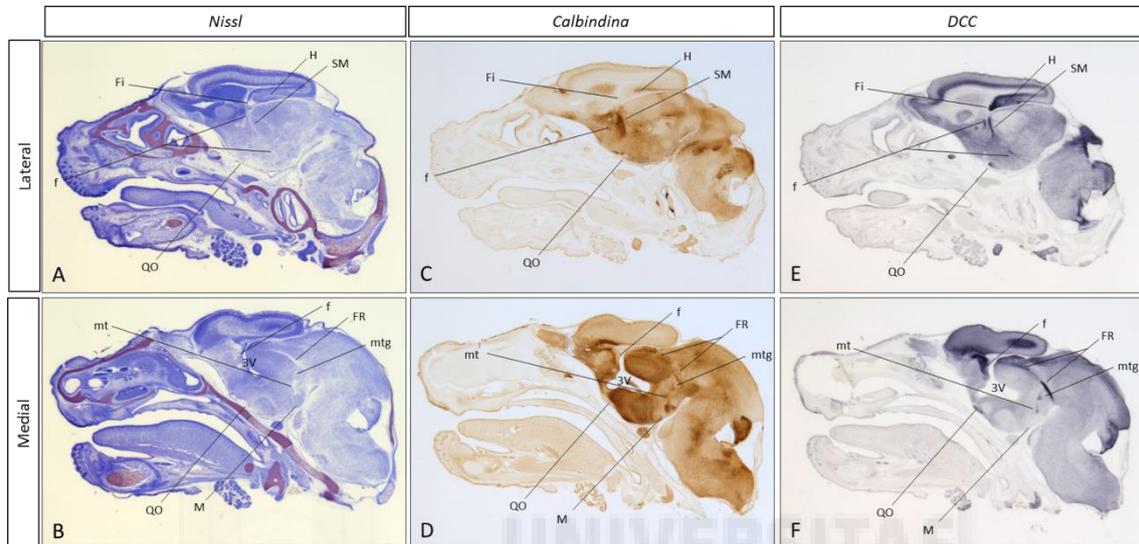


FIGURA 11: Cortes sagitales del cerebro de un embrión de ratón *WT* de E18.5 a los que se les ha hecho la tinción de *Nissl* (A y B), la IHQ contra calbindina (C y D) y contra DCC (E y F). Siendo A, C y E cortes más laterales y B, D y F mediales. Se reconocen las estructuras del hipocampo (H), fimbria (Fi), estría medularis (SM), fórnix (f), quiasma óptico (QO), cuerpos mamilares (M), fascículo retroflexo (FR) y tractos mamilotalámico (mt) y mamilotegmental (mtg).

De la misma manera, en los cortes coronales de los embriones *wild type* se aprecia el cuerpo del fórnix que se divide en las 2 columnas del fórnix bajo la comisura ventral hipotalámica y en los pilares del fórnix que forman la fimbria al comienzo rostral del hipocampo (Fig. 12, A, C y E). En los cortes más mediales (Fig. 12, B, D y F) se observa el fascículo retroflexo, con un fuerte marcaje en la IHQ contra DCC (Fig. 12, F), así como el fórnix y el tracto mamilotalámico, que viajan hasta los cuerpos mamilares.

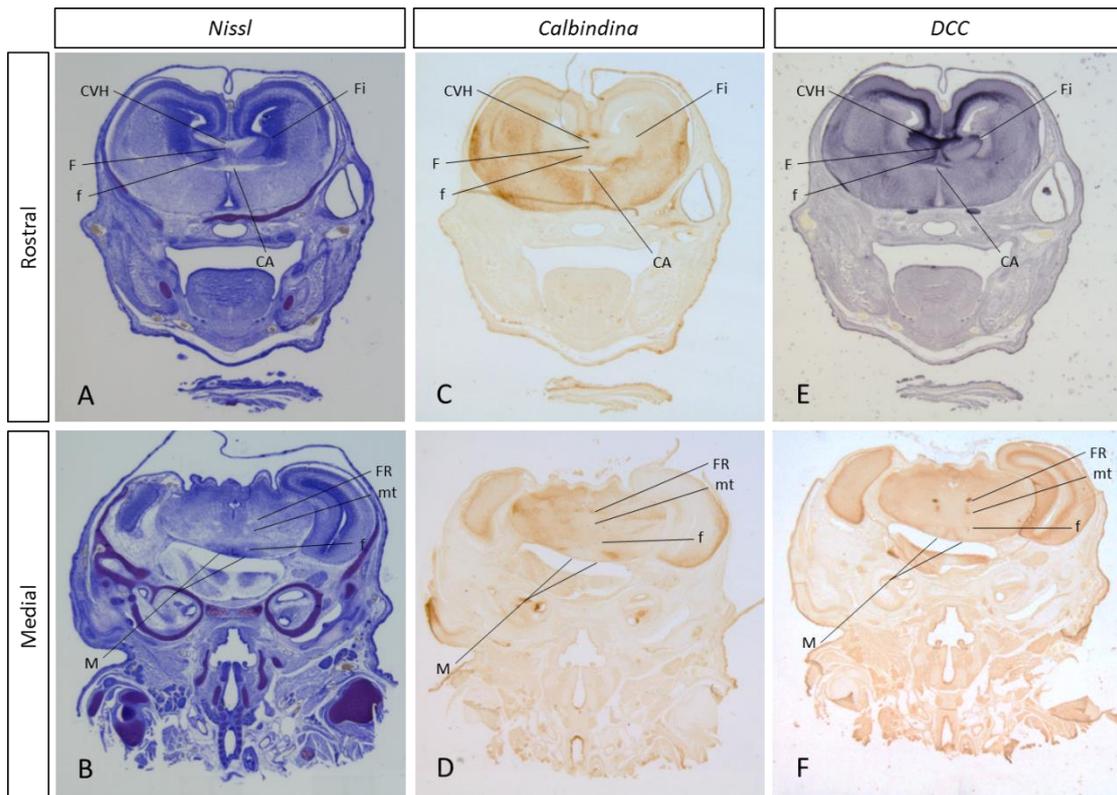


FIGURA 12: Cortes coronales del cerebro de un embrión de ratón *WT* de E18.5 a los que se les ha hecho la tinción de *Nissl* (A y B), la IHQ contra calbindina (C y D) y contra DCC (E y F). Siendo A, C y E cortes más rostrales y B, D y F mediales. Se reconocen las estructuras de la comisura ventral hipotalámica (CVH), la comisura anterior (CA), el cuerpo del fórnix (F), que se divide en las columnas del fórnix (f), la fimbria (Fi), el fascículo retroflexo (FR), los tractos mamilotalámico (mt) y mamilotegmental (mtg) y los cuerpos mamilares (M).

FENOTIPO MUTANTE VS. *WT*

A simple vista ya se pueden apreciar notables diferencias entre el fenotipo mutante (*Fgf8* (*neo/Δ2,3*)) y el *WT*. La formación del hocico no es completa y mientras que el *WT* presenta un hocico recto y ancho con un extremo recto (Fig. 13, A y B), el mutante presenta un hocico con forma de pico afilado y con una apertura bucal más estrecha (Fig. 13, C y D). Además la posición de los ojos y las orejas en el mutante es más elevada que en su correspondiente en *WT*.

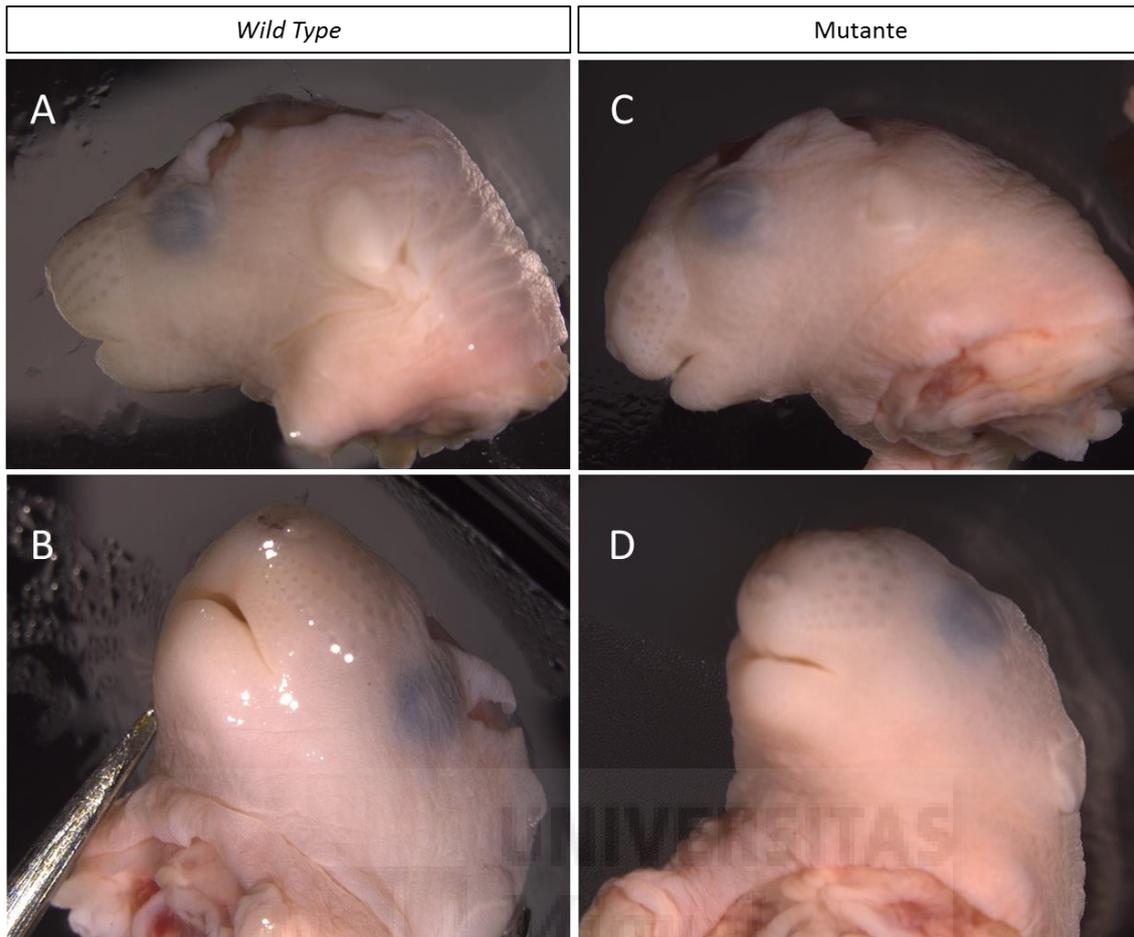


FIGURA 13: Comparación entre las cabezas de embriones de E18.5 *WT* (A y B) y mutante (C y D) donde se puede apreciar la diferencia en la formación del hocico y la posición de los ojos y las orejas.

Los ratones *Fgf8* (*neo/Δ2,3*) presentan fenotipo mutante que difiere del *WT* en la presencia de un ventrículo lateral único, que proviene de la fusión de los 2 ventrículos laterales que se observan en el *WT* (Fig. 14, A, B, G y H), por lo tanto solo existe un hipocampo que no se forma adecuadamente y no existe cuerpo del fórnix como tal, sino que la fimbria forma un continuo por debajo del hipocampo (Fig.14, J). Tampoco se forma correctamente el quiasma óptico, que pasa a ser una fibra gruesa que atraviesa ventralmente el cerebro de lado a lado en los cortes más mediales (Fig. 14, C, I y J). De la misma manera parece que los cuerpos mamilares se encuentran fusionados (Fig. 14, K) y el tercer ventrículo se ve agrandado. Sin embargo parece que el fascículo retroflexo mantiene su anatomía.

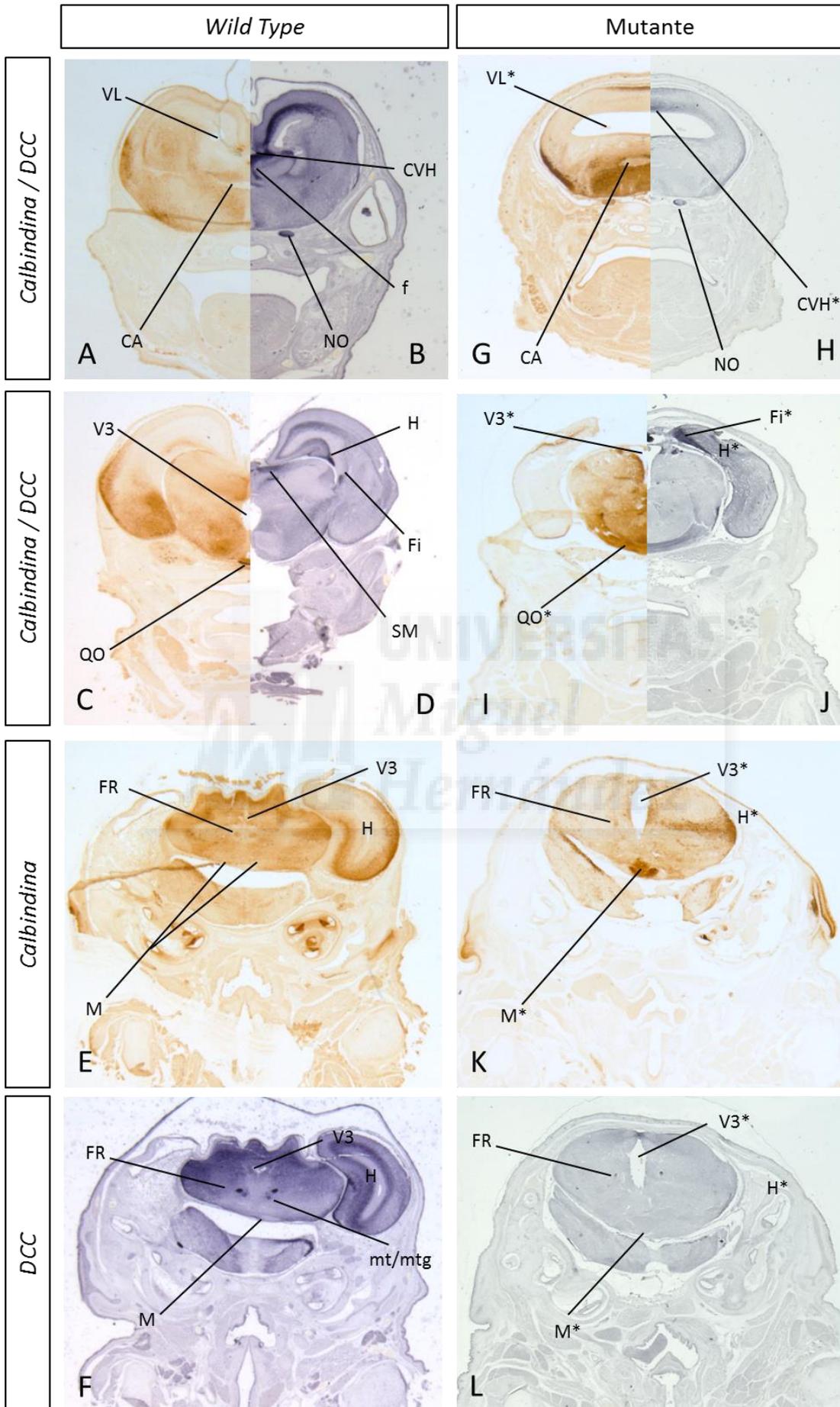


FIGURA 14: Cortes coronales del cerebro de un embrión de ratón de E18.5 *Wild Type* (A, B, C, D, E y F) frente a los cortes correspondientes del mutante (G, H, I, J, K y L) a los que se les ha hecho la IHQ contra calbindina (A, C, E, G, I y K) y contra DCC (B, C, F, H, J y L). Los cortes están ordenados de rostral a caudal, de izquierda a derecha. Se reconocen las estructuras de los ventrículos laterales (VL), fusionados en el mutante (VL*), la comisura ventral hipotalámica (CVH), ausente en el mutante (CVH*), la comisura anterior (CA), engrosada en el mutante, el nervio óptico (NO), el quiasma óptico (QO), deforme en el mutante (QO*), el hipocampo (H) que en el mutante (H*) no llega a formar el giro dentado del hipocampo, y por lo tanto la fimbria (Fi) que está bien definida en el *WT* es continua en el mutante (Fi*), el tercer ventrículo (V3), también presenta cambios con respecto al *WT*, siendo en el mutante más alargado (V3*), mientras que la formación hipocampal desaparece antes. También se observan los cuerpos mamilares (M), fusionados en el mutante (M*), el fascículo retroflexo y los tractos mamilotalámico (mt) y mamilotegmental (mtg*), no distinguibles en el mutante.

En los cortes sagitales (Fig. 15) de los embriones se observan claras diferencias en cuanto a la formación del telencéfalo, así como la línea media del cerebro, apreciable en la presencia del ventrículo lateral fusionado y un hipocampo sin giro dentado que recorre la superficie ventro-caudal del ventrículo lateral. También se ven diferencias en el quiasma óptico que no se llega a formar adecuadamente. Sin embargo son observables todos los tractos estudiados, fimbria, fórnix, mamilotalámico, mamilotegmental y fascículo retroflexus, aunque sí que se aprecia diferencias en la fimbria, que ocupa toda la parte ventral de la formación hipocampal malformada (Fig. 15, G y H). Además de una formación hipotalámica más pequeña bajo el tercer ventrículo.

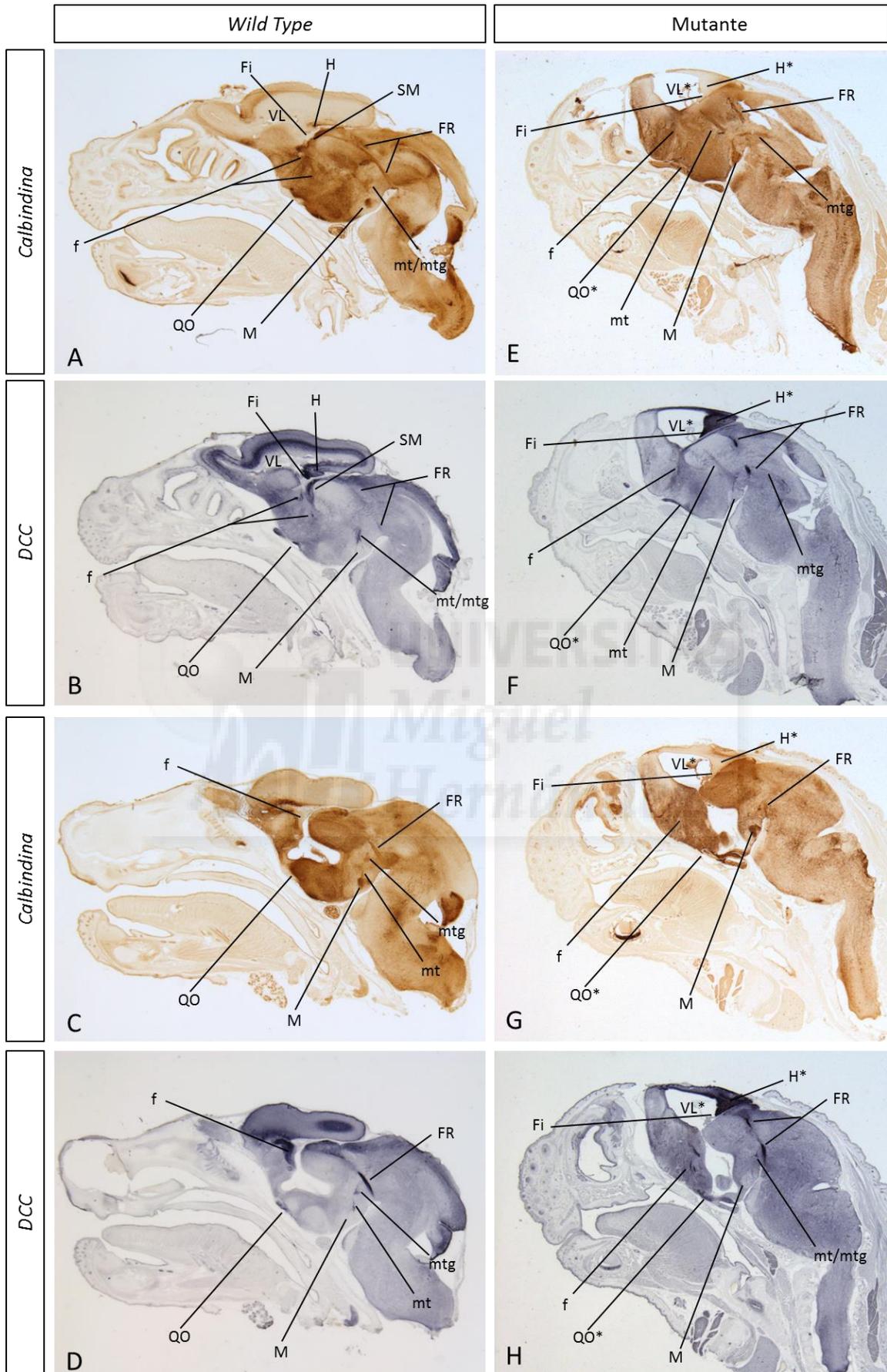


FIGURA 15: cortes sagitales del cerebro de un embrión de ratón de 18.5 *Wild Type* (A, B, C y D) frente a los cortes correspondientes del mutante (G, H, I y J) a los que se les ha hecho la IHQ contra calbindina (A, C, E y G) y contra DCC (B, D, F y H). Los cortes A, B, E y F coinciden con secciones laterales del cerebro, mientras que los cortes C, D, G y H son mediales. Se reconocen estructuras como la fimbria (Fi), el hipocampo (H) que no presenta giro dentado en los mutantes (H*) y además se ve a lo largo de toda la línea media del cerebro, el ventrículo lateral (VL), mucho más grande y extendido en el mutante (VL*), el Fascículo retroflexus (FR), el quiasma óptico (QO), que no se forma como tal en el mutante (QO*), los tractos del fórnix (f), mamilotalámico (mt) y mamilotegmental (mtg) y los cuerpos mamilares (M).

DISCUSIÓN

Fgf8 juega un papel importante en la formación del sistema nervioso central como organizador secundario con una expresión centrada en el istmo cerebral, en la cresta neural anterior y en la zona limitans principalmente (Fig. 3) induciendo o reprimiendo la expresión de otros genes y es determinante para la correcta formación del SNC en los distintos estadios del desarrollo embrionario como la gastrulación, como demostró Meyers en 1998 con el uso de mutantes nulos para *Fgf8* que no mostraban mesodermo embrionario.

En el estudio de los mutantes hipomorfos para *Fgf8*, que presentan una expresión reducida para este gen, se ha demostrado su importancia como organizador secundario, la expresión hipomórfica parece suficiente para la inducción del mesodermo embrionario y, por lo tanto, la gastrulación, sin embargo existe una delección del mesencéfalo posterior y el cerebelo, dada la falta de expresión en el organizador ístmico cerebral. Además de una deformación craneofacial y una deformación de los lóbulos olfatorios (Meyers, 1998; Crosley, 2001).

Hemos visto que el hipotálamo se encuentra reducido y los cuerpos mamilares fusionados, a pesar de ello aparentemente los tractos aferentes y eferentes del mismo no se ven afectados. No existe cuerpo calloso por lo que esta, la mayor comisura del SNC, utiliza otros puentes de paso de vía de la información. En este caso usará la comisura anterior y el quiasma óptico.

Son apreciables en los mutantes hipomorfos los tractos mamilotalámico y mamilotegmental, así como el fascículo retroflejo y el fórnix, no obstante este último se presenta en una forma inadecuada. Al no formarse correctamente la línea media del cerebro y por lo tanto no existir una separación de los hemisferios cerebrales y por lo tanto únicamente se forma un gran ventrículo lateral fusionado que recorre el cerebro de lado a lado, de la misma manera, el hipocampo recorre todo el ventrículo latero-caudalmente sin llegar a formarse un giro dentado y de la misma manera, la fimbria no se encuentra dividida en dos fascículos longitudinales, si no que forma un solo cuerpo (lámina), fórnix sin división en vez de dos pilares

del fórnix (de ahí la comisura ventral hipocámpica mucho más extendida), aunque sí parece que se separa en las columnas anteriores del fórnix alrededor y largo de un tercer ventrículo más grande de lo normal hasta llegar de manera desfasciculada a los cuerpos mamilares.

El tercer ventrículo se ve agrandado lateralmente pero con mayor tejido pos su parte ventral (ocupado por el grosor del quiasma óptico-cuerpo calloso ectópico) y también a causa de la formación de un hipotálamo más pequeño en comparación con el *WT*, con fusión de los núcleos mamilares y alteración del tallo hipofisiario (formación del infundíbulo y neurohipófisis).

Aunque los cuerpos mamilares se encuentran fusionados y pudiera indicar un único tracto mamilotalámico y mamilotegmental en lugar de uno desde cada cuerpo mamilar aunque parece que sí que se separan en 2 fibras para llegar al núcleo anterior del tálamo y los núcleos reticulares del puente del tegmento, respectivamente. Esto indica que la fusión de los mismos no altera la recepción de la información proveniente de hipocampo y por lo tanto la transmisión de la información hacia los núcleos anteriores de las dos masas talámicas y pares de núcleos reticulares del rafe. Estos resultados indican que *FGF8* es importante para la formación de la línea ventral mamilar pero no para el desarrollo de los cuerpos mamilares.

Parece lógico pensar por lo tanto que *Fgf8* no determina para la formación de las proyecciones hipotalámicas, sin embargo estas se ven afectadas al no formarse una separación correcta de las vesículas telencefálicas.

También hemos podido observar un desplazamiento dorsal de los ojos y las orejas en los embriones mutantes, debido probablemente a que la formación deficiente del telencéfalo provoca una deformación craneal. Además sabemos que *Fgf8* se expresa en la cresta neural anterior, participando en la formación correcta del rostro, por lo tanto no es de extrañar encontrar deformaciones craneofaciales en estos mutantes hipomorfos para *Fgf8*.

CONCLUSIONES

- *FGF8* no determina directamente para el establecimiento de las proyecciones aferentes y eferentes del hipotálamo, fundamentalmente de los cuerpos mamilares.
- Existen deformaciones anatómicas severas de las mismas dada la carencia de cuerpo calloso.

- La no formación de la línea media dorsal prosencefálica provoca una alteración anatómica (y funcional) del telencéfalo y todas las estructuras que a éste pertenecen, incluido por lo tanto el hipocampo, el septum y sus respectivas fimbrias, fórnix y estra medularis. Estas alteraciones provocan que los axones que deben enviar la información a la corteza contralateral o regiones caudales del cerebro, utilicen la comisura anterior y/o quiasma para dicha función.
- Ventralmente, la fusión de los cuerpos mamilares sí es debida a la disminución de la expresión de *Fgf8* en esta región, la cual sí es específica para la formación de la región intermiliar.

PROYECCIONES FUTURAS

Hemos visto que la disminución de la dosis de la proteína FGF8 tiene unos resultados (fenotipos) muy dramáticos en el desarrollo de las estructuras medias tanto del techo como del suelo de la subdivisión prosencefálica secundaria (telencéfalo e hipotálamo).

Los resultados obtenidos durante este TFG demuestran que los axones provenientes del hipocampo a la región milar, aunque desfasciculados y modificados en su trayectoria llegan a su destino, quizás porque el factor quimio-atrayente que hay en la región milar siga activo y en condiciones idóneas. Este factor podría ser una Netrina, la Netrina 1. Se cree que la Netrina está involucrada en la guía de axones y la migración celular durante el desarrollo. La proyección futura de este trabajo sería averiguar la expresión de este gen en estos animales mutantes y en particular en el hipotálamo así como identificar y demostrar la vía corticoidal ectópica a través de la comisura anterior y el quiasma óptico.

BIBLIOGRAFÍA

Alpeeva E.V., Makarenko I.G. (2007). Perinatal Development of Mammillotegmental Connections in Rats. *Russian Journal of Developmental Biology*, 38, 58–65.

Chi C., Martínez S., Wurst W., Martin G.R. (2003). The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development*, 130, 2633-2644.

Crossley P.H., Martinez S., Ohkubo Y., Rubenstein J.L.R. (2001). Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience*, 108, No. 2, 183-206.

Echevarría D., Belo J.A., Martínez S. (2005). Modulation of Fgf8 activity during vertebrate brain development. *Brain Research Reviews* 49, 150– 157

Echevarría D., Vieira C., Gimeno L., Martínez S. (2003). Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain, *Brain Research Review*, 43, 179-191.

Garda A.L., Echevarría D., Martínez S. (2001). Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmus organizer. *Mechanisms of Development*, 101, 111-118.

Grove E.A., Fukuchi-Shimogori T. (2003). Generating the cerebral cortical area map. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 355–80.

His W. (1893). Vorschläge zur Einteilung des Gehirns, *Arch. Anat. Entwickl. Gesch.* (Leipzig), 17, 172-179

Kwon H.G., Hong J.H., Jang S.H. (2011). Mammillothalamic tract in the human brain: diffusion tensor tractography study. *Neuroradiology* 53, 623–626.

Lee K.J., Jessell T.M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system, *Annu. Rev. Neurosci.*, 22, 261 – 294.

Macdonald R., Barth K.A., Xu Q., Holder N., Mikkola I. and Wilson S.W. (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes, *Development* 121, 3267-3278 (1995)

Meyers E.N., Lewandoski M., Martin G.R. (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nature Genetics*, 18, 136-141.

Pomero A., Martinez S. (2009). Telencephalic Morphogenesis during the Process of Neurulation: An Experimental Study Using Quail–Chick Chimeras, *The Journal of Comparative Neurology* 512, 784–797.

Puelles L., Amat J.A., Martinez-de-la-Torre M. (1987). Segmental-Related, Mosaic Neurogenetic Pattern in the Forebrain and Mesencephalon of Early Chick Embryos: I.

Topography of AChE-Positive Neuroblast up to Stage HH18, *The Journal Of Comparative Neurology*, 266, 247-268.

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

Puelles, L. and Rubenstein J.L.R. (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggests a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* 16, 472-479.

Roelink H., Wang J., Black D.M., Solomon E., Nusse R. (1993). Molecular cloning and chromosomal localization to 17q21 of the human WNT3 gene, *Genomics*, 17, 790 – 792.

Rubenstein J.L., Martínez S., Shimamura K., Puelles L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science*, 266, 578 – 580.

Shimamura K., Hartigan D.J., Martínez S., Puelles L., Rubenstein J.L. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube, *Development*, 121, 3923 – 3933.

Vann S.D., Aggleton J.P. (2004). The mammillary bodies: two memory systems in one? *Nat Rev Neurosci.* 5(1), 35-44.

Vann S.D., Nelson A.J.D., (2015). The mammillary bodies and memory: more than a hippocampal relay. *Prog Brain Res.*, 219, 163–185.

Vann S.D., Saunders R.C., Aggleton J.P. (2007). Distinct, parallel pathways link the medial mammillary bodies to the anterior thalamus in macaque monkeys. *Eur J Neurosci.*, 26(6), 1575-86.

Vieira C., Pombero A., García-López R., Gimeno L., Echevarria D., Martínez S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers, *Int. J. Dev. Biol.*, 54, 7-20.