



Papel del gen *Mash1* en la determinación de la Eminencia Ganglionar Medial

Autor: Murcia Ramón, Raquel

Tutor: De Puelles Martínez de la Torre, Eduardo

Grado en Biotecnología
Facultad de Ciencias Experimentales
Universidad Miguel Hernández de Elche

Departamento de Histología y Anatomía
Área de Anatomía y Embriología Humana

Curso:2016-2017

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	5
1.2. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	5
1.2.1. PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR	8
1.2.2. DESARROLLO DEL PROSENCÉFALO	9
1.3. ENCÉFALO	10
1.4. GANGLIOS DE LA BASE	11
1.4.1. CUERPO ESTRIADO	11
1.4.2. GLOBO PÁLIDO	12
1.4.3. FUNCIONES DE LOS GANGLIOS BASALES	13
1.5. TRANSTORNOS ASOCIADOS A FALLOS EN LOS GANGLIOS BASALES	14
1.6. PAPEL DEL GEN <i>MASH1</i> EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO	14
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. OBTENCIÓN DE EMBRIONES	15
3.2. FIJACIÓN Y CONSERVACIÓN DE EMBRIONES	16
3.3. INCLUSIÓN EN PARAFINA	16
3.4. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS (CORTE Y MONTAJE)	16
3.5. INMUNOHISTOQUÍMICA	17
3.6. OBTENCIÓN DE IMÁGENES	18
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	22
7. BIBLIOGRAFÍA	22

RESUMEN

Los ganglios de la base son un conjunto de estructuras con la función de recibir información de diversas estructuras como la corteza cerebral, el tálamo, los núcleos subtalámicos y la sustancia negra, integrarla y enviar una señal en forma de respuesta de vuelta a dichas estructuras. Con esto se consiguen funciones importantes como el control motor y algunas funciones cognitivas. Esto hace que alteraciones en este complejo causen diferentes trastornos como el corea, el hemibalismo o el parkinson. Por tanto, el estudio del desarrollo, especificación y funcionamiento de los ganglios basales, mediante el estudio de los genes involucrados, es vital para poder crear técnicas de detección y/o algún tipo de tratamiento.

En este trabajo, el objetivo fue estudiar el papel del gen *Mash1* en la formación de los ganglios basales. Este gen es un factor de transcripción expresado durante el desarrollo del sistema nervioso central. Para ello, se empleó un mutante de pérdida de función de *Mash1* y se estudió la población de neuronas Gabaérgicas de la eminencia ganglionar medial, a partir de la cual se desarrolla, en embriones silvestres el globo pálido, una de las estructuras que conforman los ganglios basales.

Se concluyó que el gen *Mash1* participa en la diferenciación de neuroblastos hacia neuronas Gabaérgicas inhibitorias. Sin embargo, no es el único gen que cumple esta función, pues hay más genes induciendo cascadas que favorecen esta diferenciación. El mutante *Mash1*^{-/-} no es capaz de especificar bien la eminencia ganglionar medial, por lo que el globo pálido no se llega a formar. Además, la pérdida de función de este gen afecta a la trayectoria de las fibras talamocorticales, ya que esta depende de la correcta especificación de esta eminencia ganglionar medial.

Palabras Clave: *Neuroanatomía, Eminencias ganglionares, Globo pálido, Gaba, Mash1*

ABSTRACT

The basal ganglia are a group of structures, which receive information of distinct structures such as the cerebral cortex, the thalamus, subthalamic nucleus and the substantia nigra. The complex processes the information, generates a response and sends it back to the structures; playing an important role in motor control and some cognitive functions. Alteration of these structures can cause different disorders like chorea, parkinson's disease and hemiballismus. So that, the study of development, specification and functioning of the basal ganglia and the implicated gens, could be useful for the development of diagnosis techniques and different treatments.

The objective of the present study was to clarify the function of the gen *Mash1* in the formation of basal ganglia. This gen is a transcriptional factor expressed during the development of the central nervous system. For that purpose, a mutant with lack function of *Mash1* was used and the population of Gabaergic neurons in the medial ganglionic eminence was studied. Globus pallidus, a component of basal ganglia is generated from this region, the medial ganglionic eminence.

This study concludes that the gen *Mash1* is involved in the differentiation of neuroblast in Gabaergic inhibitory neurons. However, *Mash1* is not the only one gen implicated in this process, there are other gens inducting this differentiation. *Mash1*^{-/-} mutant is not capable of specify the medial ganglionic eminence, so that, Globus pallidus is not formed. In addition, the lack if this gene function has an effect in the thalamocortical fibers trajectory because it depends on the correct specification of the medial ganglionic eminence.

Key Words: Neuroanatomy, Ganglionic eminences, Globus pallidus, Gaba, *Mash1*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso central es uno de los sistemas más complejos del cuerpo humano y, en general, de la mayoría de los animales. Su función es la de recibir y procesar estímulos y sensaciones recogidas por los diferentes órganos receptores del cuerpo y transmitir la respuesta en forma de órdenes a los diferentes órganos efectores.

El sistema nervioso central está formado, a grandes rasgos, por la médula espinal, situada en el conducto raquídeo y el encéfalo, situado dentro del cráneo y constituido por cerebro, cerebelo y tronco encefálico.

1.2. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Al inicio, el embrión humano está organizado en dos capas, en lo que se conoce como disco embrionario bilaminar, formado por el hipoblasto, más pequeño; y el epiblasto, más grande. Durante la tercera semana, las células del epiblasto darán lugar a tres capas diferentes: ectodermo, más externa; endodermo, más interna; y mesodermo, entre las dos anteriores. En este momento se forma la placa neural de la que deriva el sistema nervioso central.

La placa neural se forma por un engrosamiento del ectodermo en su parte medial y en los bordes se genera una banda llamada cresta neural que separa el ectodermo en dos zonas: una de ellas dará lugar al sistema nervioso central (primordio del ectodermo neural) y otra que dará lugar al resto del cuerpo (primordio del ectodermo corporal).

Con el tiempo esta placa neural va creciendo y se va hundiendo por su línea media en forma de bisagra formando el canal neural; a la vez que sus bordes se elevan formando los pliegues neurales a cada lado, que finalmente se encuentran y se cierran en el plano dorsal dejando una cavidad interna en cuyo exterior queda el ectodermo. Este proceso se denomina neurulación primaria y da lugar al tubo neural.

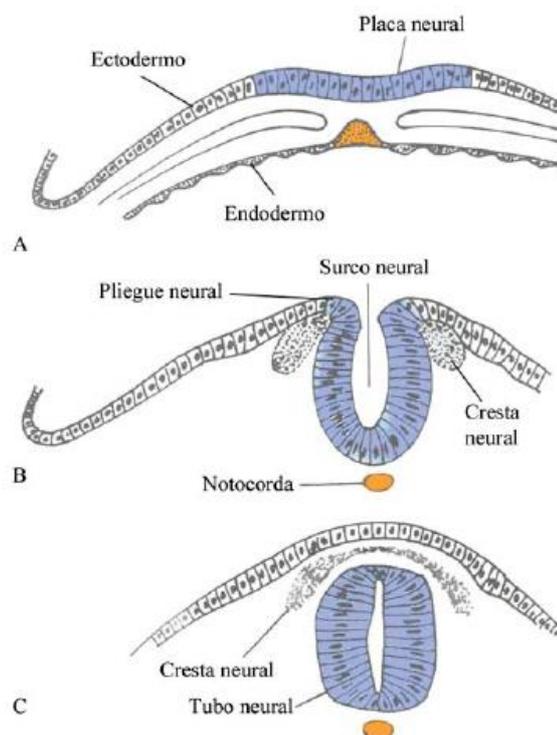


Imagen 1. Neurulación o formación del tubo neural a partir de la placa neural. A, formación de la placa neural a partir de células del ectodermo. B, formación del surco neural y las crestas neurales a cada lado. C, cierre del tubo neural quedando la capa del ectodermo por fuera.¹

El tubo neural se cierra por varias zonas, desde el centro hasta los extremos, de manera que antes de cerrarse por completo el tubo neural tiene unas aperturas llamadas neuroporo anterior o rostral y neuroporo posterior o caudal. A medida que se cierra va creciendo, sobretodo de forma longitudinal, debido a la proliferación de neuroblastos que se encuentran en su interior y que llevan a cabo divisiones simétricas dando lugar a dos células hijas idénticas entre sí e idénticas a la célula de la que proceden, aumentando así el número de neuroblastos y, por tanto, el tamaño de la estructura.

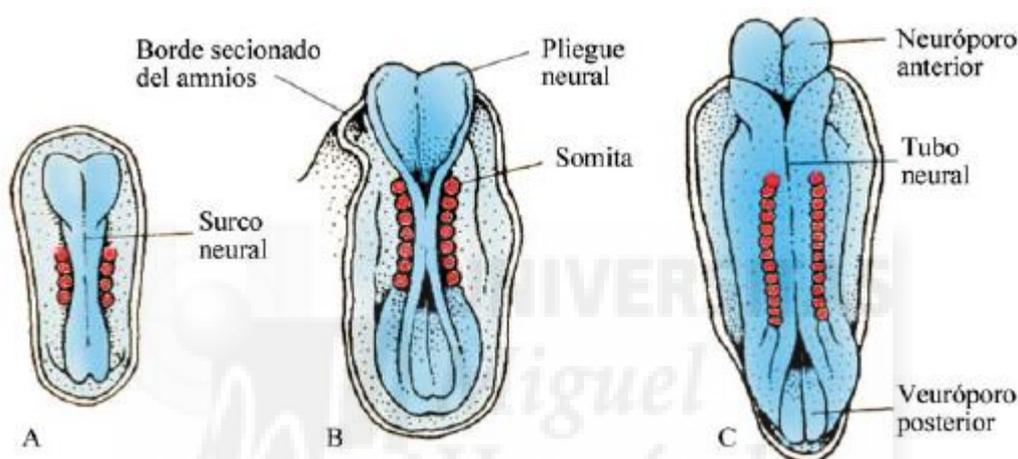


Imagen 2. Esquema del ectodermo de un embrión humano en diferentes estadios. A, muestra el surco neural formado desde la placa neural. B, muestra los pliegues neurales y las somitas (estructuras segmentadas formadas a partir del mesodermo y que aparecen a ambos lados del tubo neural). C, cierre de parte del tubo neural, quedando abierto los neuroporos posterior y anterior.²

Finalmente, el tubo neural se cierra por completo quedando una cavidad en forma de hendidura y llena de líquido, cuyas paredes pueden dividirse en diferentes placas según la posición en la que se encuentren, como son la placa del suelo (ventral), la placa del techo (dorsal) y las placas laterales (anterior y posterior). Las placas del techo y del suelo son más delgadas, ya que están formadas por una única capa de células epiteliales, mientras que las placas laterales aumentan su espesor debido a que son las que darán lugar al encéfalo y la médula espinal. Las placas laterales están divididas, por un surco ventricular longitudinal, en dos placas con funciones diferentes: la placa basal (ventrolateral) de la que se desarrollarán los centros motores primarios; y la placa alar (dorsolateral), de la que derivarán los centros sensitivos primarios.

Antes de cerrarse el tubo neural por completo, la parte rostral del encéfalo primordial contiene un pliegue transversal llamado pliegue encefálico ventral que marca el límite entre el arquencéfalo y el deuterencéfalo. Una vez que el tubo neural se ha plegado por completo, esta parte rostral del tubo neural se ensancha formando 3 vesículas primarias: prosencéfalo, que procede del arquencéfalo; mesencéfalo y rombencéfalo, que proceden del deuterencéfalo. Estas vesículas están divididas por constricciones y fibras trasversales. El estrechamiento entre

prosencefalo y mesencefalo es conocido como comisura posterior y el estrechamiento entre mesencefalo y rombencefalo es conocido como istmo. Más adelante se forman nuevas hendiduras a partir de las anteriores, generando así 5 vesículas secundarias, debido a que el prosencefalo se divide, por la comisura anterior, en telencefalo (rostral) y diencefalo (caudal) y el rombencefalo se divide en metencefalo (rostral) y mielencefalo (caudal) que se continua con la médula espinal que, junto a las cinco anteriores (diencefalo, telencefalo, mesencefalo, metencefalo y mielencefalo), forma parte de las seis regiones principales del sistema nervioso central humano.

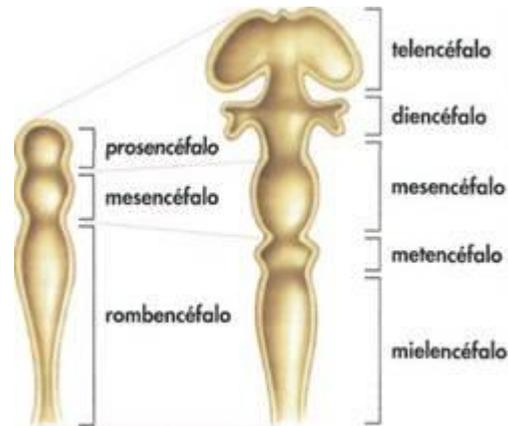


Imagen 3. Muestra las principales divisiones del tubo neural en dos estadios. A la izquierda se muestran las 3 vesículas primarias: prosencefalo, mesencefalo y rombencefalo. A la derecha se muestran las 5 vesículas secundarias: telencefalo, diencefalo, mesencefalo, metencefalo y mielencefalo.³

Al tiempo en que se van creando las vesículas primarias y secundarias, estas se van dividiendo en regiones llamadas neurómeros que se repiten a lo largo del tubo neural. Estos neurómeros empiezan como constricciones en la pared del tubo neural pero conforme van pasando los días y la pared neural aumenta de grosor el límite entre ellas se va perdiendo. Según la zona en la que se encuentren los neurómeros, estos pasan a llamarse prosómeros, en prosencefalo; mesómeros, en mesencefalo; rombómeros, en rombencefalo y mielómeros, en médula espinal.

El crecimiento de estas regiones no es a la par, es decir, que unas regiones crecen más que otras. Por ejemplo, las regiones del prosencefalo crecen más rápidamente, ya que esta será la región de mayor tamaño. Debido a este crecimiento desigual aparecen unas flexuras en el tubo neural que, poco a poco, le darán un aspecto similar a la forma que conocemos del encéfalo. Las tres flexuras principales que aparecen en desarrollo son: flexura cefálica, entre el diencefalo y el mesencefalo con orientación cóncava ventral; la flexura cervical, también con orientación ventral, que aparece en la unión entre el rombencefalo y la médula espinal; y la flexura pontina con orientación dorsal que aparece en la mitad del rombencefalo dividiendo el mielencefalo del metencefalo. (Img.4)

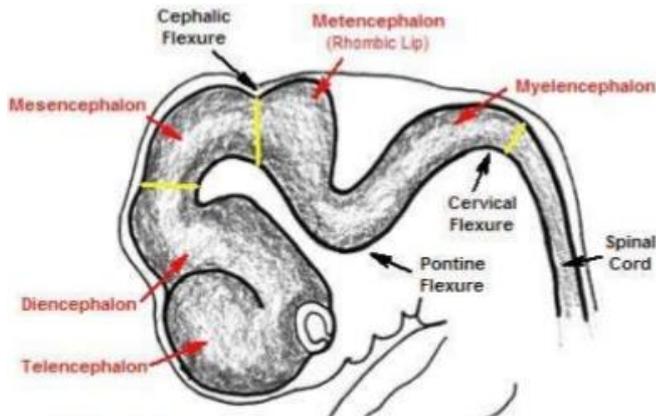


Imagen 4. Esquema de corte sagital de embrión humano de 6 semanas en el que se observan las 5 vesículas: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo; y las flexuras: cefálica, pontina y cervical.⁴

1.2.1. PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

Al inicio del desarrollo, las células madre se dividen simétricamente dando lugar a dos células hija idénticas entre sí e idénticas a la madre, formando una capa de células madre llamada matriz. Esta división simétrica conlleva un aumento del tamaño del tubo neural, generando un ambiente proliferativo.

En estadios más avanzados del desarrollo, para dar lugar a las diferentes estructuras del sistema nervioso central, los neuroblastos deben ser capaces de ir diferenciándose en distintos tipos celulares según la zona en la que se encuentren, es por ello que requieren información posicional. Esta información posicional se consigue gracias a un gradiente de proteínas (organizadores secundarios) generado por las propias células y que les indica la posición exacta que ocupan dentro del embrión y, en concreto, dentro del tubo neural, de esta forma entran en un proceso de diferenciación, en el cual las células madre se dividen de forma asimétrica, dando lugar a dos células hija: una idéntica a la célula de la que procede (neuroblasto) y otra diferente a ambas que se separa de esta zona proliferativa; estas células son conocidas como células postmitóticas. Más adelante, estos neuroblastos hacen divisiones simétricas de nuevo, pero esta vez las dos células hija son neuronas inmaduras diferenciadas, de esta forma también se van perdiendo neuroblastos en los tejidos.

Una vez que se han generadas las neuronas inmaduras, estas migran desde la zona proliferativa en que se han generado a la zona en la que se van a establecer definitivamente. Esta migración puede llevarse a cabo de dos maneras distintas: migración radial, desde los ventrículos a la superficie pial y migración tangencial, paralelo a la superficie pial, esta última solo la realizan algunas de las neuronas.⁵ (Img.5).

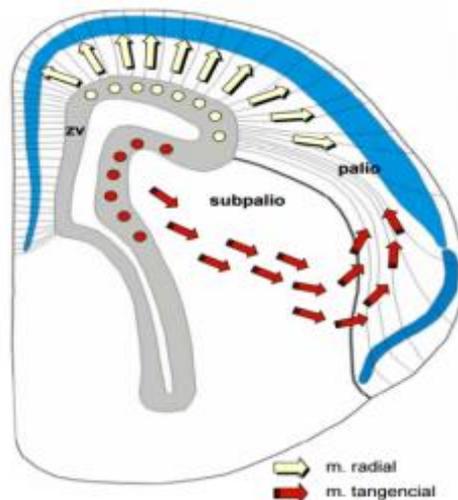


Imagen 5. Esquema de un corte transversal de un hemisferio cerebral en el que se muestra la migración neuronal tangencial (flechas rojas) y radial (flechas amarillas), ambas partiendo de la zona ventricular (ZV) a través del telencéfalo: palio (dorsal) y subpalio (ventral).⁶

1.2.2. DESARROLLO DEL PROSENCÉFALO

El encéfalo puede regionalizarse con la intersección entre neurómeros transversales, mencionados anteriormente, y zonas longitudinales. Dentro de estas regiones suele haber un patrón de expresión genético definido que dará lugar a las diferentes unidades morfológicas. Cada una de estas unidades morfológicas contiene una zona proliferativa o matriz más cerca del ventrículo y neuronas inmaduras migrando radialmente hasta su destino donde originarán un determinado tipo de estructura. Sin embargo, en ocasiones, los neuroblastos de varias zonas adyacentes contribuyen a la formación de un solo núcleo o estructura determinada por lo que debe haber migración tangencial. Este es el caso de las eminencias ganglionares de las que derivan muchas de las interneuronas corticales, es decir, que neuroblastos pertenecientes a estas eminencias ganglionares migran tangencialmente y llegan a la corteza.

Al igual que cualquier región del encéfalo en desarrollo, el prosencéfalo tiene una estructura similar a la del tubo neural, teniendo una placa del suelo (abajo), una del techo (arriba) y dos placas laterales a ambos lados, a su vez divididas en placa basal (ventral) y una alar (dorsal) divididas por una banda en la que se expresa el gen Nkx-2.2.

Para dar forma a lo que será el prosencéfalo desarrollado por completo, se producen principalmente tres evaginaciones. Primero ocurren las evaginaciones ópticas a ambos lados formando las vesículas ópticas a partir de las cuales se desarrollarán los ojos con sus respectivos nervios ópticos. Más tarde ocurre la formación de los hemisferios telencefálicos debido a la evaginación en ambos lados de la zona dorsolateral a las vesículas ópticas. La pared de cada una de las vesículas que darán lugar a los hemisferios telencefálicos sufre una evaginación secundaria dando lugar a los bulbos olfatorios.

La parte dorsal del prosencéfalo primordial dará lugar al diencéfalo, mientras que la porción más rostral forma el telencéfalo impar. Es en este momento cuando se empiezan a formar los ventrículos laterales y el tercer ventrículo entre ambos e irán creciendo hasta adquirir su forma definitiva.

El telencéfalo está dividido en hemisferio derecho e izquierdo y estos se pueden dividir en palio (zona rostral grande) y subpalio (zona medial y lateral, situada ventralmente al palio). La pared del subpalio lateral de cada hemisferio aumenta de grosor para formar una protrusión interventricular llamada eminencia ganglionar, de la que derivan los ganglios de la base, estructura que se explicará más adelante. La eminencia ganglionar está dividida por un surco en eminencia ganglionar medial (EGM), de la que surgen el globo pálido y otras estructuras; y la eminencia ganglionar lateral (EGL), de la que derivan el núcleo caudado y el putamen. La parte caudal del subpalio que no está dividida por el surco es la que da origen al núcleo amigdalino.

Para formar los ganglios de la base, en primer lugar, se desarrolla un primordio del cuerpo estriado a partir de las células madre de la EGL, después, fibras corticales atraviesan este primordio dando lugar a una lámina compacta de sustancia blanca en forma de cono hueco denominada cápsula interna y así se separan el núcleo caudado y el putamen. El globo pálido se forma gracias a la migración de células desde la EGM hasta la región medial de lo que será el putamen.

Durante el segundo mes de desarrollo, en estas eminencias aparece una zona celular proliferativa fuera de la matriz, que es más proliferativa incluso que esta, por lo que muchas neuronas parten de esta zona y migran tangencialmente a la corteza convirtiéndose en células inhibitorias secretoras de gaba (ácido γ -aminobutírico), pero al final del cuarto mes esta zona tan proliferativa se pierde.

Existen varios tipos de interneuronas en el estriado. Las neuronas Gabaérgicas con somatostatina derivan de la EGL, las interneuronas colinérgicas derivan de la EGM (Olsson et al.,1998), sin embargo, se desconoce el origen de las interneuronas que contienen parvalbúmina y calretinina.

Estudios recientes han demostrado que hay migración celular desde la EGM hasta la EGL (Sussel et al.,1999; Wichterle et al.,1999) lo que sugiere que algunas células estriatales deriven del EGM.

1.3. ENCÉFALO

Una vez desarrollado por completo, el encéfalo puede dividirse en prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. De caudal a rostral, nos encontramos con la médula espinal que se continúa con el bulbo raquídeo o mielencéfalo y luego con el puente en cuya parte dorsal encontramos el cerebelo. Estas tres estructuras forman el rombencéfalo. Unido al puente encontramos el mesencéfalo, un segmento corto en forma de cuña que une el rombencéfalo y prosencéfalo.

El prosencéfalo está formado en mayor parte por el telencéfalo, dividido en dos hemisferios (izquierdo y derecho), y ventralmente por el territorio hipotalámico. Las vesículas telencefálicas envuelven al prosencéfalo impar y el diencefalo. Este contiene, entre otras estructuras, un gran complejo nuclear que es el tálamo. Caudalmente encontramos el mesencéfalo y el rombencéfalo.

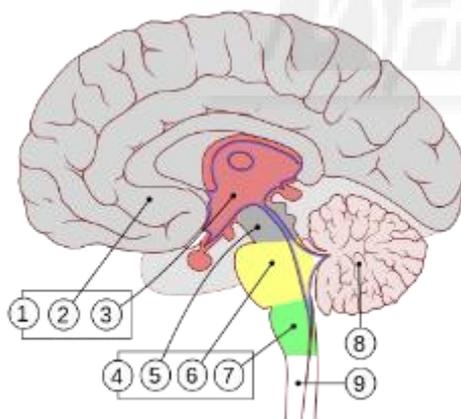


Imagen 6. Esquema de sección sagital del encéfalo humano en el que se muestran las diferentes regiones. Prosencéfalo (1) dividido en telencéfalo (2) y diencefalo (3), tronco encefálico (4) formado por mesencéfalo (5), puente (6) y mielencéfalo (7). El cerebelo (8) forma parte del metencéfalo junto con el puente (6) y el metencéfalo forma parte del rombencéfalo junto con el mielencéfalo (7). Médula espinal (9).⁷

Debido a su desarrollo a partir de un primordio tubular, el sistema nervioso central y, en concreto, el encéfalo, posee unas cavidades en su interior que forman ventrículos interconectados entre sí y bañados en líquido cefalorraquídeo. Esta cavidad empieza en su parte más rostral con los ventrículos laterales de los hemisferios cerebrales, telencefálicos, grandes y con forma de semiluna. Estos ventrículos laterales están comunicados a ambos lados, a través del agujero interventricular, al tercer ventrículo con forma de hendidura y estrecho romboidal y diencefálico. El tercer ventrículo se comunica, a su vez, con el cuarto ventrículo, rombencefálico, con forma romboidal. La unión entre el tercer y el cuarto ventrículo es un conducto mesencefálico más estrecho llamado acueducto cerebral. El cuarto ventrículo se continúa con el conducto central o conducto endimario que baja por la médula espinal.

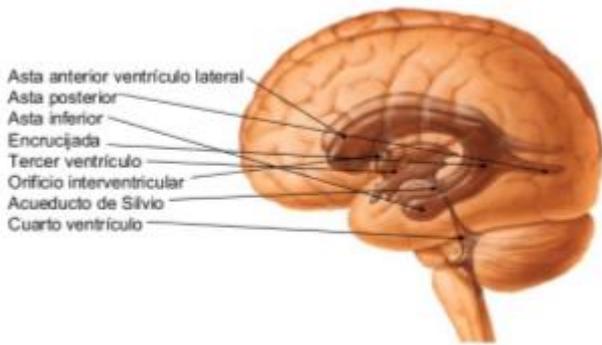


Imagen 7. Esquema del sistema vascular en el que se muestran los ventrículos tercero, cuarto y lateral y del último sus astas anterior, posterior, inferior y la encrucijada donde convergen las tres.⁸

1.4. GANGLIOS DE LA BASE

La zona del telencéfalo cuyo desarrollo va a ser tratado a lo largo de este trabajo son los ganglios de la base, en concreto el globo pálido.

Los ganglios de la base son un conjunto de masas de sustancia gris situados dentro de cada hemisferio cerebral. Los forman el estriado (núcleo caudado y putamen), el globo pálido. Estos forman un conjunto funcional con el núcleo subtalámico y la sustancia negra.

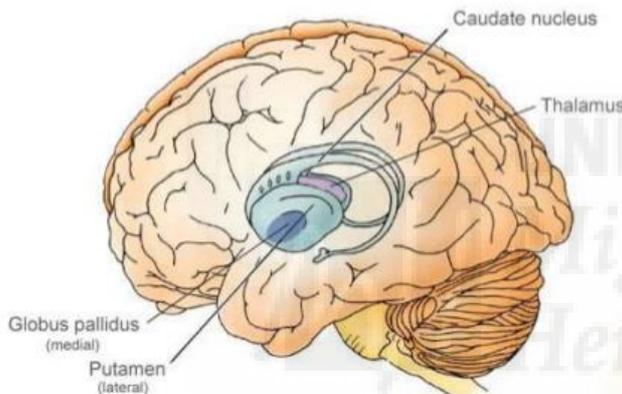


Imagen 8. Esquema en el que se muestra la situación de los ganglios de la base dentro del encéfalo.⁹

1.4.1. CUERPO ESTRIADO

El cuerpo estriado, lateral al tálamo, se divide, por la cápsula interna, en núcleo caudado y putamen. El término estriado se debe a las bandas de sustancia gris que atraviesan la cápsula interna y conectan en núcleo caudado con el putamen. El putamen junto con el globo pálido forman una estructura morfológica llamada núcleo lenticular.

El núcleo caudado es una masa de materia gris en forma de C, que por su morfología se asemeja a una cabeza, un cuerpo y una cola. La cabeza aparece a continuación del putamen, es grande y algo redondeada formando la pared lateral del asta anterior del ventrículo lateral. En la zona del agujero interventricular, la cabeza continua con el cuerpo que es largo y estrecho formando el suelo del cuerpo del ventrículo lateral. La cola es también larga y estrecha siguiendo el contorno del ventrículo lateral hasta el asta inferior de este. La cola termina en la punta con el núcleo amigdalino. En la zona en la que convergen el núcleo caudado y el putamen existe el núcleo acumbens y este junto con el tubérculo olfatorio forma parte del estriado.

El núcleo lenticular es una masa de sustancia gris en forma de cuña e insertada en la sustancia blanca del hemisferio cerebral. Está dividido, por una lámina vertical de sustancia blanca, en el putamen, una porción lateral grande y más oscura y el globo pálido, una porción interior más clara debido a una concentración de fibras

nerviosas mielinizadas. Este núcleo está relacionado lateralmente con una capa fina de sustancia blanca llamada lámina externa, seguida de una capa fina de sustancia gris llamada claustró, que separa la cápsula externa de la sustancia blanca subcortical de la ínsula, pegada a la corteza insular.

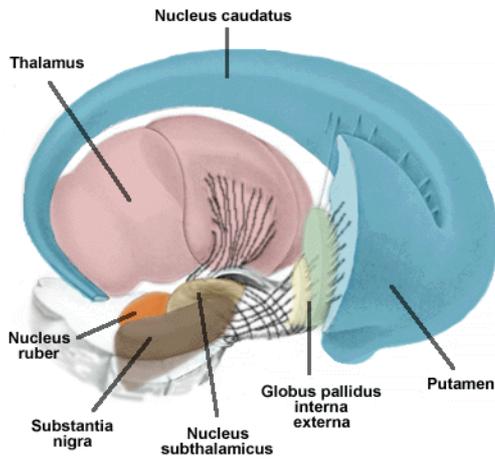


Imagen 9. Esquema de los ganglios basales en el que se puede observar el núcleo amigdalino, el núcleo lenticular y el núcleo caudado; con sus respectivas regiones.¹⁰

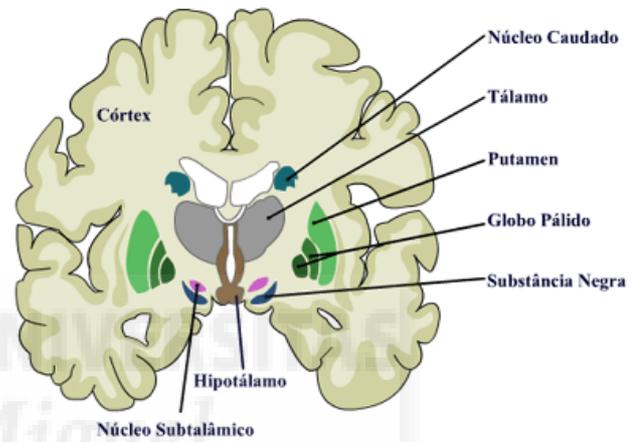


Imagen 10. Esquema de una sección coronal de encéfalo en el que se muestran diferentes núcleos de los ganglios basales.¹¹

1.4.2. GLOBO PÁLIDO

El globo pálido es una masa triangular de células separada del putamen por una capa de fibras llamada lámina medular externa. Como ya se ha comentado, está atravesado por gran cantidad de fibras mielínicas que le aportan un color pálido, lo que le da nombre. Esta estructura está dividida en segmento interno y segmento externo por una lámina medular interna.

Para integrar la información en cualquier núcleo neuronal se requiere la colaboración de proyecciones neuronales (de axón largo) y de interneuronas (de axón corto)¹². En el caso del estriado y del globo pálido están compuestos en su mayoría por neuronas de proyección, habiendo menor número de interneuronas¹³. Esto hace que pueda tener conexiones con numerosos núcleos neuronales, como por ejemplo la corteza, el tálamo, la sustancia negra y el tronco cerebral.

Existen cuatro grandes tipos de interneuronas en el estriado y el globo pálido: neuronas colinérgicas, neuronas Gabaérgicas con calretinina (CR), neuronas Gabaérgicas con parvalbúmina (PV), y neuronas Gabaérgicas con somatostatina (SOM), neuropéptido Y (NPY) y sintasa de óxido nítrico (NOS) (Kawaguchi et al., 1995)¹⁴.

El globo pálido recibe fibras eferentes, proyectan de los órganos receptores al SNC y aferentes, proyectan del SNC a los órganos efectoras¹⁵. Las neuronas aferentes que proyectan hacia el globo pálido externo suelen ser neuronas Gabaérgicas que contienen encefalina, mientras que las neuronas que contienen sustancia P proyectan sobre el globo pálido interno. En cuanto a las fibras aferentes, las neuronas del segmento externo del globo pálido proyectan hacia los núcleos subtalámicos y las del segmento interno proyectan hacia el tálamo y otras estructuras.

1.4.3. FUNCIONES DE LOS GANGLIOS BASALES

Gracias a la gran cantidad de conexiones que tienen las diferentes estructuras de los ganglios de la base, son capaces de recibir información desde la corteza cerebral, el tálamo, los núcleos subtalámicos y la sustancia negra, integrarla y llevarla de vuelta a esas estructuras. Su función está relacionada con el control motor y con algunas funciones cognitivas como el aprendizaje procedimental y tareas de memoria de trabajo.

Cuando estamos en reposo, el segmento interno del globo pálido proyecta neuronas Gabaérgicas inhibitorias sobre el tálamo, que al ser inhibido no puede activar la corteza motora. Esto se conoce como freno palidal. Cuando tenemos la intención de movernos, la corteza envía fibras aferentes glutamatérgicas al estriado, tanto al núcleo caudado como al putamen, y estos envían fibras Gabaérgicas inhibitorias al segmento interno del globo pálido. Al estar inhibido, el globo pálido interno deja de inhibir al tálamo y este activa la corteza motora mediante fibras eferentes glutamatérgicas. Esto es conocido como circuito estriatal directo.

En el circuito indirecto, la información comienza también en la corteza cerebral, que manda fibras aferentes glutamatérgicas al estriado y, es el putamen el que, al activarse envía fibras Gabaérgicas inhibitorias al globo pálido externo, esto provoca que se reduzca el efecto inhibitorio que ejerce el globo pálido externo sobre los núcleos subtalámicos. Al deshinibirse los núcleos subtalámicos, estos activan al globo pálido externo y a la sustancia negra, activando así el freno palidal. El circuito indirecto es el encargado de que mantengamos inmóviles determinadas partes del cuerpo mientras otras se mueven gracias al circuito directo.

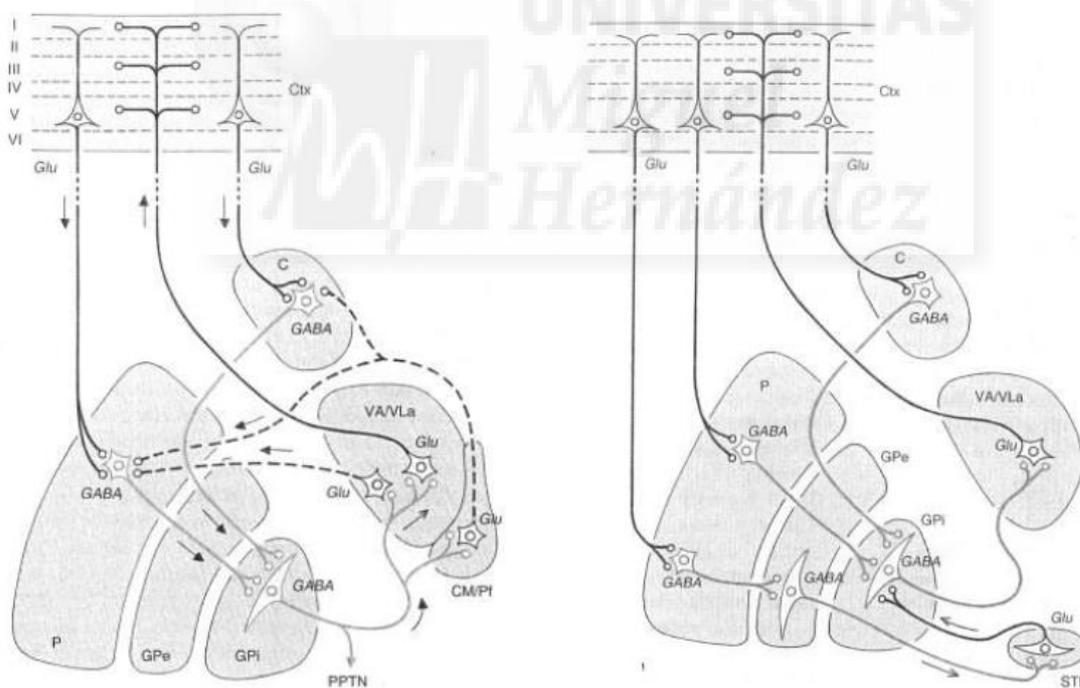


Figura 6. Esquema del circuito directo (izquierda) e indirecto (derecha). Ctx, corteza.; C, caudado; VA/VLa, tálamo; P, putamen; GPe, globo pálido externo; GPI, globo pálido interno; STN, núcleo subtalámico.¹⁶

1.5. TRANSTORNOS ASOCIADOS A FALLOS EN LOS GANGLIOS BASALES

La gran importancia de la función del globo pálido o de cualquiera de los núcleos de los ganglios de la base, hace que el fallo de alguna de estas estructuras provoque trastornos de dos tipos: hipercinéticos, con movimientos excesivos y anormales; e hipocinéticos, con movimientos lentos o con falta de ellos.

El parkinson es una enfermedad progresiva causada por la degeneración neuronal principalmente de la sustancia negra y en menor medida del globo pálido, el putamen y el núcleo caudado. Al degenerar las neuronas de la sustancia negra hay una menor liberación de dopamina al estriado que genera una hipersensibilidad de sus receptores en las neuronas postsinápticas del estriado. Los enfermos de parkinson suelen tener temblor, sobre todo cuando las extremidades están en reposo; rigidez; bradicinesia, dificultad para iniciar movimientos; y alteraciones de la postura. Esta enfermedad incluye ambos tipos de afectaciones motoras, tanto hipercinético como hipocinético.

El hemibalismo es el movimiento involuntario de un lado del cuerpo, afectando sobre todo a las extremidades que se mueven bruscamente. La lesión está en el núcleo subtalámico opuesto al lado que se ve afectado o sus conexiones, ya que en este núcleo se integran los movimientos suaves de las diferentes partes del cuerpo.

El corea cursa con movimientos involuntarios rápidos e irregulares, sobre todo en la cabeza y las extremidades. Existen dos tipos de coreas: la mayor y la menor. La corea mayor o enfermedad de Huntington es hereditaria autosómica dominante afectando a un gen único del cromosoma 4, que codifica para la huntingtina, de función desconocida. Los enfermos de Huntington tienen una degeneración de las neuronas inhibitorias Gabaérgicas con sustancia P y con acetilcolina, lo que provoca que las neuronas secretoras de dopamina de la sustancia negra se hiperactiven. Debido a ello, la vía nigroestriada inhibe el núcleo caudado y el putamen causando los movimientos anormales típicos del trastorno. El corea menor o corea de Sydenham está asociada con fiebre reumática debido a que los antígenos de *Streptococcus* poseen una estructura similar a las de las proteínas de membrana de las neuronas del estriado, provocando un ataque del cuerpo a las neuronas estriatales propias. Esto causa los movimientos aleatorios pero transitorios.¹⁷

1.6. PAPEL DEL GEN *MASH1* EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Gracias al modelo animal del ratón se han podido identificar gran cantidad de genes reguladores implicados en el crecimiento y la formación temprana del patrón del telencéfalo. En concreto se han descubierto dos rutas de transcripción principales en el subpalio en desarrollo: las rutas reguladas por los genes *Dlx1* y *Dlx2* y la regulada por el gen *Mash1*¹⁸. Además, se han encontrado numerosos genes bHLH (basic Helix-loop-helix) encargados de la diferenciación de varios linajes neuronales, sin embargo, *Mash1* es el único gen bHLH conocido que se encuentra en el telencéfalo ventral (Lo et al.,1991; Guillermot and Joyner,1993).

Mash1 es un factor de transcripción que aparece durante el desarrollo embrionario y se expresa en las células progenitoras de la EGL y la EGM (Porteus et al., 1994; Torii et al.,1999) actuando a nivel de diferenciación celular.

Este gen se requiere para la generación de los ganglios parasimpático, las neuronas receptoras olfativas y las neuronas noradrenérgicas del rombencéfalo (Guillermot et al.,1993; Hirsch et al.,1998). También es absolutamente necesario para la especificación de precursores neuronales en la EGM y activa la señalización Notch regulando el ritmo de producción de poblaciones de células precursoras, lo que significa que es esencial para el correcto

desarrollo de las neuronas a estadios tempranos en el telencéfalo basal y de algunas interneuronas corticales. (Casarosa et al., 1999).¹⁹

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En trabajos previos se ha estudiado el efecto de la mutación del gen *Mash1* observando la presencia de interneuronas Gabaérgicas que parten de la EGM hasta la corteza. Para ello, se marcó el ARN mensajero (mRNA) de diferentes genes característicos de este tipo de neuronas y se vio que en estadios tempranos hay una ausencia de estas interneuronas, pero la población parece reestablecerse en estadios posteriores (Casarosa et al., 1999). Este hecho puede indicar que *Mash1* no es el único gen que participa en la diferenciación de estas interneuronas Gabaérgicas. En el estudio únicamente se busca la presencia de mRNA, pero no se describió la presencia o ausencia de las proteínas propias de las neuronas Gabaérgicas y tampoco se describió el efecto de este gen en la formación del globo pálido.

El objetivo de este trabajo es estudiar el papel del gen *Mash1* como factor de transcripción necesario para la correcta especificación de neuronas Gabaérgicas en la EGM, mediante el estudio de la presencia de diversas proteínas específicas de neuronas Gabaérgicas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DE EMBRIONES

Las muestras se obtuvieron a partir de embriones de ratón. Se emplearon embriones silvestres y embriones mutantes *Mash1*^{-/-} en estadios de desarrollo de 12.5 y 15.5 días post-coito (E12.5 y E15.5, respectivamente). En total se utilizaron 12 embriones: 3 silvestres E12.5, 3 mutantes E12.5, 3 silvestres E15.5 y 3 mutantes E15.5. Estos mutantes son de pérdida de función, es decir que no contienen el factor de transcripción *Ascl1* (achaete-scute de la familia bHLH).

Los embriones mutantes *Mash1*^{-/-} fueron obtenidos cruzando ratones heterocigotos *Ascl1*^{+/-} mantenidos en un fondo C57BL/6. El alelo mutante (*Ascl1*^{tm1And}) contiene una mutación puntual generada por recombinación homóloga con un vector. Con esta recombinación homóloga se sustituye la región codificante completa de 600pb, la secuencia 5' del codón de iniciación a la traducción y 200 pares de bases de la secuencia 3' del codón de terminación de la traducción por el *cassette* de resistencia PGK-neomicina.

El genotipado de esta línea se realiza mediante una PCR con 3 oligonucleótidos, utilizando el siguiente conjunto de *primers*:

Para el alelo silvestre de *Mash1*, "wild type" (377pb):

***Oligo Mash1 exon-DI*: 5'CTCGTCCTACTCCTCCGAC 3'**

***Oligo Mash1 intron-R1*: 5'CTCAATACGCAGGGTCTCTATG 3'**

Para el alelo *Ascl1*^{tm1And} (303pb):

***Oligo Mash1 intron-R1*: 5'CTCAATACGCAGGGTCTCTATG 3'**

***Oligo PGKpolyA-DI*: 5'GATCTCTCGTGGGATCATTG 3'**

La manipulación de los ratones fue realizada por personal con la certificación pertinente y toda la experimentación se encontraba aprobada por el Órgano evaluador de Proyectos de la UMH.

Tras la extracción de los embriones, estos se sumergieron en PBS (tampón salino fosfato cuya concentración salina es similar a la del líquido extracelular de mamíferos) y se separó la cabeza de los embriones. Tanto la extracción de los embriones como la obtención de las cabezas, se realizó con tijeras y pinzas de disección y con la ayuda de una lupa binocular.

3.2. FIJACIÓN Y CONSERVACIÓN DE EMBRIONES

Los cerebros y embriones obtenidos se fijan en paraformaldehído entre 12 y 24 horas (o/n) a 4°C en agitación. El formaldehído se une a los grupos funcionales de algunas proteínas provocando su inactivación, por lo que se evita que las enzimas degraden el tejido, permitiendo la conservación del mismo.

Una vez fijados, los embriones se deshidratan lo que también favorece su conservación y facilita la inclusión en parafina. Primero se hicieron 2 lavados de 30 minutos con PBS 1X y luego se llevó a cabo la deshidratación pasando los embriones a soluciones de etanol cada vez más concentradas: 25%, 50%, 70%, y, finalmente 100%. Deben estar en cada solución entre 30 y 45 minutos y durante todo el tiempo en agitación.

Finalmente se cambian de nuevo los embriones a una solución de etanol 100% y se conservan a 4°C (en nevera). El etanol se usa como conservante, pues al deshidratar la muestra se evita que el agua oxide los tejidos por lo que se conservan mejor.

3.3. INCLUSIÓN EN PARAFINA

Los cerebros se incluyeron en parafina para facilitar el corte. Es importante que las muestras estén deshidratadas para que la parafina penetre bien en el tejido, y después lavarlas con una sustancia intermedia, soluble tanto en etanol 100% como en parafina. En este caso se usó butanol como sustancia intermedia llevando a cabo 2 lavados de 30 minutos. Después se incluyó la muestra en un recipiente con parafina líquida y se conservó caliente en una estufa 60°C. Se realizaron 6-7 cambios de parafina, también cada 30 minutos para eliminar los restos de butanol de la muestra y que el tejido quede bien impregnado de parafina.

Una vez finalizados los cambios de parafina se coloca el cerebro en un recipiente de plástico cúbico con la orientación deseada según el tipo de corte, se añade parafina líquida y se deja enfriar poco a poco a temperatura ambiente. Mientras la parafina se solidificaba se iba derritiendo la capa sólida de arriba para permitir que el cubo solidificase completamente de abajo hacia arriba.

3.4. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS (CORTE Y MONTAJE)

Para la obtención de las muestras de tejido cerebral embrionario se procedió al corte de las mismas con secciones de 10µm con un Microtomo Microm.

Una vez obtenidas las secciones, estas se pasaron a un baño con agua entre 30-40°C y se montaron en portaobjetos ordenados en series, obteniendo entre 4 (A-D) y 5 (A-E) series de cada embrión. A cada serie se le aplica un tratamiento diferente, permitiendo así comparar diferentes marcajes en cortes muy similares del mismo embrión.

Con el objetivo de preparar las muestras para la inmunohistoquímica, estas se desparafinaron, para lo cual se mantuvieron los portaobjetos con las muestras en un horno a 95°C durante 20 minutos y luego se rehidrataron

pasándolos por las siguientes soluciones de forma secuencial: xilol (2 cambios de 10 minutos), etanol 100%, etanol 96% y etanol 70% (2 cambios de 5 minutos en cada uno de ellos) y por último un cambio de agua destilada.

3.5. INMUNOHISTOQUÍMICA

Previo a la realización de la inmunohistoquímica se deben hervir los portaobjetos con las muestras para desnaturalizar las proteínas y que de esta forma los antígenos se unan con más facilidad a los anticuerpos. El hervido se realizó en una solución de citrato sódico 0,01M con el microondas a una potencia de 700W y con los siguientes intervalos de tiempo: 4, 3, 3 y 3 minutos, tras cada intervalo de tiempo se añadió solución al recipiente en caso de que fuera necesario, ya que las muestras deben estar cubiertas de la solución en todo momento para evitar que se sequen.

Una vez hervidas las muestras, se pasaron a una cubeta coplin y se les dieron 3 lavados de 5 minutos con PBS-T. El PBS-T es una solución 1X de PBS con 0,1% de tritón, un detergente que permeabiliza las membranas para que los reactivos puedan entrar bien en el tejido.

Para bloquear la peroxidasa endógena y evitar que interfiera con la peroxidasa que se añade en pasos posteriores, tras los lavados, se mantuvieron las muestras sumergidas en una solución de PBS-T con 0,9% H₂O₂ durante 30 minutos, en los que la cubeta se aisló de la luz con papel de aluminio para evitar que el agua oxigenada se inactivase. Esta solución se prepara con 1,8 ml de H₂O₂ al 30% y hasta 60 ml de PBS-T. Posteriormente se hicieron otros 3 lavados de 5 minutos con PBS-T.

Después se incubó durante 1 hora con la solución de bloqueo para bloquear los reactivos presentes en el tejido de forma natural y evitar marcaje inespecífico. La solución de bloqueo contiene PBS-T con 1% BSA (Albúmina de suero bovina), 10% Lisina (aminoácido esencial) y 0,01% Azida (conservante para poder reutilizarlo con otras muestras). Para preparar 100mL de bloqueo se mezclaron 80 ml de PBS-T, 1g de BSA, 10 ml de Lisina y 10 ml de Azida 0.1%.

Tras la incubación con el bloqueo se añadió directamente el anticuerpo primario, que se une de forma específica al antígeno/proteína que deseamos marcar. En este trabajo se emplearon los siguientes anticuerpos policlonales primarios a las diluciones que aparecen entre paréntesis: α Nkx2.1 (1:100), α Pax6 (1:500), α Gad65/67 (1:300). Todos estos anticuerpos son inmunoglobulinas G (IgG) de conejo. La dilución de los anticuerpos se hizo en una solución de PBS-T con 1% BSA y 0,01% de Azida. Por cada porta se prepararon 500 μ l de esta dilución que se vertieron con ayuda de una pipeta sobre los portaobjetos colocados de forma horizontal y se dejaron incubando con el anticuerpo hasta el día siguiente (overnight) a temperatura ambiente. Para evitar que la solución con el anticuerpo se evapore y el tejido quedase seco, los portaobjetos se introdujeron en una caja y se colocaron de forma horizontal sobre unas plataformas quedando un espacio abajo para colocar papel impregnado en agua destilada, y se tapó la caja con la tapa durante la incubación. Transcurrido este tiempo se llevaron a cabo, de nuevo, 3 lavados de 5 minutos con PBS-T. El anticuerpo primario se recuperó para poder utilizarlo en otro momento con otras muestras.

Después se incubaron los portaobjetos que contenían las muestras con el anticuerpo secundario, de la misma manera que el primario. El anticuerpo secundario usado fue GAR (Goat Anti-Rabbit), es decir, es IgG de cabra que se une a anticuerpos de conejo. Además, estos anticuerpos están conjugados con biotina, para poder llevar a cabo del revelado. El anticuerpo secundario se preparó a una concentración 1:200 en PBS-T. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS-T.

Luego se incubó con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC), de la misma forma que con el anticuerpo secundario, durante 1 hora. Este complejo se prepara en PBS-T con una dilución de Avidina y de Biotina-peroxidasa, ambas a 1:500. En este paso, el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa, se une, por la avidina, a la biotina conjugada al anticuerpo secundario. Tras esta incubación se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS-T y luego 2 lavados de 10 minutos con PBS 1X, para eliminar el detergente, ya que los compuestos que se forman en la reacción posterior son apolares y deben precipitar para ser visibles.

Una vez retirado el detergente se procedió al revelado en la cubeta coplin. La solución de revelado contiene PBS con 0,003% de H_2O_2 y 1% de DAB, diaminobencidina tetrahidrocliclorhídrica, (6 μ l de H_2O_2 30%, 600 μ l de DAB y hasta 60 ml de PBS1X). El DAB reacciona con el H_2O_2 formando un sustrato de la peroxidasa, el producto de la reacción con la enzima es de color marrón y precipita generando una mancha en el sitio en el que se encuentra el complejo, haciendo visible la proteína que deseábamos marcar. Durante el revelado se mantuvo la cubeta tapada con papel de aluminio, ya que tanto el DAB como el agua oxigenada se inactivan con la luz. Cuando se consideró que el marcaje era suficiente se paró la reacción eliminando de la cubeta la solución de revelado y haciendo dos lavados con PBS 1X.

Para poner el cubreobjetos primero se deshidrataron, de nuevo, las muestras ya tratadas pasando por soluciones sucesivas de etanol: 70%, 96% y 100% (2 lavados de 5 minutos en cada uno) y 2 lavados de 10 minutos con xilol. El cubreobjetos se fijó con Eukitt e incubando durante varias semanas en una estufa a 37°C.

3.6. OBTENCIÓN DE IMÁGENES

La obtención de las imágenes se hizo mediante una cámara asociada a una lupa binocular. Para crear las figuras se utilizó el paquete de Adobe: Photoshop para el tratamiento de las imágenes e Illustrator para la composición de las figuras.

4. RESULTADOS

Se analizaron embriones de estadios tempranos, donde la diferenciación neuronal se encuentra en las primeras etapas, como E12.5 (Fig. 1) y estadios tardíos, donde dicha diferenciación se encuentra avanzada, como E15.5 (Fig. 2). Las muestras incluyeron tanto embriones mutantes de pérdida de función (*Mash1*^{-/-}) como embriones silvestres (*Wild-type*) para comparar los resultados obtenidos. Hemos estudiado la distribución de tres marcadores diferentes para determinar el fenotipo del ratón nulo. Pax6, marcador de la corteza cerebral entre otras regiones, es un factor de transcripción que se expresa en diversas etapas del desarrollo. Nkx2.1 marcador en la eminencia ganglionar medial (EGM) y en la región hipotalámica. Por último, GAD65/67, isoformas de la descarboxilasa de ácido glutámico, responsable de la síntesis de GABA, por lo que se expresa en interneuronas Gabaérgicas inhibitorias de la corteza y marca las dos eminencias ganglionares, estructuras ampliamente colonizadas por neuronas inhibitorias.

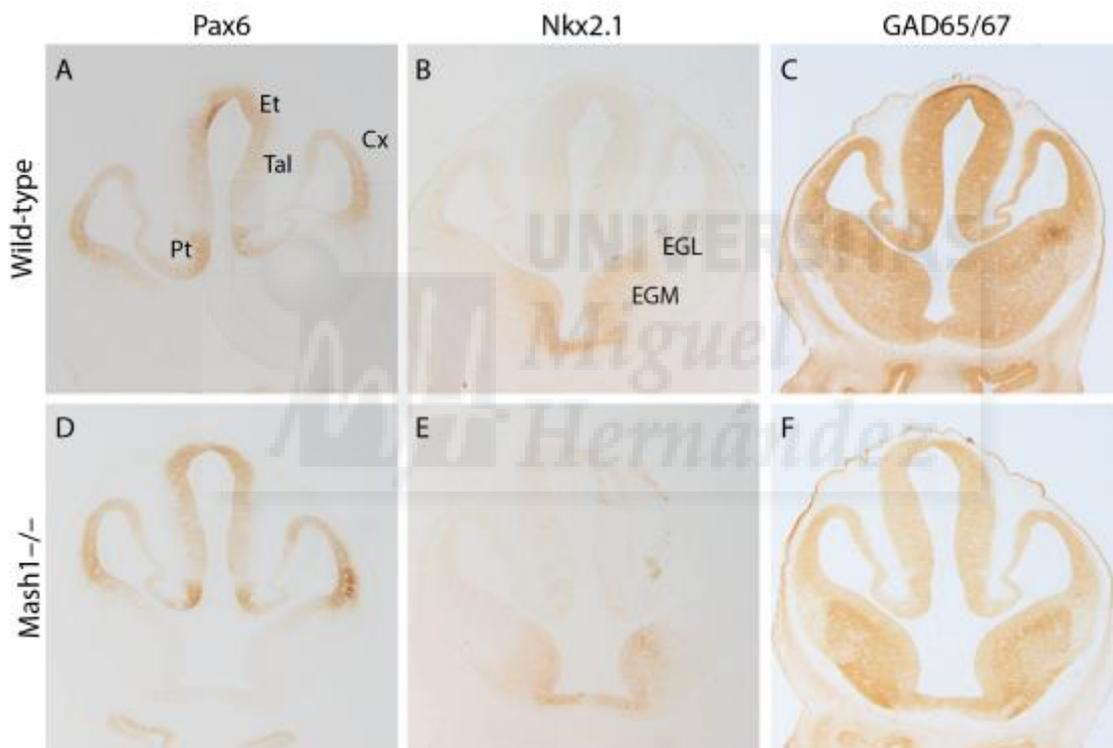


Figura 1. Se observan cortes transversales seriados de encéfalo de embrión E12.5 silvestres o *Wild-type* (A, B y C) y mutantes *Mash1*^{-/-} (D, E y F); marcados con diferentes anticuerpos. Pax6 (A y D), Nkx2.1 (B y E), GAD65/67 (C y F). Et, epitálamo; Tal, tálamo, Pt, pretálamo, Cx, corteza; EGL, eminencia ganglionar lateral; EGM, eminencia ganglionar medial.

A estadio E12.5 (Fig.1) no se observa gran diferencia entre los embriones mutantes y silvestres en la distribución de estos marcadores en la corteza cerebral (Fig. 1A y 1D) y en las EGM y EGL (Fig. 1B y 1E) como era de esperar debido a que estas estructuras se encuentran en las primeras fases de diferenciación neuronal, aunque sí se puede observar un tamaño ligeramente menor en la EGM del mutante (Fig. 1E) en comparación con el silvestre (Fig. 1B). También se ve una disminución de expresión de neuronas Gabaérgicas en el mutante (Fig. 1F) en comparación con el silvestre (Fig. 1C), pero no se observa una ausencia total de estas neuronas en el mutante.

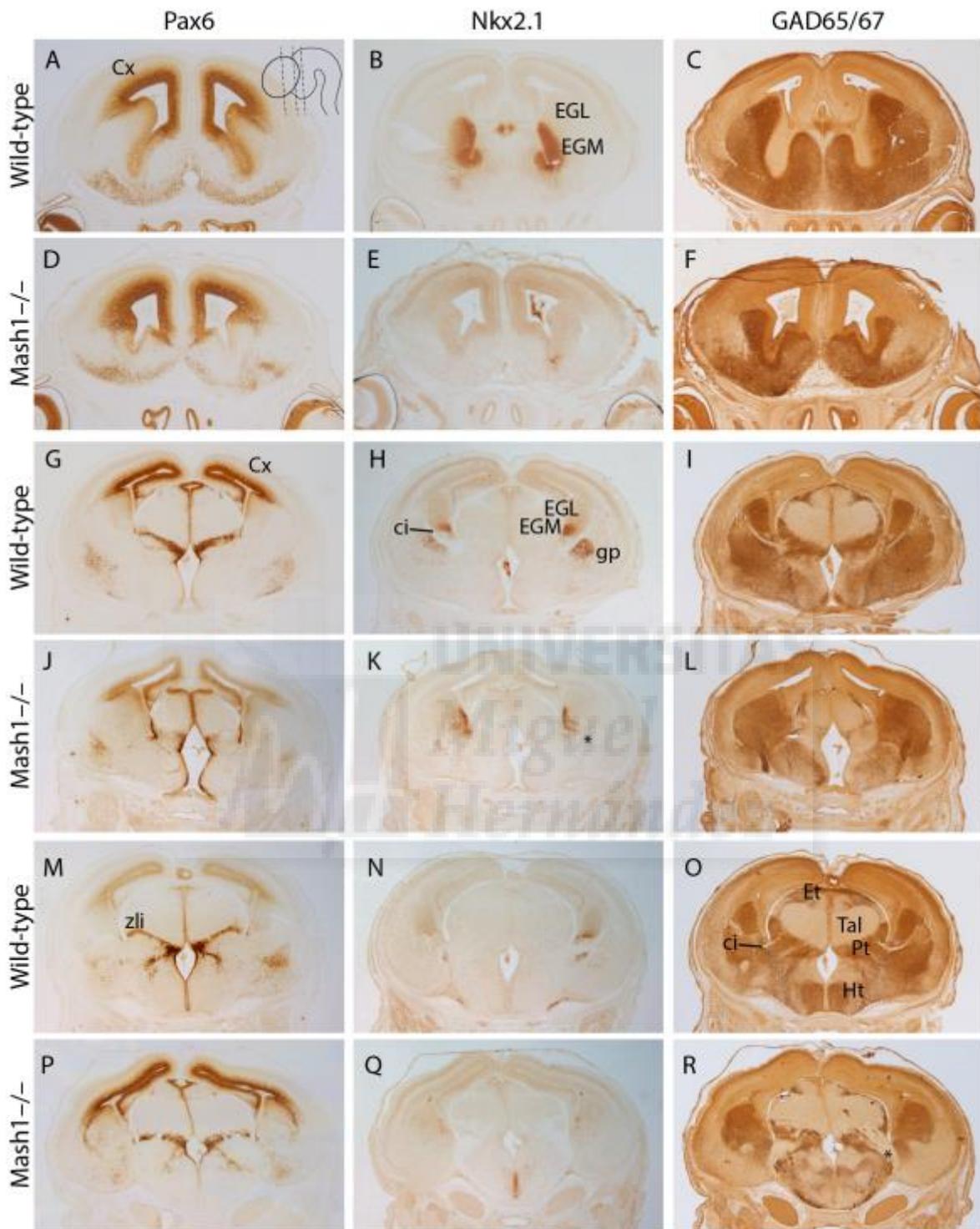


Figura 2. Cortes transversales del encéfalo de embriones a E15.5 silvestres o Wild-type (A-C, G-I, M-O) y mutantes *Mash1*^{-/-} (D-F, J-L, P-R). Los cortes son: más rostrales (A-F), más caudales (M-R) y entre ambos (G-L), tal y como se muestra en el esquema de la esquina superior derecha de A. Marcados con Pax6 (A, D, G, J, M y P), Nkx2.1 (B, E, H, K, N y Q) y GAD65/67 (C, F, I, L, O y R). Cx, corteza; EGL, eminencia ganglionar lateral; EGM, eminencia ganglionar medial; ci, cápsula interna; gp, globo pálido; zli, zona limitans intratalámica; Et, epitálamo; Tal, tálamo; Pt, pretálamo; Ht, hipotálamo.

En estadio E15.5 (Fig.2) las eminencias ganglionares ya se han diferenciado y ya se observan grandes diferencias entre encéfalos silvestres y mutantes *Mash1*^{-/-}.

En cortes más rostrales podemos observar, gracias al marcaje con Pax6, que la pared del ventrículo en la zona de la EGM está bien definida en el silvestre (Fig. 2A), pero no lo está en el mutante (Fig. 2D). Además, con el marcaje de Nkx2.1 vemos una ausencia de la EGM en el mutante (Fig. 2E), mientras que el silvestre esta zona se ve marcada perfectamente (Fig. 2B). Con GAD65/67 vemos una disminución en el número de las neuronas Gabaérgicas en el mutante (Fig. 2F) en comparación con el silvestre (Fig. 2C), tanto en EGM como en EGL.

Avanzando hacia zonas más caudales, observamos en los cortes marcados con Pax6, que tanto en el silvestre como en el mutante (Fig. 2G y 2J) hay una migración de neuronas desde la corteza hasta la EGM. En el silvestre, gracias al marcaje con Nkx2.1 (Fig. 2H) vemos la presencia del globo pálido, síntoma de que la EGM se está diferenciando correctamente, mientras que en el mutante hay una ausencia total de esta estructura, como se observa en el asterisco de la Fig. 2K. Con el marcaje GAD65/67, vemos una distribución anormal en las eminencias ganglionares del mutante (Fig. 2L), pues en el silvestre (Fig. 2I) se aprecian perfectamente las diferentes estructuras de las eminencias ganglionares.

En los cortes más caudales vemos que la zona limitans intratálámica, situada entre el tálamo y el pretálamo, no es continua y está menos marcada en el mutante (Fig. 2P) y en el silvestre (Fig. 2M) esta línea aparece continua y bien definida. En estos cortes marcados con Nkx2.1 vemos cómo en el silvestre (Fig. 2N) se ve el final de la EGM y el globo pálido, zona que en el mutante (Fig. 2G) sigue estando ausente. En los cortes marcados con GAD65/67 podemos observar, de nuevo, una distribución anormal de las estructuras del pretálamo e hipotálamo. En el silvestre (Fig. 2O), podemos observar en negativo el trayecto seguido por las fibras talamocorticales, que procedentes del tálamo tienen que atravesar las eminencias ganglionares para poder alcanzar su destino final que es la corteza cerebral. En el mutante (asterisco en Fig. 2R) podemos observar como las fibras talámicas se agrupan formando un grueso fascículo. Este no sigue la trayectoria esperada y cursa ventralmente.

5. DISCUSIÓN

En encéfalos de embriones wild-type o silvestres se observó que a E12.5 aún no se habían diferenciado por completo las eminencias ganglionares, pero sí se vio presencia de interneuronas Gabaérgicas en la zona. Sin embargo, los mutantes de déficit de función del gen *Mash1* mostraban menor cantidad de este tipo de interneuronas, indicando que el gen es un factor de transcripción que participa en la diferenciación en neuronas secretoras de Gaba. El hecho de no existir una ausencia total de estas neuronas en embriones *Mash1*^{-/-} indica que la cascada génica inducida por este gen no es la única en este proceso de diferenciación, otros genes tienen que conducir a los neuroblastos hacia este destino neuronal.

En estadios más avanzados (E15.5), cuando las eminencias ganglionares medial y lateral ya están más diferenciadas, se observan claramente las diferentes estructuras como el globo pálido, la cápsula interna, la zona limitans intratálámica, etc. Sin embargo, cuando el gen *Mash1* no es funcional no somos capaces de detectar el globo pálido, lo que indica que este gen juega un papel fundamental en la determinación de la EGM y por lo tanto de la especificación del globo pálido. La trayectoria anómala de las fibras talamocorticales nos indica que la EGM es una estructura necesaria para guiar estas fibras hasta su destino final como quedó demostrado por el laboratorio de la Dra. López-Bendito²⁰.

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

1. El gen *Mash1* es necesario y fundamental para determinar la EGM y por lo tanto para la especificación del globo pálido.
2. La cascada genética inducida por *Mash1* no es la única vía de inducción la diferenciación de neuronas Gabaérgicas.
3. La no determinación de la EGM provoca graves alteraciones en la ruta de los axones talamocorticales.

Conocer el desarrollo embrionario del SNC y, en concreto, el desarrollo de las neuronas Gabaérgicas del circuito de los ganglios de la base es vital porque, como ya hemos visto, es un complejo que participa en funciones de control motor y funciones cognitivas. Los fallos en este sistema pueden causar graves trastornos en la funcionalidad de los pacientes. En muchos casos no se conoce exactamente la causa que ha favorecido el desarrollo de las alteraciones de los ganglios basales. Por ello investigar sobre el desarrollo, el funcionamiento de esta estructura, las diferentes neuronas que lo componen y los genes que participan, es esencial para llegar a comprender mejor estas alteraciones y cómo podemos llegar a tratar o evitar.

Una vez conocidos en profundidad estos procesos, gracias a la biotecnología se podrían diseñar diferentes técnicas de detección y tratamiento según el tipo de alteración en estas estructuras. En los problemas causados por alteraciones genéticas podrían desarrollarse terapias génicas mediante vectores víricos o liposomas para incorporar el material genético dentro de la célula; emplear ARN de interferencia frente a genes alterados; o utilizar la edición genética mediante el sistema CRISPR, entre otras muchas posibles técnicas.

Otra de las posibilidades que ofrece la biotecnología, en el caso de conocer por completo el funcionamiento de este sistema y las diferentes afectaciones que puede tener, es el diseño de animales modelo para diferentes enfermedades relacionadas. Esto es importante para estudiar la evolución de los diferentes trastornos y poder testar los posibles tratamientos que vayan surgiendo.

7. BIBLIOGRAFÍA

¹Oznacčavanje. Embriología humana. Parte II: Embriología especial. Capítulo 15: Sistema Nervioso. Desarrollo y morfogénesis del tubo neural. Neurulación. Fig.15.2. Recuperado de <https://goo.gl/xcW4Gb>

²Oznacčavanje. Embriología humana. Parte I: Embriología General. Capítulo 3: Periodo embrionario. Derivados de la capa germinativa ectodérmica. Control molecular de la diferenciación del tubo neural. Fig.3.3. Recuperado de <https://goo.gl/BYzqHf>

³Anatomía de Rembrandt. Lecciones de anatomía en el IES Carpetania. Monthly Archives: marzo 2015. Evolución del sistema nervioso. Recuperado de <https://goo.gl/8Dhhz5>

⁴InSlide Share. Malformaciones del encéfalo. 6 de 111. Recuperado de <https://goo.gl/rkbgYk>

⁵SciELO. (2010) Flores, M.G. y Escobar, A. Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Migración neuronal normal. Recuperado de <https://goo.gl/HFEMBE>

- ⁶ Emaze. Migración neuroblástica. Leidy Johana Acosta Garces. Kigración radial y tangencial. Recuperado de <https://goo.gl/tJFkZH>
- ⁷ Wikipedia. Encephalon human saggittal section multilingual.svg. Recuperado de <https://goo.gl/yQ7sht>
- ⁸ InSlideShare. Cerebro configuración externa. Ventriculos. 12 de15. Recuperado de <https://goo.gl/BNWHLx>
- ⁹ InSlideShare. Araneda-Urrutia, Carlos. NM3-Sistema Nervioso. Ganglios basales y sistema Límbico. 9 de 21. Recuperado de <https://goo.gl/ut2Udb>
- ¹⁰ Neurocirugía Contemporánea. Globo Pálido. Recuperado de <https://goo.gl/CQn7wo>
- ¹¹ Sandra Merlo. Fonoaudiología da fluencia. Noticias: Núcleos de la base. Recuperado de <https://goo.gl/2CDMiD>
- ¹² Universidad de Chile. Tipos de Neuronas. Recuperado de <https://goo.gl/PBwtCZ>
- ¹³ Marín, O; Steward, A.A; Rubenstein, J.L.R (2000). Origin and Molecular Specification of Striatal Interneurons. The Journal of Neuroscience.
- ¹⁴ Kawaguchi, Y; Wilson, C.J; Augood; Emson, PC (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. Recuperado de <https://goo.gl/KC8G4q>
- ¹⁵ Psicología y mente. Neurociencias. Vía aferente y vía eferente: los tipos de fibras nerviosas. Recuperado de <https://goo.gl/2WtPyt>
- ¹⁶ Nieuwenhuys, Voogd y van Huijzen. El sistema Nervioso Central Humano. Ed. Panamericana. (2009). Tomo 1, Sección I, Capítulo 2 Desarrollo. Tomo 2. Sección II. Capítulo 14: Telencéfalo-ganglios basales.
- ¹⁷ Richard S. Snell, Neuroanatomía Clínica. Ed. Lippincot Williams y Wilkins (2010). Capítulo: Ganglios de la base.
- ¹⁸ Long, J.E; Cobos, I; Potter, G.B; Rubenstein, J.L.R (2009). *Dlx1-2* and *Mash1* Transcription Factors Control MGE and CGE Patterning and Differentiation through Parallel and Overlapping Pathways. Cerebral Cortex.
- ¹⁹ Casarosa, Simona; Fode, Carol; Guillermot, François (1999) Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon.
- ²⁰ López-Bendito, G; Molnar, Z. (2003) Thalamocortical development: how are we going to get there? Nat Rev Neurosci.