

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**TRABAJO FIN DE GRADO EN FARMACIA**



**Papel de Mash1 en la determinación de las neuronas  
GABAérgicas en el diencéfalo.**

Autora: Savova Kirpecheva, Mariya

DNI: X-5057873-N

Tutor: De Puelles Martinez de la Torre, Eduardo

Modalidad: Trabajo experimental

Departamento de Histología y Anatomía

Curso académico 2016-2017

Convocatoria de Junio

## AGRADECIMIENTOS

A Eduardo de Puelles, por su tiempo y dedicación, por enseñarme tanto y tan bien.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página:
● Resumen y palabras clave	4
● Abstract and keywords	5
● Introducción	6
● Objetivo	9
● Hipótesis de trabajo	10
● Material y métodos	11
● Resultados	17
● Discusión	21
● Conclusiones	22
● Referencias bibliográficas	23



## RESUMEN

**Introducción:** El tubo neural está formado únicamente por neuroblastos que sufren primero una gran proliferación y posteriormente una diferenciación y especificación debido a una cascada genética inducida por un morfogen. Mash1 es un gen que transcribe un factor de transcripción involucrado en la cascada genética que origina la especialización de los neuroblastos en neuronas GABAérgicas inhibitorias en el cerebro.

**Objetivo:** Estudiar el desarrollo embrionario del pretálamo en embriones mutantes para el gen Mash1.

**Hipótesis de trabajo:** Mash1 es un factor de transcripción necesario para la especificación de las neuronas GABAérgicas pretalámicas.

**Materiales y métodos:** Este estudio se ha llevado a cabo utilizando la técnica inmunohistoquímica en material procedente de individuos mutantes para el factor Mash1 y sus respectivos controles.

**Resultados:** Mediante el estudio neuropatológico se observa que en caso de presencia de mutación sobre el gen Mash1 se ve reducido el número de neuronas GABAérgicas inhibitorias funcionales.

**Discusión:** La ausencia del gen Mash1 se traduce en una diferenciación errónea de los neuroblastos y por tanto un menor número de neuronas GABA. El gen Mash1 no es el único gen que codifica las neuronas GABA por eso se observa que en el caso de su mutación no hay una ausencia completa de estas neuronas.

**Conclusiones:** La mutación del gen Mash1 afecta e impide el desarrollo normal de las neuronas GABAérgicas inhibitorias del diencéfalo.

**Palabras clave:** Mash1, Tálamo, Pretálamo, GABAérgicas.

## ABSTRACT

**Introduction:** The neural tube is formed by neuroblasts that suffers first a great proliferation process and later a differentiation and specification processes due to a genetic cascade induced by a morphogen. Mash1 is a gene that transcribes a transcription factor involved in the genetic cascade that originates the specialization of neuroblasts in inhibitory GABAergic neurons in the brain.

**Objective:** Study of the embryonic development of the prethalamus in Mash1 mutant embryos.

**Working hypothesis:** Mash1 is a transcription factor necessary for the specification of prethalamic GABAergic neurons.

**Materials and methods:** This study was carried out using the immunohistochemical technique in material from mutant individuals for the factor Mash1 and their respective controls.

**Results:** Through the neuropathological study it is observed that in case of presence of mutation on the Mash1 gene the number of functional inhibitory GABAergic neurons is reduced.

**Discussion:** The absence of the Mash1 gene results in an erroneous differentiation of the neuroblasts and, therefore, a smaller number of GABA neurons, the Mash1 gene is not the only gene encoding the GABA neurons, so it is observed that in the case of their mutation there is not a complete absence.

**Conclusions:** The mutation of the Mash1 gene affects and disrupts the normal development of the inhibitory GABAergic neurons of the diencephalon.

**Key words:** Mash1, Thalamus, Prethalamus, Gabaergic

## INTRODUCCIÓN

El Sistema Nervioso Central (SNC) se forma a partir de la placa neural (una zona paramediana engrosada y alargada de la capa germinativa externa) que se transforma en un surco que se cierra posteriormente para dar lugar al tubo neural, este proceso se denomina neurulación primaria (proceso fundamental de embriogénesis). La zona interna del tubo neural se denomina capa de la matriz y está formada exclusivamente por un único tipo de células epiteliales que se encuentran en distintos estadios del ciclo mitótico y participan en los procesos de proliferación, estas células son las precursoras de todas las células neuronales y macrogliales del SNC<sup>1</sup>.

Incluso antes de que la porción posterior del tubo neural temprano se haya formado completamente la porción anterior está sufriendo grandes cambios y se forman las tres vesículas primarias: rombencéfalo, mesencéfalo y prosencéfalo<sup>2</sup>. Las paredes laterales de estas vesículas se engruesan pasando a formar el tejido nervioso en el cual se diferenciarán las neuronas con sus prolongaciones y la glía<sup>1</sup>. El prosencéfalo está formado por telencéfalo y diencéfalo; el diencéfalo a su vez está compuesto entre otros por dos complejos nucleares de gran importancia, el tálamo y el pretálamo<sup>2</sup>.

La visión clásica sobre el desarrollo encefálico en la mayoría de los vertebrados se puede resumir de la siguiente manera: placa neural -> canal neural -> tubo neural -> formación de tres vesículas encefálicas primarias (prosencefalo, mesencefalo y rombencefalo)-> formación de cinco vesículas encefálicas secundarias (rombencefalo se divide en metencefalo y mielencefalo; prosencefalo se divide en telencefalo y diencefalo).<sup>1</sup>

La regionalización neural es el proceso mediante el cual las células indiferenciadas, se disponen a dar lugar a determinados tipos de neuronas dependiendo de su posición dentro del tubo neural<sup>3</sup>. A través de la regionalización, el tubo neural en desarrollo queda dividido en regiones o

territorios, que comparten propiedades histogenéticas similares<sup>1</sup>. En primer lugar las distintas identidades neuronales y gliales son adquiridas bajo la influencia de las señales ambientales locales. En una segunda etapa actúan los organizadores secundarios, grupos de células que se hallan en el tubo neural y liberan morfógenos. Estos actúan sobre diferentes distancias (desde decenas a cientos de micrómetros), durante diferentes tiempos (horas o días) y en muy diversos contextos de desarrollo<sup>4</sup>; producen una regulación diferencial de la transcripción genómica por células competentes dentro del rango de acción, posteriormente su actividad refina las identidades neuronales locales. Durante el desarrollo en vertebrados, las células indiferenciadas (neuroblastos) denominadas progenitores o precursores, experimentan una diferenciación progresiva y sucesiva para dar lugar a células más específicas<sup>5</sup>. En la placa y tubo neural han sido identificadas tres regiones como organizadores secundarios putativos: la cresta neural anterior en la zona abierta de la placa neural, la zona limitans intertalámica en el diencéfalo y por último el organizador ístmico<sup>6</sup>.

El diencéfalo es la zona central del desarrollo del cerebro donde se generan los núcleos talámico y pretalámico. La zona limitans es un plano prácticamente acelular formado por una empalizada de fibras de glía radial con sus somas en posición ependimaria<sup>1</sup>. La zona limitans presenta un patrón único de expresión conservado entre todos los vertebrados, lo que demuestra la importancia de este área como organizador secundario del diencéfalo<sup>6</sup>.

Dentro de los procesos de diferenciación que se producen en el diencéfalo tenemos el de formación de las neuronas inhibitorias que usan GABA como neurotransmisor. Existen diversos genes identificados en las cascadas genéticas de este proceso de diferenciación. Entre ellos el gen Mash1, en los embriones mutantes de Mash1 se generan precursores neuronales pero su desarrollo se bloquea antes de la etapa de diferenciación terminal<sup>7</sup>. Los neuroblastos proliferan pero no sufren una correcta especialización en neuronas GABAérgicas dado que la falta de función de

Mash1 provoca que la cascada genética de la especificación de las células madres en neuronas GABA esté impedida.

En la bibliografía hay numerosos estudios realizados sobre los efectos de la mutación Mash1 en el cerebro del ratón, pero los efectos de esta mutación a nivel del tálamo y pretálamo son prácticamente desconocidos, debido a ello hemos centrado nuestro estudio en estas dos áreas cerebrales.



## OBJETIVO

Llevar a cabo un estudio neuropatológico de diversas muestras de encéfalo de embrión de ratón mutante (carencia de la expresión del gen Mash1) en diferentes estadios de desarrollo y compararlas con sus respectivas muestras control con el fin de demostrar la importancia de la presencia del factor Mash1.



## HIPÓTESIS

El factor Mash1 (expresado en las neuronas del diencefalo) es necesario para la especificación de las neuronas pretalámicas. Se propone que su expresión es vital para la correcta especificación de las neuronas que se encuentran en el diencefalo.



## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se ha llevado a cabo durante el periodo de tiempo comprendido entre el 4 y el 29 de Julio de 2016 en el laboratorio 138 del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández. Se ha realizado un estudio observacional descriptivo, consistente en el análisis neuropatológico de varias muestras encefálicas de ratones mutantes para el factor Mash1 en diferentes estadios de desarrollo y de sus respectivos controles. El único criterio de inclusión de las muestras es ser procedente de sujetos que presenten la mutación para el gen Mash1.

El material biológico es procedente de los ratones del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández.

### **Genotipado de mutantes**

Los embriones mutantes para el gen Mash1 fueron obtenidos cruzando ratones heterocigóticos Mash1 +/- mantenidos en un fondo C57BL. El alelo mutante (Mash1) se generó por David Anderson, California Institute of Technology, HHMI. Un casete de resistencia a PGK-neomicina reemplazó toda la región codificante, 0,6 kb de la secuencia 5' del codón de iniciación de la traducción y 0,2 kb de la secuencia 3' del codón de terminación de la traducción.

Para el genotipado de esta línea de ratones mutantes se ha realizado una PCR que contenía 3 primers: dos de los cuales identificaban la presencia de un gen Mash1 intacto (Exon-D1 de Mash1 e intron-R1 de Mash1) y el otro primer identificaba la presencia de PGK poly of the LacZ cassette (Oligo PGKpolyA-D1).

Para el alelo Mash 1 “wild type” (377bp):

Oligo Mash1 exon-D1: 5'-CTCGTCCTACTCCTCCGAC- 3'

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

Para el alelo Mash1 (303bp):

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

Oligo PGKpolyA-D1: 5'-GATCTCTCGTGGGATCATTG- 3'

**Tabla1.** Protocolo de PCR empleado

<b>Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleado:</b>
4 minutos a 94°C
40-44 ciclos de: 30 segundos a 94°C 30 segundos a 54°C 30 segundos a 72°C
10 minutos a 72°C
Conservar a 4°C

Los productos de amplificación por PCR se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% y se identifican por tamaño:

Presencia sólo de una banda superior (+/+): Wild type

Presencia de banda superior e inferior (+/-): Heterocigoto

Presencia sólo de una banda inferior (-/-): Mutante homocigoto

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.

## **Procesado de las muestras**

### **Fijación de embriones**

Tras aislar los embriones del útero con la ayuda de una lupa estereoscópica, éstos se limpiaron en una solución salina de PBS e inmediatamente se procedió a su fijación en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS donde permanecieron a 4°C durante una noche o dos dependiendo del tamaño de los embriones. Tras la fijación los embriones se lavaron en PBS y a continuación, estos fueron deshidratados progresivamente en metanol 25%, 50%, 75% y 100% y almacenados a -20°C hasta su uso.

### **Inclusión en parafina y sección en microtomo**

Para estudiar en profundidad la morfología de las distintas regiones del tubo neural, se usó la técnica de inclusión en parafina del tejido para, posteriormente, realizar secciones en el microtomo. Tras aislar los segmentos de encéfalo objeto de estudio fueron limpiados con una solución salina de PBS (Phosphate Buffered Saline) e inmediatamente se procedió a su fijación en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS donde permanecieron a 4°C durante 24 horas. Tras la fijación, las muestras se lavaron con PBS y a continuación fueron deshidratadas progresivamente en metanol 25 %, 50 %, 75 % y 100 %.

Con el objetivo de incluirlas en parafina, la muestras fueron lavadas en etanol 100% durante 10 minutos. Después fueron incubadas en butanol 2 horas para retirar toda traza de etanol (no miscible con parafina). A continuación, las muestras fueron incubadas en parafina líquida a 58°C, donde se realizaron 4 ó 5 cambios de parafina con el fin de eliminar totalmente los restos de butanol.

Una vez incluida la muestra, se depositó en un molde de plástico con forma de cubo donde se orientó al embrión con respecto a una cara del cubo y se dejó solidificar la parafina a temperatura ambiente. Tras solidificar la parafina, se extrajo el bloque del molde y se procedió a su sección, realizándose los cortes con un microtomo (Microm HM 335 E<sup>®</sup>). El grosor de cada sección se fijó en 10 µm. Los cortes fueron montados en portaobjetos en series paralelas usando una solución de albúmina al 1,5 % en agua. Después de secar los cortes a 37°C durante un día, se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

Posteriormente se procedió a la realización de una inmunohistoquímica, a continuación se procede a describir la técnica empleada.

#### Inmunohistoquímica

Esta técnica permite detectar una variedad de antígenos presentes en las células (en este caso neuronas). Se basa en aplicar un anticuerpo primario al tejido que reconozca la proteína de interés, para después añadir un anticuerpo secundario conjugado con biotina que reconozca el anticuerpo primario, amplificando así la señal y posibilitando el revelado posterior.

Los cortes de parafina fueron desparafinados en xilol (disuelve la parafina) durante una noche. Al día siguiente los cortes fueron rehidratados en una serie decreciente de alcoholes al 100 %, 96 %, 70% hasta agua. Cada paso fue de 10 minutos.

Posteriormente se procedió a la técnica de re-exposición de los epítomos. La técnica consiste en la aplicación de calor por hervido en un tampón de citrato sódico a 0,01 M en agua. El hervido se llevó a cabo en un microondas a 750 vatios de potencia en 4 tiempos de 4 minutos. En la **Tabla 2** se detallan los dos anticuerpos utilizados en este estudio, la concentración a la que se usaron, si necesitaron hervido o no y qué anticuerpo secundario se usó.

**Tabla 2.**Lista de anticuerpos y concentraciones utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Hervido</b>	<b>Ac. Secundario</b>
<b>Pax 6</b>	1:500	Sí	GAR(goat anti-rabbit)
<b>GAD 65/67</b>	1:300	No	GAR (goat anti-rabbit)

Después del tratamiento los cortes fueron lavados con PBS con tritón (PBST) al 0,1 % para eliminar los restos de citrato sódico. A continuación se bloqueó la peroxidasa endógena del tejido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos a temperatura ambiente en un copling protegido de la luz. Y para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se utilizó lisina al 10% en PBST. El anticuerpo primario se incubó a la concentración indicada en albúmina de suero bovino (BSA) al 1% con azida al 0,1% en PBST. Se dejó actuar durante una noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente se recuperó el anticuerpo primario y se lavaron los portaobjetos varias veces en PBST. Se usó el anticuerpo secundario biotinilado en PBST durante una hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados en PBST se añadió el complejo ABC (Avidin Biotin Complex) de Vector Laboratories<sup>®</sup> a la concentración de 1:300 en PBST. Este complejo contiene avidina y la peroxidasa del rábano biotinilada. La avidina tiene una gran afinidad por la biotina y forma un complejo donde se unen la peroxidasa biotinilada a la avidina dejando al menos un sitio de unión libre para la biotina del anticuerpo secundario. Al añadirlo a los portaobjetos, la avidina se une al secundario biotinilado y ancla la peroxidasa al lugar de expresión de la proteína. Para el revelado se usó como sustrato de la peroxidasa 1 ml de diaminobenzidina (DAB) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,6 % y 0,025 mg de níquel por cada 100 ml de PBS. La reacción se paró con PBS y se deshidrataron los portaobjetos en una serie creciente de etanoles hasta llevarlos al 100% etanol, desde donde se pasaron a xilol, para luego montarlos con Eukitt<sup>®</sup> (cubreobjetos) y dejarlos secar varios días en una estufa a 37°C.

Tras el procesamiento de las muestras, estas fueron conservadas en el laboratorio hasta el inicio del presente estudio, cuando se procedió al análisis microscópico de las muestras y posterior toma de fotografías de las secciones consideradas de interés, para realizar las fotografías se utilizó una cámara digital de alta resolución modelo LEICA® DC500.

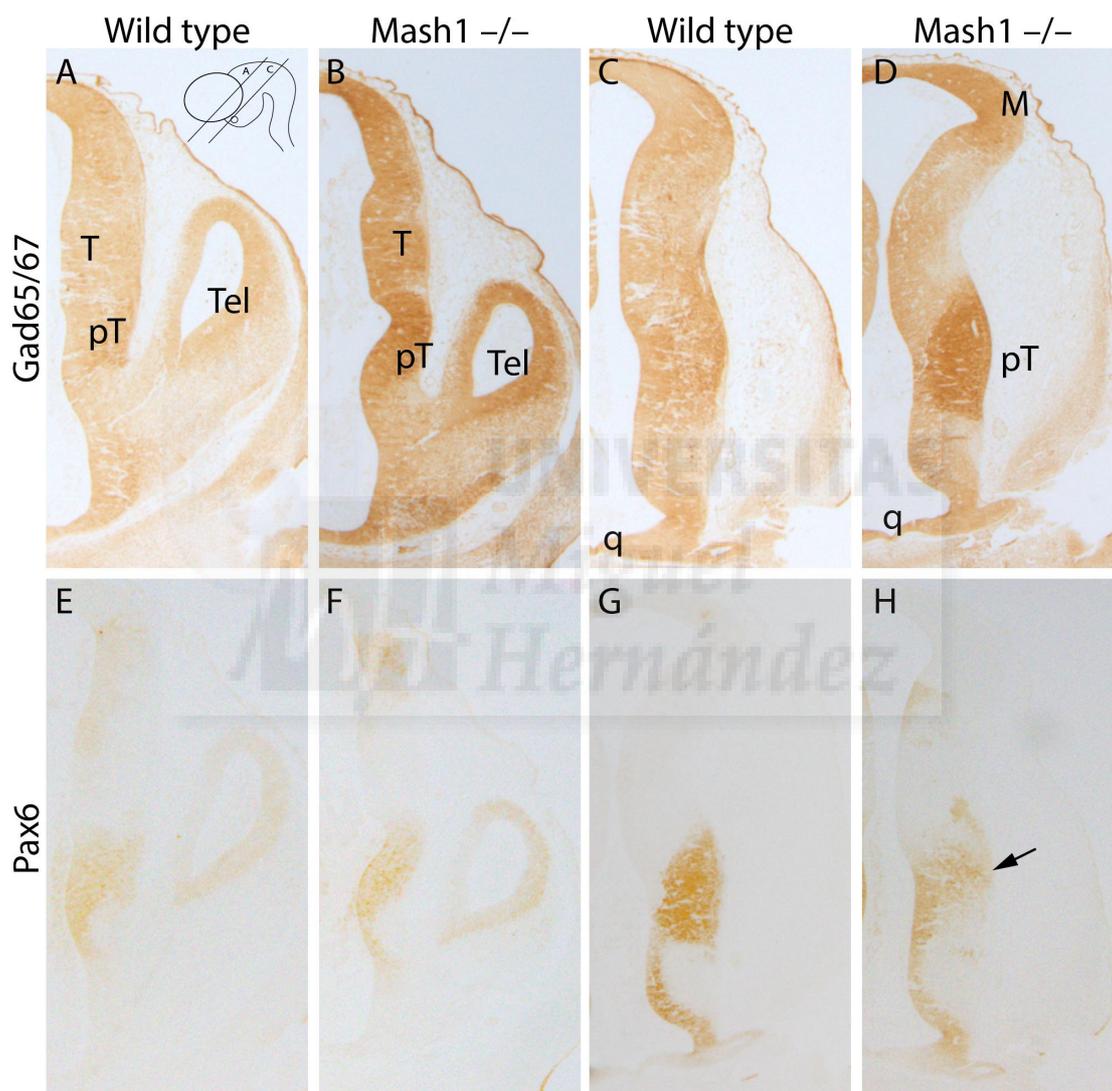
Posteriormente se llevó a cabo el tratamiento de fotos con el software de edición de imagen Adobe Photoshop Cs6 y se montaron las figuras con el programa de maquetación Adobe Illustrator Cs6. Al terminar se procedió a la descripción de las figuras y búsqueda de conclusiones.



## RESULTADOS

Se procedió a analizar embriones mutantes comparados con el wild type para comprobar las alteraciones provocadas por la falta del gen Mash1.

A continuación se va a proceder a describir las figuras obtenidas.

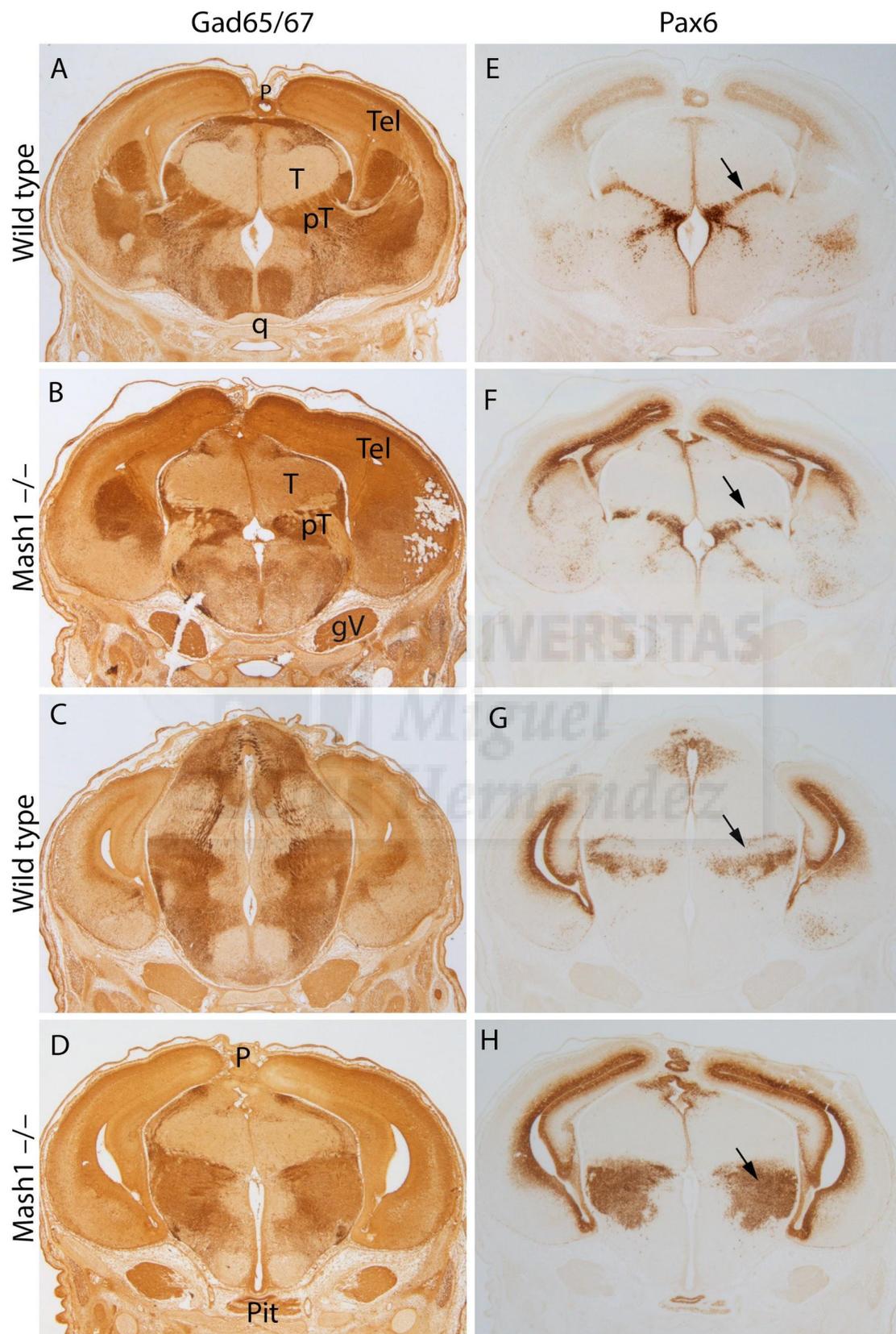


**Figura 1.** Cortes frontales del encéfalo de ratón Wild Type +/+ (A,C,E,G) y mutante Mash1 -/- (B,D,F,H) en estadio 12.5 procesados con diferentes técnicas inmunohistoquímicas: GAD 65/67 para las imágenes (A,B,C,D) y Pax6 para las imágenes (E,F,G,H). Abreviaturas: T, tálamo; pT, pretálamo; Tel, telencéfalo; M, mesencéfalo; q, quiasma óptico.

En este estadio temprano, tanto con el anticuerpo GAD 65/67 como con Pax6 no se observan diferencias significativas entre el mutante y el wild type, esto se debe a que en este estadio los neuroblastos diencefálicos se encuentran en su mayoría en la fase de proliferación, y al haber poca diferenciación hacia neuronas no se observan diferencias significativas. A pesar de ello, en la figura 2H (anticuerpo Pax6) se observa la presencia de una masa (flecha en figura 2H) que está ausente en el wild type y por tanto vemos cómo algunas células están empezando a diferenciarse y, por tanto, se empiezan a observar las primeras diferencias entre el wild type y el mutante.

Una vez analizado el estadio intermedio, pasamos a un estadio más avanzado en el periodo gestacional, exactamente en E15.5. Observamos de nuevo un corte frontal de embrión wild type frente al mutante.





**Figura 2.** Cortes frontales de encéfalo de ratón Wild Type +/+ (A,C,E,G) y

*mutante Mash1 -/- (B,D,F,H) en estadio 15.5 procesados con diferentes técnicas inmunohistoquímicas: GAD65/67 para las imágenes (A,B,C,D) y Pax6 para las imágenes (E,F,G,H). Abreviaturas: p, pineal; T, tálamo; pT, pretálamo; Tel, telencéfalo; Q, quiasma óptico; gV ganglio del trigémino (V par craneal); Pit, pituitaria.*

En el estadio 15.5 los neuroblastos ya se encuentran en la fase de diferenciación y se observan las diferencias entre el wild type y el mutante debido a la interrupción de la cascada de diferenciación. Primero comprobamos la distribución de neuronas GABAérgicas en este territorio. En el embrión wild type observamos como el tálamo se encuentra libre de neuronas GABAérgicas mientras que el pretálamo al igual que el epitálamo presentan una gran concentración de estas neuronas (Fig. 2A). En esta misma imagen se pueden detectar las fibras talamocorticales atravesando el pretálamo en dirección a la corteza telencefálica. En el embrión nulo para Mash1 vemos que la distribución de neuronas gabaérgicas en el pretálamo aparece parcheada con territorios negativos lo que nos muestra una clara alteración en la diferenciación (Fig. 2B). Hay que destacar también que las fibras talamocorticales muestran una trayectoria anómala, dato que no era esperado. Si comparamos los mismos niveles de sección estudiados con el marcador Pax6 observamos, en el wild type, un grupo de células positivas en la frontera entre el tálamo y el pretálamo (flecha de la figura 2E). En el embrión mutante para Mash1 podemos ver como esta banda aparece parcheada por zonas negativas, lo que indica que se esta región sufre problemas de desarrollo (flecha en Figura 2F). En regiones caudales, comparando el control con el mutante podemos comprobar cómo las neuronas GABAérgicas presentan una distribución anómala ocupando un mayor espacio en el mutante (comparar Fig. 2C con D). Esta distribución anómala coincide plenamente con el patrón de expresión de Pax6 que es plenamente coincidente con la región positiva para GABA (comparar la región indicada con una flecha en Fig. 2G con H).

## DISCUSIÓN

En los cortes de estadio 12,5 no se observan prácticamente diferencias entre el mutante y el Wild type. Esto se debe a que en ese estadio temprano los neuroblastos aún se encuentran únicamente en la fase de proliferación; en cambio en el estadio 15,5 los neuroblastos ya se encuentran en la fase de diferenciación y debido a esto se observan diferencias significativas entre el mutante y el wild type.

Atendiendo a la distribución de las neuronas GABAérgicas en el mutante, podemos confirmar que efectivamente, la ausencia del gen Mash1 se traduce en una diferenciación errónea de los neuroblastos y por tanto, un menor número de neuronas GABA. El gen Mash1 no es el único gen que codifica las neuronas GABA, por eso, se observa que en el caso de su mutación hay un menor número de neuronas GABA y no una ausencia completa.

Puesto que los anticuerpos Pax6 y GAD 65/67 expresan las neuronas GABA, se ha podido demostrar que al encontrarse el gen Mash 1 ausente la expresión de los mismos se ve severamente afectada (la cascada de señalización se ve interrumpida), con las consiguientes consecuencias que esto supondrá en el posterior desarrollo del embrión.

## CONCLUSIONES

Según nuestra hipótesis, la expresión del factor Mash1 es vital para la correcta especificación de las neuronas pretalámicas. Partiendo de esta relación causa efecto, si se elimina la expresión del factor Mash1, el mecanismo de especificación de las neuronas talámicas y pretalámicas quedará dañado y afectará al desarrollo de las neuronas GABAérgicas del diencefalo. Observamos que efectivamente esto es así y, por tanto, demostramos que nuestra hipótesis de partida es cierta.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Nieuwenhuys, Voogd, van Huijzen. El sistema nervioso central humano. 4ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2009.
2. Werner Kahle. Sistema nervioso y órganos de los sentidos. 7ª ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2003.
3. Álvarez-Bolado G. Mecanismos de la formación de regiones en el cerebro anterior. Rev Neurol. 2002; 34 (5): 490-5.
4. Müller P, Rogers KW, Yu SR, Brand M and Schier AF. Morphogen transport. Development. 2013;140(8):1621-38.
5. Torii Ma, Matsuzaki F, Osumi N, Nakamura S, Casarosa s, Guillemot F et al. Transcription factors Mash1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. Development. 1999; 123 (3): 443-5.
6. Watson C, Paxinos G, Puelles L. The mouse nervous system. 1ª ed. Amsterdam: Elsevier; 2012.
7. Gradwohl G, Fode C, Guillemot F. Restricted Expression of a Novel Murine atonal-Related bHLH Protein in Undifferentiated Neural Precursors. Dev Biol. 1996; 180(1): 227-41.