

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO FIN DE MÁSTER EN TERAPIA OCUPACIONAL
EN NEUROLOGÍA



Papel de la señalización de Sonic Hedgehog vía Gli2 en la especificación del hipotálamo

AUTOR: Martínez Muñoz, Beatriz

Nº de expediente 69

TUTOR: De Puelles Martínez de la Torre, Eduardo

Departamento de Histología y Anatomía

Curso académico: 2016-2017

Convocatoria de junio

Índice de contenidos

| | |
|----------------------------------|----|
| 1. Resumen y palabras clave..... | 1 |
| 2. Abstract and key words | 2 |
| 3. Introducción | 3 |
| 4. Hipótesis de trabajo | 7 |
| 5. Objetivo..... | 8 |
| 6. Material y métodos | 9 |
| 7. Resultados | 14 |
| 8. Discusión | 19 |
| 9. Conclusiones | 22 |
| 10. Bibliografía | 23 |

1. Resumen y palabras clave

Resumen

Introducción. La expresión del gen Sonic Hedgehog (Shh) es fundamental para el desarrollo de la placa del suelo y la placa basal del tubo neural durante el desarrollo embrionario. Cualquier alteración en la cadena señalizadora de Shh puede tener como consecuencia que no se especifiquen estructuras ventrales en el sistema nervioso central. **Hipótesis.** La señalización de Sonic Hedgehog mediada por Gli2 es necesaria para el correcto desarrollo del hipotálamo. **Objetivos.** Analizar el desarrollo embrionario del hipotálamo en un ratón nulo para el gen Gli2. **Material y métodos.** El presente estudio se ha llevado a cabo con material procedente de ratones Wild Type (silvestres) y ratones mutantes Gli2 mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas. **Resultados.** En primer lugar identificamos el territorio hipotalámico, su área mamilar y tuberal así como la eminencia ganglionar medial en la vesícula telencefálica; posteriormente analizamos estadios tempranos del ratón nulo destacando la falta de desarrollo del hipotálamo y la hipófisis y una alteración morfológica de la estructura pretalámica y finalmente, en estadios tardíos destacamos de nuevo la falta de formación del hipotálamo y evidenciamos un aumento de tamaño de los ventrículos laterales mostrando una clara hidrocefalia. **Discusión.** De entre los factores de transcripción de la familia Gli, se destaca la importancia de Gli2 para la señalización del gen Shh en la región hipotalámica. La falta de función de este gen provoca la desaparición de todo el territorio hipotalámico. **Conclusión.** Gli2 como factor determinante en la señalización de Sonic Hedgehog para el desarrollo de la estructura hipotalámica, hipofisaria y en el desarrollo de la eminencia ganglionar medial.

Palabras clave: Gli2, Sonic Hedgehog, hipotálamo, holoprosencefalia.

2. Abstract and key words

Abstract

Introduction. Expression of the Sonic Hedgehog (Shh) gene is critical for the development of the soil plaque and the basal plate of the neural tube during the embryonic development. Any alteration in the chain of Shh may result in the absence of ventricular structures in the central nervous system. **Hypothesis.** The Gli2-mediated Sonic Hedgehog signaling is necessary for proper development of the hypothalamus. **Goals.** Analyzing the embryonic development of the hypothalamus in a null mouse for the Gli2 gene. **Material and methods.** The present study has been carried out with material from wild type mice and Gli2 mutant mice using histological and immunohistochemical techniques. **Results.** *Figure 1* shows the hypothalamic territory and its mammillary and tuberal area as well as the medial ganglion eminence in the telencephalic vesicle; In *Figure 2* we highlight the lack of development of the hypothalamus and pituitary gland, as well as a morphological alteration of the pretalamic structure and finally, in *Figure 3* we highlight again the lack of formation of the hypothalamus and we evidence an enlargement of the lateral ventricles showing a clear hydrocephalus. **Discussion.** Among the transcription factors of the Gli family, the importance of Gli2 for Shh gene signaling in the hypothalamic region is highlighted. The lack of the function of this gene causes the disappearance of the entire hypothalamus territory. **Conclusion.** Gli2 as a determinant factor in the signaling of Sonic Hedgehog for the development of the hypothalamic and pituitary structure and in the development of the medial ganglion eminence

Key words: Gli2, Sonic Hedgehog, hypothalamus, holoprosencephaly

3. Introducción

El sistema nervioso central de los seres humanos y de otros vertebrados deriva de la placa neural, una zona engrosada y alargada que surge de la capa más externa del embrión, el ectodermo. Los laterales de la placa neural se van elevando formando los pliegues neurales, mientras que su línea media se hunde para formar el canal neural. Posteriormente, el canal neural se profundiza y los pliegues neurales acaban encontrándose en el plano dorsal fusionándose finalmente para formar el tubo neural¹

La regionalización del tubo neural es un proceso mediante el cual las células madre neurales o neuroblastos dan lugar a diferentes tipos de neuronas dependiendo de su posición dentro del tubo neural. Mediante este proceso el tubo neural queda dividido en regiones que se corresponden con las estructuras que darán lugar al cerebro adulto¹

En una visión longitudinal, el tubo neural queda dividido en placa de suelo, placa del techo, placa basal y placa alar. El mesodermo axial emite señales ventralizantes verticales que actúan intensamente, por proximidad, sobre la parte más ventral del tubo neural, determinando la especificación de un territorio impar medio, la placa del suelo, y territorios adyacentes a derecha e izquierda que formarán la placa basal. Por otro lado, el epitelio que cubre la parte dorsal del tubo neural es una fuente de señales dorsalizantes que genera una banda única y media dorsal, la placa del techo, y dos regiones dorso-laterales adyacentes más amplias, la placa alar²

Para todo ello, entran en juego procesos que informarán a los neuroblastos de la placa neural, acerca de su posición medio - lateral y antero – posterior. Una serie de moléculas dirigen estos procesos histogénéticos (transmiten información posicional). Dichas células reciben información externa en forma de factores solubles (también conocidos como *morfógenos*³), generalmente proteínas distribuidas a lo largo de dos ejes, antero - posterior y dorso - lateral.

Estos grupos de células reciben el nombre de *organizadores* secundarios que contribuyen a añadir mayor ‘detalle’ a la regionalización de una cierta zona del neuroepitelio.

Por otro lado, la placa del suelo y la placa basal sólo se forman si ocurre correctamente la inducción vertical ejercida por el mesodermo axial, acción desempeñada por el gen Sonic Hedgehog (Shh), que es expresado tanto en el mesodermo axial como en la placa del suelo, o incluso en la placa basal que actúa induciendo la placa del suelo a gran concentración y la placa basal a menor concentración⁴

Posterior a la regionalización, entran en juego estructuras del mesodermo subyacente a la placa neural: la notocorda y el proceso cefálico. Ambas segregan la proteína llamada Sonic Hedgehog anteriormente citada. Dicha proteína actúa sobre una región central longitudinal de la placa, llevando la información a las correspondientes células que darán lugar a regiones ventrales (las células quedarán especificadas como ventrales). Shh marcará por lo tanto el eje de coordenadas anteroposterior en la placa neural⁴

La secreción de Shh es el primer eslabón de una “cadena señalizadora”. Este proceso de comunicación entre células implica varios pasos cuidadosamente regulados y culmina cuando el mensaje comunicado es traducido por la célula receptora a expresión específica de factores de la transcripción. Para reconocer a Shh y escuchar su mensaje son necesarias dos proteínas de membrana llamadas *patched* y *smoothed*. Estas a su vez activan los factores de la transcripción de la familia Gli (Gli1, 2 y 3), que finalmente entran en el núcleo celular y activan la expresión de otros factores de la transcripción como los de la familia Nkx (Nkx2.1, 2.2 y 6.1) entre otros⁵

Las alteraciones en la cadena señalizadora de Shh pueden tener como consecuencia que no se especifiquen esas estructuras ventrales. En animales de experimentación dañando quirúrgicamente la placa precordial (estructura mesodérmica que segrega Shh) o alterando genéticamente cualquiera de los eslabones de dicha cascada de señalización se pueden reproducir diferentes malformaciones⁴

La proteína de secreción SHH está implicada directamente en el patrón de inducción ventral del prosencéfalo e induce la expresión de varios genes de desarrollo (*Shh* y *Nkx-2.2*) en la región hipotalámica.

En relación con el hipotálamo, éste es una estructura perteneciente al prosencéfalo secundario, que se extiende desde el quiasma óptico hasta el límite caudal de los tubérculos mamilares. Se encuentra por debajo del tálamo y forma el suelo y la parte inferior de las paredes laterales del tercer ventrículo⁶

Es una estructura neural, formada en su parte medial por los siguientes núcleos: núcleo preóptico, núcleo anterior, parte del núcleo supraquiasmático, núcleo paraventricular, dorsomedial, ventromedial, infundibular y posterior y en su zona lateral, los siguientes núcleos: núcleo preóptico, parte del núcleo supraquiasmático, supraóptico, lateral, tuberomamilar y tuberales laterales¹

Entre las funciones más importantes de dicha estructura destaca la activación del sistema nervioso simpático, mantenimiento de la temperatura corporal, control de la osmolaridad, las funciones reproductoras, la ingesta de alimentos, interacción con el sistema límbico teniendo un papel importante en el comportamiento y las emociones e influencia sobre el centro del control cardiovascular en el bulbo raquídeo. Además actúa como enlace entre el sistema nervioso central y el sistema endocrino; por medio del sistema hipotálamo – hipofisario, el hipotálamo produce hormonas que serán liberadas en la neurohipófisis, donde se acumulan para ser liberadas al torrente sanguíneo o estimularán células endocrinas hipofisarias⁶

Holoprosencefalia (HPE) y ciclopía

Como se ha mencionado recientemente, la secreción de Sonic Hedgehog está implicada directamente en el patrón de inducción ventral del prosencéfalo e induce varios genes de desarrollo. Mutaciones en el gen SHH, una inhibición en el procesado de su proteína o alteraciones en su distribución pueden provocar holoprosencefalia (alteración por la cual el

prosencefalo secundario no queda dividido en dos hemisferios⁶) de distinto grado y en casos extremos pueden estar acompañados incluso de ciclopía entre otras características⁷.

La HPE puede ir acompañada de diferentes anomalías craneofaciales en aproximadamente el 80% de los casos. Se piensa que la proteína SHH suprime la expresión de *Pax6* en la región central del embrión dividiendo el campo de expresión de *Pax6* en dos, por lo tanto su ausencia impediría esta división dejando un único ojo central^{7, 8, 9}

Implicaciones en Terapia ocupacional

Teniendo en cuenta las funciones vitales que desarrolla el hipotálamo y su importancia en el desarrollo del tubo neural en estadios tempranos, se hace evidente la necesidad de investigar y conocer los mecanismos a través de los cuáles se pueden producir malformaciones tales como la holoprosencefalia, la ciclopía o la hidrocefalia entre otras.

En el caso concreto de la holoprosencefalia más leve, en la que se producen alteraciones neuronales, los usuarios con dicha patología podrían ser susceptibles de intervenciones especializadas e individualizadas para el tratamiento de los síntomas.

Teniendo en cuenta este tipo de patologías y sus manifestaciones, podremos elaborar y establecer intervenciones apropiadas a las características particulares de cada persona desde el ámbito de la Terapia ocupacional.

4. Hipótesis de trabajo

La señalización de Sonic Hedgehog mediada por Gli2 es necesaria para el correcto desarrollo del hipotálamo.



5. Objetivos

Analizar el desarrollo embrionario del hipotálamo en un ratón nulo para el gen Gli2.



6. Material y métodos

El presente estudio se ha llevado a cabo durante el periodo de tiempo comprendido entre el 22 de diciembre de 2016 y el 30 de marzo de 2017 entre los laboratorios 102 y 138 del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández.

Los embriones mutantes Gli2 fueron obtenidos cruzando ratones heterocigotos Gli2 +/- mantenidos en un fondo C57BL. El alelo mutante (Gli2ZFD) se generó como se describió previamente (Mo et al., 1997). Los exones 3 y 5 fueron eliminados, dando lugar a una proteína truncada incapaz de cumplir su función biológica de unión a ADN.

Para el genotipado de esta línea de ratones mutantes se han realizado dos PCR independientes, utilizando el siguiente conjunto de *primers* (Mo et al., 1997):

Para el alelo Gli2 “wild type” (300pb):

Gli2-S: 5'AAACAAAGCTCCTGTACACG 3'

Gli2-AS: 5' CACCCCAAAGCATGTGTTTT 3'

Para el alelo Gli2 ZFD (600pb):

Gli2-S: 5'AAACAAAGCTCCTGTACACG 3'

Neo-pA: 5'ATGCCTGCTCTTTACTGAAG 3'

Los embriones mutantes R26R – tdTomato, fueron obtenidos del Laboratorio Jackson (cepa 007905).

Los ratones transgénicos Nkx2.1Cre (o BAC-Nkx2.1-Cre, cepa 008661) expresan Cre bajo el control de las regiones promotoras y potenciadoras de Nkx2.1.

Para el alelo Nkx 2.1cre/+ “wild type” (324pb)

oIMR7338: CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT

oIMR7339: GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC

Para el alelo Tomatoflox/+ (~410 pb):

14324: CGGTTATTCAACTTGCACCA

17400: CTCTGGTGGCTGCCTAAAAC

Los embriones $tdNkx2.1cre/+$ y $tdTomatoflox/+$; fueron obtenidos cruzando ratones macho homocigóticos ($Nkx2.1cre/+$) con hembras homocigóticas ($tdTomatoflox/flox$).

Origen de las muestras

Los animales fueron obtenidos del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche, en concreto del animalario de la Unidad de Sant Joan de dicho servicio. Este animalario sigue el control ISO 9001/2008 y mantiene una excelente calidad en sus instalaciones y mantenimiento de las líneas animales. La manipulación de los ratones fue llevada a cabo por personal acreditado para ello.

El estudio se ha efectuado siguiendo estrictamente la normativa que rige la experimentación con animales y el uso de organismos modificados genéticamente (Real Decreto 53/2013, Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea). Esta experimentación recibió el visto bueno del Órgano evaluador de proyectos de la Universidad Miguel Hernández de Elche y la aprobación de la Generalitat Valenciana.

Criterios de selección

Como único criterio de selección de los embriones se ha tenido en cuenta ser de la línea genética correspondiente ($Gli2^{-/-}$ en los mutantes y Wild Type o silvestre en los controles) y estar en el estadio de desarrollo embrionario necesario (15.5 y 18.5).

Procesado de muestras

Con el objetivo de obtener las muestras se utilizaron dos hembras preñadas para el estadio E15.5 (15 días después del coito, detectado por la presencia del tapón vaginal) y una

hembra para el estadio E18.5 (18 días después del coito) a las que se sacrificó por dislocación cervical por personal autorizado. A continuación se procedió a aislar los embriones del útero con la ayuda de una lupa estereoscópica (modelo LEICA® EZ4D). Seguidamente fueron limpiados en 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 en PBS (se realizaron 2 cambios de 40 minutos) y a continuación fueron deshidratadas progresivamente en etanol 25%, 50%, 70% y 100% (1 cambio de 40 minutos en cada alcohol excepto en el de 100% que se realizaron 2) y almacenados hasta su posterior selección y uso. Sólo el 25% de todos los embriones extraídos de una madre mutante son *En1 cre/+*; *Shh flox/flox* y para seleccionarlos se usa una técnica de genotipado conocida como PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Una vez seleccionados los embriones y con el fin de estudiar en profundidad los distintos patrones de distribución de las proteínas de interés, se usó la técnica de inclusión en parafina. Los embriones fueron inmersos en butanol (2 cambios de 30 minutos) para retirar toda traza de etanol (no miscible con la parafina). A continuación, las muestras fueron incubadas en parafina líquida a 60°C, donde se realizaron entre 4 y 5 cambios de 30 minutos 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 el embrión y se dejó solidificar la parafina a temperatura ambiente. Una vez sólida la parafina se extrajo el bloque del molde y se procedió a su sección, realizándose los cortes con un microtomo (Microm HM 335 E®). El grosor de cada sección se fijó en 7µm. Los cortes fueron montados en portaobjetos en 3 (embrión E10.5) y 4 (embrión E12.5) series paralelas con la ayuda de un baño de agua templada.

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 distintas técnicas de inmunohistoquímica para comenzar el estudio de las muestras.

Técnica de Inmunohistoquímica

Se usó esta técnica con el fin de detectar la expresión de las proteínas objeto de interés, ya que es capaz de reconocer una gran variedad de antígenos presentes en las células. Se basa en aplicar un anticuerpo primario al tejido que reconozca la proteína a estudio, para después añadir un anticuerpo secundario conjugado con biotina que reconozca el anticuerpo primario, amplificando así la señal y posibilitando el revelado posterior.

En este caso la proteína a estudiar fue únicamente la Gli2, ya que las inmunohistoquímicas para el resto de proteínas que interesaban (α Islet1, α Nkx2.1, α Pax6 y α RFP) habían sido obtenidas con anterioridad en muestras de embriones procesados meses antes en el laboratorio (asegurando que cumplían con los criterios de inclusión determinados).

Para iniciar la técnica, los cortes de parafina fueron introducidos 40 minutos en el horno a 95°C y posteriormente inmersos 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 una técnica de re-exposición de los epítomos. La técnica consiste en la aplicación de calor por hervido en un tampón de citrato sódico a 0,01M en agua. El hervido se llevó a cabo en un microondas a 750 vatios de potencia en 4 tiempos. En la Tabla 1 se detallan todos los anticuerpos utilizados en el presente estudio, la concentración a la que se usaron, si necesitaron hervido o no y qué anticuerpo secundario se usó.

Después del tratamiento, los cortes fueron lavados en PBS con Tritón (PBST) al 0,1% para eliminar los restos de citrato sódico. A continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena del tejido con H₂O₂ durante 30 minutos a temperatura ambiente en un copling protegido de la luz. Tras lavar de nuevo con PBST se procedió a bloquear las uniones inespecíficas del

anticuerpo primario con lisina al 10% en PBST. El anticuerpo primario se incubó a la concentración indicada en suero fetal 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 a 1:200 de concentración en PBST durante una hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados en PBST se añadió el complejo ABC (Avidin Biotin Complex) de Vector Laboratories® a la concentración de 1:500 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 (posterior a 3 lavados con PBST y 3 con PBS 1%) se usó como sustrato de la peroxidasa 1 ml de diaminobenzidina (DAB) con H₂O₂ al 0,6% y 0,025 mg de níquel por cada 100 ml de PBS. El níquel provoca que el precipitado aparezca de color negro en vez del marrón habitual de la DAB. La reacción se paró con PBS y se deshidrataron los portaobjetos en una serie creciente de etanoles hasta llevarlos a 100% etanol, desde donde se pasaron a xilol, para luego montarlos con Eukitt® (cubreobjetos) y dejarlos secar varios días en una estufa a 37°C

Para visualizar las muestras se utilizó el microscopio estereoscópico modelo LEICA(R) MZ 16FA (motorizado) a 60 y 26 aumentos (para las muestras E10.5 y E12.5 respectivamente) y para realizar las fotografías se utilizó una cámara digital de alta resolución modelo LEICA(R) DFC550. 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.

6. Resultados

Los resultados del presente estudio de investigación se han obtenido mediante la observación con el microscopio electrónico de las muestras obtenidas tanto del ratón silvestre como del mutante comparando sus diferencias. Los resultados se han establecido comparando la región hipotalámica en ambos ratones.

Figura 1.

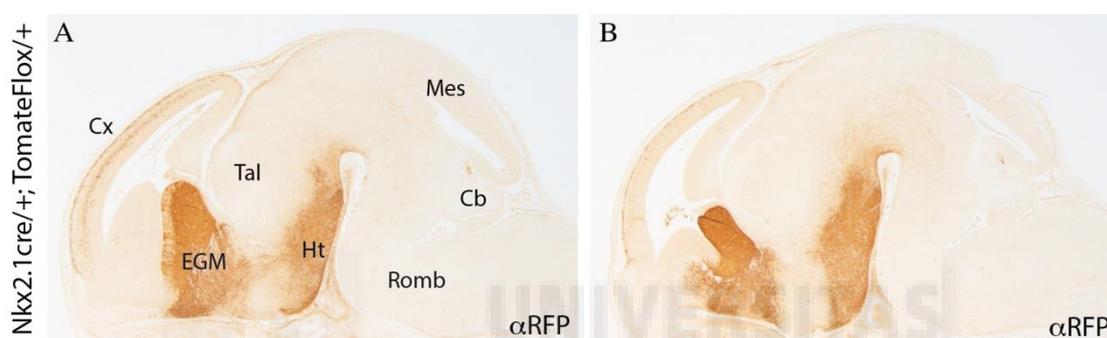


Figura 1. Corte sagital de tubo neural de ratón *Nkx 2.1 cre/+* (A) y *TomateFlox/+* (B) en estadio 15,5 procesados con técnica inmunohistoquímica para α RFP.

Abreviaturas: Cx: corteza; EGM: eminencia ganglionar medial; Tal: tálamo; Ht: hipotálamo; Romb: rombencéfalo; Cb: cerebelo; Mes: mesencéfalo.

Antes de comenzar el estudio del ratón mutante para *Gli2* realizamos una histoquímica para la proteína roja fluorescente (RFP) en un ratón modelo donde el territorio positivo para *Nkx2.1* presenta dicha proteína. Este marcaje nos permitirá delimitar y reconocer la región hipotalámica que estudiaremos más adelante.

En la **Figura 1**, presentamos dos imágenes que corresponden a un ratón *Nkx 2.1cre/+*; *TomateFlox/+* (A y B). Se trata de cortes parasagitales a una cabeza embrionaria de E15.5. En ellos podemos observar cómo se distribuye la proteína RFP en el territorio hipotalámico, cubriendo tanto el área mamilar como el área tuberal.

Así mismo también podemos observar cómo aparece marcada en su totalidad la eminencia ganglionar medial en la vesícula telencefálica. Esta estructura dará lugar al globo

pálido y a las interneuronas corticales. De hecho ya se pueden observar dichas neuronas migradas tangencialmente en el Cortex. Una vez realizado este estudio procedimos a analizar los embriones mutantes para Gli2.



Figura 2.

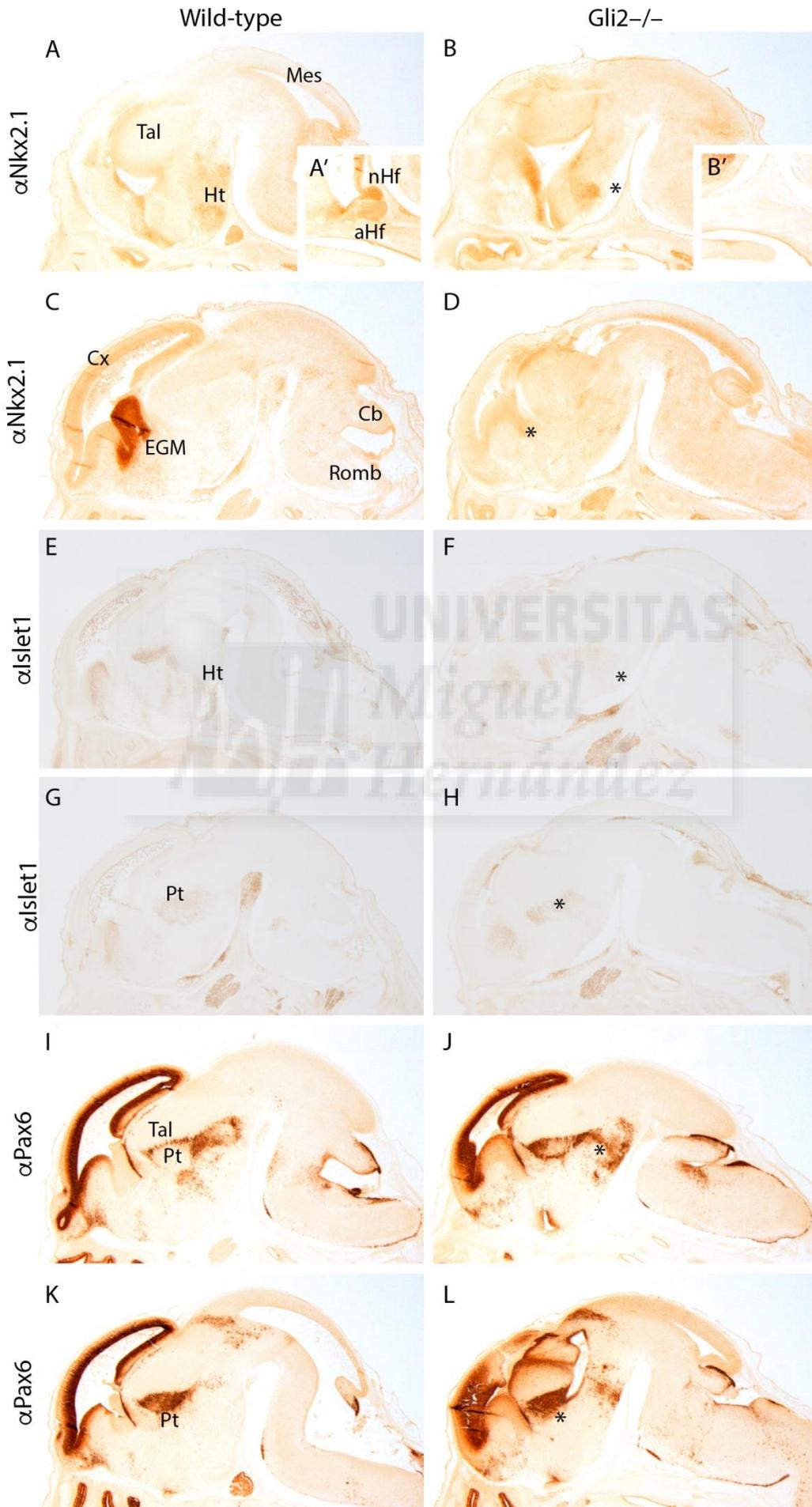


Figura 2. Cortes sagitales de tubo neural de embrión Wild Type (A, C, E, G, I, K) y *Gli2*^{-/-} (B, D, F, H, J, L) en estadio 15,5 procesados con diferentes técnicas inmunohistoquímicas: *αNkx 2.1*, para las imágenes A, B, C y D; *islet 1* para las imágenes E, F, G y H y *αPax6* para las imágenes I, J, K y L.

En la imagen A' se observa el desarrollo de la hipófisis y de sus dos principales estructuras: adenohipófisis y neurohipófisis, en contraposición a la falta de desarrollo de dicha formación en la imagen B'.

Abreviaturas: Cx: corteza; EGM: eminencia ganglionar medial; nHF: neurohipófisis; aHF: adenohipófisis; Ht: hipotálamo; Pt: pretálamo; Tl: tálamo

En la **Figura 2**, presentamos dos series de imágenes, una de ellas de ratón Wild Type (empezando en A) y de ratón mutante *Gli2* (empezando en B). En ellas se puede mostrar la falta de desarrollo de la estructura hipotalámica en el ratón *Gli2*^{-/-} así como la ausencia de la estructura hipofisaria con sus dos formaciones principales: adenohipófisis y neurohipófisis (A' y B'). Comparando la distribución de la proteína *Nkx2.1* en embriones wild type (A y C) y mutantes (B y D) podemos observar que el territorio hipotalámico se encuentra totalmente ausente en el mutante (Asterisco en B) mientras que en el silvestre observamos diversas poblaciones hipotalámicas marcadas. Es llamativo que no solo el territorio hipotalámico se encuentra afectado si no que la eminencia ganglionar medial también.

Comparando C y D, podemos observar como el marcaje de *Nkx2.1* en este territorio se encuentra desaparecido lo que nos hace sospechar su malformación en este ratón mutante. Los insertos A' y B' sirven para mostrar la ausencia completa de hipófisis que muestran estos ratones. No es posible distinguir ningún remanente no solo de la neurohipófisis si no de la adenohipófisis. Con la distribución de la proteína *Islet1* (comparar E y G con F y H) observamos de nuevo la dramática pérdida de territorio hipotalámico (asterisco en F). Este marcador nos permitió también observar una alteración en el territorio pretalámico (asterisco en H) y a su vez detectar que la especificación de la eminencia ganglionar lateral, al contrario que

la medial, no se encuentra afectada ya que se observa un mismo patrón de distribución de la proteína en las dos muestras.

Por último, la distribución de la proteína Pax6 (comparar I y K con J y L) nos permitió confirmar la alteración pretalámica (asterisco en J y L) que probablemente se deba a la ausencia del territorio hipotalámico. Por último pudimos confirmar que el territorio cortical no se encuentra afectado por esta mutación.

Figura 3.

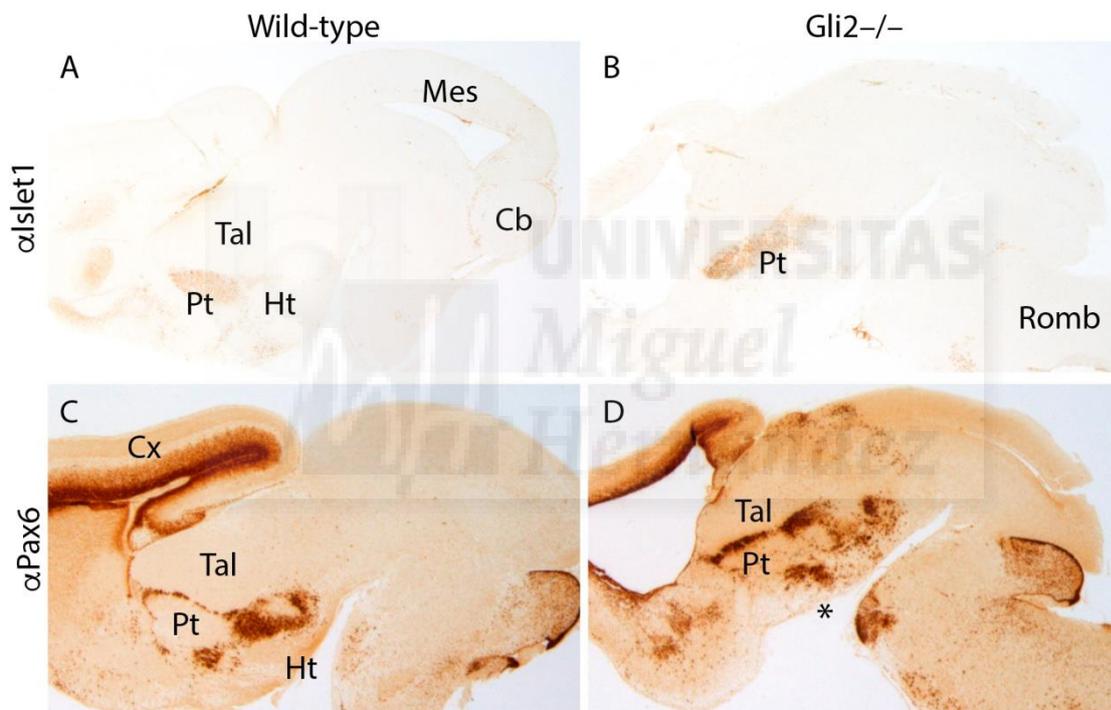


Figura 3. Corte sagital del tubo neural de ratón Wild Type (A y C) y *Gli2*^{-/-} (B y D) en estadio 18.5 procesados con técnicas inmunohistoquímicas diferentes: *aislet1* para las imágenes A y B y *α Pax6* para las imágenes C y D.

Abreviaturas: Mes: mesencéfalo; Tal: tálamo; Pt: pretálamo; Ht: hipotálamo; Cb: cerebelo.

Por último, procedimos a analizar embriones de estadios E18.5 (último día embrionario antes del nacimiento). En la **Figura 3**, exponemos las imágenes A y C, Wild type,

y las imágenes B y D del cerebro mutante *Gli2*^{-/-}. La distribución de la proteína *Islet1* nos muestra, en el embrión silvestre el dominio pretalámico y poblaciones hipotalámicas positivas (Fig. 3A). En el embrión mutante observamos una ausencia completa de las poblaciones hipotalámicas y un desplazamiento anómalo de las neuronas positivas del pretálamo (Fig. 3B).

El estudio de la presencia de la proteína *Pax6* en el embrión wild type nos enseña el límite entre tálamo y pretálamo así como poblaciones hipotalámicas (Fig. 3C). En el embrión mutante comprobamos el desplazamiento del territorio pretalámico, ya que el límite con el tálamo aparece inclinado con respecto al eje rostro – caudal.

La región hipotalámica se observa claramente afectada con una ausencia completa del tejido neural correspondiente (Fig. 3D). Es destacable, que en este estadio se observa como los ventrículos laterales están dilatados mostrando una clara hidrocefalia. Esta patología está normalmente asociada a la holoprosencefalia.



7. Discusión

El gen Sonic Hedgehog es el responsable principal de la inducción ventral del prosencéfalo. Dicha proteína, como primer eslabón en la cadena señalizadora, necesita de factores de transcripción para su reconocimiento tales como Patched y Smoothened. Estas proteínas a su vez, activan los factores de transcripción Gli1, Gli2 y Gli3 que finalmente entrarán en el núcleo de la célula para llevar a cabo el proceso de regionalización.

De entre los factores de transcripción de la familia Gli, por medio del presente estudio, se ha podido establecer la importancia de la proteína Gli2 como factor determinante en la señalización del gen Sonic Hedgehog en la región hipotalámica.

Como se puede observar por medio de los resultados obtenidos en las figuras 1, 2 y 3, sin la señalización del gen Shh, no se desarrolla la región hipotalámica en su totalidad.

El objeto de estudio de la presente investigación, como se ha mencionado anteriormente, es la región hipotalámica. Sin embargo, a través de las figuras obtenidas en los resultados, podemos destacar estructuras encefálicas en las que también se ve modificada su morfología.

Un ejemplo de ello es la falta de desarrollo de la estructura hipofisaria junto con sus dos formaciones principales: neurohipófisis y adenohipófisis (*Figura 2A y 2B*) y la alteración de desarrollo de la eminencia ganglionar medial (*Figura 3C*).

También cabe destacar la estructura pretálica ya que aparece orientada de diferente forma en el ratón silvestre y el ratón mutante (como se puede observar en la *Figura 2G y 2H*), esto podría deberse a la desaparición de la estructura sobre la que se debería sustentar, el hipotálamo.

Por otro lado, cabe mencionar que la holoprosencefalia puede cursar, en el 80% de los casos, con manifestaciones clínicas tales como hidrocefalia entre otras. Por medio de los

resultados obtenidos en el presente estudio de investigación, en la *Figura 3B* y *3D*, podemos destacar la dilatación e los ventrículos laterales mostrando una clara hidrocefalia en el ratón mutante Gli2 -/-.

Para finalizar, como planteamiento para futuras investigaciones y como continuación al presente estudio, sería interesante conocer las causas por las cuales no se ha formado la región hipotalámica (*Figura 3B* y *3D*); una de las causas puede ser debido a la muerte de las células que deberían haberse especializado, o por que dichas células se hayan especializado en otro tejido alternativo.



8. Conclusiones

1. Gli2 como factor determinante en la señalización de Sonic Hedgehog en la región del hipotálamo
2. Gli2 como factor determinante en el desarrollo y formación de la hipófisis y ambas estructuras que la conforman: neurohipófisis y adenohipófisis.
3. Gli2 como factor determinante en el desarrollo de la eminencia ganglionar medial.



9. Bibliografía

1. Nieuwenhuys R. Sistema Nervioso Central I. Madrid: Editorial Médica Panamericana: 2009.
2. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Zonas longitudinales (subdivisión dorsoventral). En: Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Neuroanatomía. Madrid: Editorial Médica Panamericana;2008. p.79-83.
3. Álvarez-Bolado G. Mecanismos de la formación de regiones en el cerebro anterior. Rev Neurol. 2002; 34 (5): 490-5.
4. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Morfogénesis temprana del SNC: Inducción neural y neurulación. Cresta neural. Vesiculación y segmentación. Incurvación del eje neural. En: Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre. Neuroanatomía. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. p.43-52.
5. Hammerschmidt M, Brook A, McMahon AP. The world according to hedgehog. Trends Genet. 1997; 13: 14-21.
6. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Hipotálamo basal y alar. En: Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre. Neuroanatomía. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. p.185-192.

7. Solomon B, Gropman A, Muenke. Holoprosencephaly Overview. NCBI Bookshelf; a service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. 2013.

8. Xavier GM, Seppala M, Barrel, Birjandi AA, Gegheagan F, Cobourne MT. Hedgehog receptor function during craniofacial development. *Developmental Biology*. 2016; 415 (2): 198 – 215.

9. Petryk A, Graf D, Marcucio R. Holoprosencephaly: signaling interactions between the brain and the face, the environment and the genes, and the phenotypic variability in animal models and humans. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*. 2015; 4(1): 17 – 32.

