



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

LA CEPA TRANSGÉNICA POU4F1 TAU LACZ PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL GANGLIO DEL TRIGÉMINO

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2017

Autor: Tania Minguillón Martínez

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Eduardo De Puelles Martínez de la Torre y Verónica Company Devesa

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Desarrollo y estructura del sistema trigeminal.	4
Papel del gen Pou4f1 en la especificación del ganglio del trigémino.	9
Justificación del interés clínico del trabajo.	10
OBJETIVO.....	13
HIPÓTESIS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Origen de las muestras.	15
Procesado de muestras.	16
Marcadores empleados en el estudio.	21
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIÓN.....	33
BIBLIOGRAFÍA	34

RESUMEN

Introducción: el nervio trigémino o quinto par craneal es el nervio sensitivo más importante de la cabeza y el cuello. El ganglio del trigémino se localiza en la cavidad trigeminal y de él salen las tres grandes ramas del nervio; la rama oftálmica (V1), la rama maxilar (V2) y la rama mandibular (V3).

El Brn3a es un factor de transcripción altamente expresado en el desarrollo sensorial del Sistema Nervioso Periférico. Los estudios han demostrado que este factor es necesario para: la supervivencia del ratón, el correcto crecimiento sensorial del axón y la supervivencia de las neuronas del ganglio trigémino y de los ganglios de la raíz dorsal, entre otras funciones.

La futura aplicación clínica de este trabajo es ampliar el conocimiento sobre el ganglio del trigémino, para poder ayudar a esclarecer etiologías de enfermedades que todavía no están claras como la neuralgia del trigémino.

Objetivo del trabajo: estudiar en un ratón heterocigoto (+/-) la formación del ganglio del trigémino durante el desarrollo embrionario, comparando la distribución de la enzima β -galactosidasa (LacZ) con otros marcadores conocidos.

Materiales y métodos: se ha realizado un estudio observacional descriptivo, basado en el análisis neuropatológico del ganglio trigémino y sus proyecciones, en seis muestras de encéfalo del embrión del ratón mutante Pou4f1 Tau-LacZ en tres estadios embrionarios diferentes (E12.5, E14.5 y E16.5). Las muestras se compararon con marcadores de la β -Galactosidasa ya conocidos mediante técnicas de histología e inmunohistoquímica.

Resultados: la localización de la β -Galactosidasa coincide plenamente con los lugares de expresión del gen Pou4f1.

Conclusión: la cepa transgénica Pou4f1 Tau LacZ es una herramienta útil para el estudio del desarrollo embrionario del ganglio del trigémino.

Palabras clave: Ganglio del Trigémino, Factor de Transcripción Brn-3A, beta-Galactosidasa.

INTRODUCCIÓN

Este trabajo fin de grado está centrado en el campo del desarrollo embrionario del Sistema Nervioso Central (SNC) de vertebrados, y más concretamente en el ganglio sensitivo del nervio trigémino. Para poder contextualizar el estudio vamos a introducir una serie de conceptos.

Desarrollo y estructura del sistema trigeminal.

A nivel embrionario los seis arcos faríngeos comienzan a desarrollarse en torno al principio de la cuarta semana cuando las células de la cresta neural migran hacia las que serán las futuras estructuras de la cabeza y el cuello. Cada arco se desarrolla asociado a un par craneal¹.

Los pares craneales surgen directamente del cerebro o a nivel del tronco del encéfalo, para distribuirse a través de los agujeros de la base del cráneo hacia la cabeza, cuello, tórax y abdomen. Los pares craneales transportan fibras aferentes cuya función es inervar la musculatura esquelética derivada del arco faríngeo correspondiente. El primer arco está inervado por el nervio trigémino (V), el segundo por el nervio facial (VII), el tercero por el nervio glossofaríngeo (IX) mientras que el quinto y sexto están inervados por el nervio vago (X)^{1, 2}.

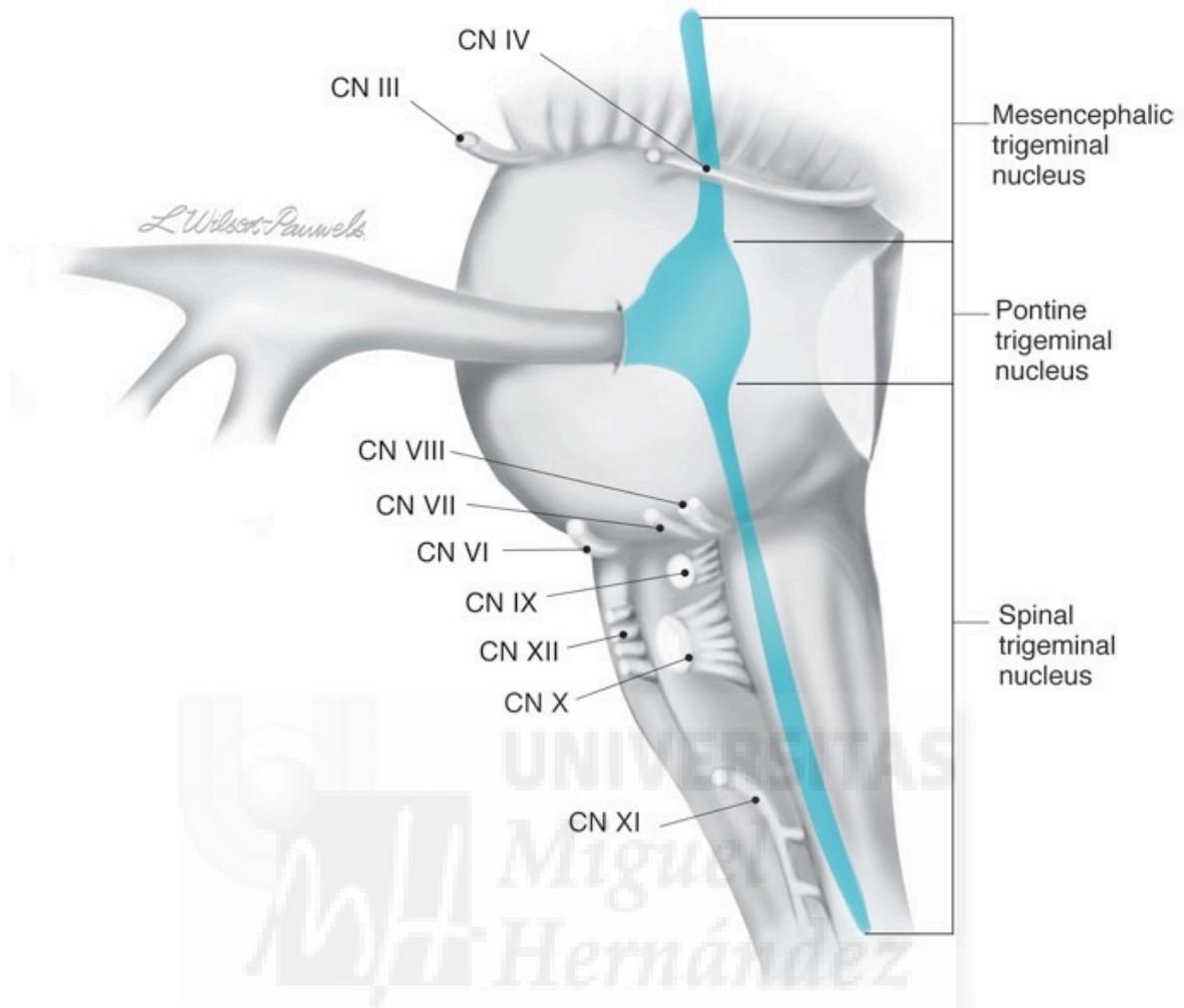
Del primer arco faríngeo deriva la inervación de la cara a través del nervio trigémino (V), el cual se divide en tres ramas principales: **el nervio oftálmico (V1)**, **el nervio maxilar (V2)** y **el nervio mandibular (V3)**. En la división oftálmica (V1) a su vez se distinguen tres nervios principales; el frontal, el lagrimal y el nasociliar. Respecto a la división maxilar (V2) también se diferencian una serie de nervios principales; el cigomático, el infraorbitario, el alveolar superior y el palatino. En la división mandibular (V3) destacan el bucal, el lingual, el alveolar inferior y el auriculotemporal³. El nervio trigémino (V) emerge por la superficie anterolateral de la protuberancia; donde se diferencian una raíz sensitiva y una raíz motora, siendo la primera la más grande^{2, 3}.

Por lo tanto, el nervio trigémino (V) es el nervio sensitivo más importante de la cabeza y el cuello y el nervio motor para los músculos de la masticación. Sus fibras sensitivas inervan la piel de la cara y la mucosa de la boca y la nariz.

Su ganglio sensitivo (el ganglio trigeminal; TG) se localiza en la depresión denominada cavidad trigeminal en el suelo de la fosa craneal media². El origen embriológico del TG viene de las placodas oftálmicas y maxilo-mandibulares, originadas en el ectodermo superficial, y de las células de la cresta neural derivadas del rombencéfalo, las cuales migran y se condensan para formar el ganglio⁴. Los axones sensitivos del ganglio forman las tres divisiones mayores (V1, V2 y V3), mientras que los motores solo discurren por la división mandibular (V3). Por consiguiente, el TG recoge los cuerpos celulares de las neuronas sensitivas del nervio trigémino que conducen la propiocepción³.

El núcleo sensitivo del trigémino (el núcleo más grande de los nervios craneales) es una amplia estructura que se desarrolla a lo largo del tronco del encéfalo y en la porción superior de la médula espinal cervical. Este núcleo a su vez está compuesto por tres subnúcleos trigeminales: el pontino (núcleo principal), el mesencefálico y el espinal³.

- El **núcleo trigeminal pontino** recoge la sensación táctil discriminativa de la cara a través de numerosas neuronas sensitivas secundarias.
- El **núcleo trigeminal mesencefálico** es una delgada columna de neuronas sensitivas primarias. A partir de sus prolongaciones periféricas obtenemos información propioceptiva de los músculos de la masticación, mientras que de las prolongaciones centrales obtenemos el control reflejo de la mordida.
- El **núcleo trigeminal espinal** está vinculado con la percepción del dolor y la temperatura, sobretodo en su porción caudal.



Esquema 1: Núcleos sensoriales del trigémino (vista lateral del tronco cerebral)³.

Los núcleos motores trigeminales inervan todos los músculos que intervienen en la masticación. Los movimientos mandibulares tienen dos funciones principales en los seres humanos: la función puramente masticatoria de los alimentos y la función que ejerce la articulación para emitir los sonidos del habla.

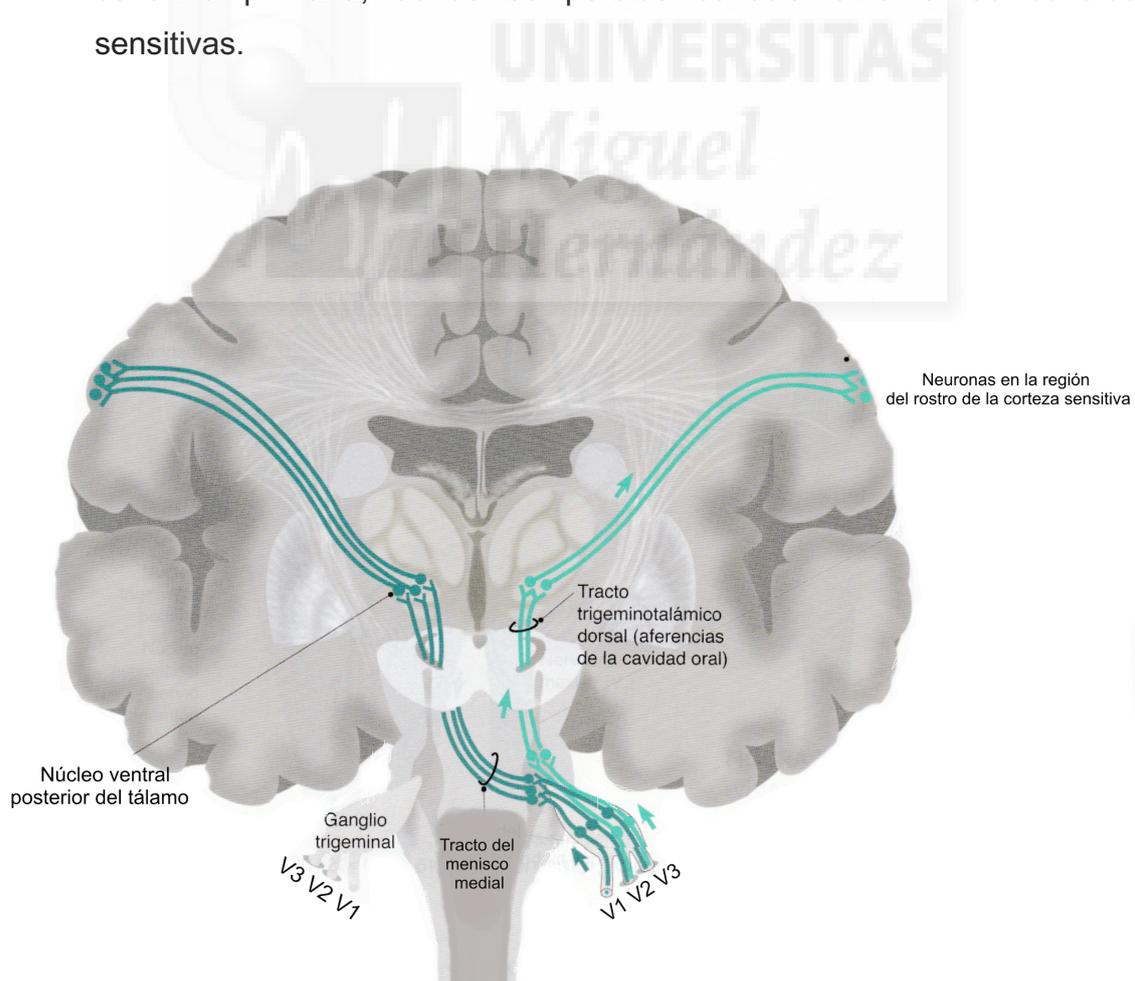
Los nervios motores para los músculos de la masticación discurren con la división mandibular del nervio trigémino. Una vez que estos nervios salen por el foramen oval se dividen en cinco ramas: el nervio pterigoideo medial y lateral, el maseterino, el temporal profundo y el milohioideo³.

Toda la información que se recoge a través de estos núcleos viaja por dos vías centrales: la vía del tacto discriminativo y la vía para el dolor y la temperatura.

La estimulación de estas vías conlleva la activación concomitante del sistema límbico y de la respuesta de lucha o huida.

La propiocepción y la palestesia (sensibilidad vibratoria) viajan a través de la vía del tacto discriminativo. Dicha vía está compuesta por tres neuronas³:

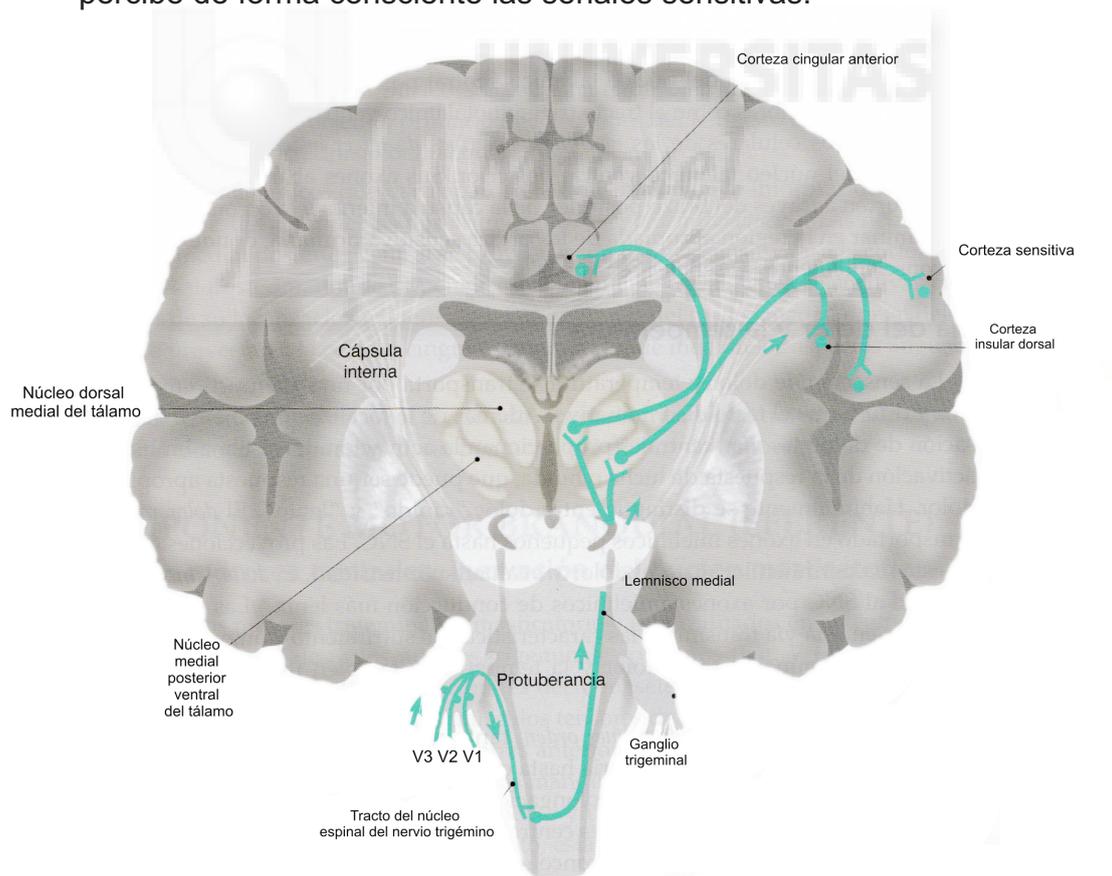
- Las **neuronas sensitivas de primer orden** tienen sus cuerpos celulares en el TG, mientras que sus axones viajan hacia el núcleo pontino. Estas neuronas recogen la información del rostro y de las meninges.
- Los cuerpos celulares de las **neuronas sensitivas de segundo orden** forman el núcleo trigeminal pontino. Los axones de estas migran hacia el tálamo.
- Es en el tálamo, donde se encuentran los cuerpos celulares de las **neuronas sensitivas de tercer orden**. Los axones abandonan el tálamo y discurren hasta la región correspondiente de la corteza sensitiva primaria, donde se percibe conscientemente las señales sensitivas.



Esquema 2: Vía del tacto discriminativo desde la cabeza³.

En el caso de la vía del dolor y la temperatura todo es más subjetivo debido a que la localización del dolor es relativa. Las tres neuronas que forman parte de esta vía son³:

- Las **neuronas de primer orden** envían impulsos desde la periferia hasta el SNC. Los cuerpos celulares se localizan en el ganglio del trigémino y sus prolongaciones centrales junto con las del tacto discriminativo entran en el tronco encefálico y descienden hasta hallar el núcleo espinal del trigémino.
- Los cuerpos celulares de las **neuronas de segundo orden** forman el núcleo espinal del trigémino, mientras que sus axones viajan hasta el tálamo.
- Los axones de las **neuronas de tercer orden** se proyectan desde el tálamo hasta la región de la corteza sensitiva correspondiente, donde se percibe de forma consciente las señales sensitivas.



Esquema 3: Vía del dolor y la temperatura desde la cabeza³.

El tacto leve o simple se localiza con dificultad, por lo que se cree que puede ser transportado tanto por la vía del tacto discriminativo como por la vía del dolor y la temperatura.

Papel del gen Pou4f1 en la especificación del ganglio del trigémino.

Para la especificación de este complejo trigeminal es necesaria la función de una secuencia génica. Esta secuencia génica está compuesta por factores de transcripción que interactúan con el ADN y determinan el destino de los progenitores.

El dominio POU, clase 4, factor de transcripción 1 (POU4F1) también conocido como **Brn3a**, es una proteína que en humanos es codificada por el gen POU4F1 y en ratones la codifica el **gen Pou4f1**. El Brn3a es un dominio POU clase 4 que contiene un factor de transcripción altamente expresado en el desarrollo sensorial del Sistema Nervioso Periférico (SNP), en zonas como: los Ganglios de la Raíz Dorsal (DRG), el TG y los nervios sensoriales del rombencéfalo. También se expresa en ciertas regiones del SNC como: la médula espinal, el núcleo rojo, la habénula y la retina⁵. En el ser humano el gen se encuentra localizado en el cromosoma 13, mientras que en los ratones de estudio su localización es el cromosoma 14.

El Brn3a es un factor de transcripción que actúa regulando aguas abajo diferentes dianas génicas. En las neuronas sensoriales el Brn3a está coexpresado con el factor de transcripción dominio LIM o Islet1, con el cual se ha visto que tiene múltiples dianas en común. El factor de transcripción Islet-1 se expresa en el SNC principalmente en neuronas motoras y, además, tiene roles importantes en el desarrollo del corazón y de las células pancreáticas⁴. Brn3a e Islet1 son regulados de forma independiente y parece que interactúan sólo a nivel de la diana.

Los estudios sobre el ratón mutado Brn3a han demostrado que este factor es necesario para^{4, 5, 6, 7}:

- El correcto crecimiento sensorial del axón.
- La invasión de las dianas correspondientes.
- La supervivencia de las neuronas del TG y de los DRG.

- La expresión sensorial de un complejo conjunto de genes.
- La correcta expresión de los receptores neurotrópicos TrkA y TrkC.
- Reprimir los reguladores neurogénicos de manera temprana, incluyendo los factores bHLHL de las clases Neurog (precursores sensoriales craneales) y Neurod (precursores sensoriales de la neurogénesis).
- Supervivencia del ratón.

Justificación del interés clínico del trabajo.

La aplicación clínica de este trabajo a largo plazo es emplear todos los conocimientos que podamos extraer de la anatomía y funcionalidad del nervio trigémino, así como de su ganglio para poder comprender mejor la etiología de la enfermedad que acarrea, la **neuralgia del trigémino**.

La neuralgia del trigémino es un dolor compresivo paroxístico unilateral que produce ataques de dolor limitados al área de distribución del nervio trigémino o quinto par craneal, normalmente en las ramas maxilares y/o mandibulares. El dolor usualmente se describe como severo, repentino, punzante y de corta duración. Puede estar inducido por el tacto o simplemente por frío en ciertas zonas de la piel o de las membranas mucosas de las áreas conocidas como dianas⁸.

La neuralgia del trigémino se caracteriza por episodios espontáneos de dolor de corta duración, que no responden a analgésicos. Esta patología tiene dos variedades; tipo 1 es un dolor intermitente y tipo 2 es un dolor constante. Los pacientes pueden progresar del tipo 1 al tipo 2 con el tiempo, aunque no es lo mayoritario. Normalmente, los dolores no aparecen cuando el paciente está dormido. Es común en adultos de entre 40 y 50 años, con mayor frecuencia en mujeres que en hombres⁹.

En cuanto a la etiología de la enfermedad; menos del 10 % de los pacientes tienen una enfermedad sintomática asociada a una causa diferente a una lesión por compresión vascular, normalmente causada por: un tumor benigno, un quiste o esclerosis múltiple¹⁰. Por lo tanto, podemos afirmar que la causa principal de la enfermedad, en líneas generales, es la compresión vascular que parece tener lugar en la zona de entrada de la raíz del nervio.

En este estudio lo que queremos observar es si alguna malformación a nivel embrionario puede predisponer en mayor medida la aparición de esta enfermedad.

El diagnóstico de la neuralgia del trigémino se hace a través de la historia clínica (anamnesis) y excluyendo otras patologías neurológicas por su histología y exploración. En el caso de la neuralgia del trigémino idiopática, al carecer de signos neurológicos, se complica su diagnóstico. Las técnicas de imagen como la tomografía computarizada y la resonancia magnética se usan como apoyo para la exclusión de otras patologías. El TAC se utiliza para la eliminación de la posibilidad de la presencia de un tumor cerebral y/o anomalías vasculares, mientras que la RNM se utiliza para descartar esclerosis diseminadas, las cuales están presentes en un 8 % de los casos⁸.

El manejo de la neuralgia del trigémino puede ser tanto farmacológico como quirúrgico:

- **Farmacológico:** fármacos de primera línea (carbamazepina y fenitoína) y fármacos de segunda línea (baclofeno).
- **Quirúrgico:** procedimientos periféricos (bloqueo alcohólico, neurectomía, crioterapia, termocoagulación por radiofrecuencia) y procedimientos centrales (descompresión microvascular y rizotomía sensorial parcial).

A continuación, nos centramos en el tratamiento farmacológico que es nuestro campo. La evidencia demuestra que la **carbamazepina** es el fármaco de elección en primera línea. La carbamazepina estabiliza las membranas nerviosas hiperexcitadas, inhibiendo la entrada de sodio lo que provoca un bloqueo de las descargas neuronales y una reducción de la propagación sináptica de los impulsos excitatorios. Por lo tanto, se cree que su principal mecanismo de acción es la prevención de descargas repetitivas de potenciales de acción dependientes de sodio en neuronas despolarizadas y el bloqueo de los canales de sodio voltaje dependientes. El alivio del dolor puede ser debido al bloqueo de la transmisión sináptica en el núcleo trigémino¹¹. El 80 % de los pacientes responden inicialmente a la carbamazepina pero el efecto se reduce con el tiempo. El efecto terapéutico es usualmente rápido. La pauta posológica

comienza con una dosis inicial de 200-400 mg que se aumenta de forma gradual hasta que se consigue mitigar el dolor (normalmente 200 mg/8 o 6h). Con el alivio completo del dolor la dosis puede reducirse, aunque debe volver a aumentarse si el dolor recidiva⁸.

El otro fármaco de primera línea es la **fenitoína**. La fenitoína se usa como tratamiento cuando la carbamazepina falla o los efectos adversos no permiten su uso. Los efectos de la fenitoína están relacionados con su acción sobre los canales de sodio de la membrana de la célula neuronal¹¹. La dosis habitual es de 300-400 mg diarios ajustados a la respuesta y a los niveles sanguíneos del paciente⁸.

El **baclofeno**, fármaco de segunda línea, se utiliza solo o en combinación con carbamazepina o fenitoína. El baclofeno actúa a nivel presináptico inhibiendo la liberación del potencial excitatorio de los aminoácidos, cómo actúa a un nivel diferente de la carbamazepina y la fenitoína tiene efectos sinérgicos con estas. El baclofeno no es tan efectivo como la carbamazepina pero es más seguro. Los pacientes suelen empezar con 15 mg divididos en tres tomas al día después de las comidas. La dosis se irá aumentando gradualmente hasta el control satisfactorio del dolor. La dosis normal de mantenimiento son 30-80 mg diarios repartidos en varias tomas⁸.

La terapia quirúrgica debe considerarse cuando los tratamientos farmacológicos fallan, no se pueden tolerar o es el deseo del paciente. El objetivo de la cirugía es eliminar los estímulos aferentes del área dañada. Esto se puede conseguir con procedimientos centrales o periféricos que los realizan neurocirujanos y maxilofaciales respectivamente⁸.

En conclusión, la neuralgia del trigémino es una enfermedad debilitante asociada a una morbilidad considerable. El diagnóstico es a través de la historia clínica y la eliminación de otras patologías. La etiología de la enfermedad sigue sin estar clara por lo que planteamos la posibilidad de que alteraciones durante el desarrollo embrionario puedan llevar a la aparición de pacientes con mayor predisposición a sufrir esta patología. El tratamiento inicial incluye fármacos, normalmente carbamazepina y fenitoína, y cuando estos fallan se realizan procedimientos quirúrgicos.

OBJETIVO

Estudiar en un ratón heterocigoto (+/-) la formación del ganglio trigémino durante el desarrollo embrionario, comparando la distribución de la enzima β -galactosidasa (LacZ) con otros marcadores conocidos. Este estudio permitirá confirmar la utilidad del modelo transgénico como herramienta para ampliar nuestro conocimiento sobre la anatomía y funcionalidad del sistema trigeminal.



HIPÓTESIS

El ratón Brn3a TAU LacZ es una herramienta útil para estudiar el desarrollo embrionario del ganglio del trigémino, así como de sus proyecciones.



MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó durante el periodo de tiempo comprendido entre el 3 de julio y el 29 de septiembre de 2017, exceptuando el mes de agosto, en los laboratorios 102 y 138 del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández (UMH).

Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo, el cual consistió en el análisis neuropatológico del TG y sus proyecciones en seis muestras de encéfalo del embrión del ratón mutante Pou4f1 Tau-LacZ en tres estadios embrionarios diferentes (E12.5, E14.5 y E16.5). Las muestras se compararon con marcadores de la β -Galactosidasa ya conocidos mediante técnicas de histología e inmunohistoquímica.

Origen de las muestras.

Los animales de estudio se obtuvieron del Servicio de Experimentación Animal de la UMH. Los animales obtenidos de esta institución son ratones para modelos experimentales, creados y cuidados por personal acreditado en la manipulación y modificación de animales de laboratorio.

Los embriones pertenecen a la línea genética Pou4f1 Tau-LacZ, la cual se caracteriza por producir la proteína bacteriana β -Galactosidasa. Se utilizaron dos embriones de tres estadios diferentes (E12.5, E14.5 y E16.5).

La creación del ratón se produjo al sustituir el locus del gen Pou4f1 mediante recombinación homóloga por el gen de la β -Galactosidasa, junto con una secuencia TAU que provoca la dispersión de la enzima por las prolongaciones neuronales. La sustitución provoca, por lo tanto, la falta de función de Pou4f1. De manera que las cepas transgénicas se mantienen en heterocigosis, es decir, sólo presenta un 50 % de la función. Aun así, estos animales no muestran ninguna alteración en comparación con los animales silvestres. Esta línea fue generada por el grupo del Dr. Eric Turner (USA), la cual cedió amablemente a nuestro laboratorio.

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 UMH y la aprobación de la GVA.

Procesado de muestras.

Primeramente, procedimos a comprobar que en nuestra cepa transgénica se expresaba la enzima β -Galactosidasa bajo el promotor del gen Pou4f1. Para ello fijamos embriones de estadios tempranos desde E9.0 hasta E12.5 y los teñimos con el sustrato de la β -Galactosidasa. Para comenzar, las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS (tampón fosfato salino) durante 30 minutos o 3 horas dependiendo del estadio. A continuación, se realizaron tres lavados de quince minutos en una solución de 5 mM EGTA, 0.01 % Deoxicolato sódico, 0.02% Nonidet P40, 2 mM MgCl₂ en PBS. En embriones mayores del E10.5 solo lavar en PBS. Seguidamente, se incubaron en una solución de X-Gal (1 mg/ml 5-Bromo-4-cloro-3-indol-b-D-galactopiranosido, 20 mM Fe³⁺, 20 mM Fe²⁺, 5 mM EGTA, 0.01 % Deoxicolato sódico, 0.02 % Nonidet P40, 2 mM MgCl₂ en PBS) a 37 °C., Para embriones mayores al E10.5 no se añade; EGTA, deoxicolato sódico ni Nonidet P40. Debemos de comprobar la tinción con frecuencia, si no se tiñe lo suficiente se puede dejar incubando durante toda la noche. Posteriormente, se hicieron tres lavados de quince minutos en PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante una noche entera. Las muestras se conservaron a 4 °C sumergidas en paraformaldehído al 1 %.

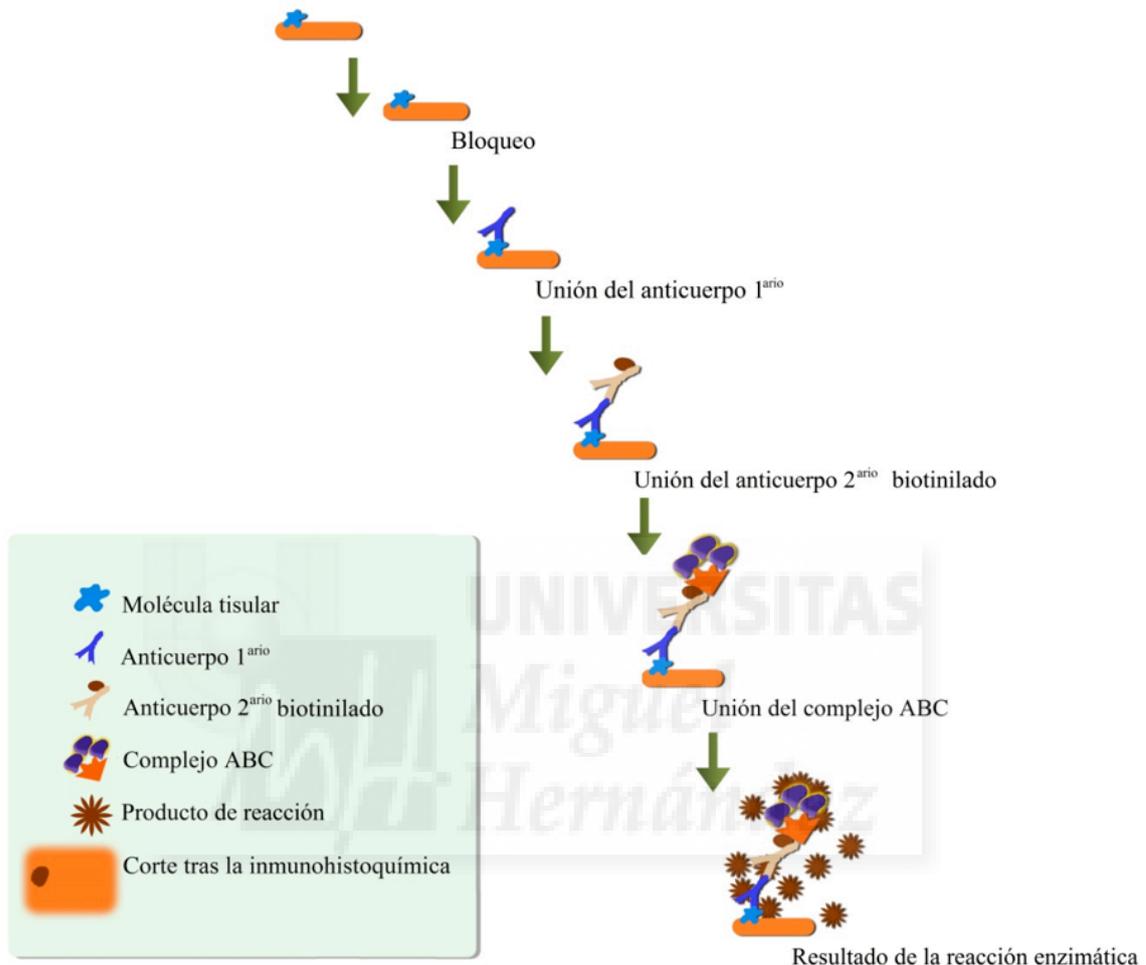
Los embriones estudio que se utilizaron en este trabajo se encontraban de manera inicial fijados en paraformaldehído y deshidratados en etanol 100 % con el fin de conservar las muestras. Tras la selección de los embriones se optó por la técnica de inclusión en parafina, que permite observar la distribución de proteínas en tejidos neuronales.

Las muestras recibieron dos baños de 30 minutos cada uno de butanol, para retirar el etanol y deshidratar el tejido. Una vez eliminado el etanol los embriones fueron sumergidos en parafina líquida a 60 °C y se realizaron 5 cambios de 30 minutos cada uno con el objetivo de desplazar y eliminar el butanol. Las muestras se solidificaron en un molde cúbico (dos muestras del mismo estadio por cubo) en el cual, mediante una aguja caliente, se orientaron para colocarlas en el plano adecuado para la realización de los cortes posteriores.

Tras la solidificación de la parafina y su extracción del molde, se procedió a la sección de las muestras utilizando un micrótopo modelo Microm HM 334 E®. El micrótopo es un instrumento que permite el corte de muestras en secciones muy finas para su posterior estudio, en este caso los cortes realizados fueron de 10 µm. Respecto a los planos de corte, un embrión de cada estadio se seccionó en plano sagital y el restante en plano coronal. Posteriormente, los cortes fueron montados en portaobjetos en 4 series sucesivas de 5 portaobjetos (E12.5), 4 series de 7 portaobjetos (E14.5) y 4 series de 9 portaobjetos (E16.5) respectivamente. Para el montaje de las muestras se utilizó un baño de agua templada en el que se introdujeron los cortes para alisar el tejido antes de situarlo encima del portaobjetos. Una vez estuvieron los cortes en el portaobjetos se llevaron a la estufa de 37 °C durante un día.

Se seleccionó una serie de cada estadio para ser teñida con cresil violeta. El cresil violeta es un compuesto orgánico ampliamente utilizado como marcador en histología, al teñir los ácidos nucleicos en tejidos de cualquier tipo. Para realizar el proceso de tinción en cresil violeta, en primer lugar, se sumergieron los portaobjetos 7 minutos en dicho tinte. A continuación, se realizó una inmersión en agua destilada para regular el color del tejido (el agua actúa como disolvente). Posteriormente, se efectuaron inmersiones rápidas en etanoles: 2 en etanol 70 %, 1 en etanol 96 %, seguido de un baño de etanol 96 % de 5 minutos. El siguiente paso fue realizar 2 baños de 5 minutos en etanol 100 % y finalmente 2 baños de 10 minutos en Xilol de Merk. Tras este proceso los portaobjetos se montaron con un cubreobjeto fijado con el pegamento Eukitt® y se dejaron secar varios días en una estufa a 37 °C.

El resto de muestras fueron sometidas a tratamiento de inmunohistoquímica, el cual sigue el patrón que se muestra a continuación:



Esquema 4: Ilustración de la técnica de inmunohistoquímica.

Esta técnica consiste en exponer a la muestra a un anticuerpo primario para que se fije a la proteína objetivo de estudio para después añadir un anticuerpo secundario junto con biotina, el cual se adhiere al anticuerpo primario posibilitando su detección y revelado posterior.

En este caso la proteína a estudiar fue la β -Galactosidasa una enzima glicosilada hidrolizada que cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos.

Antes de poder iniciar la técnica fue necesario desparafinar los cortes. Para ello, los portaobjetos se introdujeron 20 minutos en la estufa a 95 °C para fundir la parafina y posteriormente en 2 baños de 20 minutos de Xilol de Merck cada uno, para disolver los posibles restos. A continuación, se rehidrataron las muestras en una serie decreciente de etanoles al 100 %, 96 % y 70 % hasta llegar a un baño de agua destilada. Cada baño tuvo una duración de 7 minutos.

Tras la rehidratación, se procedió a la técnica de re-exposición de epítomos. Dicha técnica consiste en la aplicación de calor por hervido en un tampón de citrato sódico a 0.001 M en agua destilada. El hervido se realizó en un microondas a 750 W de potencia en 4 tiempos (el primero de 4 minutos y los 3 restantes de 3 minutos cada uno). Tras esto se procedió al lavado de las muestras con agua destilada de manera gradual para desplazar poco a poco el citrato sódico. Por lo tanto, realizados los procesos de desparafinado, rehidratación y hervido, se inició el tratamiento con anticuerpos.

Previamente a añadir los anticuerpos los cortes tuvieron que ser lavados tres veces en PBS y una con PBS-T (con tritón añadido al 0.1 %) con el objetivo de eliminar los restos de citrato sódico procedentes del proceso de hervido, cada lavado duró 7 minutos. A continuación, se inició el bloqueo de la peroxidasa endógena usando H₂O₂ al 1.5 % en PBS-T durante 30 minutos en oscuridad. Este proceso es importante debido a que una peroxidasa endógena activa podría dar lugar a una inmunoreactividad residual y, por lo tanto, a errores en el revelado. Tras retirar el bloqueo se lavó 3 veces en PBS-T durante 7 minutos cada vez. El siguiente paso fue bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario con lisina al 10 % en PBS-T. Tras añadir el anticuerpo primario se dejó actuar toda una noche a temperatura ambiente incubando en una solución de BSA (Suero Fetal Bovino) al 1 % junto con azida al 0.1 % en PBS-T.

Según la serie a la que le aplicamos la técnica de inmunohistoquímica los anticuerpos primarios y secundarios, así como sus concentraciones, son diferentes como refleja la siguiente Tabla 1.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Concentración
β-Gal	Goat anti Chicken biot.	1:500
Tag-1	Rabbit anti Goat biot.	1:500
Dcx	Goat anti Rabbit biot.	1:100

Tabla 1: Anticuerpos y concentraciones utilizadas en el proceso de inmunohistoquímica.

Tras 24 horas de incubación con el anticuerpo primario se recuperó el anticuerpo sobrante de los portaobjetos y se lavaron 3 veces en PBS-T, durante 7 minutos cada uno. Posteriormente, a los portaobjetos se les administró el anticuerpo secundario dejándolo actuar durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario debe previamente diluirse 1:200 en PBS-T. A continuación, se lavaron tres veces las muestras en PBS-T tras la acción del anticuerpo secundario y se añadió el complejo ABC (Avidin Biotin Complex) diluido 1:500 en PBS-T, que se dejó actuar durante una hora. Este complejo contiene avidina y peroxidasa del rábano biotinilada. La avidina tiene una gran afinidad por la biotina y forma un complejo donde se unen la peroxidasa biotinilada a ella, 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. Seguidamente, se retiró el complejo ABC y se realizaron 3 lavados en PBS-T de 7 minutos cada uno y otros 2 en PBS de 10 minutos cada uno. Seguidamente a los lavados se inició el revelado.

Para realizar el revelado se utilizó 1 ml de DAB (diaminobencidina) con H₂O₂ al 0.6 %. El DAB tiñe el tejido con una gama de colores que va desde el naranja al marrón oscuro, dependiendo del tiempo que se deje interactuar. Los portaobjetos se depositaron en un couplin con el DAB, dejándolo actuar el tiempo necesario para que se produjera un revelado óptimo. El proceso de revelado debe realizarse con extremo cuidado al tratarse de un compuesto altamente tóxico.

Tras el revelado, las muestras se deshidrataron en una serie creciente de etanoles, desde agua destilada hasta etanol 100 %. Tras dos baños de 10

minutos de Xilol de Merck se montaron los portaobjetos con un cubreobjetos sellado con el pegamento Eukitt® y se dejaron secar varios días en una estufa a 37 °C.

Para observar las muestras se utilizó el microscopio estereoscópico modelo LEICA® M7 16 FA (motorizado) del laboratorio 102 a 20 y 15 aumentos (para las muestras E12.5 y E14.5/E16.5 respectivamente). Para la toma de las fotografías se utilizó la cámara digital LEICA® DFCSSO. Posteriormente, las fotografías fueron tratadas 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.

Marcadores empleados en el estudio.

Los marcadores del trigémino que se utilizaron en este trabajo son los siguientes:

- **Doble Cortina (Dcx):** la proteína que codifica este gen es una proteína citoplasmática que contiene dos dominios doble cortina enlazados con microtúbulos. En el córtex cerebral las neuronas corticales deben migrar a través de distancias muy largas hasta encontrar el sitio final de su diferenciación. La proteína que codifica este gen parece que dirige la migración neuronal mediante la regulación, organización y la estabilización de microtúbulos¹².
- **Tag1:** es un gen que codifica un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Tiene un rol en la proliferación, migración y como guía en el crecimiento del axón¹³.
- **β-Galactosidasa:** es una enzima glicosilada hidrolizada que cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos.
- **Tinción de Nissil (Cresil Violeta):** es una tinción usada ampliamente en histología ya que permite la tinción de ácidos nucleicos casi en cualquier tejido. El colorante básico en el que se basa la tinción normalmente es el violeta de cresilo.

La siguiente tabla hace un resumen del tratamiento que sufrieron cada una de las series en los tres estadios.

SERIE	E 12.5	E 14.5	E 16.5
A	β -Galactosidasa	β -Galactosidasa	β -Galactosidasa
B	Tag1	Tag1	Tag1
C	Doble Cortina	Doble Cortina	Doble Cortina
D	Cresil Violeta	Cresil Violeta	Cresil Violeta

Tabla 2: Tratamiento realizado sobre las muestras.



RESULTADOS

En primer lugar, con la tinción X-Gal podemos examinar en los estadios E9.0 y E9.5 la aparición: del TG, del núcleo mesencefálico del trigémino y de los DRG que van manifestándose a lo largo de la médula espinal (Fig. 1A, B). En el estadio E10.5 observamos cómo se van desarrollando las proyecciones del TG y aparecen las tres ramas que progresaran hasta alcanzar sus territorios diana (Fig. 1C). Por último, en el estadio E12.5, el ganglio está plenamente desarrollado y podemos ver como las proyecciones se extienden hasta ocupar todo su territorio diana.

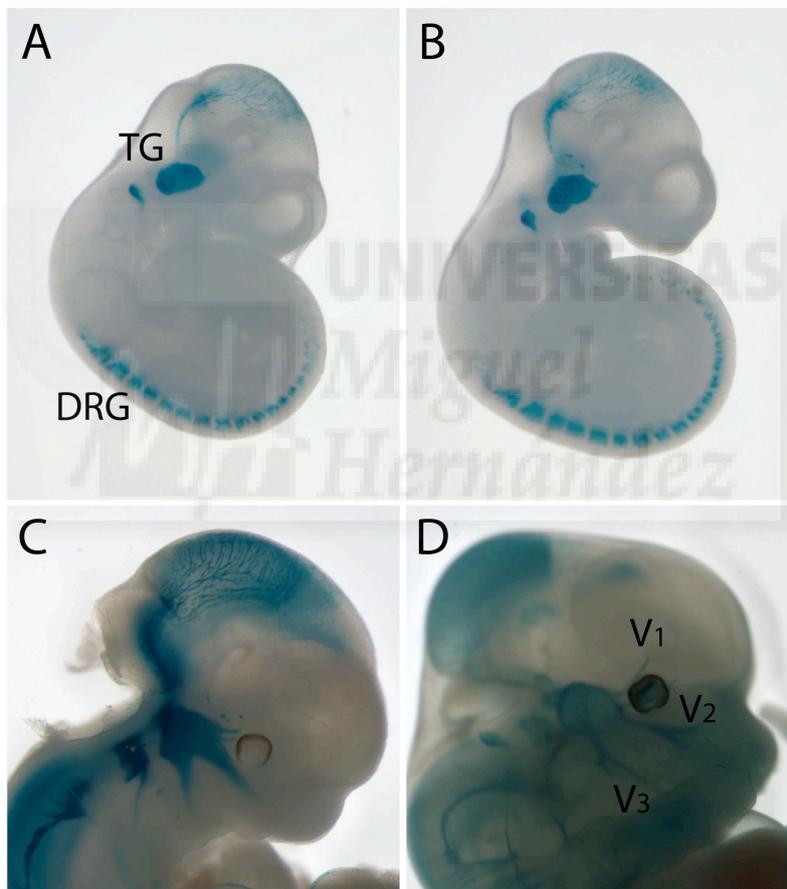


Figura 1: Técnica de tinción X-Gal en embriones heterocigotos de Brn3a TAU-LacZ en estadios E9.0 (A), E9.5 (B), E10.5 (C) y E12.5 (D). Se aprecia el patrón de expresión de Brn3a puesto de manifiesto por la presencia de la enzima β -Galactosidasa. Abreviaciones: DRG, ganglios de la raíz dorsal; TG, ganglio del trigémino; V1, rama oftálmica; V2, rama maxilar; V3, rama mandibular.

Posteriormente, procedimos a analizar cortes histológicos a lo largo del desarrollo embrionario comparando la distribución de la β -Galactosidasa con la de otros marcadores. El análisis comenzó con cortes sagitales seriados a la altura del TG en el estadio E.12.5 (Fig. 2). En la figura 2A podemos observar el corte con la tinción básica de cresil violeta, la cual nos permite diferenciar todas las estructuras morfológicas, entre ellas el TG y su segunda rama, la maxilar. Además, también se aprecia cómo se inicia ya la formación del rostro. La figura 2B representa un corte adyacente que revela la localización de la β -Galactosidasa. En dicho corte se distingue de forma meridiana el TG y nuevamente su rama maxilar, en la que se aprecian la salida de sus proyecciones hasta todos sus territorios diana. De esta imagen cabe destacar la entrada de axones neuronales al tronco cerebral (es decir, al SNC). Para corroborar que lo que nos muestra esta imagen es el marcaje que queremos la imagen se comparó con dos marcadores del TG bien conocidos como son; Doble Cortina (Dcx) y Tag1 (Fig. 2C, D). En las figuras 2C y 2D podemos observar el TG en su totalidad y sus tres ramas principales; siendo la rama V2 la más desarrollada para este estadio, mientras que, las ramas V1 y V3 se muestran todavía de manera más liviana por el plano de corte en el que nos encontramos. Destacar la completa correlación entre la distribución de nuestra proteína experimental y los dos marcadores del TG.

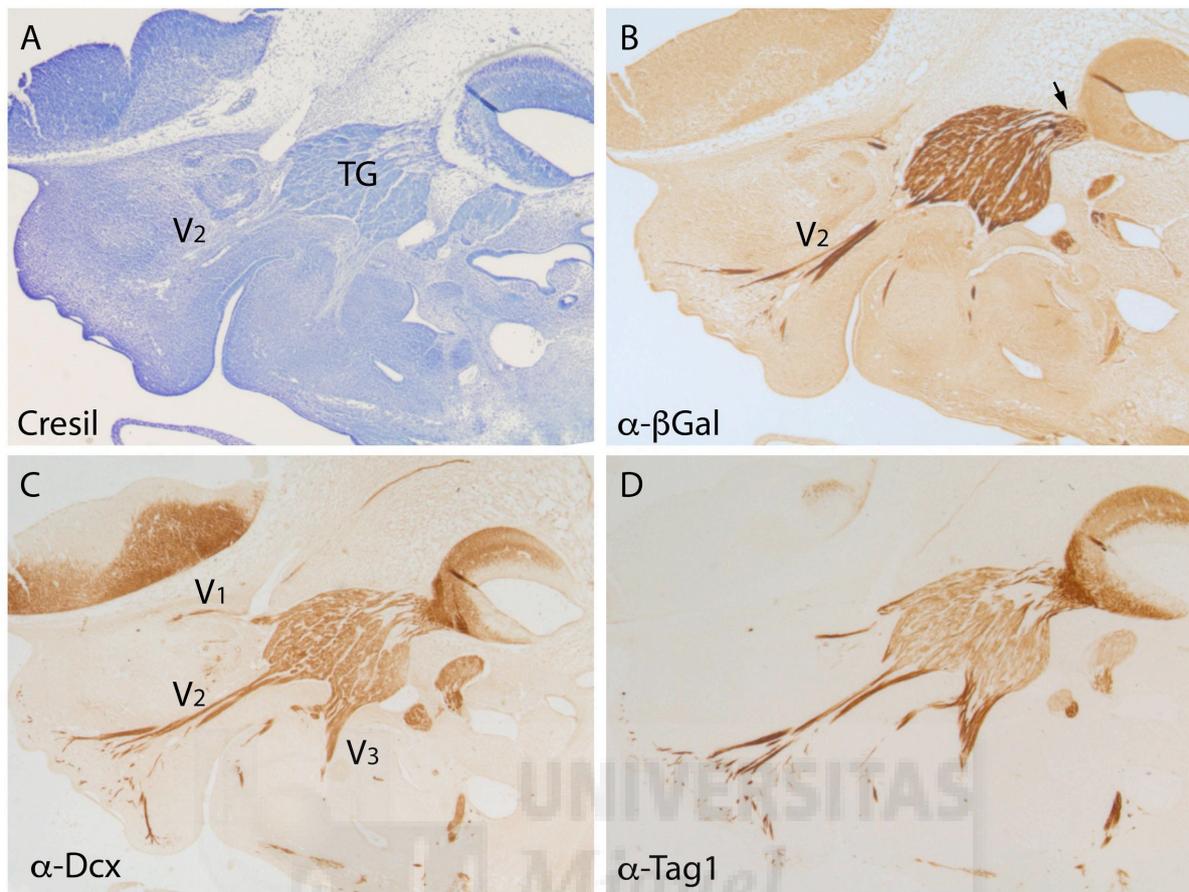


Figura 2: Cortes sagitales seriados de un embrión de E12.5. A, Cresil Violeta; B, inmunohistoquímica para β -Galactosidasa; C, inmunohistoquímica para Dcx; D, inmunohistoquímica para Tag1. La flecha en B señala a los axones de las neuronas ganglionares penetrando en el tronco cerebral. Abreviaturas: TG, ganglio del trigémino; V1, rama oftálmica; V2, rama maxilar; V3 rama mandibular.

Avanzando a lo largo del desarrollo embrionario procedimos a examinar cortes sagitales en el E14.5 a la altura del TG y sus proyecciones. En las figuras referentes al cresil violeta (Fig. 3A, E) no se pueden discernir con claridad las ramas principales por su contenido celular, pero nuevamente el TG queda perfectamente identificado, lo que nos permite diferenciarlo del resto de estructuras cerebrales. Con esta tinción podemos distinguir las diferentes áreas del rostro del ratón, cabría destacar la aparición de tejido cartilaginoso (color rosado) en distintas regiones del cráneo. Asimismo, podemos discernir la región de la vesícula ótica y la cavidad nasal que contiene el epitelio olfatorio. Es primordial observar en la región maxilar las vibrisas, importante elemento de percepción táctil en los roedores. La distribución de la β -Galactosidasa nos vuelve a mostrar toda la extensión del ganglio del nervio trigémino observando

a la perfección como la rama maxilar progresa hacia sus territorios diana (Fig. 3B, F). La base de las vibrisas aparece ligeramente teñida por la llegada de los terminales dendríticos (Fig. 3B). A otro nivel, podemos vislumbrar la rama mandibular del mismo modo que la entrada de los axones provenientes del TG en el tronco cerebral, dicha entrada se ve teñida de en la Figura 3F. Al comparar la distribución observada con los marcadores seleccionados, pudimos corroborar que Dcx es un marcador general de todo el tejido neural, así como de todos los ganglios. En este caso nos identifica tanto TG como las dos ramas observadas con nuestra molécula experimental (Fig. 3C, D). Mientras que con Tag1 se tiñen de forma selectiva algunos territorios neurales como la corteza cerebral y las regiones mesencefálicas. De nuevo volvemos a observar los componentes de trigémino, destacando el complejo nuclear que también presenta esta proteína (Fig. 3D, H), coincidiendo plenamente con la distribución de la β -Galactosidasa.



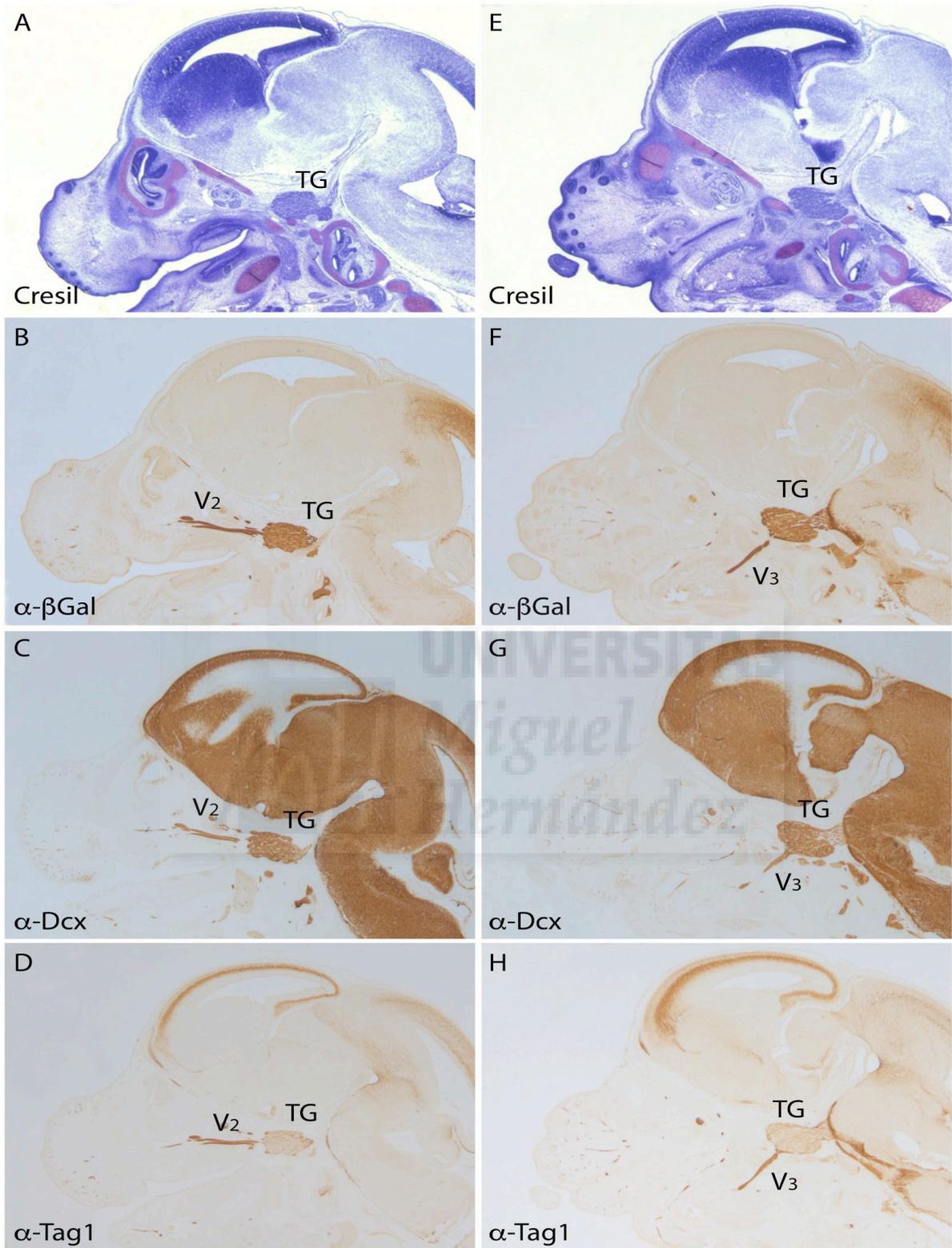


Figura 3: Cortes sagitales seriados de un embrión de E14.4. A y E, Cresil Violeta; B y F, inmunohistoquímica para β -Galactosidasa; C y G, inmunohistoquímica para Dcx; D y H, inmunohistoquímica para Tag-1. Abreviaturas: TG, ganglio del trigémino; V2, rama maxilar; V3 rama mandibular.

Estudiamos también cortes coronales en el estadio E14.5 para poder extraer una idea tridimensional de la disposición del TG con respecto al resto de estructuras. En el cresil violeta observamos en la parte superior, la región hipotalámica y como a ambos lados se encuentran las masas de neuronas ganglionares del trigémino. En la parte inferior, aparece la cavidad oral que contiene la lengua (Fig. 4A). Al estudiar la distribución de la β -Galactosidasa podemos observar el TG y diferentes componentes de la rama mandibular (Fig. 4B). Con el marcador Dcx confirmamos la identificación morfológica y destacamos el marcaje de fibras musculares, fácilmente observables en la lengua (Fig. 4C). Por último, con el marcador Tag1 vemos cómo se van desfasciculando los distintos componentes del nervio mandibular. Pudiendo ver con claridad como uno de estos es el nervio lingual, que se dirige hacia la lengua (Fig. 4C).

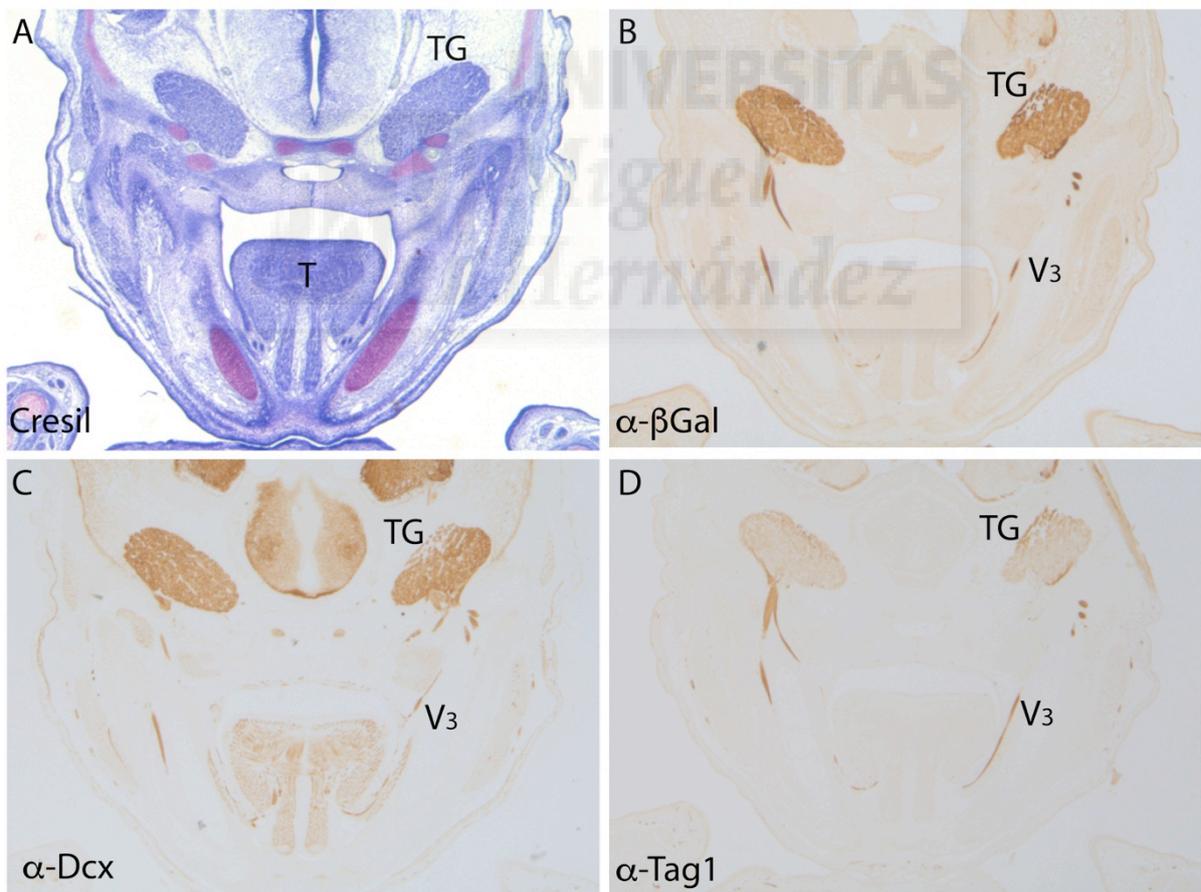


Figura 4: Cortes coronales seriados de un embrión de E14.5. A, Cresil Violeta; B, inmunohistoquímica para β -Galactosidasa; C, inmunohistoquímica para Dcx; D, inmunohistoquímica para Tag1. Abreviaturas: T, lengua; TG, ganglio del trigémino; V3, rama mandibular.

Para terminar nuestro estudio procedimos a analizar secciones sagitales de embriones de E16.5. En la tinción con cresil violeta son fácilmente distinguibles múltiples estructuras morfológicas de la cabeza del embrión. Podemos destacar la vesícula ótica con sus componentes vestibulares y auditivos, la cavidad nasal, las glándulas salivares y la base de las vibrisas en el labio superior (Fig. 5A). El TG aparece apoyado en la base del cráneo y cerca de la región hipotalámica (Fig. 5A). Nuestro marcador sigue identificando claramente el TG y sus ramas, nuevamente con mayor intensidad la rama maxilar (Fig. 5B). Con el anticuerpo Dcx volvemos a ver un marcaje generalizado de todo el cerebro, el epitelio olfatorio y del TG con sus ramas (Fig. 5C). En el caso del Tag1 podemos diferenciar el marcaje en la corteza cerebral y como era de esperar en el TG y sus ramas (Fig. 5D).

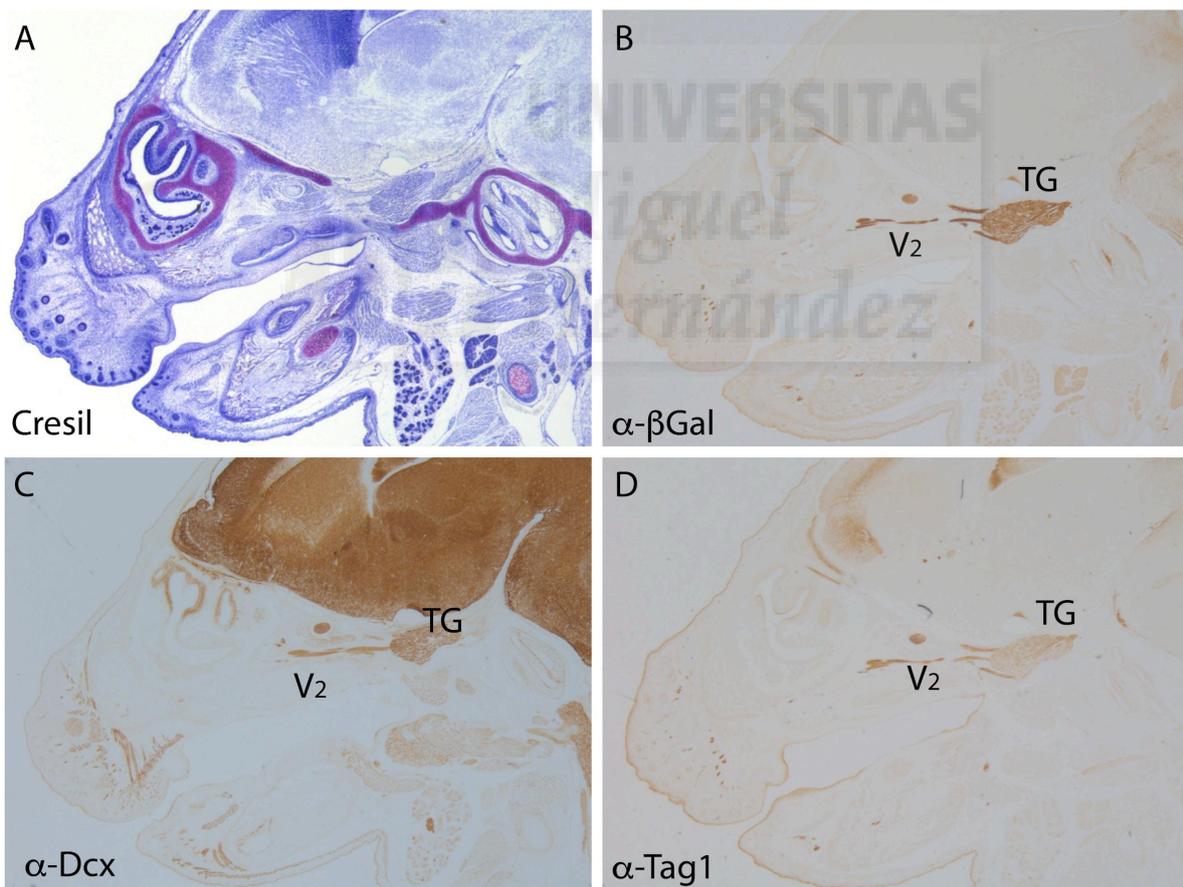


Figura 5: Cortes sagitales seriados de un embrión de E16.5. A, Cresil Violeta; B, inmunohistoquímica para β -Galactosidasa; C, inmunohistoquímica para Dcx; D, inmunohistoquímica para Tag1. Abreviaturas: TG, ganglio del trigémino; V2, rama maxilar.

En la última figura del trabajo, volvemos a observar un corte coronal correspondiente al E16.5. En la imagen de cresil violeta apreciamos un corte a nivel diencefálico con las vesículas telencefálicas a ambos lados. Debajo del encéfalo apoyado en el cráneo aparece el TG. En la parte inferior de la imagen, se aprecian: las ramas de la mandíbula, la parte posterior de la lengua y, por debajo, las glándulas salivares sublinguales (Fig. 6A). La distribución de nuestra proteína aparece en el cerebro en la región habenular y en el tracto óptico. Los ganglios aparecen fuertemente marcados al igual que algunas de sus ramas y nuevamente podemos apreciar la estructura de la lengua en la parte inferior de la figura (Fig. 6B). Volvemos a observar que Dcx se distribuye por todo el tejido neural, incluyendo el TG (Fig. 6C). La distribución de Tag1 coincide en la región habenular y en el tracto óptico con la tinción de β -Galactosidasa. Sin embargo, a diferencia de nuestra imagen estudio en la tinción con Tag1 aparecen marcadas las fibras talamocorticales además del ganglio y sus ramas (Fig. 6D).



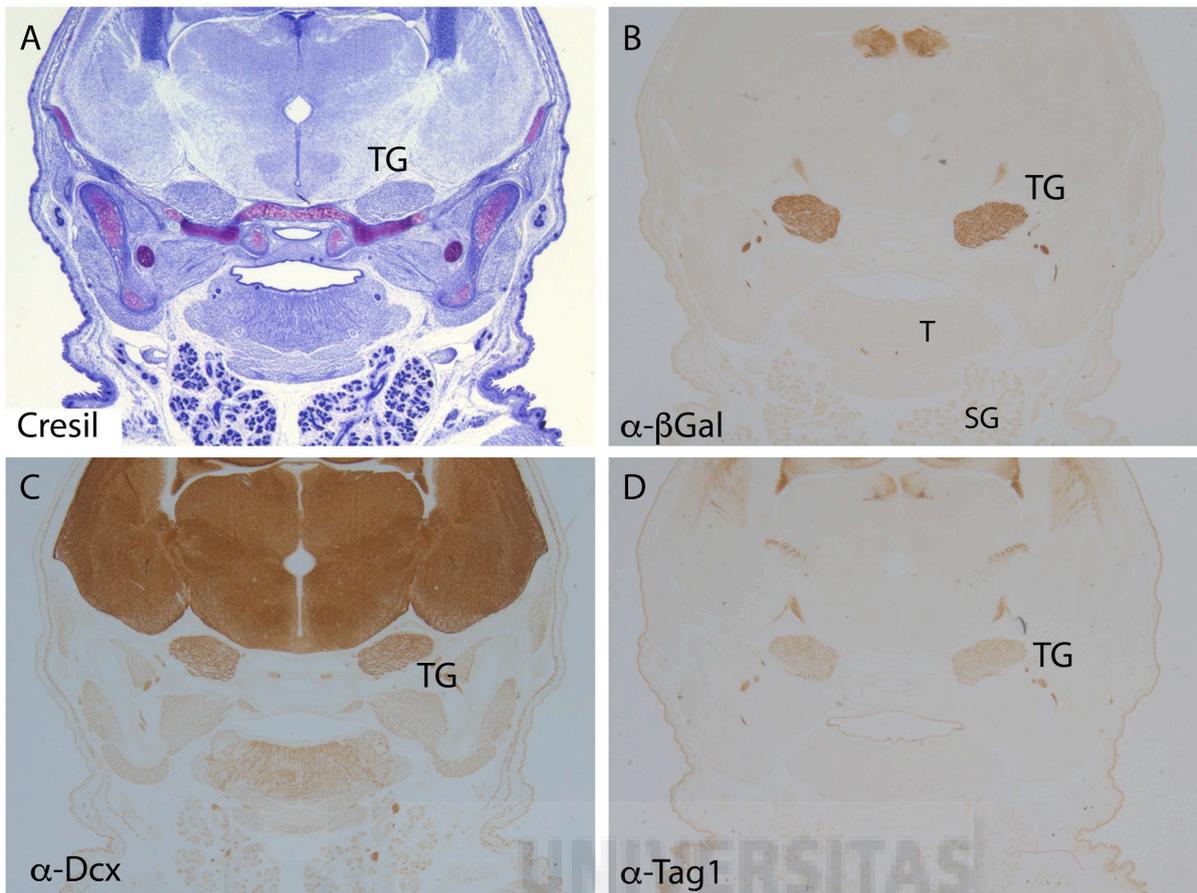


Figura 6: Cortes coronales seriados de un embrión de E16.5. A, Cresil Violeta; B, inmunohistoquímica para β -Galactosidasa; C, inmunohistoquímica para Dcx; D, inmunohistoquímica para Tag1. Abreviaturas: SG, glándula salivar; T, lengua; TG, ganglio del trigémino.

DISCUSIÓN

Una de las grandes dificultades que nos encontramos en el estudio del desarrollo embrionario de estructuras neuronales es poder seguir la diferenciación de dichas neuronas y la formación de sus prolongaciones celulares (dendritas y axones). Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos han permitido validar una cepa transgénica de ratón como herramienta para el estudio del sistema trigeminal.

A la hora de interpretar nuestros resultados lo que más nos llama la atención es que la localización de la β -Galactosidasa coincide plenamente con los lugares de expresión del gen Pou4f1. Este hecho confirma que al tratarse de un ratón heterocigoto la pérdida de función del gen no se ha visto alterada.

Debe resaltarse también que la construcción empleada para generar esta cepa nos permite expandir la localización de la enzima (β -Galactosidasa) a todas sus proyecciones neuronales, como se demuestra a lo largo de las figuras de este trabajo, donde se observan las prolongaciones axonales que abandonan el TG adentrándose en el SNC. Esto nos lleva a pensar que esta cepa es una buena herramienta de trabajo para futuros estudios.

Respecto a los marcadores del trigémino usados debemos comentar que el anticuerpo Dcx se expresa ampliamente en neuronas migratorias y se observa en las etapas tempranas del desarrollo neuronal. Por lo que, si hubiéramos escogido estadios mayores del desarrollo embrionario podríamos no haber observado el marcaje.

CONCLUSIÓN

Tras validar los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que la cepa transgénica Pou4f1 Tau LacZ es una herramienta útil para el estudio del desarrollo embrionario del ganglio del trigémino.



BIBLIOGRAFÍA

1. Moore K, Persaud T, Torchia M. Capítulo 9: Aparato faríngeo, cara y cuello. En: Moore K, Persaud T, Torchia M. Embriología clínica. 9ª Ed. Barcelona, España: Editorial Elsevier; 2013. p. 362-440.
2. Drake Richard L, Wayne Vogl A, Mitchell Adam W.M. Cabeza y cuello. En: Drake Richard L, Wayne Vogl A, Mitchell Adam W.M. Gray Anatomía básica. Barcelona, España: Editorial Elsevier; 2013. p. 413-592.
3. Wilson-Pauwels, Akesson, Stewart, Spacey. V nervio trigémino. En: Wilson-Pauwels, Akesson, Stewart, Spacey. Nervios craneales En la salud y la enfermedad. 3º Ed. México DF: Editorial Médica panamericana; 2013. p. 83-110.
4. Eng SR, Dykes IM, Lanier J, Fedtsova N, Turner EE. POU-domain factor Brn3a regulates both distinct and common programs of gene expression in the spinal and trigeminal sensory ganglia. *Neural Dev.* 2007 Jan 19;2:3. DOI: 10.1186/1749-8104-2-3.
5. Eng SR, Gratwick K, Rhee JM, Fedtsova N, Gan L, Turner EE. Defects in Sensory Axon Growth Precede Neuronal Death in Brn3a-Deficient Mice. *J. Neurosci.* 2001 Jan 15;21(2):541-9. PMID: 11160433.
6. Dykes IM, Lanier J, Eng SR, Turner EE. Brn3a regulates neuronal subtype specification in the trigeminal ganglion by promoting Runx expression during sensory differentiation. *Neural Dev.* 2010 Jan 22;5:3. DOI: 10.1186/1749-8104-5-3.
7. Lanier J, Dykes IM, Nissen S, Eng SR, Turner EE. Brn3a regulates the transition from neurogenesis to terminal differentiation and represses non-neural gene expression in the trigeminal ganglion. *Dev Dyn.* 2009 Dec;238(12):3065-79. DOI: 10.1002/dvdy.22145.
8. Sidebottom A, Maxwell S. The medical and surgical management of the trigeminal neuralgia. *J Clin Pharm Ther.* 1995;20: 31-5.

9. Yadav YR, Nishtha Y, Sonjjay P, Vijay P, Shailendra R, Yatin K. Trigeminal Neuralgia. *Asian J Neurosurg*. 2017 Oct-Dec;12(4):585-97. DOI: 10.4103/ajns.AJNS_67_14.
10. Bennetto L, Patel NK, Fuller G. Trigeminal neuralgia and its management. *BMJ*. 2007 Jan 27;334(7586):201-5. DOI: 10.1136/bmj.39085.614792.BE.
11. Flórez J. Sección IV: Sistema nervioso central. En: Flórez J. *Farmacología humana*. 6º Ed. Barcelona, España: Editorial Elsevier; 2014. p. 407-581.
12. National Institutes of Health (NIH). Dcx doublecortin: *Mus musculus* (house mouse) [sede Web]. Bethesda, USA: NIH; [actualizada 23 may 2018; citada 25 mayo 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13193>.
13. National Institutes of Health (NIH). Cntn2 contactin 2: *Mus musculus* (house mouse) [sede Web]. Bethesda, USA: NIH; [actualizada 23 may 2018; citada 25 mayo 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/21367>.

