

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO EN TERAPIA OCUPACIONAL**



**Título:** Papel de Sonic Hedgehog en la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia negra.

**AUTOR:** Pozo Bermúdez, Beatriz

**Nº Expediente:** 400

**TUTOR:** De Puelles Martínez de la Torre, Eduardo

**Departamento:** Histología y Anatomía, Área de Anatomía y Embriología Humana

**Curso académico:** 2015/2016

**Convocatoria de Junio**

**A la atención de la vicedecana del grado de Terapia Ocupacional**



## **AGRADECIMIENTOS**

*A D. Eduardo de Puelles por su enseñanza, ayuda, paciencia y darme la oportunidad de poder introducirme en un pequeño matiz del apasionante campo de la neurología.*



## INDICE

Resumen.....	Pág 5
Abstract.....	Pág 6
1. Introducción.....	Pág 7
1.1 Desarrollo embrionario del sistema nervioso central.....	Pág 7
1.2 Sonic Hedgehog.....	Pág 10
1.3 Poblaciones dopaminérgicas.....	Pág 10
1.4 Parkinson.....	Pág 11
2. Objetivo establecido.....	Pág 12
3. Hipótesis de estudio.....	Pág 13
4. Material y métodos.....	Pág 14
5. Resultados.....	Pág 20
6. Discusión.....	Pág 22
7. Conclusiones.....	Pág 24
8. Anexos.....	Pág 25
9. Bibliografía.....	Pág 29

## RESUMEN

**Introducción:** La expresión de la proteína Sonic Hedgehog en la placa del suelo juega un papel importante en la especificación, diferenciación y supervivencia de todas las poblaciones basales del sistema nervioso central. Entre estas poblaciones neuronales nos encontramos las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del mesencéfalo que producen el neurotransmisor dopamina.

**Objetivo:** demostrar el papel de Shh en la determinación de las neuronas dopaminérgicas describiendo las alteraciones en el desarrollo de las mismas en un modelo de ratón transgénico con falta de función de Shh en la región de interés.

**Hipótesis de trabajo:** Sonic Hedgehog es un factor indispensable en la especificación y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta del mesencéfalo.

**Material y métodos:** Este estudio se ha llevado a cabo con material procedente de ratones C57BL/6J, o ratones wild type (línea silvestre) y ratones con falta de función de Shh en la región de interés mediante técnicas histológicas y de inmunohistoquímica.

**Resultados:** En el primer caso se ha perdido la expresión del gen *Shh*. En el segundo caso se observa la desaparición del surco limitante de His y una distribución diferente de las neuronas dopaminérgicas. En el tercer caso se observa la desaparición de neuronas dopaminérgicas en la zona de la fuente invertida y presencia de ellas en la zona de la sustancia negra pars compacta.

**Discusión:** Ante la falta de función de Shh la determinación de las neuronas dopaminérgicas se encuentra comprometida. La presencia reducida de estas neuronas en nuestro modelo experimental implica que existen diversos mecanismos genéticos para generar este tipo neuronal.

**Conclusiones:** Las neuronas dopaminérgicas componen una población heterogénea y dependen parcialmente de Shh para su especificación aunque la determinación de todo el territorio basal se encuentra afectada por la mutación.

**Palabras clave:** Sonic Hedgehog, mesencéfalo, sustancia negra, neuronas dopaminérgicas.

## ABSTRACT

**Introduction:** The expression of Sonic Hedgehog protein in the floor plate plays an important role in specification, differentiation, and survival of all basal CNS populations. In that neuronal populations we found the dopaminergic neurons of the substantia nigra of the midbrain and they produce dopamine.

**Objective:** Demonstrate the role of Shh in the determination of dopaminergic neurons describing the variations in their growth by a genetically modified mouse without Shh function in the interest region.

**Working Hypothesis:** Sonic Hedgehog is an essential part in the specification and differentiation of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta in the midbrain.

**Materials and methods:** This study has been done with material of mice C57BL/6J, or Wild Type mice and mice without Shh function in the interest region with histologic and immunohistochemical methods

**Results:** In the first case there isn't expression of Shh gene. In the second case we analyze the disappearance of the limit groove of HES1 and a different distribution of the dopaminergic neurons. In the third case we analyze the dopaminergic neurons disappearance in the inverted fountain and presence of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta.

**Discussion:** Without Shh function, the dopaminergic neurons determination is problematic. The limited presence of these neurons in our experimental model entail that there are some ways to produce this neuronal type.

**Conclusions:** Dopaminergic neurons form a heterogeneous population and it depends partially of Shh, but the determination of all the basal zone is affected by the mutation

**Key words:** Sonic Hedgehog, midbrain, substantia nigra, dopaminergic neurons

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Desarrollo embrionario del sistema nervioso central

El sistema nervioso central de los seres humanos así como el de vertebrados deriva de la placa neural, que es la zona paramediana engrosada y alargada de la parte central del ectodermo, el cual se forma por la capa de células más externa del embrión que dará origen al sistema nervioso y la hipófisis<sup>(1)</sup>.

A partir de la placa neural y mediante un proceso llamado neurulación primaria se forma el tubo neural. Este proceso ocurre a medida que crece la placa neural y sus bordes se elevan para formar los pliegues neurales, hundiéndose a la vez la región de la línea media y por consiguiente formando el canal neural. El tubo neural se forma en el momento en el que los pliegues acaban encontrándose en el plano dorsal. Una vez que se encuentra cerrado, comienzan a determinarse los principales territorios en el eje anteroposterior. El proceso de formación de estas subdivisiones se conoce con segmentación<sup>(1,2)</sup>.

El tubo neural temprano se encuentra a su vez dividido en el eje dorsoventral en una serie de dominios, que son: placa del suelo, placa del techo y placas laterales a ambos lados. En la mayor parte del tubo neural se desarrolla un surco ventricular longitudinal llamado *surco limitante de His*, el cual divide las placas laterales de cada lado en una placa basal o ventral donde se desarrollarán los centros motores primarios y una placa alar o dorsal donde se desarrollarán los centros sensitivos primarios.<sup>(1,4)</sup>

El patrón ventral es impuesto por la notocorda (estructura del mesodermo axial) mientras que el patrón dorsal es inducido por la zona de transición entre placa neural y ectodermo (futura epidermis).

La especificación del eje dorsoventral es explicada por dos factores paracrinos principales; la proteína Sonic Hedgehog (SHH) desde la región ventral y proteínas TGF-Beta desde la región dorsal. En regiones específicas del tubo neural se localizan unas señales conocidas como organizadores secundarios. Tales regiones son 3, borde neural anterior (BNA), zona limitans intratálámica (ZI) y

organizador ístmico (Ist). Se encargan de codificar moléculas señalizadoras estableciendo identidades regionales y polaridad de las células neuroepiteliales.<sup>(6)</sup>

Las regiones formadas en el eje anteroposterior a partir de la segmentación son el prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal.

El prosencéfalo es la parte más anterior del cerebro y en él ocurre ulteriormente la evaginación óptica, evaginación bilateral de la parte dorsolateral, donde se formarán los bulbos olfatorios a cada lado y por último la formación de los ventrículos laterales. La porción más rostral formará parte del telencéfalo. En el telencéfalo se encuentran los ganglios basales. El diencéfalo se desarrollará a partir de la porción caudal.<sup>(1,4)</sup>

El mesencéfalo es la estructura superior del tronco del encéfalo también conocida como *cerebro medio*. Une el puente troncoencefálico y el cerebelo con el diencéfalo. Se desarrolla a partir de una vesícula encefálica primaria y tendrá función de conducción y control de los impulsos motores que van desde la corteza cerebral a la espina dorsal. También es responsable de los impulsos sensoriales que se manifiestan en la médula espinal.<sup>(7)</sup>

Se compone por dos partes fundamentales: el tectum y el tegmentum.

El tectum se localiza en la región dorsal del mesencéfalo. Sus principales estructuras son los tubérculos cuadrigéminos superiores, los cuales intervienen en el sistema visual, en concreto en los reflejos y respuestas a estímulos, y los cuadrigéminos inferiores que forman parte del sistema auditivo.

El tegmentum está compuesto por varios núcleos encargados de controlar los movimientos oculares, núcleo rojo, sustancia negra y área tegmental ventral. Todo esto se denomina formación reticular. Ocupa la zona desde el mesencéfalo hasta el bulbo raquídeo teniendo funciones sensoriales, de control del sueño, activación del tono muscular, movimiento y reflejos vitales.

El núcleo rojo y la sustancia negra participan en el control del sistema motor. La sustancia negra posee diversas proyecciones de axones que controlan el movimiento hacia los núcleos caudado y

putamen que son los núcleos de los ganglios basales. La Sustancia negra está formada por la parte Pars reticulata, compuesta por neuronas gabaérgicas y la parte Pars compacta, compuesta por neuronas dopaminérgicas.

El rombencéfalo se encuentra entre el mesencéfalo y la médula espinal. Las superficies de las porciones caudal (mielencefálica) y rostral (metencefálica) se aproximan entre sí y la parte interpuesta del cuarto ventrículo, el cual se encuentra en tal región, se angosta mucho. En el rombencéfalo se forman el bulbo raquídeo que controla funciones como la respiración, frecuencia cardíaca y presión arterial. además, es el punto donde se cruzan los nervios que provienen de centros superiores del cerebro o que se dirigen a ellos. También se forma por la protuberancia anular que conecta el bulbo raquídeo y la médula espinal con estructuras superiores como el cerebro o cerebelo. En el rombencéfalo también se encuentra el cerebelo, responsable de ciertos reflejos y coordinación de movimientos corporales.

La médula espinal es un cordón formado por tejido nervioso que ocupa toda la longitud del conducto raquídeo. En cada uno de los engrosamientos que posee en las regiones superior e inferior se encuentran las células nerviosas destinadas a la inervación de la piel y musculatura de las extremidades superiores e inferiores. <sup>(7)</sup>

A partir del tubo neural primitivo proliferan los neuroblastos. Los neuroblastos darán lugar a distintos tipos de células nerviosas diferenciadas. Después de su nacimiento migran lejos de sus zonas proliferativas de origen dirigiéndose hacia sus posiciones finales en determinados grupos celulares diferenciados que darán posteriormente lugar a la formación del sistema nervioso.

## 1.2 Sonic Hedgehog

La placa basal se origina bajo la influencia de Sonic Hedgehog (Shh), perteneciente a la familia *Hedgehog*. Se reconoce su origen primario desde la notocorda y su vía de señalización es esencial en embriogénesis ya que se encuentra implicada en múltiples órganos donde controla la especificación de los distintos tipos celulares, proliferación o supervivencia celular. Shh constituye una serie de factores paracrinos que a menudo son utilizados por el embrión para inducir tipos celulares específicos y crear límites entre los tejidos de regiones mediales del cerebro y médula espinal creando una función señalizadora. La expresión de *Shh* en la placa del suelo juega un papel importante no solo en la especificación y diferenciación sino en la supervivencia de todas las poblaciones basales del sistema nervioso central. Puede actuar tanto ligada a la membrana de la célula donde ha sido procesada como difundiendo tras ser procesada.<sup>(1)</sup> Entre estas poblaciones neuronales nos encontramos las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del mesencéfalo, las cuales requieren la señalización mediada por Shh y Fgf-8. Cuando esta señalización viene precedida por FGF-4, las células se diferencian hacia el fenotipo serotoninérgico a expensas del fenotipo dopaminérgico.<sup>(3)</sup>

## 1.3 Poblaciones dopaminérgicas.

Las neuronas dopaminérgicas son las encargadas de producir el neurotransmisor dopamina. Debido a la naturaleza del presente estudio, nos centraremos específicamente en aquellas poblaciones dopaminérgicas que se encuentran presentes en la sustancia negra pars compacta y en el área tegmental ventral, localizadas en la región del mesencéfalo y diencefalo. Pueden dividirse en tres grupos según su función; regulación de movimientos, comportamiento emocional y funciones

relacionadas con el lóbulo frontal tales como cognición, memoria, comportamiento y pensamiento abstracto.<sup>(3)</sup> Las disfunciones en las neuronas dopaminérgicas se encuentran implicadas en trastornos neuropsiquiátricos incluyendo adicciones y esquizofrenia si los niveles de dopamina se encuentran elevados, mientras que una degeneración en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra es la clave neuropatológica que caracteriza la enfermedad de Parkinson.<sup>(5)</sup>

#### **1.4 Parkinson**

La enfermedad de Parkinson es un trastorno del sistema nervioso central crónico y progresivo caracterizado por una degeneración de las neuronas dopaminérgicas que se encuentran en la sustancia negra de los ganglios basales sin etiología definida, aunque se suele asociar a factores genéticos y ambientales. Debido a la presente degeneración se produce un déficit en la formación de dopamina, la cual tiene como función transmitir información para un correcto control de los movimientos. Las consecuencias de tal déficit son que los receptores dopaminérgicos situados en el cuerpo estriado no reciben las cantidades adecuadas de dopamina, y tal hecho se traduce en una presencia de rigidez, lentitud de movimientos, inestabilidad postural y temblor, pero además de los síntomas motores, se sufren alteraciones cognitivas, psiquiátricas, del sueño, oculomotoras, de la voz y deglución entre otras. Tales alteraciones asociadas a la enfermedad requieren una constante redefinición de necesidades debido a su progresión. Tales necesidades deben estar relacionadas con una adopción de estrategias que determinen un aumento de la autonomía y calidad de vida perdidas.<sup>(5)</sup>

**Abreviaciones:** Shh (Sonic Hedgehog), BNA (Borde neural anterior), zona limitans intratalámica (Zl) y organizador istmico (Ist)

### **OBJETIVO ESTABLECIDO**

El objetivo del presente estudio es demostrar el papel de Shh en la determinación de las neuronas dopaminérgicas describiendo las alteraciones en el desarrollo de las mismas en un modelo de ratón transgénico con falta de función de Shh en la región de interés.



## **HIPÓTESIS DE ESTUDIO**

La hipótesis establecida en el presente estudio de investigación es que Sonic Hedgehog es un factor indispensable en la especificación y diferenciación de la neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta del mesencéfalo y diencefalo.



## MATERIAL Y MÉTODOS

Para comprobar la hipótesis establecida, hemos realizado un estudio de investigación en el laboratorio del Dr. Puelles, situado en el Instituto de Neurociencias de San Juan de Alicante en el periodo comprendido entre los meses de enero y febrero.

Se ha utilizado el ratón como modelo animal para llevar a cabo el estudio. Se trata de ratones C57BL/6J, o ratones *wilde type* (línea silvestre), provenientes del animalario del instituto de Neurociencias. Son ratones “inbred”, es decir, genéticamente idénticos, que presentan una variabilidad interindividual tan pequeña que el componente genético no necesita ser considerado una variable en las investigaciones. Los ratones fueron tratados de acuerdo a las regulaciones y leyes de la Unión Europea (Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de julio de 2003) y del Gobierno Español (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero de 2013) sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

Se han utilizado también ratones a los cuales se les ha eliminado la función de Shh en la región de interés y por tanto se les llamará *mutantes*. La mutación localizada en el espacio de Shh se realiza mediante la técnica de la endonucleasa cre. Esta endonucleasa reconoce unas secuencias específicas, llamadas flox, y provoca la pérdida del segmento nucleico incluido entre estas secuencias. En nuestro caso la expresión de la endonucleasa está dirigido por el gen *Engrailed1* (expresado a ambos lados del organizador ístmico).

El periodo gestacional de un ratón dura alrededor de 18 días y las neuronas dopaminérgicas comienzan a observarse a partir del día 12, por tanto se han escogido 4 embriones de los siguientes estadios teniendo en cuenta que el día en el que se detecta la cópula se toma como estado E0.5.

→ 2 embriones de 12 días y medio (E12,5). Uno de ellos *Wilde Type* y otro *Engrailed1Cre Shh FloxFlox*

→ 2 embriones de 16 días y medio (E16,5). Uno de ellos Wilde Type y otro mutante

Se recogerán muestras del mesencéfalo del embrión desde un plano frontal, se incluirán en un portaobjetos y se les realizará una tinción por inmunohistoquímica para poder observar mediante microscopio si existen diferencias en la formación de neuronas dopaminérgicas entre la muestra de ratón mutante y la de ratón silvestre. Posteriormente se realizarán fotos para establecer la comparación entre ambas muestras. Tales procedimientos se realizaron mediante una serie de técnicas histológicas e inmnohistoquímicas.

### 1.Fijación de los embriones

En primer lugar se realizará un proceso de fijación. Este proceso tiene la finalidad de impedir las modificaciones post mortem que pueda sufrir el tejido manteniendo la estructura morfológica sin que ocurran cambios notables en células y tejidos. Los embriones fueron recolectados por personal del laboratorio acreditados para manipular animales de experimentación. Se trataron los embriones en Paraformaldehido al 4% en PBS durante una noche. Al día siguiente se lavaron en PBS para retirar el exceso de fijador.

Una vez fijados, se obtuvo una muestra de ADN cromosómico de cada embrión. Estas fueron procesadas por PCR para detectar las mutaciones introducidas y así identificar los embriones mutantes de los silvestres.

El siguiente paso fue la deshidratación que es la extracción de agua de los tejidos fijados antes de introducirlo en parafina. Este paso se realizó debido a que la parafina no es miscible en agua e implica que para que la parafina pueda entrar completamente en el tejido ha de sustituirse el agua por un solvente orgánico (butanol). Para tal fin se utilizó alcohol etílico en distintas graduaciones, se procesaron los embriones en cuatro baños con alcoholes crecientes de 25°, 50°, 75° y 100°

progresivamente y posteriormente se hicieron dos baños en Butanol debido a que la parafina no es miscible en etanol.

## 2. Inclusión en parafina

Tras la deshidratación se pasó el embrión a parafina previamente situada en una estufa para que adquiriese una conformación líquida. Se introdujeron los embriones durante un tiempo determinado y esa parafina se sustituyó tres veces.

Cuando se realizaron los tres baños en parafina se incluyó la muestra en un molde con parafina con la finalidad de que se solidificase con la muestra en el interior. Se orientaron los embriones dentro del molde de tal manera que se pudiera realizar el corte frontal de los mismos.

## 3. Corte de la muestra en microtomo y monta en portaobjetos

Cuando la parafina se solidificó, se procedió a realizar el corte de los embriones. Se empleó el microtomo, el cual realiza cortes precisos de 10 micras del bloque de parafina que contiene el embrión. El corte de la muestra tiene la finalidad de que puedan ser visibles los resultados en el microscopio.

Cuando obtuvimos las muestras, se procedió a montarlas en el portaobjetos. Para realizar este paso se colocaron las muestras en un *baño de flotación* con agua destilada a una temperatura de 40-45°C para que se estirasen completamente antes de introducirlas en el portaobjetos. Cuando se estiraron, se colocaron en el portaobjetos.

Los portaobjetos estaban numerados y cada muestra se colocó en orden morfológico en cada uno de ellos.

Una vez montados los portaobjetos, se colocaron en un horno a una temperatura de 37°C para eliminar cualquier resto de líquido y así las muestras quedaron completamente adheridas al portaobjetos.

Posteriormente se introdujeron los portaobjetos en un horno a 95°C durante 40 minutos para derretir y así facilitar la retirada de la parafina.

El siguiente paso fue desparafinar las muestras introduciendo los portaobjetos en Xilol, realizando dos baños de 10 minutos.

Se procedió a hidratar también los portaobjetos introduciendolos en etanol, siguiendo el orden de 2 baños en etanol 100°, 2 baños en etanol 96° y uno en etanol 70° por último se introdujeron en agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>).

Previamente a la técnica de inmunohistoquímica, se introdujeron las muestras en Pt Link, un dispositivo destinado para el pretratamiento de las muestras por coloración. En concreto, tal dispositivo realiza un desenmascaramiento de los epítomos del tejido para favorecer su detección con anticuerpos específicos.

#### 4. Inmunohistoquímica

Cuando se extrajeron las muestras de Pt Link se procedió a realizar inmunohistoquímica a las mismas, con la finalidad de demostrar la variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados mediante técnicas de inmunotinción. Se utilizaron técnicas de inmunoperoxidasa aplicando un complejo avidina-biotina ligada a peroxidasa (AB Complex) en oscuridad. Previamente a tratar la muestra con el complejo avidina-biotina, se incubaron dos anticuerpos el anticuerpo primario anti-Tirosina hidroxilasa realizado en conejo y un anticuerpo secundario anticonejo realizado en cabra biotinilado.

##### *Protocolo:*

3 lavados con PBS-T (100ml PBS 10x Inmuno + 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> + 1ml Tritón 0,1%) [3 lavados 7min]

1 lavado de 30 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en oscuridad (0,15 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 10ml PBS-T)

3 lavados de 7 minutos con PBS-T

1 lavado de 1 hora con solución de bloqueo (BSA 1%+ Lisina 1M)

Incubación de Ac Primario 1:500 (20 ( ) L Ac + 10 ml Lisina-BSA-Azida)[Toda la noche]

3 lavados de 7 minutos con PBS-T

Incubación de Ac Secundario 1:200 (20 () L Ac + 6ml BSA) [1 hora]

3 lavados de 7 minutos con PBS-T

Adición de complejo AB en oscuridad preparado 30 minutos antes a 4° en oscuridad. [1 hora]

(20 () L A + 20()L B+ 6ml PBS-T)

2 lavados de 10 minutos con Tris 0,05 M (25 ml Tris + 475 ml H2O)

Revelado con DAB en oscuridad (1 ml DAB+100ml Tris 0,05 M+6 () L H2O2)

2 lavados con Tris 0,05 M

#### Explicación del protocolo:

El primer paso son 3 lavados con PBS- T. El tritón actúa como detergente creando poros para que el anticuerpo pueda introducirse en el tejido mejor.

La adición de agua oxigenada bloquea la actividad de la peroxidasa endógena ya que es importante evitar su función.

Con la adición del bloqueo se evitan uniones inespecíficas del anticuerpo con el tejido, permitiendo solamente uniones específicas de Ag.

En la incubación del Ac primario se añade azida para la conservación del anticuerpo y su tejido. También para su reutilización. Se debe de añadir el complejo AB para que el anticuerpo 2° pueda estar biotinilado y reaccionen entre ellos.

Se reveló la muestra con DAB (diaminobenzidina tetrahidroclorhídrica) junto con agua oxigenada en oscuridad. Se le añade Tris ya que en su presencia ambos compuestos actúan mejor. El compuesto DAB al ser modificado por la peroxidasa se vuelve insoluble y produce un precipitado de color marrón. El tiempo que deben estar las muestras en tal complejo se estima mediante la comprobación

progresiva en microscopio de las muestras y la tinción que están obteniendo mientras se encuentran inmersas en el mismo.

Por último se realizan dos lavados con Tris para eliminar el exceso de reactivo

#### 5. Cubrir el portaobjetos

Cuando el tejido obtuvo la tinción se introdujeron las muestras en etanol con un orden creciente (70°, 96° y 100°) y posteriormente se hicieron dos lavados en Xilol. Posteriormente se comenzó a poner los cubres en el portaobjetos, adheridos con un pegamento llamado *Eukit* para sellar la muestra y que no resultase alterada con un agente externo. Cuando se colocaron los cubres adecuadamente se expusieron los portas a secado.

#### 6. Foto a la muestra

Por último, tras el secado se procedió a realizar fotos a las muestras resultantes mediante un microscopio electrónico. Se captó la muestra con un aumento de 26x.

**Abreviaciones:** Ac (anticuerpo), Ag (antígeno)

## 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. La comparación se establece observando el corte frontal en el mismo punto del mesencéfalo en ambos ratones.

Previamente a nuestro análisis de la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas aprovechamos material previamente generado en el laboratorio del Dr. Puelles para confirmar la mutación condicional del gen *Shh*. Por la técnica de hibridación in situ con sondas de ARN antimensajero podemos poner de manifiesto las regiones del embrión donde se expresa un gen. En la figura 1A podemos ver un embrión completo de estadio E10.5 en el que se observa de color azul la región de expresión del gen *Engrailed 1* (*En1*). Esta zona será positiva para la endonucleasa *cre* y por lo tanto será la región donde se perderá la expresión del gen *Shh*. En la figura 1B y C, mostramos una hibridación in situ con dos colores en cerebros seccionados por la línea media de embriones de estadio E12.5. La expresión de los genes *Shh* (azul) y *Fgf8* (rojo) en cerebros silvestres (Fig.1B) y en cerebros mutantes (Fig.1C)

En la figura 1C, exponemos el cerebro mutante  $En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}$ . Las dos flechas delimitan la zona que cubre el territorio mesencefálico y rombencefálico donde se ha expresado el gen *En1*. En este territorio se ha activado la endonucleasa *cre*, eliminando la función de *Shh* por lo que no se aprecia su presencia representada con color azul. Se observa que en dicha zona, *Fgf8* sigue presente en el organizador ístmico.

En la figura 2 podemos ver un corte frontal en el que se contempla el cerebro desde una posición dorsoventral de la zona del mesencéfalo del tubo neural de dos embriones E12.5. La figura 2A corresponde al cerebro del embrión WT y podemos apreciar la presencia de neuronas dopaminérgicas con color marrón a lo largo de los dominios centrales de la placa del suelo. La línea discontinua

determina la presencia del *surco limitante de His* delimitando la placa basal de la placa alar. En el mismo corte se aprecian también la placa alar y la placa del techo, por lo tanto tenemos representados los cuatro dominios dorsoventrales del mesencéfalo. La figura 2B corresponde al cerebro del embrión mutante y podemos observar que hay presencia de poblaciones dopaminérgicas pero éstas abarcan un espacio menor y tienen una distribución distinta en comparación con la figura 2A. Se ha señalado con una flecha que ha desaparecido el surco limitante de His que delimita la placa basal de la placa alar. Esto nos indica que la falta de función de Shh está provocando un efecto en la determinación de la placa basal mesencefálica. Podemos apreciar que la parte superior de la placa alar y la placa del techo no sufren diferencias en comparación con la figura 2A.

En la figura 3 se observa un corte frontal en el que se observa el cerebro desde una posición dorsoventral de la zona del mesencéfalo del tubo neural de dos embriones E16.5. La figura 3A se corresponde con el cerebro del embrión WT y podemos apreciar con un color marrón la presencia de las poblaciones dopaminérgicas en la placa del suelo. Se encuentran distribuidas abarcando el Área tegmental ventral, especialmente donde se encuentra la llamada *fuentes invertidas*, parte central de la placa del suelo y llegando a los bordes que delimitan el acueducto de Silvio en su parte posterior. En los dominios de la sustancia negra pars compacta se observa la abundante presencia de neuronas dopaminérgicas. La figura 3B corresponde al cerebro del embrión mutante y observamos que la flecha señala que en la zona de la fuente invertida, a ambos lados de la placa del suelo, no hay apenas presencia de neuronas dopaminérgicas. Contemplamos también que las zonas distales de la placa del suelo, en los dominios de la sustancia negra, había presencia de neuronas dopaminérgicas pero en notable menor abundancia que en la figura 3A.

**Abreviaciones:** En1 (Engrailed 1), WT (Wilde Type)

## DISCUSIÓN

La especificación y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y del área tegmental ventral depende de la función de Shh junto a Fgf8 desde el istmo. Los resultados descritos en el presente trabajo nos muestran que ante la falta de función de Shh la determinación de las neuronas dopaminérgicas se encuentra comprometida. La presencia reducida de estas neuronas en nuestro modelo experimental implica que existen diversos mecanismos genéticos para generar este tipo neuronal.

En el caso de la figura 2A, es congruente que posea más neuronas dopaminérgicas que la figura 2B por el motivo anteriormente citado. Algunas neuronas consiguen especificarse pero en un número mucho menor. La ausencia del surco limitante de His implica que la delimitación entre la placa alar y basal está afectada. Lo que implica que la determinación de todo el territorio basal del mesencéfalo se encuentra afectado por la mutación.

En la figura 3 se puede conservar con más claridad el aspecto definitivo y la organización que tendrán las neuronas dopaminérgicas en la placa del suelo y en la placa basal ya que el embrión se encuentra en una fase cercana al fin del proceso gestacional. La distribución final de estas neuronas en el embrión silvestre se asemeja a una fuente invertida. Con el área tegmental central localizada en la línea media y la sustancia negra pars compacta en una posición más lateral. La afectación en el embrión mutante nos hace suponer que la función de Shh es vital en la zona cercana a la placa del suelo ya que todo este territorio está fuertemente afectado mientras que las neuronas dopaminérgicas remanentes se concentran en el espacio lateral.

En el trabajo de investigación realizado se constata la relevancia de la señalización y diferenciación de neuronas dopaminérgicas por parte de Shh. Debido a que Fgf8 no ha sido eliminado, se ha podido observar con más detalle qué poblaciones dopaminérgicas dependían de la expresión de Shh mediante la comparación de los embriones WT y mutantes.

Los resultados obtenidos tiene una relevancia clínica ya que hemos demostrado que la población dopaminérgica no es homogénea. Existen diversos tipos neuronales que son especificados por

diferentes mecanismos genéticos. Sería interesante como futura línea de investigación descubrir si estos diferentes tipos de neuronas dopaminérgicas contestan de forma diferente a los tóxicos que provocan su muerte y la aparición del Síndrome de Parkinson.



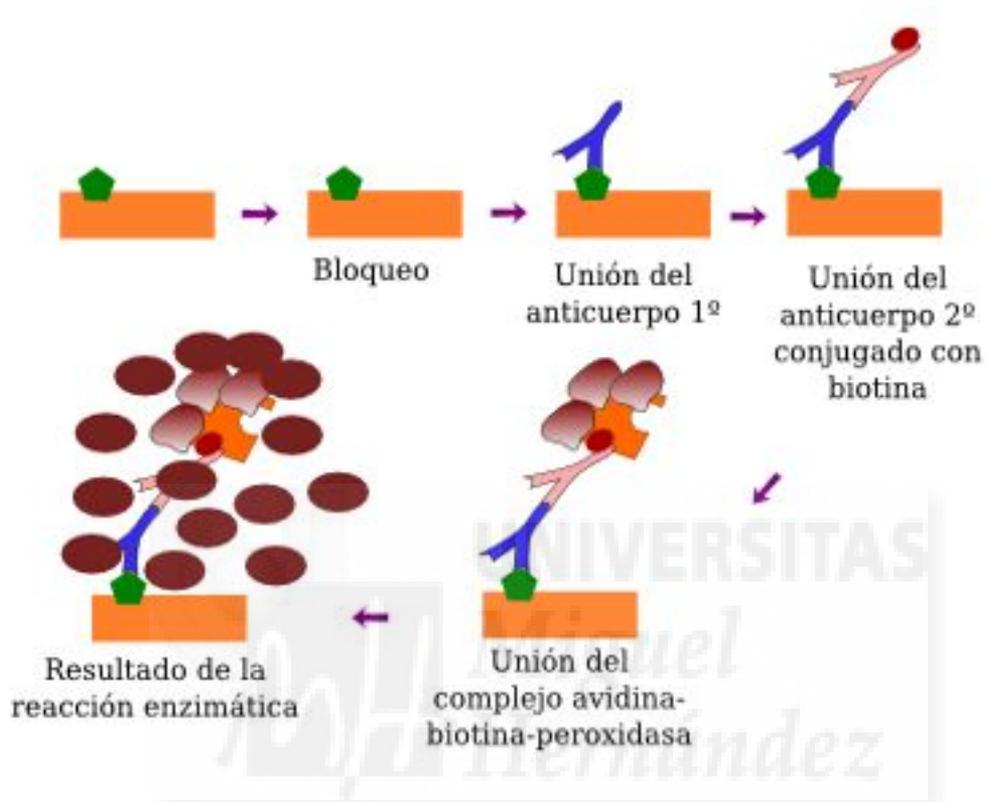
## CONCLUSIONES

1. Las neuronas dopaminérgicas dependen parcialmente de Shh para su especificación.
2. Las neuronas dopaminérgicas situadas lateralmente no dependen de Shh.
3. Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo componen una población heterogénea.
4. La determinación de todo el territorio basal se encuentra afectada por la mutación

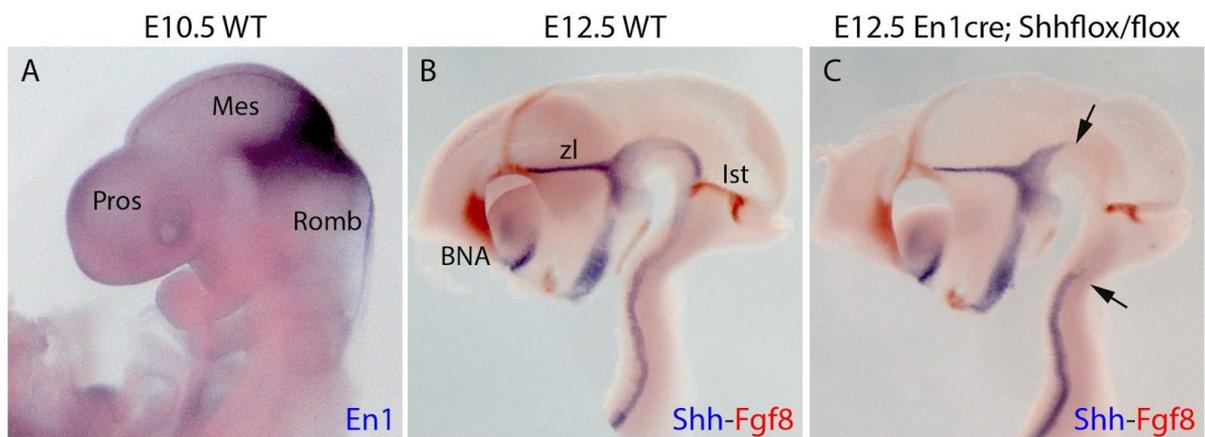


## ANEXOS

Esquema. Técnica de inmunohistoquímica



**Figura 1.** Caso 1



**2a.** Embrión completo de estadio E 10,5 en el que se expresa el gen En1 en la región de color azul **2b.**

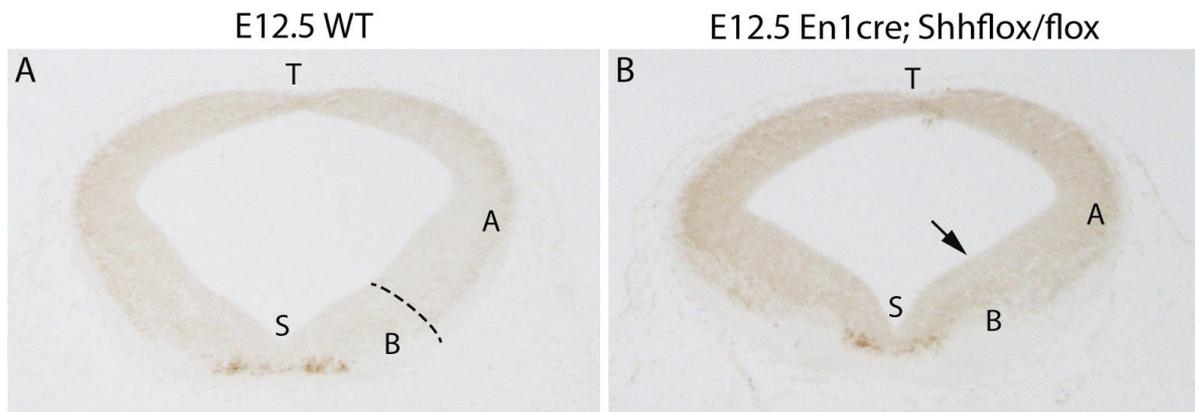
Embrión de estadio E12,5 WT en el que se observa la presencia de Shh de color azul y la presencia de

Fgf8 de color rojo **2.c** Embrión de estadio E12,5 En1 en el que se observa la ausencia de Shh en la

región de interés

**Abreviaciones:** En1 (Engrailed 1), WT (Wilde type), Shh (Sonic Hedgehog)

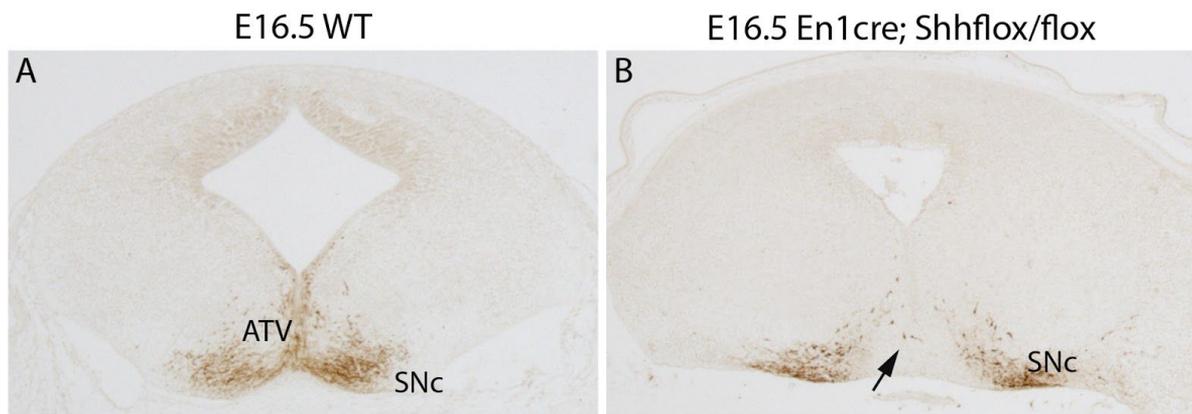
**Figura 2.** Caso 2



Corte frontal de la zona dorsoventral del mesencéfalo de dos embriones E12,5 **3a.** Corte perteneciente al embrión WT donde se observa la presencia de neuronas dopaminérgicas de color marrón en la placa del suelo y el surco limitante de His señalado con una línea discontinua. **3b.** Corte perteneciente a En1 donde se observa la presencia de neuronas dopaminérgicas de color marrón y la ausencia del surco limitante de His

**Abreviaciones:** T (Placa del techo), A (Placa alar), B (Placa basal), S (Placa del suelo), WT (Wilde Type), En1 (Engrailed 1)

**Figura 3.** Caso 3



Corte frontal de la zona dorsoventral de dos embriones E16,5. **3.a** Corte perteneciente al embrión WT donde se observan las poblaciones dopaminérgicas de color marrón ocupando la zona de la SNc y zona de la fuente invertida. **3.b.** Corte perteneciente al embrión En1 donde se aprecia con una flecha la ausencia de poblaciones dopaminérgicas en la zona de la fuente invertida y presencia de las mismas en la zona de la SNc.

**Abreviaciones:** ATV ( Área tegmental ventral), SNc (Sustancia negra pars compacta), WT (Wilde type), En1 (Engrailed 1)

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gilbert SF (2005). «Biología del Desarrollo». *Editorial Médica Panamericana, Inc.* (7 edición). pp. 426-429.
2. Wolpert Jessel et. al. (2007). *Principios del Desarrollo*. Tercera Edición, Capítulo 10. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.
3. Parga Martín, J. (2009). *Generación de neuronas dopaminérgicas a partir de células madre neurales mesencefálicas*. [Santiago de Compostela]: Universidade de Santiago de Compostela, Servizo de Publicacións e Intercambio Científico.
4. Wolpert, L. and Ferrán, J. (2010). *Principios del desarrollo*. Madrid [etc.]: Médica Panamericana. pp. 394
5. Micheli, F. (1998). *Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
6. Martínez, S. *Mecanismos generales del control molecular de la formación de las regiones del cerebro durante el desarrollo*. [Internet]. (2011) [Consultado Mar, 2016] Serie VI, nº 1. Disponible en: <http://revista.isciii.es/index.php/ecemc/article/view/719/772>
7. Puelles L, Martínez S, Martínez M. *Neuroanatomía*. Madrid: Ed Panamericana; 2008

