

Papel del mutante *Sonic hedgehog* en la
determinación de las poblaciones
serotoninérgicas en el rombómero 1 de
ratón



Melisa Pinilla Riquelme

**Tutores: Fernández Jover, Eduardo; De Puelles Martínez de la Torre,
Eduardo**

4º de Biotecnología, Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Anatomía y Embriología; Área de Biología Celular

Índice

Índice	2
Resumen	3
Palabras clave	3
Abstract.....	4
Key words.....	4
I. Introducción	5
I.2. Antecedentes y objetivos.....	15
I.3. Materiales y métodos	16
I.4. Resultados	19
I.5. Discusión.....	22
I.6. Conclusiones y proyección futura.....	23
I.7. Bibliografía	24



Resumen:

El cerebro es un órgano complejo cuya determinación anatómica depende del desarrollo de patrones espaciales y temporales de diferentes procesos moleculares y celulares. Además, la determinación de la anatomía de las regiones cerebrales tiene gran importancia en la búsqueda de los mecanismos encargados de generar la complejidad cerebral.

El estudio de los mutantes $En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}$ en el rombómero 1 ha permitido comprobar la función de moléculas implicadas en la regionalización del sistema nervioso central, así como entender el papel del gen *Sonic hedgehog* en la correcta formación de las poblaciones basales y su relación con las poblaciones serotoninérgicas.

El gen *Sonic hedgehog* es un morfógeno directamente implicado en la expresión de factores de transcripción esenciales en la especificación de las poblaciones serotoninérgicas. En los resultados obtenidos en este estudio, se pudo comprobar como en el mutante, el cual carece del gen, no se observan dichas poblaciones en el rombómero 1, puesto que su manifestación depende de la especificación de la placa del suelo por *Sonic hedgehog*.

Palabras clave: *Neuroanatomía, rombencéfalo, serotonina, Shh*

Abstract:

The brain is a complex organ whose anatomical determination depends on the development of spacial and temporary patterns involving different molecular and cellular processes. Furthermore, the establishment of the anatomy of the brain regions has a major impact in the search of the mechanisms in charge of generating the neural complexity.

The study of the mutants $En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}$ in the rhombomere 1 was useful to prove the function of molecules implicated in the regionalization of the central nervous system, as well as in the understanding of the *Sonic hedgehog* role in the correct formation of the basal populations and its relation with the serotonergic populations.

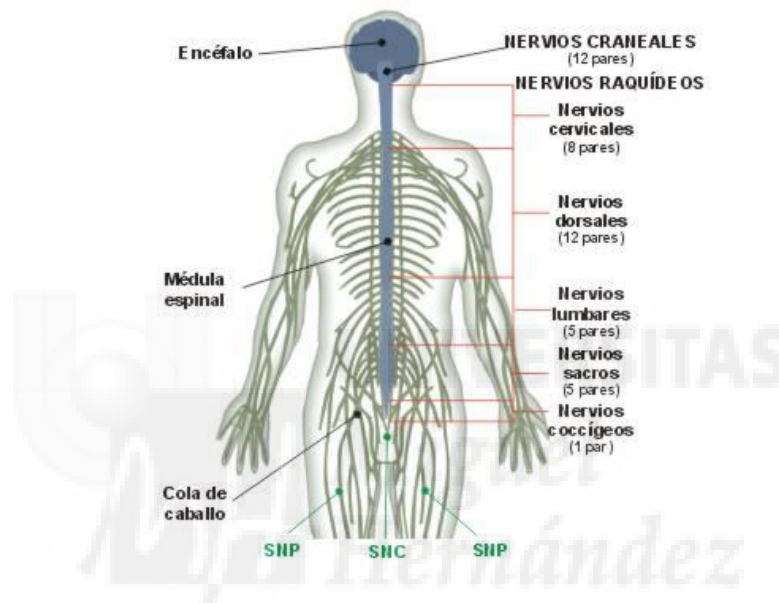
The *Sonic hedgehog* gene is a morphogen directly implicated in the expression of essential transcriptional factors in the specification of the serotonergic populations. In the results obtained in the study, it could be proved how, in the mutant mice that lack the gene, those populations were not observed in the rhombomere 1, due to the fact that its manifestation depends on the specification of the floor plate by *Sonic hedgehog*.

Key words: *Neuroanatomy, rhombencephalon, serotonin, Shh*

I. Introducción:

1.1.Introducción al sistema nervioso

El sistema nervioso es uno de los sistemas más complejos del cuerpo humano, siendo el responsable de coordinar todas las funciones del organismo. Para poder efectuar dichas funciones, el sistema nervioso se divide en central (SNC), que incluye el encéfalo y la médula espinal, y en periférico (SNP), formado por los nervios craneales y raquídeos (Esquema 1).



Esquema 1: Diagrama de organización del sistema nervioso. Copyright © 2013 Amadeo Blasco ¹

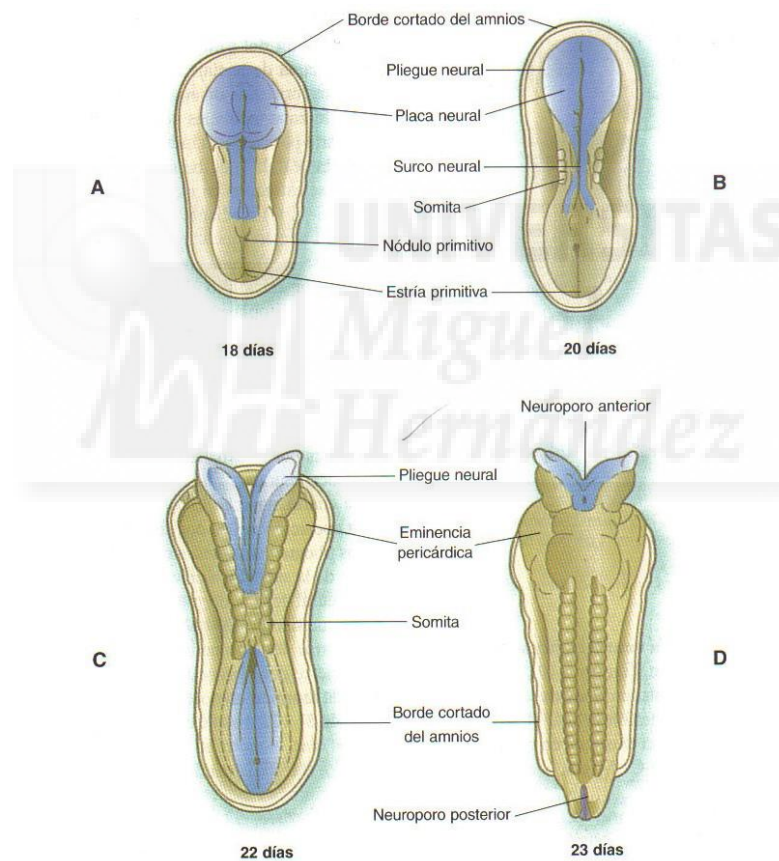
La función de ambas divisiones del sistema nervioso está altamente interconectada: la información periférica proveniente de receptores es recogida por los nervios periféricos aferentes y transmitida al SNC, donde es procesada y se emite una respuesta que es conducida por los nervios periféricos eferentes al lugar de ejecución. La perfecta integración de ambas partes es esencial para la función.

1.2.Desarrollo morfofuncional del sistema nervioso central

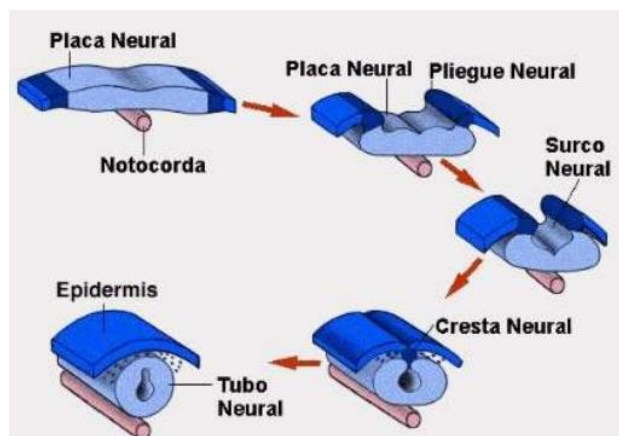
Durante la tercera semana del desarrollo embrionario en humanos tiene lugar la gastrulación, en la cual el embrión pasa de ser una estructura organizada en dos capas

(epiblasto e hipoblasto) a una organizada en tres capas (ectodermo, mesodermo y endodermo). Es en esta etapa en la que tiene lugar el establecimiento de la placa neural.

En la formación del sistema nervioso central de humanos y otros vertebrados tiene lugar un proceso de gran importancia, la neurulación. Es en dicho proceso en el cual la placa neural va creciendo, sus bordes se elevan formando los pliegues neurales, y al mismo tiempo, la región de la línea media se hunde. Los pliegues neurales terminan juntándose en la región dorsal, generándose un cilindro cerrado en la línea media llamado tubo neural. Durante la fusión de los pliegues neurales, queda una apertura transitoria en ambos extremos del tubo neural, los llamados neuroporos anterior y posterior (Esquema 2).

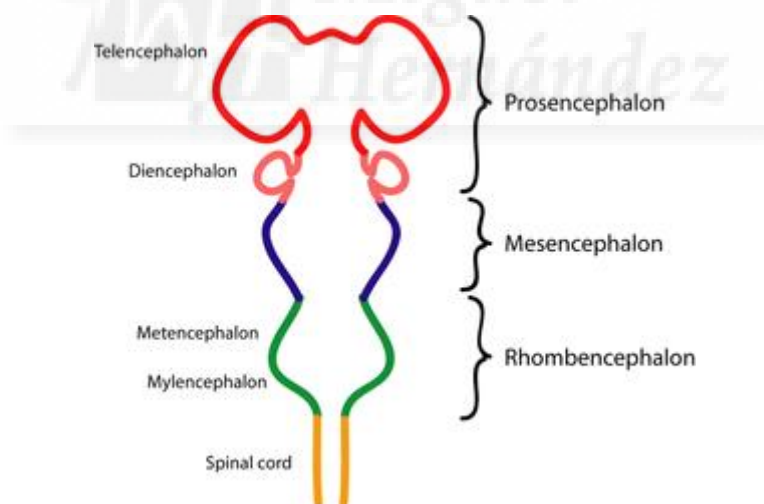


Esquema 2: Proceso de neurulación embrionaria en humanos. (A) Estadío 18 en el desarrollo embrionario en el cual se observa la placa neural y los pliegues neurales. (B) Estadío 20 en el desarrollo embrionario en el que se observa el comienzo de la fusión del surco neural en la región media de la placa neural. (C) Estadío 22 en el desarrollo embrionario en el que tiene lugar la fusión de los pliegues neurales en la región dorsal. (D) Estadío 23 en el desarrollo embrionario en el que se observa el tubo neural formado con los neuroporos anterior y posterior.²



Esquema 3: Proceso de neurulación. Se observa como tiene lugar la migración de las células de la cresta neural mientras se fusionan los bordes neurales en la línea media, dando lugar a una capa continua en la superficie que dará lugar al epitelio epidérmico.³

En el tubo neural anterior, se produce un ensanchamiento mayor que en el posterior. Es en dicho tubo neural, el anterior, en el cual se distinguen 3 dilataciones, las llamadas vesículas encefálicas primarias: prosencéfalo (Pros), mesencéfalo (Mes) y rombencéfalo (Romb). (Esquema 4)



Esquema 4: División del tubo neural en vesículas encefálicas primarias y secundarias. Se observan las 3 vesículas encefálicas primarias: Prosecencéfalo (Prosencephalon), mesencéfalo (Mesencephalon) y rombencéfalo (Rhombencephalon). A su vez, cada una de ellas se subdivide en vesículas encefálicas secundarias: Prosencéfalo en telencéfalo (Telencephalon) y diencefalo (Diencephalon), rombencéfalo en metencéfalo (Metencephalon) y mielencéfalo (Myelencephalon)⁴.

El estrechamiento observado entre el rombéncefalo y el mesencéfalo se denomina istmo o istmo del rombencéfalo y se cree que la región que lo rodea podría considerarse un segmento encefálico en sí mismo (Puelles,L. Rubenstein,J. et al., 2015).

Además, antes de que el tubo neural se cierre por completo, tiene lugar la protrusión bilateral de las vesículas ópticas, que se expanden a cada lado del prosencéfalo. A su vez, el rombencéfalo se subdivide en dos partes: metencéfalo y mielencéfalo. Lo mismo ocurre con el prosencéfalo, que se diferencia en telencéfalo y diencefalo. A este conjunto de divisiones se les denomina vesículas encefálicas secundarias, y junto al mesencéfalo y la medula espinal, conforman las seis regiones principales del SNC.

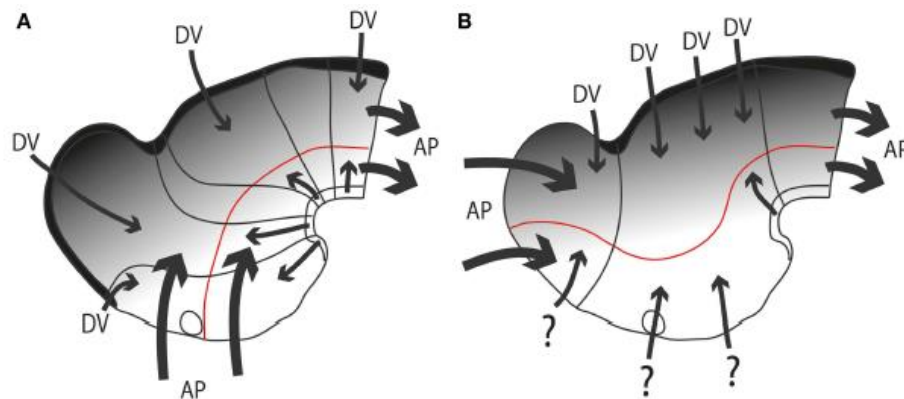
A partir del descubrimiento de genes reguladores de expresión en patrones regionales en el cerebro junto con observaciones morfológicas, se propusieron dos modelos para la interpretación del proceso de regionalización descrito del SNC:

- Un modelo topográfico o “en columnas”, construido con el objetivo de salvar la clásica interpretación de las regiones cerebrales de acuerdo a la localización de los surcos del diencefalo en cuatro zonas longitudinales: columnas de Herrick (1910) (Alvarez-Bolado et al., 1995).
- Un modelo topológico segmentario, conocido como el “modelo prosomérico”, construido sobre la evidencia de una serie de divisiones transversales del tubo neural, que se superponen a las zonas longitudinales primarias descritas por Hiss (Hiss, 1893a,b).

La incapacidad del “modelo en columnas” de integrar la variedad de patrones de expresión de genes observados en diencefalo e hipotálamo ha favorecido su desuso a favor del “modelo prosomérico”, que se presenta consistente con datos moleculares y morfológicos. (Puelles et al., 2004, 2012b; Shimogori et al., 2010; Diez-Roux et al., 2011). (Esquema 5)

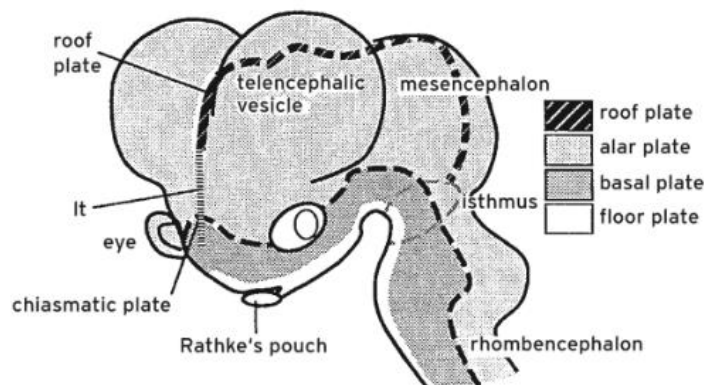
El modelo prosomérico divide el cerebro anterior en secciones transversales (neurómeros) y secciones longitudinales (columnas), que se intercalan para explicar la función cerebral. El número de neurómeros no está determinado debido a la dificultad de establecer límites las diferentes regiones, pero son constantes para todos los

vertebrados, por lo que variaciones en el patrón de expresión van a estar asociadas a cambios moleculares (Puelles, L. Rubenstein, J. et al., 2015).



Esquema 5: Diagrama ilustrando los dos tipos de modelos propuestos de regionalización del SNC. Se observa los patrones de los ejes anteroposterior (AP, flechas grandes) y dorso-ventral (DV, flechas más estrechas y cortas) y el límite alar-basal (línea roja). A) Modelo prosomérico en el cual se observan las secciones transversales llamadas neurómeros. B) Modelo en columnas en el cual se indica la falta de notocorda y placa del suelo en ciertas regiones (interrogaciones), necesarias para que tenga lugar la ventralización.⁵

La especificación de diferentes territorios longitudinales dentro del epitelio neural va a depender de la expresión espacio-temporal de moléculas directoras de los procesos histogénéticos. El patrón de distribución de dichos morfógenos a lo largo del eje dorso-ventral da lugar a una serie de divisiones conocidas, de dorsal a ventral, como placa del techo, placa alar, placa basal y placa del suelo. (Esquema 6). El otro patrón de distribución se produce a lo largo del eje antero-posterior.



Esquema 6: Ilustración de la organización longitudinal del SNC en una visión rostralateral. Se observa el patrón de distribución dorso-ventral: placa del techo (roof plate), placa alar (alar plate), placa basal (basal plate) y placa del suelo (floor plate). (Simamura et al., 1995)

1.3. Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del eje antero-posterior

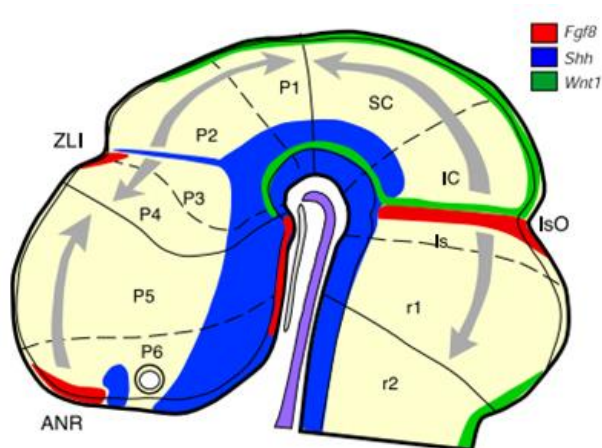
La regionalización antero-posterior subdivide la placa neural en dominios transversales (neurómeros). Las principales divisiones transversales en el SNC son el prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, el cual consta a su vez de subdivisiones llamadas rombómeros.

Una cierta regionalización inicial tiene lugar durante la gastrulación, especialmente en la parte más rostral, sin embargo no es suficiente y se requiere la regionalización de la parte más caudal de la placa neural. La regionalización de la parte más rostral de la placa neural (proencéfalo y mesencéfalo) está codificada por el gen *Otx2* entre otros, el cual va disminuyendo su expresión a medida que avanza hacia la zona más caudal del neuroeje (rombencéfalo y médula espinal). En cambio, la regionalización de la parte más caudal de la placa neural está codificada por la expresión de genes homeobox como *Gbx2* y genes *Hox*.

La lucha entre los genes *Otx2* y *Gbx2* da lugar a la aparición de un organizador neural secundario, el Organizador Ístmico (IsO). Dicho organizador incluye fuentes de señales difusibles que pasarán a los territorios vecinos rostrales y caudales, induciendo y estableciendo patrones en tejidos adyacentes.

El organizador ístmico se encuentra situado en el límite entre rombencéfalo y mesencéfalo, y expresa moléculas como el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (*Fgf8*), encargado de controlar la especificación del mesencéfalo y la parte más caudal del rombencéfalo. (Esquema 7)

Además del organizador ístmico, se han descrito otros dos organizadores secundarios: el Borde Neural Anterior (BNR o ANR) y la Zona Limitans Intratalámica (ZLI). El BNR se encuentra en el borde anterior del tubo neural, y expresa *Fgf8* y *Shh*. ZLI se sitúa a nivel del límite interprosomérico p2/p3, donde la placa basal presenta una espiga transversal que asciende dorsalmente dentro del límite p2/p3 hasta niveles cercanos al techo, y expresa *Shh* y algunos miembros de la familia *Wnt*. (Esquema 7)



Esquema 7: Representación de las principales moléculas implicadas en la regionalización del SNC de acuerdo al modelo prosomérico. Se pueden observar los organizadores secundarios, de rostral a caudal: el borde neural anterior (ANR) que expresa Fgf8 (rojo), la Zona Limitans Intratalámica (ZLI) que expresa Fgf8 (rojo) y Shh (azul), y el Organizador Ístmico (IsO) que expresa Fgf8 (rojo). Además, se observa a expresión de Shh por la placa del suelo y basal, y la expresión de Wnt (verde) por la placa del techo.⁶

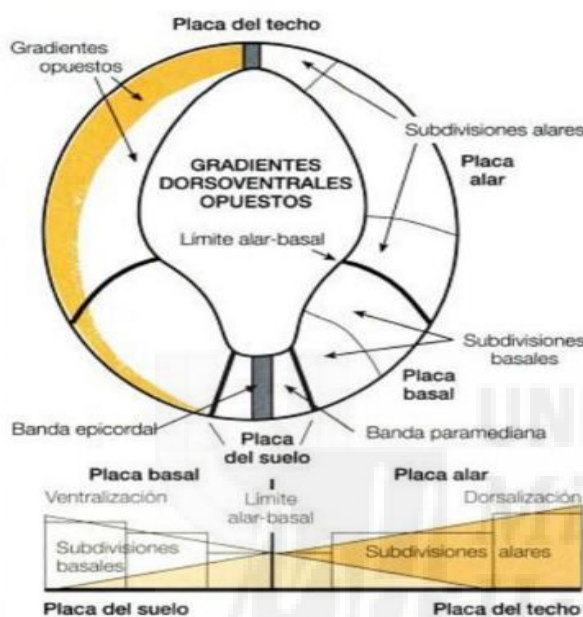
1.4. Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del eje dorso-ventral

La responsable última de la diferenciación dorso-ventral es la notocorda, una estructura cilíndrica que corre paralela a lo largo de la zona ventral del tubo neural, desde su extremo caudal hasta el comienzo del diencéfalo.

La regionalización dorso-ventral es la responsable de la formación de los diferentes segmentos longitudinales (placa del techo, alar, basal y del suelo) en el tubo neural.

La placa precordal y la notocorda adoptan el papel de fuente de señales ventralizantes verticales que actúan intensamente en áreas adyacentes, determinando la especificación de la placa del suelo, así como de los territorios adyacentes a derecha e izquierda, la placa basal. A su vez, el tejido que recubre la parte dorsal del tubo neural es una fuente de señales dorsalizantes, que se oponen a las señales ventralizantes mediante un gradiente molecular. En dicha zona dorsal se genera la placa del techo, y a ambos lados, la placa alar. (Esquema 6)

Las placas del suelo y basal solo se forman si ocurre correctamente la inducción vertical ejercida por la acción de genes como *Sonic hedgehog* (Shh), que es expresado en la placa del suelo o incluso la basal. El gen codifica a una proteína secretada difusible, SHH, que actúa induciendo la placa del suelo. Las placas alar y del techo son el resultado de la acción dorsalizante de genes de la familia de los *bone morphogenetic proteins* (BMPs), dorsalin y la familia Wnt, que codifican también a proteínas secretadas difusibles. (Esquema 8)



Esquema 8: Regionalización dorso-ventral del tubo neural. Se puede observar la parcelación longitudinal del tubo neural en placa del suelo, basal, alar y del techo. El gradiente de proteínas proveniente de la placa del suelo se opone al gradiente de proteínas de la placa del techo.^{vii}

1.5. Papel de Shh en el desarrollo del rombómero 1 en ratón

Los rombómeros son generalmente especificados por los genes Hox junto con otros morfógenos. Sin embargo, el rombómero 1 (r1) posee características especiales como el hecho de carecer de expresión de genes Hox.

r1 se encuentra situado entre IsO y r2. Además, su parte dorsal genera los hemisferios del cerebelo, y la ventral da lugar a diversas poblaciones como los núcleos del rafe.

Durante el desarrollo neural temprano, el morfógeno SHH es secretado por la notocorda, e induce la diferenciación de las células adyacentes a placa del suelo. Esta proteína, a su vez, induce su propia expresión en la placa del suelo, actuando como fuente secundaria de señales ventralizantes.

Es en los núcleos del rafe donde se observa una gran parte de las neuronas serotoninérgicas del SNC. Vamos a estudiar cómo la ausencia de Shh hace que dichas neuronas no se desarrollen en r1.

1.6. Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) es una monoamina neurotransmisora sintetizada en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central (SNC) y en las células enterocromafines (células de Kulchitsky) del tracto gastrointestinal de los animales. La serotonina también se encuentra en varias setas y plantas, incluyendo frutas y vegetales.

A través de extensa investigación, se ha demostrado que la serotonina tiene un papel en la modulación de la movilidad gastrointestinal, del tono vascular periférico, del tono vascular cerebral, en la función de las plaquetas y que está implicada en la fisiopatología de trastornos del estado de ánimo como la depresión o el trastorno bipolar.

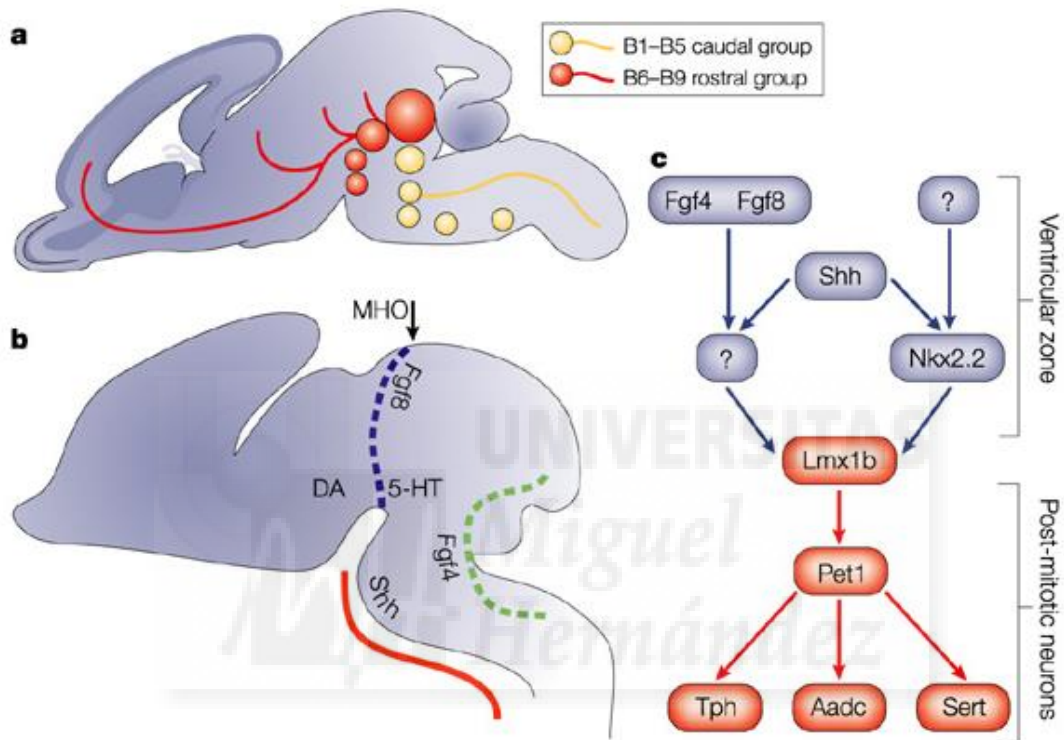
1.6.1. Poblaciones serotoninérgicas en el sistema nervioso central

Las neuronas serotoninérgicas se encuentran entre las neuronas generadas más tempranamente, y la serotonina es liberada por axones en desarrollo antes de que las sinapsis convencionales sean establecidas.

Las neuronas productoras de serotonina se encuentran localizadas en una zona restringida del cerebro. La mayoría se encuentran en los núcleos del Rafe, en la línea media del rombencéfalo. Las neuronas que contienen serotonina son conocidas como B1-B9 y se dividen principalmente en dos grupos: la división caudal (B1-B5) y la división rostral (B6-B9) (Esquema 8a). Estas neuronas son especificadas por los morfógenos Shh, Fgf4 y Fgf8. Se pudo comprobar que al desplazar el centro de organización entre el rombencéfalo y el mesencéfalo (MHO), también se producía un desplazamiento de las poblaciones serotoninérgicas. (Brodski, C. et al. 2003)⁸

Otros factores de transcripción son requeridos para establecer el fenotipo neuroquímico serotoninérgico como Lmx1, Pet1, Tph, Addc y Sert. (Esquema 8b)

La serotonina también es producida en algunas zonas de la periferia como en la glándula pineal. La diferencia entre las proteínas utilizadas para producir serotonina en el SNC y en la periferia podrían reflejar los diferentes mecanismos de especificación de neuronas serotoninérgicas.



Esquema 8: Organización de las neuronas serotoninérgicas en el SNC. a) Las neuronas serotoninérgicas se distribuyen en 9 grupos celulares (B1-B9). El grupo caudal (amarillo) proyectan la serotonina al tronco cerebral y médula espinal, mientras que el grupo rostral (rojo) la proyectan hacia el diencefalo y el telencefalo. b) Especificación de los precusores de las neuronas serotoninérgicas en el tubo neural. El factor de crecimiento 8(Fgf8) es secretado a la región de unión entre el mesencéfalo y el rombencéfalo en el MHO; el factor de crecimiento 4 (Fgf4); y Sonic hedgehog (Shh) el cual es producido por la notocorda en la línea media ventral. c) Red transcripcional que controla el fenotipo de la serotonina en los núcleos del rafe. Los factores etiquetados en azul controlan la especificación de neuroblastos hacia un fenotipo serotoninérgico en la zona caudal. Los factores etiquetados en rojo controlan la especificación de lo neuroblastos especificados hacia un fenotipo serotoninérgico funcional.⁹

1.6.2. Patologías asociadas con serotonina

La serotonina o 5^h-hidroxitriptamina (5-HT) es un neurotransmisor derivado del triptófano asociado a diversas funciones fisiológicas en el organismo.

La serotonina es parte del sistema de comunicación interna del cerebro. Dado que se trata de un neurotransmisor, lo que hace es ayudar a las neuronas a transmitir información. En concreto, altos niveles de serotonina en el cerebro hacen que un individuo se siente relajado y feliz. En cambio, cuando el cerebro produce bajos niveles de serotonina, tienen lugar procesos de enfermedades psiquiátricas como la depresión y la ansiedad, el trastorno obsesivo-compulsivo y la adicción.

La depresión es un trastorno que afecta cada vez a un mayor número de personas y sus principales síntomas cognitivos son la pérdida de memoria, falta de concentración, dificultades en ejecución de acciones y pérdida de flexibilidad cognitiva. Además, se caracteriza por una tristeza profunda y falta de vitalidad. La causa de dicho trastorno continua desconocida, pero la teoría más aceptada son bajos niveles de serotonina. Es por ello que se utilizan los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) como compuestos antidepresivos en el tratamiento de cuadros depresivos y trastornos de ansiedad. Se cree que los ISRS incrementan los niveles extracelulares del neurotransmisor serotonina al inhibir su recaptación hacia la célula presináptica, por lo que aumenta la cantidad de serotonina en la hendidura sináptica disponible para unirse al receptor postsináptico

Algunos estudios han demostrado la relación de un aumento en los niveles de serotonina con la disminución de la irritabilidad y el incremento de una mejora en las relaciones en el día a día. Además, interacciones sociales más agradables están asociadas a una mejora del estado de ánimo, dado que el apoyo social y el aislamiento social tienen gran importancia están relacionados tanto con la salud física como mental. (Young, SN)¹⁰

Además, el mensajero serotonina ha sido también asociado con el autismo. Se pudieron encontrar evidencias consistentes de anormalidades en el sistema serotoninérgico tanto a nivel fisiológico como genético al comparar pacientes con autismo con individuos que no padecen la enfermedad (Cook,E. Leventhal,B. et al., 1996; Zafeiriou,D. et al., 2009)

I.2. Antecedentes y objetivos

En estudios previos se pudieron determinar las características principales del desarrollo de serotonina en las neuronas del rafe, aunque aún quedan numerosos detalles por ser revelados. Se descubrió que existe heterogeneidad entre las neuronas serotoninérgicas del rafe, por lo que podrían tener diferentes rutas de especificación. Además, se pudo establecer que los progenitores serotoninérgicos son producidos en el tronco cerebral en diferentes rombómeros bajo la influencia de ciertas moléculas difusibles, *Sonic hedgehog* y el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (Fgf8), los cuales determinan su posición en el tubo neural. (Kiyasova,V. Gaspar,P. et al., 2010; Varjosalo,M. Taipale,J. et al., 2008)

El objetivo de este experimento es estudiar el papel del gen *Sonic hedgehog* (Shh) como morfógeno en la determinación de las poblaciones serotoninérgicas en el rombómero 1 del rombéncefalo. Comprobaremos la importancia de Shh en la diferenciación del tejido del tubo neural embrionario y las consecuencias de su ausencia en el mutante condicional $En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}$.

I.3. Materiales y métodos

1.3.1. Obtención de embriones de ratón.

Se obtuvieron embriones de ratón silvestres y mutantes condicionales para el gen Shh, conteniendo en homocigosis los alelos Shh flanqueados por las secuencias LoxP. Las secuencias LoxP se escinden utilizando una recombinasa específica llamada cre, que reconoce su secuencia que se encuentra rodeando al gen *Sonic hedgehog* en el rombómero 1.

Los embriones mutantes condicionales ($En1^{cre/+};Shh^{flox/flox}$) se obtuvieron cruzando ratones macho doblemente heterocigotos ($En1^{cre/+};Shh^{flox/+}$) con hembras homocigóticas condicionales ($Shh^{flox/flox}$).

Se utilizaron embriones de 12.5 días de gestación. Todos los experimentos con ratones se realizaron de acuerdo a los protocolos de la Comisión de Ética en la Investigación Experimental (CEIE) de la Universidad Miguel Hernández.

1.3.2. Rehidratación

Los embriones fueron preservados etanol 100% a -20°C, por lo que fue necesario rehidratarlos. Se utilizó primero etanol 70% (30 min), luego etanol 50% (30 min) seguido de etanol 25% (30 min) y por último dos lavados de 5 minutos cada uno con tampón fosfato salino (PBS). Todo ello mientras las muestras se encuentran en agitación suave en el Roller.

El etanol es utilizado como crioprotector para prevenir la deshidratación total y la degeneración proteica causada por la congelación del agua en los embriones.

El PBS es un buffer isotónico y muy semejante al líquido extracelular de mamíferos cuyas moléculas de agua se adhieren al cerebro y forman una monocapa alrededor que evita su modificación en el consiguiente proceso de inmovilización.

1.3.3. Extracción e inmovilización

Una vez se tuvieron los embriones rehidratados, se procedió a la extracción del cerebro de manera manual utilizando la lupa binocular.

Luego se inmovilizaron los cerebros en agarosa para poder ser cortados, teniendo cuidado de dejar el cerebro en la posición de corte deseada antes de su solidificación.

1.3.4. Obtención de muestras de tejido embrionario.

Se realizaron cortes histológicos de los embriones fijados en agarosa utilizando el micrótopo (cortes de 100 µm de espesor).

Los cortes fueron depositados en una placa con PBS.

1.3.5. Inmunohistoquímica

A partir de los cortes histológicos depositados en la placa se realizaron 3 lavados con PBS-T (6 mL en cada pocillo) de 5 minutos cada uno. El PBS-T contiene PBS más

0.1% de Tritón, un detergente muy denso que se utilizó para permeabilizar las membranas celulares y permitir que el anticuerpo que se añadirá después entre bien en las células.

Luego se procedió al lavado con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1.5% + PBS-T durante 30 minutos. Para ello se mezclaron 375 μ L de peróxido y 25 mL de PBS-T y se depositaron unos 6 mL en cada pocillo. Durante el tiempo de incubación, la placa se tapó con papel albal. Se utilizó el H_2O_2 para la eliminación de la actividad peroxidasa endógena, de forma que no interfiriera con la peroxidasa que se va a añadir posteriormente.

El siguiente paso fue la realización de 3 lavados con PBS-T (6 mL en cada pocillo) de 5 minutos cada uno.

Después se preparó el bloqueo: albúmina sérica bovina (BSA) al 1% + PBS-T + lisina (Lys) durante 1 hora. Partiendo de un volumen total de 25 mL, se disolvieron 0.25g de BSA en 25 mL de PBS-T para obtener el BSA al 1%. De esta mezcla se utilizaron 22.5 mL y se juntaron con 2.5mL de Lys en un tubo falcón, depositando posteriormente alrededor de 6 mL en cada pocillo. Este paso tiene la doble función de bloquear los radicales libres reactivos presentes en el tejido de manera natural o introducidos como consecuencia de la fijación y saturar las uniones de los anticuerpos con proteínas.

Una vez hubo transcurrido el tiempo, se realizó la incubación con el anticuerpo primario: BSA+PBS-T + Azida sódica+ anticuerpo SHT. Partiendo de un volumen final de 25mL, se disolvieron 0.25g de BSA en 25 mL de PBS-T para obtener el BSA al 1%. De esta mezcla se utilizaron 24 mL junto con 0.125 mL de azida sódica, y 0.240 mL de anticuerpo y se añadieron aproximadamente 6 mL a cada uno de los 4 pocillos. Se deja incubar durante la noche a 4°C.

Este paso tiene la misma función que anteriormente, reducir las uniones inespecíficas y permeabilizar el tejido, y además, la azida sódica es utilizada para retardar el crecimiento de microorganismos durante el tiempo de incubación. El anticuerpo utilizado es serotonina (SHT), una IgG extraída de suero de conejo.

El siguiente paso fue la realización de 6 lavados con PBS-T (6 mL en cada pocillo) de 5 minutos cada uno.

Una vez ha tenido lugar la incubación con el anticuerpo primario, se vuelve a realizar, pero con el anticuerpo secundario: PBS-T + anticuerpo anti-SHT. A 24 mL de PBS-T se le añadieron 120 μ L de anticuerpo anti-5HT y se distribuyó en los pocillos. Se dejó incubar durante 1 hora. El anticuerpo utilizado (lleva unido biotina) se une al anticuerpo primario de forma específica.

El siguiente paso fue la realización de 6 lavados con PBS-T (6 mL en cada pocillo) de 5 minutos cada uno.

Una vez realizados los lavados necesarios, se añadió el anticuerpo secundario: ABC + PBS-T en una dilución 1:500. Para ello se añadieron 24 mL de PBS-T junto con 48 μ L de ABC a los pocillos y se dejó durante 1 hora, tras la cual se realizaron otros 6 lavados con PBS-T durante 5 minutos cada uno y 2 lavados con TRIS de 10 minutos cada uno. EL ABC contiene biotina, avidina y peroxidasa.

Finalmente se realizó el revelado con diaminobenzidina (DAB) + TRIS+ H_2O_2 . Se utilizan 250 μ L de DAB, 25 mL de TRIS y 6 μ L de H_2O_2 .

Los anticuerpos en sí no son visibles al microscopio, por lo que se conjugan con moléculas que sí lo son. En este caso se usó el sistema ABC (Avidina-Biotina-Peroxidasa). El anticuerpo secundario lleva unida la biotina, y el complejo de avidina más biotina conjugada con la peroxidasa se une de manera específica a la biotina del anticuerpo secundario. La peroxidasa unida a la biotina convierte los sustratos H_2O_2 y diaminobencidina en un producto insoluble y coloreado, visible con el microscopio óptico.

I.4. Resultados

Antes de proceder al análisis de los resultados de la pérdida de función de Shh en el r1, mostramos la región de expresión de Engrailed 1 (En1; Fig. 1A) que nos indica la zona del tubo neural donde se va a perder la función de Shh. En tubos neurales seccionados por la línea media mostramos la localización de los morfógenos Shh (azul) y Fgf8 (rojo) lo que nos permite identificar los organizadores secundarios (Fig. 1B), En el embrión mutante podemos constatar cómo se pierde la expresión de Shh en una región que cubre el mesencéfalo, istmo y r1 (flechas en Fig. 1C).



Figura 1: Cortes embrionarios mostrando diferentes partes del SNC. A) Embrión de estadio E10.5 donde se muestra la región de expresión del gen Engrailed 1, que corresponde con la zona donde se pierde la función de Shh. B) Embrión estadio 12.5 días wild type. Se puede observar la zona de actuación de los marcadores moleculares Shh (azul) y FgF8 (rojo). Utilizando Fgf8 y Shh se han podido distinguir los organizadores secundarios: la zona limitans (zl), el Istmo (Ist) y el borde neural anterior (BNA). C) Embrión mutante estadio 12.5 días. Se puede observar una zona entre flechas, en la cual no se expresa Shh.

Posteriormente procedimos a analizar, durante desarrollo embrionario, las poblaciones serotoninérgicas, llamadas núcleos de rafe (Rfn). Comparamos embriones silvestres con embriones mutantes condicionales. Comenzamos el estudio en el estadio embrionario E12.5. En cortes sagitales observamos la distribución de Rfn a ambos lados de la placa del suelo (Fig. 2A). En una ampliación de la imagen, mostramos en detalle los Rfn localizados en el r1 (Fig. 2B). En el embrión mutante condicional en el mismo estadio observamos una gran reducción de la presencia de los Rfn (flecha en Fig. 2C). En una ampliación observamos la ausencia total de neuronas serotoninérgicas en el r1 (flecha en Fig. 2D).

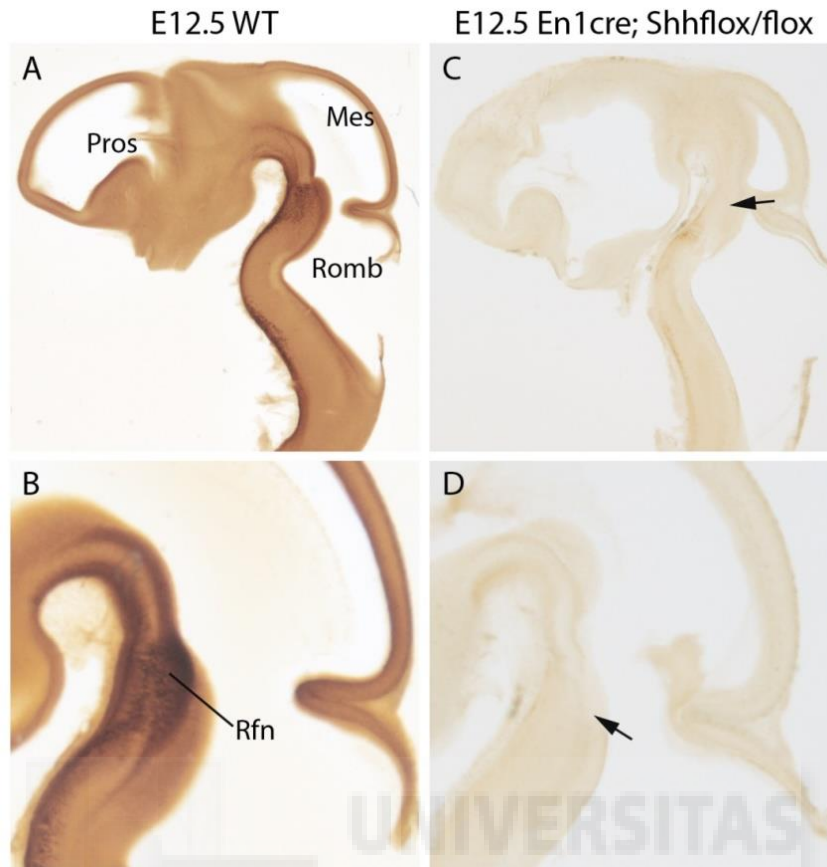


Figura 2: Representación esquemática de las secciones sagitales de embriones 12.5 días. A-B Cortes sagitales del embrión wild type con marcadores para las poblaciones serotoninérgicas. En los núcleos del Rafe (Rfn) se observa la mayor cantidad de serotonina. C-D Cortes sagitales del embrión mutante con marcadores para las poblaciones serotoninérgicas. Las flechas señalan la ausencia de serotonina en el rombencéfalo.

Avanzando en el desarrollo embrionario, pudimos corroborar en el estadio E15.5 la distribución de Rfn en el embrión silvestre y como se concentran en el rombencéfalo, mostrando un límite neto con el mesencéfalo (Fig. 3A). En el embrión mutante condicional detectamos un pequeño grupo residual de neuronas serotoninérgicas (flecha en Fig. 3B). El número de estas neuronas se encuentra ampliamente reducido y los principales Rfn localizados en el r1 no pueden ser localizados.



Figura 3: Representación esquemática de las secciones sagitales de embriones 12.5 días. A) Corte sagital del embrión wild type con marcadores para las poblaciones serotoninérgicas. En los núcleos del Rafe (Rfn) se observa la mayor cantidad de serotonina. C) Corte sagital del embrión mutante con marcadores para las poblaciones serotoninérgicas. La flecha señala la presencia reducida de serotonina en los núcleos del Rafe de r1.

I.5. Discusión

Para el estudio de embriones sin expresión de Shh en r1 se seleccionaron mutantes $En1^{cre/+}; Shhflox/flox$, ya que En1 es expresada únicamente en el istmo y r1, por lo que se sigue observando la expresión de Shh en el resto de estructuras.

En el embrión wild type se pudo determinar la presencia de serotonina mediante inmunohistoquímica, y se observó tanto en toda la placa del suelo como en los núcleos del rafe, los cuales se sitúan en el rombómero 1.

En el mutante, la supresión de la función de Shh en r1 y el istmo produjo una pérdida total de las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe en r1. Esto ocurre debido a que para la determinación de la serotonina en esa región es imprescindible la presencia de un Shh funcional, aunque se desconocen los mecanismos exactos y las moléculas implicadas en la ruta de formación de las neuronas serotoninérgicas en relación a Shh.

Lo que se sabe que ocurre es que al impedir la función en el mutante, no se produce la diferenciación de la placa del suelo y por lo tanto no se produce un gradiente entre los morfógenos sintetizados en la placa del techo y Shh. SHH aparte de diferenciar tejido a placa del suelo, también hace que dicha placa actúe como fuente de SHH,

implicada en la ventralización del tubo neural en oposición a las señales dorsalizantes provenientes de la placa del techo.

Al no existir placa del suelo, la zona en la que debería estar situada pasa a convertirse en placa alar, dado que solo actúan sobre ella moléculas dorsalizantes como BMPs y Wnts.

I.6. Conclusiones y proyección futura

La función normal de Shh conlleva la generación de neuronas productoras de serotonina, ubicadas especialmente en los núcleos del rafe en la región del cerebro medio, en el rombéncefalo. Se pudo comprobar como en el mutante $En1^{cre/+}; Shh^{flox/flox}$ se producía la supresión de las poblaciones serotoninérgicas de los núcleos del rafe, debida a la mutación de Shh.

Por lo tanto, se puede concluir que el gen Shh está implicado en la formación de las neuronas serotoninérgicas en los núcleos de rafe, y que mutaciones en el gen conllevan la ausencia de serotonina en r1.

El papel de la serotonina en el SNC es esencial, dado que bajos niveles de serotonina dan lugar a trastornos ansiedad y depresión (Wang, Y. Sun, N. et al., 2008). Además, la relación de la serotonina con el gen Shh ha sido establecida, aunque no se conocen los mecanismos implicados.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que la depresión produce la mayor disminución en salud en comparación con otras enfermedades crónicas y ha instado a todos los países a aumentar las inversiones y la cobertura de servicios en esta materia. Cada año en España se emplean más de 5000 millones de euros en aspectos relacionados con la depresión, y la mayor parte de esta cifra se debe a costes indirectos referidos a bajas por enfermedad y pérdidas de productividad (Valladares, A. Dilla, T. Sacristán, J. et al., 2009)¹¹. Vista la relación entre Shh y serotonina, se podrían encontrar tratamientos o incluso curas para la depresión mediante una mayor investigación en sus rutas, de modo que se ahorrarían una gran cantidad de los costos derivados de la depresión.

Además, existe una alta demanda en la investigación relacionada con Shh debido a su implicación en las ciliopatías. Se conoce actualmente que los cilios median en la ruta de señalización de Shh, aunque no se conocen todos los mecanismos, por ello Shh tiene una gran proyección future en esta área (Huangfu et al., 2003)¹²

Por otro lado, la ruta de señalización la familia de genes Hedgehog ha sido relacionada con multiples formas de cáncer, especialmente con cáncer de piel y meduloblastoma, y las posibilidades de una intervención terapéutica están siendo tenidas en cuenta (Varjosalo,M. Taipale,J. et al., 2008)¹³.

Se requiere mayor investigación en múltiples áreas, incluyendo el estudio de los genes diana de Shh, esenciales para entender como las señales Shh deciden el destino molecular de las células, y para descifrar los mecanismos que subyacen en la especificidad de la respuesta celular a señales provenientes de Shh.

I.7. Bibliografía

¹ Blasco, A. (2013). El sistema nervioso humano. Recuperado de <http://www.aula2005.com/html/cn3eso/11relaciosn/11snervioses.htm>

² Carlson, B. (2005). Primeras etapas en la formación del sistema central humano. [Figura 5-10]. Recuperado de http://neuropsicologia2014-1.blogspot.com.es/2014_09_01_archive.html

³ Díaz, I. (2014). Sistema neuroendocrino. [Figura 2]. Recuperado de http://www.e-sanitas.edu.co/Diplomados/endocrino/modulo_1/

⁴Nrets. (2007). Prosecéfalo.[Figura Embryonic Brain]. Recuperado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Prosenc%C3%A9falo>

⁵ Puelles,L. Rubenstein,J. (2015).A new scenario of hypothalamic organization: rationale of new hypotheses introduced in the updated prosomeric model. Recuperado de <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2015.00027/full>

⁶ Echevarría, D. Vieira, C. Gimeno, L. Martínez, S. (2003). [Figura 1]. Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Salvador_Martinez2/publication/9042998_Neuroepithelial_secondary_organizers_and_cell_fate_specification_in_the_developing_brain/links/00b7d515681e80c68f000000.pdf

⁷ Puelles, L. Martínez, S. Martínez, M. (2008). Regionalización dorsoventral del tubo neural. [Figura 13.4]. Recuperado de neuroanatomía de la editorial Panamericana.

⁸ Brodski, C. Weisenhorn, DM. Signore, M. ...Sillaber, I. (2003). Location and size of dopaminergic and serotonergic cell populations are controlled by the position of the midbrain-hindbrain organizer. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764108>

⁹ Gaspar, P. Cases, O. Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. [Figura 1]. Recuperado de <http://www.nature.com/nrn/journal/v4/n12/full/nrn1256.html>

¹⁰ Young, SN. (2013). The effect of raising and lowering tryptophan levels on human mood and social behaviour. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3638380/>

¹¹ Valladares, A. Dilla, T. Sacristán, J. (2009). La depresión: una hipoteca social. Últimos avances en el conocimiento del coste de la enfermedad. Recuperado de <http://www.actaspsiquiatria.es/repositorio/10/55/ESP/12816+12-1227.pdf>

¹² Huangfu, D. Liu, A. Rakeman, AS. ... Murcia, N. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14603322>

¹³ Varjosalo, M. Taipale, J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. Recuperado de <http://genesdev.cshlp.org/content/22/18/2454.long>

Kiyasova,V. Gaspar,P. (2010). Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22103413>

Cook,E. Leventhal,B. (1996). The serotonin system in autism. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9053096>

Zafeiriou,D. Ververi,A. Vargiami,E. (2009). The serotonergic system: its role in pathogenesis and early developmental treatment of autism. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19949574>

Whitaker-Azmitia,P. (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750793>

