

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**TRABAJO FIN DE GRADO EN TERAPIA OCUPACIONAL**



**La cepa murina trasngénica *Pou4f1 Tau LacZ* como herramienta en el estudio del desarrollo embrionario del sistema visual.**

AUTOR: Prieto Botella, Daniel

Nº expediente: 839

TUTOR: De Puelles de la Torre, Eduardo

COTUTOR: Company Devesa, Verónica

Departamento de Histología y Anatomía

Curso académico 2014 - 2018

Convocatoria de junio



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>Página:</b>
• Resumen y palabras clave	1
• Abstract and key words	2
• Introducción	3
• Objetivos	7
• Hipótesis de trabajo	7
• Material y métodos	8
• Resultados	13
• Discusión	18
• Conclusiones	19
• Bibliografía	20

## RESUMEN

**Introducción:** Pou4f1 es uno de los factores de transcripción encargados de controlar el desarrollo del sistema visual y de manera específica se encuentra expresado en la capa de células ganglionares de la retina neural. Por ello, se podría estudiar su distribución para mejorar la comprensión del desarrollo del ojo y sus proyecciones neuronales.

**Hipótesis:** La proteína bacteriana  $\beta$ -Galactosidasa expresada bajo el promotor del factor de transcripción Pou4f1 se distribuye por la retina neural y sus proyecciones nerviosas permitiendo el estudio de su desarrollo embrionario.

**Objetivo:** Evaluar la utilidad del ratón mutante *Pou4f1 Tau LacZ* como herramienta de estudio del desarrollo embrionario del sistema visual y comparar la presencia de la proteína bacteriana  $\beta$ -Galactosidasa producida por el gen LacZ con otros marcadores ya conocidos.

**Material y Métodos:** Las muestras de tejido embrionario de estadios E12.5, E14.5 y E16.5 fueron tratadas mediante tinción en cresil violeta y la técnica de inmunohistoquímica contra las proteínas  $\beta$ -Gal, Pax6, Doblecortina y Tag1.

**Resultados:** Encontramos expresión de la proteína  $\beta$ -Galactosidasa en todos los estadios iniciándose la neurogénesis de la retina neural en E12.5. Observamos la consolidación del factor de transcripción estudiado en E14.5, distribuyéndose por la capa de células ganglionares y de raíces ópticas de la retina neural desde la mácula hasta la retina periférica.

**Conclusión:** La proteína  $\beta$ -Gal se extiende por las proyecciones de las neuronas ganglionares demostrando la utilidad del modelo genético de ratón utilizado como herramienta para el estudio de las proyecciones visuales.

**Palabras clave:** sistema visual, desarrollo embrionario, retina neural, Pou4f1,  $\beta$ -Galactosidasa.

## ABSTRACT

**Introduction:** Pou4f1 is one of the transcription factors responsible for controlling the visual system development and is specifically expressed in the neural retina ganglion cell layer. For this reason, its distribution could be studied to improve our understanding of the eye and its neural projections development.

**Hypothesis:** The  $\beta$ -Galactosidase bacterial protein expressed driven by the transcription factor Pou4f1 promoter is distributed along the neural retina and its nervous projections allowing the study of its embryonic development

**Objective:** To evaluate the mutant mouse *Pou4f1 Tau LacZ* as a useful tool to study the embryonic development of the visual system and compare the presence of the bacterial protein  $\beta$ -Galactosidase produced by the *LacZ* gene with other known markers.

**Material and Methods:** The embryonic tissue samples of stages E12.5, E14.5 and E16.5 were processed by staining in cresyl violet and the immunohistochemistry technique against the proteins  $\beta$ -Gal, Pax6, DoubleCortin and Tag1.

**Results:** We founded protein  $\beta$ -Galactosidase expression in all studied embryonic phases, starting the neural retina neurogenesis in E12.5. We observed the studied transcription factor consolidation in E14.5, being distributed along the ganglion cell and optical roots layers of the neural retina from the macula to the peripheral retina.

**Conclusions:** Protein  $\beta$ -Galactosidase expands through the ganglion neurons projections demonstrating the usefulness of the genetic mouse model used as a tool for the study of visual projections.

**Key words:** visual system, embryonic development, neural retina, Pou4f1,  $\beta$ -Galactosidase.

## INTRODUCCIÓN

La retina forma parte del Sistema Nervioso Central y se encuentra en la porción interna del globo ocular formando su capa nerviosa fotosensible. La función principal que realiza es la transformación de las ondas de luz visible en impulsos eléctricos, este mecanismo se llama fototransducción y tiene lugar mediante la acción de los conos y bastones, que son las células fotorreceptoras situadas en la retina. Posteriormente estos impulsos atraviesan las células bipolares hacia las células ganglionares, donde los axones de estas células forman el nervio óptico por el cual los impulsos serán transmitidos al cerebro <sup>(1)</sup>.

La formación de la retina neural durante el desarrollo embrionario tiene lugar durante la cuarta semana de gestación a ambos lados de la porción rostral del tubo neural (prosencefalo), desarrollándose de forma primaria las evaginaciones de las vesículas ópticas <sup>(2)</sup>.

Al desarrollarse, estas vesículas establecen contacto de manera lateral con el ectodermo (capa germinal más externa del embrión) de cubierta epidermal creando un pedúnculo, de manera que quedan unidas al prosencefalo por el recién formado tallo óptico. El contacto origina una acción inductora que provoca la creación de la placoda cristalina, la cual es la precursora del cristalino. Al formarse, se invagina transformándose en la vesícula cristalina y queda cerrada e internalizada del ectodermo cefálico que se cierra sobre ella. La vesícula cristalina genera una acción inductora sobre el ectodermo que la recubre propiciando el inicio de la creación de la córnea <sup>(2)</sup>.

Durante la creación de la vesícula cristalina, la vesícula óptica se repliega sobre sí misma quedando cóncava y dando lugar a la copa óptica. La mayor parte de su capa interna se diferencia en retina neural, sin embargo, la zona interna que está próxima al ecuador del cristalino forma los cuerpos ciliares, cuya función es la de producir el humor acuoso. La capa externa formará la retina pigmentaria y la zona más distal de las capas interna y externa darán lugar al iris y al diafragma pupilar <sup>(2)</sup>.

El mesénquima altamente vascularizado que rodea a la copa óptica se concentra en una capa denominada coroides. Excéntricamente a la coroides se condensa un tejido de color blanquecino y rico en depósitos extracelulares de fibrina y elastina llamada esclerótica cuya función es la de proteger el ojo de las deformaciones durante la formación de los músculos periorbitales. La coroides no se forma delante del iris, en lugar de ello se segregan componentes que mantienen la transparencia del tejido formándose así la córnea <sup>(2)</sup>.

La retina neural comienza en el fondo de la copa óptica formándose a partir de neuroepitelio pseudoestratificado que queda aislado del resto del cerebro por epitelios más simples de la retina pigmentaria y el tallo óptico. En este estudio las capas por las que está formada ostentan un papel fundamental, por lo que es necesario mostrar sus componentes:

1. Capa nuclear externa. Contiene los cuerpos de las células fotorreceptoras, los conos y bastones. Se trata de una capa densamente poblada (100 millones de células en cada ojo). Su cuerpo celular consta de un segmento interno que acompaña al núcleo y un segmento externo especializado que se adentra en el epitelio pigmentario.

2. Capa plexiforme externa. Capa ocupada por los contactos sinápticos entre las células fotorreceptoras y las neuronas de la siguiente capa: células bipolares y horizontales.

3. Capa nuclear interna. Se trata de una capa más gruesa que las demás y está formada por cuatro poblaciones de células diferentes que se encuentran situadas en capas.

- Las más externas son las células horizontales, cuya ramificación se propaga por la capa plexiforme externa.
- Tras las horizontales encontramos las bipolares. Poseen 2 polos. Un polo externo dendrítico y articulado sinápticamente en la capa plexiforme externa con los fotorreceptores y células horizontales. El interno de tipo axonal se dirige de manera interna para contactar con las células ganglionares y amacrinas.
- En el centro se sita una capa de células de Müller. Envuelven a las neuronas retinas en toda la retina realizando funciones de apoyo metabólico y sirviendo de aislante eléctrico.
- En la parte más interna aparecen las células amacrinas. Cumplen simultáneamente labores dendríticas (recepción de estímulos) y axonales (transmisión de estímulos).

4. Capa plexiforme interna. Se trata de una capa dividida en láminas en las cuales se entrelazan los terminales axonales de las células bipolares, las prolongaciones de las amacrinas y las dendritas de las células ganglionares.

5. Capa de células ganglionares. Formada por los cuerpos de las células ganglionares, estas células tienen ramificadas sus dendritas en la capa plexiforme interna, donde reciben sinapsis excitatorias de los axones de bipolares y amacrinas.

6. Capa de fibras ópticas. Es la capa más interna de la retina. Se encuentra formada por los axones de las células ganglionares que se dirigen para formar el nervio óptico <sup>(2)</sup>.

El proceso del desarrollo del globo ocular y sus componentes se encuentra controlado por genes específicos y estos genes a su vez están controlados por factores de transcripción.

Los factores de transcripción son proteínas que se unen al Ácido Desoxirribonucleico (ADN) controlando así el paso de información genética para formar ARN mensajero. Por ello tienen un papel fundamental que activa o desactiva la señalización de genes que guían el desarrollo del organismo produciendo las cascadas de especificación <sup>(3)</sup>.

Uno de los factores de transcripción que controla el desarrollo del sistema visual es el Brn-3a (Conocido actualmente como Pou4f1). Se conoce que este factor de transcripción se expresa en el sistema inmune, endocrino, nervioso y sensorial. Respecto al ojo, los primeros estudios realizados en ratones observaron que su expresión se localizaba en la retina <sup>(4)</sup>.

Estudios posteriores lograron demostrar la similitud de su expresión en humanos encontrando el dominio Pou4f1 en el genoma humano (cromosoma N°13) y descubriendo que su expresión se localizaba en la retina neural. Además, se identificó que la proteína Brn-3a se encuentra en un 36% de los núcleos de las células ganglionares de la retina, siendo la capa retinal en la cual está más expresado el factor de transcripción Brn-3a <sup>(5)</sup>.

Los ensayos continuaron centrándose en arrojar más datos sobre su distribución. Se localizaron sus puntos de inicio de expresión, situados en el ganglio del trigémino, el nervio vestibulococlear, las raíces ganglionares dorsales y las células ganglionares de la retina. Se demostró así la importancia de este factor de transcripción en el desarrollo del sistema nervioso central y periférico <sup>(6)</sup>.

En este estudio se utilizó como objetivo de marcaje la proteína bacteriana  $\beta$ -Galactosidasa. En humanos, esta proteína se expresa en el borde epitelial de las células intestinales y su función es la de metabolizar la lactosa (la principal azúcar de la leche) para formar glucosa y galactosa <sup>(7)</sup>.

Para que la proteína  $\beta$ -Galactosidasa se exprese en el modelo animal utilizado fue necesario introducir de manera artificial el operón LacZ bajo el promotor del factor de transcripción Pou4f1 creando así la cepa murina transgénica *Pou4f1 Tau LacZ*. El operón LacZ procede de la bacteria *Escherichia Coli*, la cual utiliza la proteína  $\beta$ -Galactosidasa para el metabolismo de la lactosa sirviendo de catalizador para la hidrólisis de esta en glucosa y galactosa <sup>(8)</sup>.

Los estudios actuales se centran principalmente en el estudio de las células ganglionares de la retina, con énfasis en los mecanismos que dañan y degradan a estas células ya que son las más perjudicadas durante las enfermedades oculares <sup>(9)</sup> y ensayos sobre nuevas terapias que pretenden encontrar soluciones protectoras o regeneradoras de esta capa de la retina <sup>(10)</sup>.



Por ello es necesario arrojar nuevos datos sobre la expresión del dominio Pou4f y especialmente sobre la expresión del factor de transcripción Brn-3a en la retina, con el objetivo de, en primer lugar, comprender más este órgano de la visión y, en segundo lugar, ayudar al desarrollo de nuevas terapias génicas que protejan o regeneren la capa de células ganglionares de la retina.

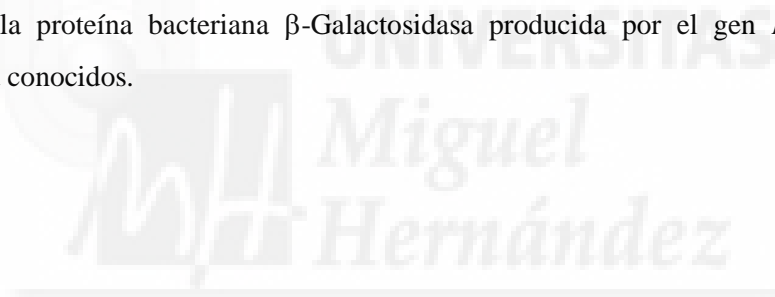


## HIPÓTESIS DE TRABAJO

Pou4f1 es un marcador de las neuronas ganglionares de la retina y mediante el uso de la proteína bacteriana  $\beta$ -Galactosidasa expresada bajo su promotor ésta se distribuye por sus prolongaciones neuronales y nos permitirá estudiar el desarrollo de la retina neural y las proyecciones nerviosas.

## OBJETIVO

Estudiar muestras de embrión de ratón mutante *Pou4f1 Tau-LacZ* en diferentes estadios embrionarios con el fin de valorar su utilidad como herramienta de estudio en el desarrollo embrionario del sistema visual, demostrando la presencia del gen Pou4f1 durante la formación del ojo, estudiando su expresión en la retina, nervio óptico y quiasma óptico y comparando la presencia de la proteína bacteriana  $\beta$ -Galactosidasa producida por el gen *LacZ* con otros marcadores ya conocidos.



## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio que se presenta se llevó a cabo durante el periodo comprendido entre el 3 de julio de 2017 y el 24 de octubre de 2017. El proyecto se realizó en los laboratorios 102 y 138 del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández de Elche, ambos pertenecientes al Departamento de Embriología y Anatomía.

Este estudio observacional descriptivo consiste en el análisis neuropatológico del ojo y sus proyecciones nerviosas en 6 muestras de encéfalo de ratón mutante *Pou4f1 Tau-LacZ* (proteína bacteriana  $\beta$ -Galactosidasa expresada bajo su promotor) en tres estadios embrionarios diferentes (E12.5, E14.5 y E16.5). Las muestras se compararon con marcadores de la  $\beta$ -Galactosidasa ya conocidos mediante técnicas de histología e inmunohistoquímica.

### **Descripción de las muestras:**

Las hembras y sus embriones se obtuvieron del animalario de Sant Joan D'Alacant que pertenece al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche. 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. Este animalario demuestra tales acreditaciones al poseer el certificado de Sistema de Gestión IQNet y seguir el control ISO 9001 de calidad.

Los embriones pertenecen a la línea genética *Pou4f1 Tau-LacZ*, la cual se caracteriza por producir la proteína bacteriana  $\beta$ -Galactosidasa. Se utilizaron dos embriones de tres estadios diferentes (E12.5, E14.5 y E16.5). Además, se utilizaron dos series de muestras de encéfalo cortado en plano coronal de embrión de ratón de E14.5 de la misma línea genética que se encontraban preparadas en el laboratorio.

### **Procesado de muestras:**

Los embriones se encontraban de manera inicial fijadas en paraformaldehído y deshidratados hasta etanol 100% con el fin de conservar las muestras. Tras la selección de los embriones se optó por la técnica de inclusión en parafina ya que es una técnica útil para observar la distribución de proteínas en tejidos neuronales.

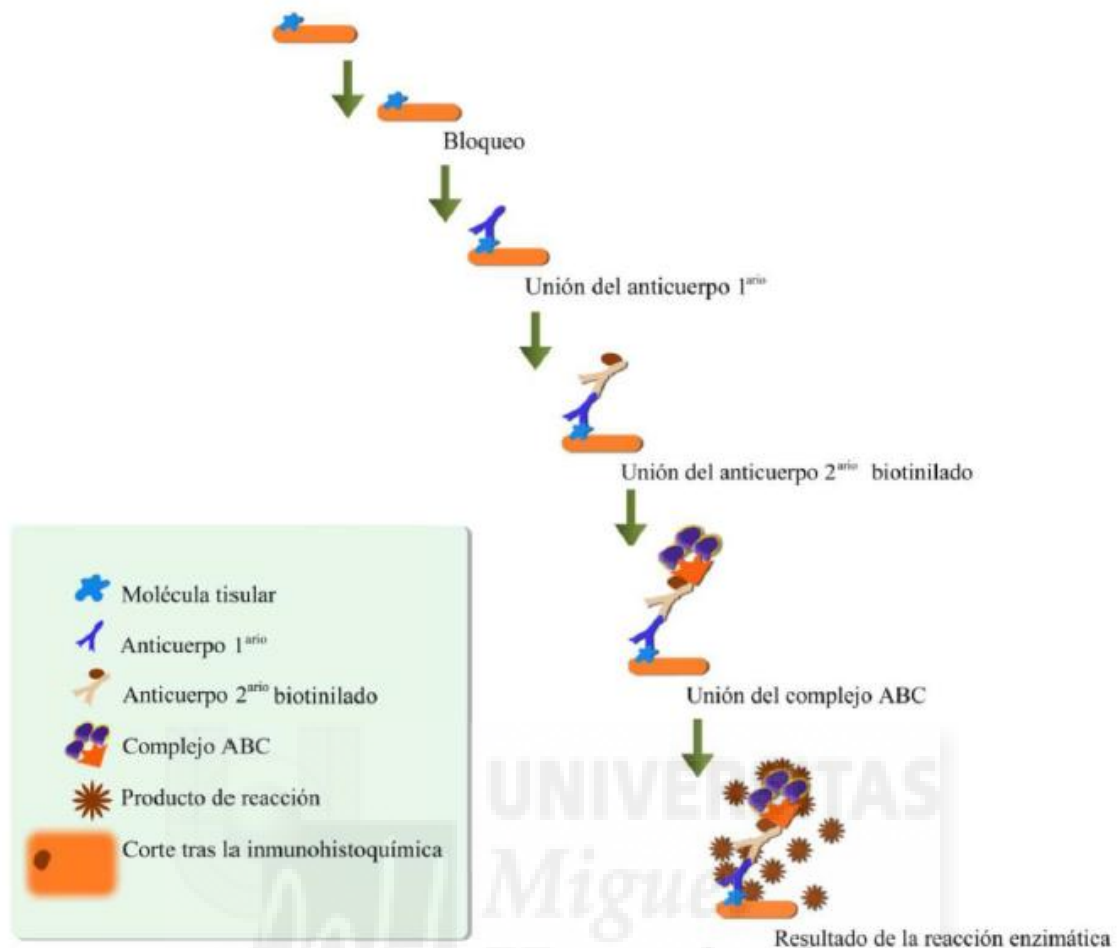
Las muestras recibieron dos baños de 30 minutos cada uno de butanol para retirar el etanol (no es miscible con la parafina). Tras retirar el etanol los embriones fueron sumergidos en parafina líquida a 60°C, se realizaron 5 cambios de 30 minutos cada uno con el objetivo de desplazar y eliminar el butanol. Las muestras se solidificaron en un molde cúbico (dos muestras del mismo estadio por cubo) en el cual mediante una aguja caliente se orientaron las muestras para colocarlas en un 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 la sección de muestras en secciones muy finas para su posterior estudio, en este caso los cortes realizados fueron fijados a un tamaño de 10µm. Respecto a los planos de corte, un embrión de cada estadio se seccionó en un plano sagital y el restante en un plano coronal. Posteriormente los cortes fueron montados en portaobjetos en 5 series seriadas de 5 portaobjetos (E12.5), 5 series de 7 portaobjetos (E14.5) y en 5 series de 9 portaobjetos (E16.5). Para el montaje se utilizó una bañera de agua templada en la que se introdujeron los cortes para estirar y acomodar el tejido antes de situarlo en el portaobjetos.

Tras secar los cortes a 37°C durante un día, se seleccionó una serie de cada estadio para ser teñida en violeta de cresilo acetato (cresil violeta). El cresil violeta es un tinte azul comúnmente utilizado para teñir ácidos nucleicos en tejidos de cualquier tipo.

Para realizar el proceso de tinción en cresil violeta, en primer lugar, se sumergieron los portaobjetos 5 minutos en dicho tinte. A continuación, se realizaron 2 inmersiones 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% y finalmente se dejaron reposar 5 minutos en un baño de etanol 96%. 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 se montaron los portaobjetos cubriéndolos con un cubreobjetos fijado con el pegamento Eukitt® y se dejaron secar varios días en una estufa a 37°C.

El resto de las muestras fueron sometidas al tratamiento mediante la técnica de inmunohistoquímica. Esta introduce un anticuerpo primario para que se fije a la proteína objetivo de estudio para a continuación añadir un anticuerpo secundario junto con biotina, el cual se adhiere al anticuerpo primario posibilitando su detección y revelado. En la **Figura 1** se puede visualizar un esquema de este proceso.



**Figura 1.** Esquema de la técnica de inmunohistoquímica

Para iniciar la técnica, en primer lugar, fue necesario desparafinar los cortes. Para ello, los portaobjetos se introdujeron 20 minutos en una estufa a 92° para derretir la parafina y posteriormente en 2 baños de 20 minutos de Xilol de Merck para disolver los posibles restos. A continuación, se rehidrataron las muestras en una serie descendente 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 hirvieron los portaobjetos en un tampón de citrato sódico 0,01M en agua como técnica para exponer los epítomos. El hervido se llevó a cabo en un microondas a 750W de potencia en 4 tiempos (el primero de 4 minutos y los 3 restantes de 3 minutos). Tras esto se procedió al lavado de las muestras con agua destilada de manera gradual para desplazar poco a poco el citrato sódico. Terminados los procesos de desparafinado, rehidratación y hervido, se inició el tratamiento con anticuerpos.

Para preparar las muestras para los anticuerpos, los cortes fueron lavados 3 veces en PBS (tampón fosfato salino) al 1% 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. A continuación, se inició el bloqueo de la peroxidasa endógena usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1.5% en PBS-T 0.1% durante 30 minutos en oscuridad. Este proceso es importante ya 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 y lavar 3 veces en PBS-T 0.1%, se procedió a añadir el anticuerpo primario con lisina al 10%. En la **Tabla 1** se detallan los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, así como su concentración.

**Tabla 1.** Anticuerpos y concentraciones utilizados en el proceso de inmunohistoquímica.

Anticuerpo 1 <sup>ario</sup>	Anticuerpo 2 <sup>ario</sup>	Concentración
<b>PAX-6</b>	GAR	1:500
<b>B-GAL</b>	GAC	1:500
<b>TAG-1</b>	RAG	1:500
<b>DobleCortina</b>	GAR	1:100

Tras añadir el anticuerpo primario se dejó actuar toda una noche a temperatura ambiente incubándose en una concentración de BSA (Suero Fetal Bovino) al 1% junto con azida al 0.1% en PBS-T 0.1%.

Al día siguiente se recuperó el anticuerpo primario sobrante de los portaobjetos y estos se lavaron 3 veces en PBS-T 0.1%. Posteriormente se preparó el anticuerpo secundario diluido a 1:200 en PBS-T 0.1% y se dejó actuar durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces las muestras en PBS-T 0.1% tras la acción del anticuerpo secundario y se procedió a añadir el complejo ABC (Avidin Biotin Complex) diluido a 1:500 en PBS-T 0.1%, que se dejó actuar durante una hora. A continuación, se retiró el complejo ABC y se realizaron 3 lavados en PBS-T 0.1% y otros 3 lavados en PBS 1%. Seguidamente a los lavados se inició el revelado.

En el revelado se utilizó 1 ml de DAB (diaminobenzilina) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.6%. El DAB tiñe el tejido con una gama de colores que va desde el naranja al marrón oscuro. Los portaobjetos se

depositaron en un copling con el DAB y se dejó sin tiempo fijo hasta que se produjera un revelado óptimo.

Tras el revelado, las muestras se deshidrataron en una serie creciente de etanoles desde el agua hasta el etanol 100%, donde tras dos baños de 10 minutos de Xilol de Merck se montaron 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 las tomas fotográficas se usó la cámara digital LEICA® DFCSSO. Posteriormente se trataron las fotografías mediante el software Adobe Photoshop CS6 y se crearon las figuras en Adobe Illustrator CS6.



## RESULTADOS

En primer lugar, se analizaron embriones desarrollados durante 12 días y medio, estadio E12.5 (**Figura 2**), comparando con diferentes marcadores la presencia de la proteína  $\beta$ -Galactosidasa. Nuestro objetivo era identificar las áreas de expresión del factor de transcripción Pou4f1. La muestra teñida con cresil violeta (**Figura 2A**) nos permite identificar las estructuras anatómicas y el estado morfológico general del ojo, dichas estructuras muestran un desarrollo temprano debido al estadio del embrión. En las muestras podemos identificar el cristalino (**C**), la retina neural (**Rn**), la retina pigmentaria (**Rp**) y los párpados (**P**).

Observamos la presencia de la proteína  $\beta$ -Galactosidasa en todas las muestras analizadas. La muestra tratada con el anticuerpo contra  $\beta$ -Gal (**Figura 2B**) presenta una tinción débil y generalizada en el ojo y sus alrededores, sin embargo, destacamos la presencia de proyecciones nerviosas faciales marcadas de una manera más intensa que nos indica la expresión del factor de transcripción Pou4f1, objetivo de estudio, en el soma de dichas proyecciones (**cabeza de flecha en Figura 2B**).

Respecto a la muestra tratada con el anticuerpo anti Pax6 (**Figura 2C**), este marcador fue seleccionado porque revela un marcaje de todas las capas de la retina neural menos en la capa de raíces ópticas, lo que nos indica una importante expresión de Pax6 en estas estructuras, no obstante, las proyecciones nerviosas no se encuentran marcadas, esto se debe a que la proteína Pax6 se localiza en el núcleo celular sin inundar a los axones, quedando estos por lo tanto sin marcaje alguno.

Las muestras tratadas con los anticuerpos anti Doblecortina (**Figura 2D**) y anti Tag1 (**Figura 2E**) presentan un marcaje similar entre sí, revelando el principio de neurogénesis en el segmento de la retina neural próximo a la retina pigmentaria (**Rp**) (**flecha en las Figuras 2D y 2E**). Además, ambas son detectables en las proyecciones nerviosas faciales (**cabeza de flecha en las Figuras 2D y 2E**).



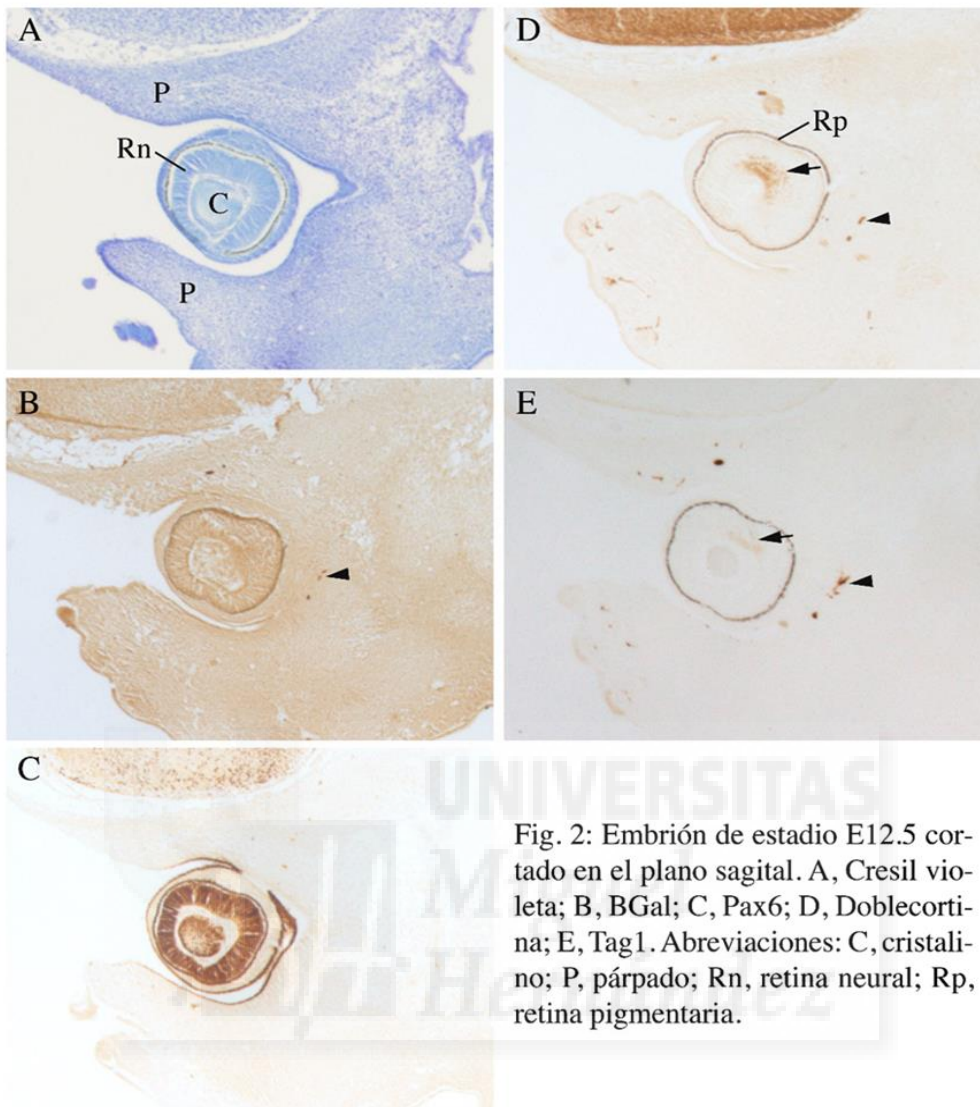


Fig. 2: Embrión de estadio E12.5 cortado en el plano sagital. A, Cresil violeta; B,  $\beta$ Gal; C, Pax6; D, Doblecortina; E, Tag1. Abreviaciones: C, cristalino; P, párpado; Rn, retina neural; Rp, retina pigmentaria.

Tras analizar las muestras del estadio 12.5, se pasó a estudiar el estadio 14.5 (**Figura 3**).

En la muestra teñida con cresil violeta (**Figura 3A**) observamos un ojo más desarrollado respecto al anterior estadio, en el cual, se identifica de manera más clara la retina neural (**Rn**) y el cristalino (**C**), además, destacamos la presencia de la córnea (**Co**) y el nervio óptico (**No**).

La muestra tratada con el anticuerpo  $\beta$ -Gal (**Figura 3B**) nos revela la presencia de la proteína  $\beta$ -Galactosidasa en las células ganglionares y sus axones en retina neural (**flecha en la figura 3B**), por lo tanto, se observa la expresión del factor de transcripción Pou4f1 en la capa de células ganglionares y de fibras ópticas, las capas más internas de la retina neural. A su vez, destacamos la expresión del nervio óptico y de las proyecciones nerviosas faciales (**cabeza de flecha en la figura 3B**).

Respecto al tejido tratado utilizando anti Pax6 (**Figura 3C**), se aprecia un marcaje generalizado de todos los cuerpos celulares de la retina neural (**flecha en la figura 3C**) y destacamos su presencia en la capa de células epiteliales de la cara anterior del cristalino (**cabeza de flecha en la Figura 3C**).

Al anticuerpo Doblecortina (**Figura 3D**) revela al igual que  $\beta$ -Gal un marcaje claro en los axones de la capa de células ganglionares y de fibras ópticas de la retina neural y de la misma manera, del nervio óptico y las proyecciones nerviosas faciales (**cabeza de flecha en Figura 3D**). Por último, la muestra tratada con el anticuerpo Tag1 (**Figura 3E**), presenta una expresión débil de los axones de la capa ganglionar de la retina, pero a su vez, un marcaje muy intenso de la capa de fibras ópticas de la retina neural (**flecha en la Figura 3E**), del nervio óptico y de las proyecciones nerviosas faciales (**cabeza de flecha en la Figura 3E**).

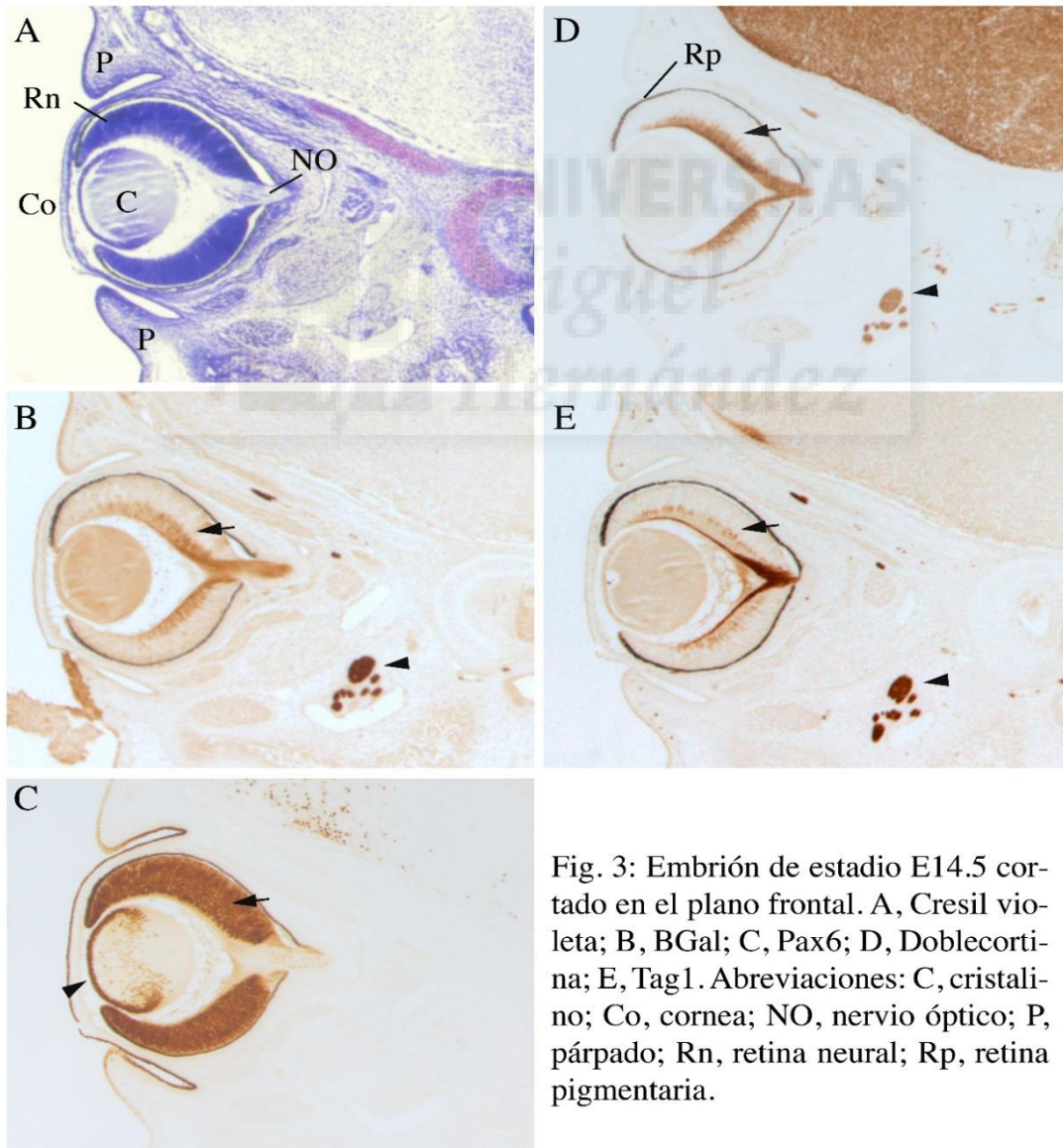
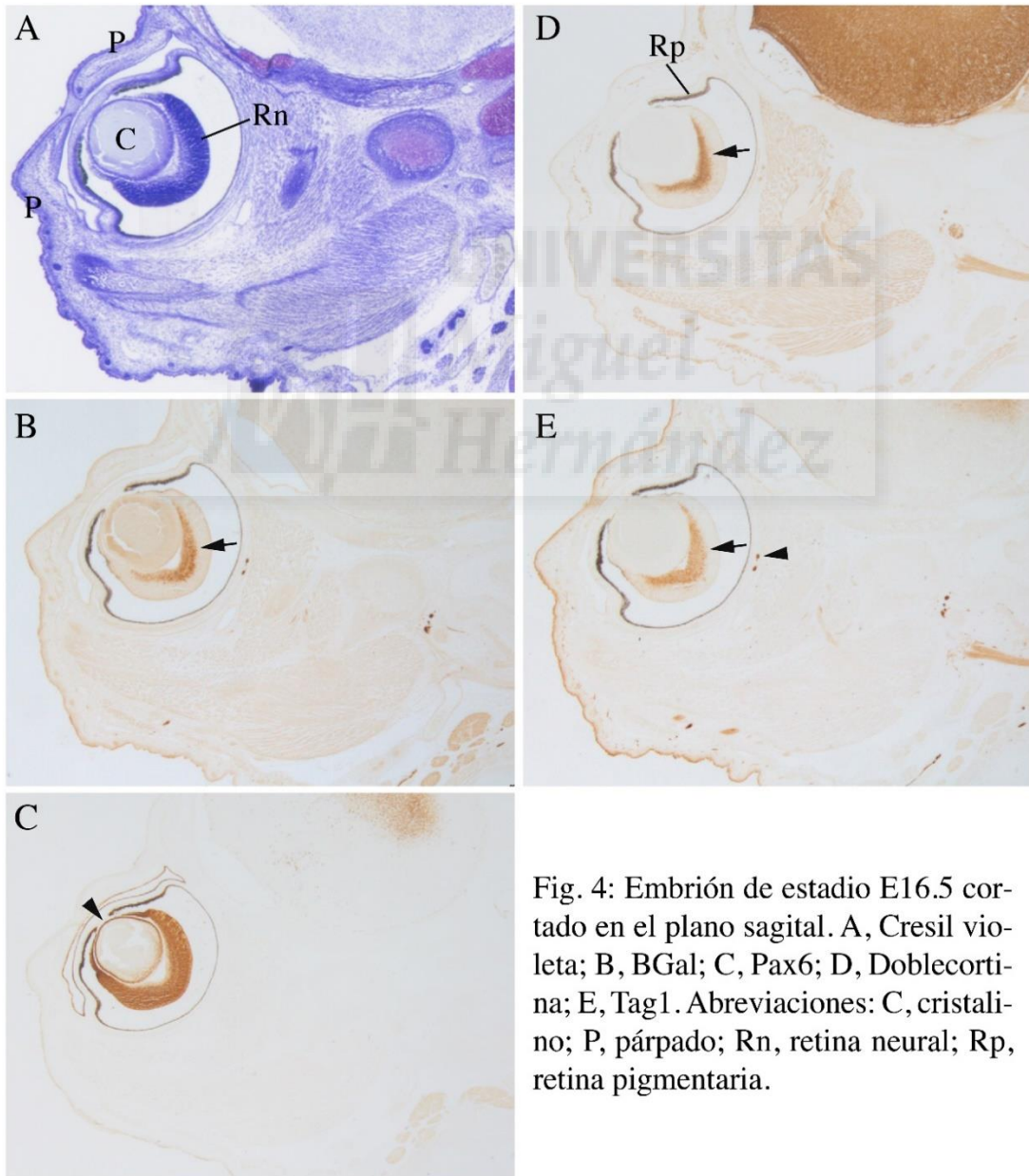


Fig. 3: Embrión de estadio E14.5 cortado en el plano frontal. A, Cresil violeta; B, BGal; C, Pax6; D, Doblecortina; E, Tag1. Abreviaciones: C, cristalino; Co, cornea; NO, nervio óptico; P, párpado; Rn, retina neural; Rp, retina pigmentaria.

El siguiente estadio en ser analizado es el de 16.5 días (**Figura 4**).

El estadio 16.5 muestra un patrón similar al del estadio 14.5 revelando el factor de transcripción en la capa de células ganglionares y la capa de raíces ópticas en el caso de los anticuerpos  $\beta$ -Gal (**flecha en la Figura 4B**), Doblecortina (**flecha en la Figura 4D**) y Tag1 (**flecha en la Figura 4E**). Al igual que en el estadio anterior, la muestra tratada con el anticuerpo Pax-6 (**Figura 4C**) revela un marcaje en las células epiteliales de la cara anterior del cristalino (**cabeza de flecha en la figura 4C**) y en todas las capas de la retina neural menos la de raíces ópticas.





Por último, se analizaron las muestras destinadas al estudio del quiasma óptico (**Figura 5**).

En la muestra teñida con cresil violeta (**Figura 5A**), podemos distinguir el quiasma óptico (**Q**) situado en la fosa cerebral anterior. Salvo el anticuerpo Pax-6 (**Figura 5C**), las muestras tratadas con los demás anticuerpos revelaron su presencia en el quiasma óptico como en el caso del anticuerpo  $\beta$ -Gal (**Figura 5B**), Doblecortina (**Figura 5C**) y Tag1 (**Figura 5D**). En las muestras tratadas con anti  $\beta$ -Gal (**Figura 5B**) y anti Tag1 (**Figura 5E**) se pueden observar proyecciones nerviosas procedentes del ganglio del trigémino (**cabezas de flecha en las Figuras 5B y 5E**).

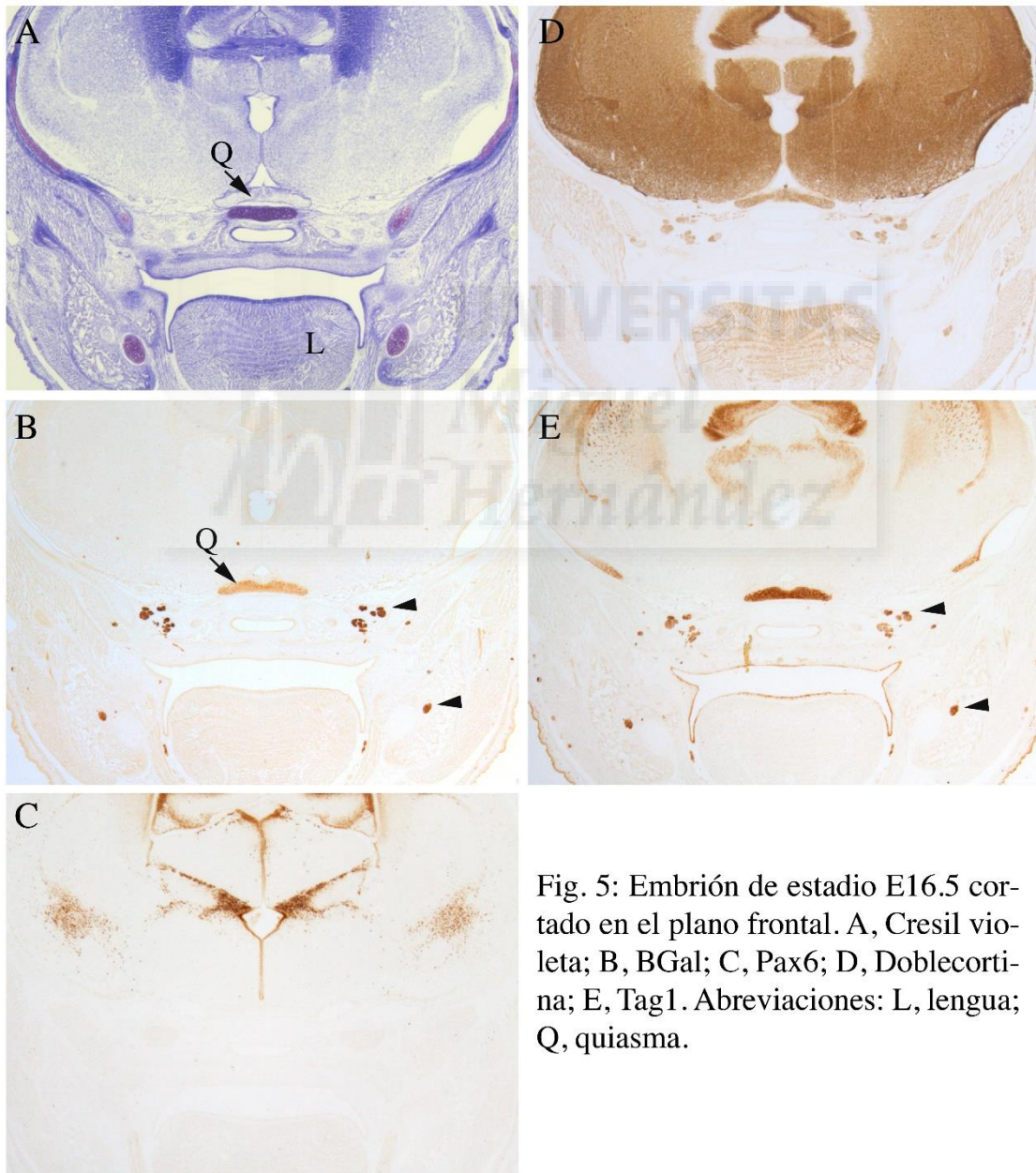


Fig. 5: Embrión de estadio E16.5 cortado en el plano frontal. A, Cresil violeta; B, BGal; C, Pax6; D, Doblecortina; E, Tag1. Abreviaciones: L, lengua; Q, quiasma.

## DISCUSIÓN

Analizando la distribución de la expresión del factor de transcripción Pou4f1 de las muestras estudiadas, podemos confirmar en primer lugar el inicio de la neurogénesis de la retina neural, la cual se encuentra en el estadio E12.5 días. En este estadio, la muestra tratada con anti  $\beta$ -Gal no muestra ningún signo de expresión, sin embargo, sí lo hacen los demás marcadores revelando su inicio y no es hasta el estadio E14.5 cuando se consolida el factor de transcripción y queda distribuido por la capa de células ganglionares y raíces ópticas de la retina neural.

Observando dicha distribución, podemos indicar a su vez el patrón de expresión morfológica, el cual se inicia en la mácula (pequeña región de la retina localizada en su parte posterior) en el estadio E12.5 días hasta alcanzar la retina periférica en el estadio E14.5. Esto no se observa en el caso de la proteína Pax6, ya que marca de manera general la retina neural permitiendo su visualización morfológica, pero sin arrojar datos sobre la capa de células ganglionares o de raíces ópticas.

Por ello, teniendo en cuenta las diferencias entre estadios, se puede confirmar la presencia de una etapa de proliferación y distribución de la expresión del factor de transcripción Pou4f1 situada entre el estadio E12.5 y el E.14.5. Lo que nos lleva a deducir la relevancia del gen objetivo de estudio en la formación de las capas de la retina neural identificadas.

Por otro lado, confirmados que como observamos en las muestras del estadio E14.5 días, el hecho de que, excepto la proteína Pax6 que se expresa en toda la retina neural, las demás proteínas utilizadas se expresan en células ganglionares diferentes. De esta manera podemos deducir que cada marcador identifica diferentes subtipos de células ganglionares en la misma capa de la retina neural.

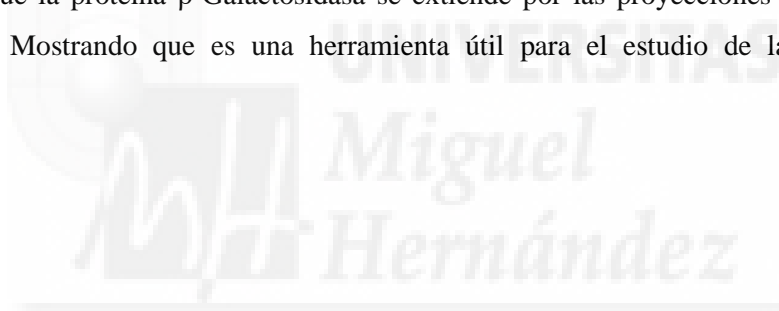
Respecto al quiasma óptico, queda confirmada la presencia del marcador objetivo de estudio en su estructura y su posible relevancia en su formación. Además, se confirma la naturaleza nuclear de la proteína Pax6 al no marcarse con su anticuerpo debido a que el quiasma óptico se encuentra formado por los axones de las células ganglionares de la retina neural.

## CONCLUSIÓN

Se ha alcanzado el objetivo del estudio. Se ha realizado el análisis de las muestras de diferentes estadios embrionarios de ratón mutante *Pou4f1 Tau-LacZ* y se ha comparado la presencia de la proteína bacteriana  $\beta$ -Galactosidasa producida por el gen *LacZ* con otros marcadores ya conocidos. Se ha estudiado su expresión en la retina, nervio óptico y quiasma óptico.

Queda confirmada la existencia de un periodo de neurogénesis del factor de transcripción objetivo de estudio entre el estadio E12.5 días y E14.5 días. En este periodo la expresión se distribuye desde la mácula hasta la retina periférica quedando confirmada su relevancia para la formación de la capa de células ganglionares y raíces ópticas. A su vez, se confirma el hecho de que cada marcador excepto Pax6 localiza su expresión en diferentes subtipos de células ganglionares. Sin embargo, no se han podido identificar estos subtipos.

Confirmamos así mismo que la construcción génica que se usó en este modelo de ratón es funcional y que la proteína  $\beta$ -Galactosidasa se extiende por las proyecciones de las neuronas ganglionares. Mostrando que es una herramienta útil para el estudio de las proyecciones visuales.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Silverthorn, Dee Unglaub. El ojo y la visión. En: Silverthorn, Dee Unglaub. Fisiología Humana, un enfoque integrado. Madrid: Editorial Panamericana; 2008. P. 357-369
2. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Percepción y vivencia: Sistemas Sensoriales. Sistema visual. Retina. En: Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Neuroanatomía. Madrid: Editorial Panamericana; 2008. P. 265-279
3. Benjamin A. Pierce. Transcripción. En: Benjamin A. Pierce. Genética. Un enfoque integrado. Madrid: Editorial Panamericana; 2009. P. 345-362
4. M. Renée Gerrero, Robert J. McEvelly, Eric Turner, Chijen R. Lin, Shawn O'Connell, Keith J. Jenne et al. Brn-3.0: A POU-Domain Protein expressed in the sensory, immune and endocrine systems that functions on elements distinct from known octamer motifs. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993;90: 10841-10845
5. Mengqing Xiang, Lijuan Zhou, Jennifer P. Macke, Takashi Yashoka, Steward C. Hendry, Roger L. Eddy et al. The Brn-3 family of Pou-Domain factors: primary structure, binding specificity, and expressions in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. J. Neuroscience. 1995; 15(7): 4762-4785
6. Natalia G. Fedtsova, Eric E. Turner. Brn-3.0 expression identifies early post-mitotic CNS neurons and sensory neural precursors. Elsevier. 1995; 53: 291-304
7. Saleshi S, Eckley L, Sawyer GJ, Zhang X, Dong X, Freund JN et al. Intestinal lactase as an autologous beta-galactosidase reporter gene for in vivo gene expression studies. Hum Gene Ther. 2009; 20(1): 21-30
8. Jacobson RH, Zhang XJ, Dubose RF, Matthews BW. Three-dimensional structure of beta-galactosidase from E. Coli. Nature. 1994; 30(6483): 761-6
9. García-Ayuso D, Garrido-Romero C, Di Pierdomenico J, Vidal Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas Pérez MP. Light-induced retinal degeneration causes a transient downregulation of melanopsin in the rat retina. Exp Eye Res. 2017; 161: 10-16
10. Galindo-Romero C, Haron-Or-Rashid M, Jiménez-López M, Vidal Sanz M, Agudo-Barriuso M, Hallböök F. Neuroprotection by  $\alpha$ 2-Adrenergic Receptor Stimulation after Excitotoxic Retinal Injury: A Study of the Total Population of Retinal Ganglion Cells and Their Distribution in the Chicken Retina. PLoS one. 2016; 9: 9-11