



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INDUCTORA DEL MORFÓGENO FGF8 EN EL TUBO NEURAL DE POLLO EMBRIONARIO

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Septiembre 2019

Autor: Almudena García Manzanaro

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Diego Echevarría Aza

Agradecimientos

A todo el Departamento de Embriología Experimental del Instituto de Neurociencias, por acogerme. Al grupo de trabajo de los Dres. Diego Echevarría y Eduardo Puelles por todo lo que he aprendido con ellos y por mostrarse siempre dispuestos a ayudarme, especialmente a mi tutor el Dr. Diego Echevarría Aza. A mi familia, y amigos por todo el apoyo y comprensión.



ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
2.1. Ontogenia del Sistema Nervioso Central.....	6
2.2. Organizadores secundarios: Morfógenos.....	9
2.3. Factores de crecimiento fibroblástico: FGF8.....	11
2.4. Uniones GAP y conexina 43.....	13
2.5. Conexinas y FGF durante el modelado cerebral.....	15
3. Objetivos.....	18
4. Materiales y métodos.....	18
4.1. Modelo animal.....	18
4.2. Implantación ectópica de Fgf8 mediante microbolitas de heparina en el mesencéfalo.....	21
4.3. Extracción de los embriones tras incubación.....	25
4.4. Inclusión en agarosa y cortes seriados.....	26
4.5. Inmunohistoquímica de cortes flotantes.....	27
5. Resultados.....	30
6. Conclusiones y discusión.....	36
7. Bibliografía.....	38

1. RESUMEN

Durante el desarrollo embrionario actúan una serie de moléculas señalizadoras llamadas morfógenos que dirigen y organizan el remodelado del Sistema Nervioso Central (SNC). Son capaces de inducir distintas respuestas en las células sobre las que actúan.

En el presente trabajo se habla de uno de ellos cuyo papel es muy importante en el desarrollo del cerebro medio y posterior, el factor de crecimiento fibroblástico-8 (Fgf8). Se ha demostrado que este factor es capaz de inducir otras proteínas y factores de transcripción. Por ejemplo, la inducción de un tipo de proteína llamada Conexina 43 (Cx43) implicada en la formación de hemicanales en las uniones celulares tipo GAP. La sinergia de los gradientes de actuación de los morfógenos con la comunicación intercelular proporcionada por estas uniones GAP, es útil para coordinar la embriogénesis y la morfogénesis

En el trabajo se estudia cómo al incluir Fgf8 en el mesencéfalo, mediante la manipulación con técnicas “*in ovo*”, se induce la síntesis de Cx43 de manera ectópica, lo que demuestra que Fgf8 y Cx43 trabajan en conjunto para el modelado del sistema nervioso.

ABSTRACT

During the embryonic development a series of signaling molecules called morphogens act that direct and organize the remodeling of the Central Nervous System (CNS). These morphogens can induce different responses in the cells on which they act.

In this paper we talk about one of them whose role is very important in the development of the mid and hindbrain, the fibroblast growth factor-8 (Fgf8). It has been shown that this factor can induce other proteins and transcription factors. For example, a type of protein, called Connexin 43 (Cx43) involved in the formation of hemichannels in GAP junctions. The synergy of the morphogen gradients with the intercellular communication provided by these GAP junctions is useful for coordinating embryogenesis and morphogenesis.

In the work, it is studied how to include Fgf8 in the midbrain, by manipulation with “in ovo” techniques, the synthesis of Cx43 is induced in an ectopic way, which demonstrates that Fgf8 and Cx43 work together for the patterning of the nervous system.

2. INTRODUCCIÓN

Como estudiante del Grado de Farmacia estoy interesada en el estudio del origen de diversas enfermedades del Sistema Nervioso Central, así como las posibilidades que ofrece la terapia genética y las diversas formas de administración de fármacos. Estamos frente a un paciente con una enfermedad del SNC, y nos preguntamos por qué tiene esa enfermedad, si su origen es genético, si está determinado o si posiblemente se trata de un defecto en el desarrollo embrionario, ya que el 50% del material genético está destinado a la formación del sistema nervioso y la mayoría de las enfermedades mentales que conocemos y somos capaces de tratar tienen su origen durante el mismo ^[1, 9]

Actualmente muchos de los fármacos que se diseñan se basan en la patología o trastorno específico que se quiere tratar, centrándose en el conocimiento de las estructuras tridimensionales de las dianas terapéuticas. ^[2] Una vez se obtiene un compuesto ideal se debe optimizar la selectividad, afinidad, potencia y sobre todo su seguridad. ^[3] También se tiene que estudiar la forma de suministrarlo para que no perjudique a la estabilidad ya que la manera de administrar un fármaco y el diseño de su forma farmacéutica pueden determinar su mecanismo de acción.

Las nuevas tecnologías nos permiten llevar el principio activo directamente a la célula diana sobre la que se quiere actuar como es el caso de los nanotubos de carbono utilizados como soporte de apoyo para obtener diferentes sistemas de administración de fármacos. La nanotecnología facilitará el movimiento de los fármacos a través de barreras del organismo que de otro modo no tendrían tanta facilidad para atravesar. ^[4]

En el Instituto de Neurociencias algunos de los laboratorios tienen como unidad de investigación la Neurobiología del Desarrollo, se centran en el estudio de formación de patrones, control de crecimiento, neurogénesis, migración y guía axonal, y sinaptogénesis en distintos modelos animales para el estudio del desarrollo normal y patológico del Sistema Nervioso (SN) mediante el uso de distintas técnicas moleculares, genéticas, celulares y electrofisiológicas. ^[5]

En el presente trabajo se pretende relacionar las técnicas de administración de fármacos modernas con las investigaciones que se llevan a cabo en el laboratorio, para ello se emplean unas perlas de heparina que actúan como quelante de la molécula en la que se centra este estudio, el Fgf8, una proteína con un papel muy importante en el desarrollo del Sistema Nervioso durante la embriogénesis.

2.1 Ontogenia del Sistema Nervioso Central

El Sistema Nervioso (SN) es el encargado de dirigir, supervisar y controlar todas las funciones y actividades de nuestros órganos y nuestro organismo en general. Se divide en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). Al primero pertenece el encéfalo y médula espinal mientras que el SNP engloba todos los nervios que salen del SNC hacia todo el cuerpo. [6]

Durante el proceso de formación y crecimiento del embrión, se desarrolla el Sistema Nervioso en una fase conocida como neurulación (Fig. 1). Durante ese proceso una hoja plana se transforma en el tubo neural. Primero, se forman las tres capas germinales: ectodermo, que da origen a la piel y sistema nervioso; la capa íntimamente relacionada con la anterior, el mesodermo, formará los tejidos esquelético, muscular y conectivo; y el endodermo, da lugar a los tractos digestivo, respiratorio y genitourinario. Posterior a la neurulación, el sistema nervioso sufre una fase de aumento de células que migrarán hasta su destino final donde establecerán conexiones. [7]

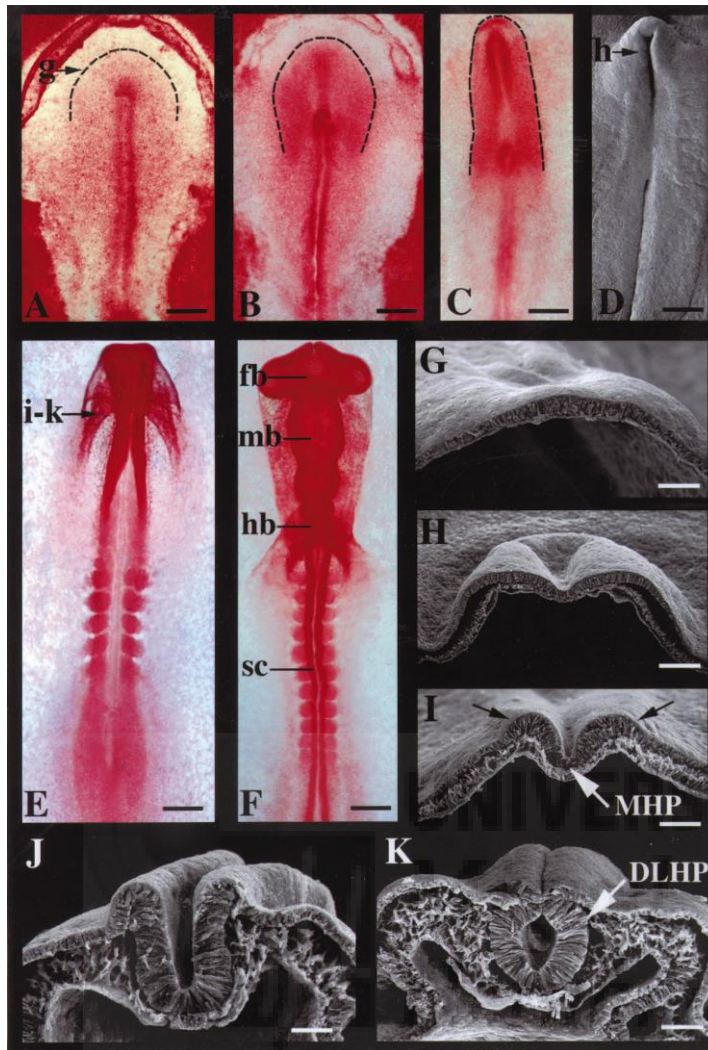


Fig. 1.- Micrografías electrónicas de luz y exploración de vistas dorsales de blastodermis de pollo en las etapas 4–10. (A) Placa neural plana (etapa 4) poco después de su formación. **(B)** Placa neural plana con proceso de la cabeza subyacente (es decir, notocorda; etapa 5). **(C)** Etapa del surco neural (etapa 6) que muestra el alargamiento rostrocaudal y el estrechamiento mediolateral característicos de la conformación de la placa neural. La línea discontinua en **A – C** indica los límites laterales aproximados de la placa neural. **(D)** Micrografía electrónica de barrido de una vista dorsal de un embrión de pollo en una etapa comparable a la del embrión en **C** (etapa 6), que muestra que la flexión de la placa neural se inicia durante su extracción. **(E)** Tubo neural incipiente (estadio 8+). **(F)** Tubo neural definitivo (etapa 10+). **(G – K)** Micrografías electrónicas de barrido de secciones transversales a través del blastodermo de pollo en los niveles neuroaxiales representados por las correspondientes letras minúsculas en las vistas dorsales. **(I – K)** indica el mismo nivel en las etapas de avance progresivo entre la formación de los incipientes pliegues neurales (flechas en **I**) y el cierre del surco neural. *Abreviaturas: fb, cerebro anterior; mb, cerebro medio; hb, cerebro posterior; sc, medula espinal MHP, punto medio de bisagra; DLHP, punto de articulación dorsolateral. A – F, barras = 325 mm; G – K, barras = 180mm.* [8]

En el ectodermo, las sustancias inductoras liberadas por el mesodermo compiten con la acción inhibitoria de las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) para evitar que las células de la capa germinal ectodérmica sigan la ruta diferenciativa hacia epidermis. Este proceso se conoce como inducción neural y culmina con el engrosamiento de la línea media dorsal formando la placa neural.

A continuación, los bordes laterales de la placa neural se elevan formando los pliegues neurales que dejan en el centro una depresión llamada surco neural. Luego las células mediante cambios en su morfología y propiedades de adhesividad fusionan los bordes concurriendo en la línea media dorsal lo que conduce a la formación del tubo neural. [8]

El desarrollo cerebral del embrión sigue avanzando y la porción rostral del tubo neural sufre una diferenciación y crecimiento masivos para formar el encéfalo. Se diferencian tres vesículas progenitoras: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo tras la evaginación de las vesículas oculares y el cierre del neuróporo anterior. Durante esta etapa se producen dos flexuras, la cefálica y cervical y el prosencéfalo y rombencéfalo se dividen. [9]

Para que se produzcan todos estos cambios actúan una serie de genes reguladores de formación de patrones identificando campos de desarrollo con distintas propiedades moleculares e histogénicas.

Tras el fenómeno de neurulación es posible distinguir cuatro regiones desde las cuales van a generarse todas las estructuras alrededor del eje transversal. La placa basal va a producir moléculas guía; de la placa suelo rombencefálica se producirán las neuronas de los núcleos del rafe y de la placa suelo del mesencéfalo, las neuronas de la sustancia nigra y área tegmental ventral. De la placa basal surgirán las regiones eferentes de actividad del SNC y Sistema Nervioso Autónomo. Por otro lado, en la placa alar se desarrollarán los centros de procesamiento sensitivo y las funciones de análisis e integración. La última de las regiones que encontramos es la placa techo que va a desarrollar las comisuras laterales; la placa techo del prosencéfalo formará el cuerpo calloso, el hipocampo y las comisuras anterior y posterior; también derivan de esta placa los plexos coroideos y la glándula pineal. [10]

Todas estas diferenciaciones en el prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo nos sitúan ante un embrión con un desarrollo del sistema nervioso más complejo. Pero es a raíz de la actuación de los organizadores secundarios cuando se construye la verdadera complejidad del Sistema Nervioso ya que es su actividad morfogénica la que controla la polaridad y la generación de subregiones neurales dentro de estas principales. ^[11]

2.2 Organizadores secundarios: Morfógenos

Existen diferentes moléculas implicadas en producir los cambios que llevan al desarrollo y formación del sistema nervioso central. A estas moléculas se les llama morfógenos, que actúan como señales posicionales controlando el destino celular del embrión. El morfógeno se une a un receptor, bien de membrana o nuclear, provocando una respuesta celular dependiente de la concentración, este hecho hace que se produzca una diferenciación celular todavía mayor. ^[12]

Los morfógenos, idealmente son definidos como un tipo particular de moléculas de señalización que actúa directamente sobre las células para inducir distintas respuestas. Son producidas por una fuente localizada formando gradientes de concentración que afectarán al tipo de respuesta, es decir, la respuesta celular va a ser dosis-dependiente. ^[13]

Para llegar a su destino, los morfógenos, pueden ser transportados bien por difusión simple, endocitosis o proteoglicanos. Se ha sugerido, también la participación de la transcitosis, los citonemas y los argosomas en el transporte de morfógenos. Independientemente del tipo de transporte, el gradiente de un morfógeno puede estar influido por la acción de inhibidores. Sin embargo, se necesitarán más estudios para evaluar el papel de estas actividades y estructuras en la formación de gradientes. ^[12, 13]

Tenemos dos posibilidades respecto a la respuesta celular que se produce en función de la concentración de morfógeno. Una de ellas se basa en que la célula individual responda o no a la señal, esto implicaría que las

diferentes respuestas corresponderían con un patrón poblacional. Por otro lado, cabe la posibilidad que la célula desarrolle distintos fenotipos en función de la concentración de morfógeno, lo que indicaría que las diferencias en las respuestas al morfógeno son individuales de cada célula. Según los estudios de M Rojas et al. (2014) esta última opción ha sido demostrada experimentalmente en células provenientes del polo animal de una blástula de *Xenopus laevis*.^[12]

Estas señales morfogénicas son procedentes de organizadores secundarios que aparecen durante el crecimiento del embrión para generar campos de desarrollo neural combinando los patrones de los ejes dorso ventral (DV) y anteroposterior (AP).^[10]

Tres regiones de la placa y el tubo neural se han identificado como organizadores secundarios: el polo neural anterior (ANR), a nivel de los bordes del neuróporo anterior, en el techo del prosencéfalo anterior; la zona limitante intratálámica (ZLI) en el diencéfalo; y el organizador del istmo (ISO), entre las vesículas mesencefálica y rombencefálica. Estas áreas se encuentran en zonas límites e inducen instrucciones morfogenéticas y propiedades de polaridad en los dominios neurales de sus alrededores.^[10]

El ANR expresa el gen *Sonic Hedgehog (Shh)* en la parte más rostral del tubo neural además de otros genes como los *Fibroblast Growth Factors (Fgf) 8* y *15*. El gen *Fgf8* se expresa muy temprano en las células ANR y se ha demostrado que es crucial para la especificación de las áreas anteriores del cerebro anterior y la polaridad telencefálica. De hecho, el *Fgf8* probablemente controle el desarrollo de regiones telencefálicas caudales.^[11]

Por otro lado, se ha demostrado que la actividad del neuroepitelio ístmico, conocido como organizador del Istmo (IsO), induce el desarrollo del mesencéfalo en el diencéfalo caudal y la responsable de este efecto es la molécula de señalización en la que se centra el trabajo, el *Fgf8*.^[11]

Esta actividad se basa en un patrón espaciotemporal complejo de expresión génica y se asienta en la coexpresión temprana de dos genes, el *Otx2* y *Gbx2*.^[11] Ambos con papeles contrarios en el desarrollo del cerebro medio y

posterior pero complementarios en el posicionamiento de la expresión de Fgf8. [14] Se conoce que la frontera creada por la coexpresión de *Otx2/Gbx2* desaparece en los estadios HH14-15. La expresión de *Otx2* disminuye en las células que expresan *Gbx2*. A su vez, en células en las que se expresa *Fgf8* - donde la expresión de *Otx2* ha disminuido- el *Gbx2* aumenta. Es decir, la expresión de *Fgf8* se da cuando el *Otx2* ha sido reprimido.

Los experimentos presentados por AL Garda, D Echevarría, S Martínez (2001) explican que la inserción de perlas impregnadas con *Fgf8* en un dominio *Otx2* genera, tras 12 horas de incubación, una coexpresión de los genes *Gbx2/Otx2* antes de que comience la represión del gen *Otx2*, que ocurre a partir de las 15 horas de incubación, manteniendo una nueva frontera entre *Gbx2/Otx2* lo que provoca la aparición de un *IsO* ectópico que conduce al desarrollo de una vesícula ectópica lateral. La perla de heparina con *Fgf8* genera estos cambios debido a la inducción de *Gbx2* en las células que entran en contacto con la perla.

[14]

2.3 Factores de crecimiento fibroblástico: FGF8

Como se ha visto, la proteína *Fgf8* es capaz de inducir multitud de cambios significativos en el desarrollo del SN y pertenece a la gran familia de factores de crecimiento fibroblástico (FGF). Estas proteínas tienen varias funciones biológicas tanto in vivo como in vitro, incluyen la mitogénesis, la migración, diferenciación y angiogénesis celular y la cicatrización de heridas. Además, regulan las vías de desarrollo, controlando eventos como el modelado del mesodermo en el embrión temprano mediante el desarrollo de múltiples sistemas de órganos. La coordinación de estas acciones tiene que estar muy bien regulada asegurando las concentraciones y la cadencia de actuación en cada lugar concreto. [15]

La familia FGF está compuesta por 23 miembros y únicamente 18 receptores de FGF (FGFR) para dichas moléculas. A diferencia de otros factores de crecimiento, los FGF actúan en conjunto con la heparina o el proteoglicano

heparán sulfato (HSPG) para activar los FGFR e inducir respuestas pleiotrópicas que llevan a una variedad de respuestas celulares inducidas por esta gran familia de factores de crecimiento. Entre las vías de señalización empleadas, se sabe que la quinasa RAS / MAP es predominante en el caso de los FGF. ^[16]

Las aplicaciones de FGF en la clínica abarcarán, en un futuro, la regeneración de tejidos incluidos tejidos de la piel, músculos, tendones/ligamentos, huesos, dientes y nervios, pero estas no serán totalmente viables hasta que los biomateriales portadores no se perfeccionen y se ajusten a sus funciones biológicas plenas. ^[16]

El Fgf8 es una molécula de señalización que tiene un papel fundamental en el remodelado del cerebro medio y posterior demostrado en el experimento de Crossley (1995) donde se demuestra que la expresión de Fgf8 se localiza en las primeras células que acaban formando el mesodermo y ectodermo definitivos. ^[17]

En el estadio final de la formación de la línea primitiva, la expresión de Fgf8 está restringida al componente epitelial de la línea media primitiva y a las células ectodérmicas inmediatamente laterales a la línea media, además, en esta etapa el nivel de RNA parece ser mayor en la parte proximal a la línea que en su extremo distal.

A medida que el embrión se va desarrollando, ocurren cambios en el modo de expresión de Fgf8.

Primero, se uniformiza a lo largo de toda la línea media. Después, empieza a ser detectado en las células mesodérmicas que salen de la línea media y este modelo de expresión se mantiene mientras que la línea media existe y, posteriormente, aparece en el brote de la cola.

Finalmente observamos su mayor expresión en la configuración y mantenimiento de la frontera entre el mesencéfalo y metencéfalo durante el desarrollo embrionario interactuando con los genes Gbx2 y Otx2 antes mencionados. A su vez, el Fgf8 se requiere para mantener la expresión de genes

y factores de transcripción que desempeñan un papel en el patrón del tubo neural formando bucles de regulación que mantienen el borde antes mencionado. [18]

La actividad de esta proteína se acompaña y autorregula junto con la actividad de otros morfógenos como son los derivados de las familias Wingless (Wnt) o Hedgehog (HH), [12] ambos con un papel principal en la regulación del comportamiento y destino celulares durante el desarrollo y modelado del sistema nervioso definiendo las identidades neurales a lo largo de los ejes AP y DV.

2.4 Uniones GAP y conexina 43

La conexina 43 (Cx43) es un péptido de 43kD miembro de la gran familia de las proteínas de las uniones GAP. [19]

Las uniones GAP son canales transmembrana que conectan el citoplasma de células adyacentes permitiendo la coordinación de múltiples procesos celulares. [20] Estos canales son microdominios espaciales de membrana plasmática contruidos a partir de combinaciones de conexones yuxtapuestos de células lindantes que forman poros hidrofílicos las cuales constituyen un canal de intercambio directo entre las células sin pasar por el plasma (Fig 2). Las conexinas se ensamblan como un hexámero formando los conexones y de esta manera son transportadas a la membrana plasmática para crear los hemicanales que una vez asociados con otros hemicanales crean dichas uniones célula-célula a través de los cuales se permite un intercambio rápido de iones y metabolitos de hasta * 1 kD de tamaño. [21]

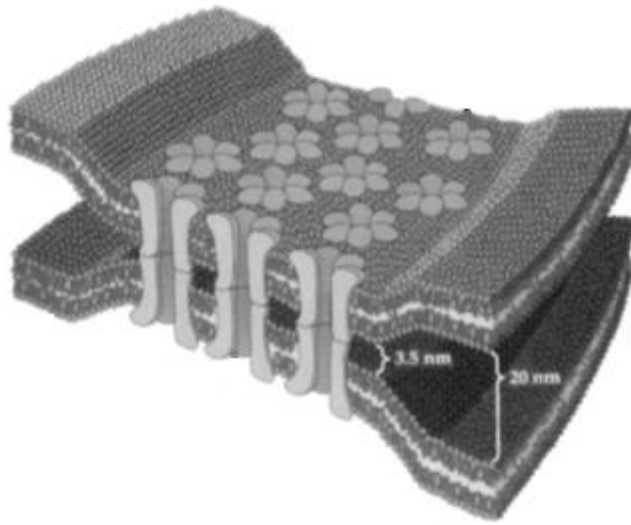


Fig2.- Modelo de unión GAP. Las subunidades de conexina hexamérica en cada una de las membranas de plasma se acoplan para generar el canal de unión de separación que conecta los dos compartimentos citoplásmicos. [21]

Estas uniones permiten la comunicación eléctrica entre las células, como se demuestra en los sistemas nervioso y cardiovascular [21] y es importante en el desarrollo y la regulación del crecimiento celular, así como para el mantenimiento del balance homeostático, la diferenciación o la muerte celular. [20, 22] En concreto, en el SNC, la función de la conexina está bien establecida en neurogénesis, migración celular, desarrollo neuronal, diferenciación y morfogénesis. [20]

Durante la morfogénesis, los morfógenos, tanto los organizadores primarios como los secundarios actúan según gradientes de difusión. Como se ha visto anteriormente, pueden ser transportados por diferentes procesos. Curiosamente, se ha asumido que las uniones GAP juegan un papel importante en la transmisión de estas señales especialmente en la comunicación dentro del neuroepitelio entre subpoblaciones celulares en estados de desarrollo críticos, por ejemplo, durante el desarrollo de la cresta neural. [15]

En concreto, las conexas tienen una labor significativa indicada por la presencia de Cx43 en las células de la cresta neural y por los defectos asociados a la mala expresión de esta en los tejidos derivados de la cresta neural.

Otro ejemplo del peso de las uniones GAP en el desarrollo y modelado del sistema nervioso sería el papel que ocupan durante la regionalización telencefálica en la que se demuestra que las conexinas se expresan durante la migración en todo el desarrollo cortical, específicamente Cx43 y Cx26, lo que parece controlar el citoesqueleto celular y la polaridad, para que se pueda producir un movimiento hacia adelante eficiente.

Las conexinas se expresan diferencialmente en el cerebro durante su ontogenia. Por ejemplo, Cx43 permanece expresado en células destinadas al linaje astrocítico, pero se reduce progresivamente en células que adquieren fenotipos neuronales. [23]

La Cx43 es tiene un patrón de expresión muy abundante en el organismo. Se aisló por vez primera en el corazón de mamíferos, no obstante, se ha identificado en órganos como el pulmón, riñón, corazón, hígado, tejido esquelético y sistema nervioso entre muchos otros realizando en cada uno de ellos una función biológica diferente. Tiene una vida media de entre 1-5 h y responde a la fosforilación de una gran cantidad de quinasas. [21, 24]

2.5 Conexinas y FGF durante el modelado cerebral

La relación de las conexinas con las moléculas de la familia FGF se establece a partir de un estudio de C Bosone, A Andreu y D Echevarría (2016) por el cual se demostró in vitro que, FGF2 causa la reducción de la proteína Cx43, la transcripción de RNAm y la comunicación intercelular. [15]

Muchos experimentos se han realizado desde entonces y los últimos resultados sugieren que las uniones GAP proporcionan un enlace directo para los mitógenos liberados como respuesta al FGF2 para regular la proliferación efectiva durante la formación del cerebro. [15]

En el encéfalo, la expresión de la Cx43 durante la neurulación es destacable en la parte del techo del telencéfalo y se extiende gradualmente hacia el extremo caudal; en el cerebro medio se observaron niveles más bajos y, por último, en el cerebro posterior se expresaba ampliamente en la zona del IsO.

Este perfil de expresión recuerda a la expresión de la proteína Fgf8 y sugiere que exista cierta relación entre las uniones GAP formadas por Cx43 y la actividad morfogénica del Fgf8. (Fig 3.) [15]

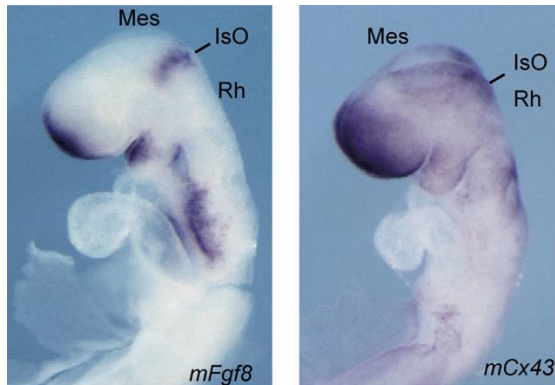


Fig 3.- Patrón de expresión de Fgf8 y Cx43 en ratón E8.0-8.5 [15]

La propagación de la molécula de señalización Fgf8 tiene lugar a través de dos factores: la difusión por el espacio extracelular y la absorción por células receptoras mediante receptores de membrana FGFR. Estas células receptoras se ocupan del control de propagación de la señal y de la intensidad de esta. [15]

La molécula, cuando interactúa con los FGFR activa una serie de cascadas de fosforilación entre las que destaca la cascada de las MAP quinasas, importante en la regulación del acoplamiento y función de las uniones GAP que modifican los dominios intracelulares de las Cxs fomentando cambios en la interacción proteína-proteína, la activación y cambios en el tráfico de canales. La regulación positiva de la Cx43 por la MAP quinasa es necesaria para la proliferación de FGF. [15]

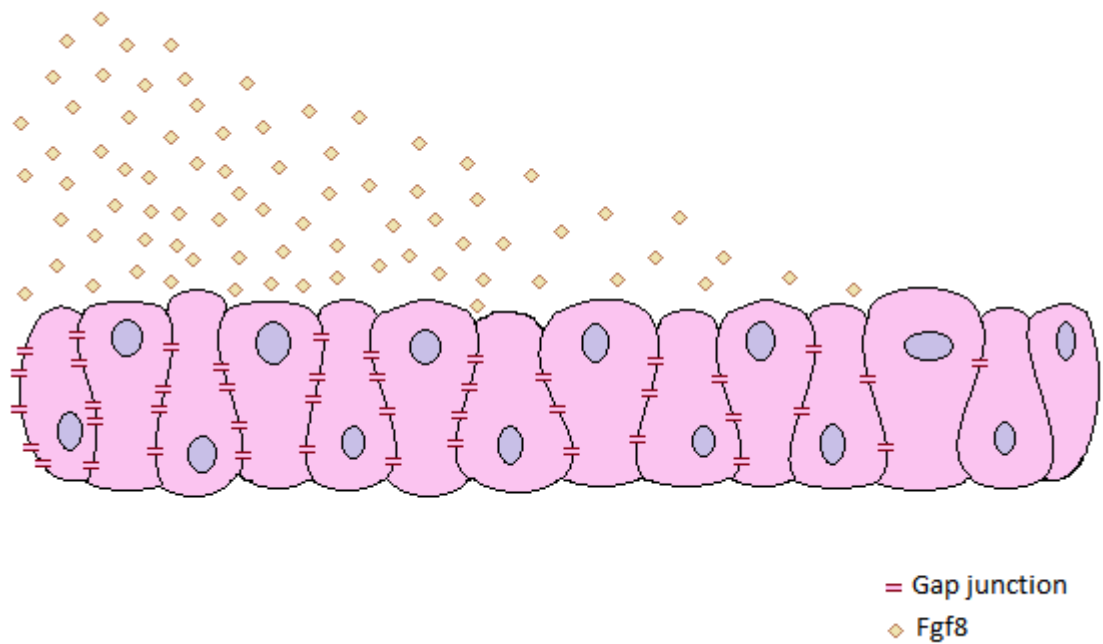


Fig 4.- Gradiente de expresión de uniones GAP en función de la concentración de Fgf8.

La comunicación por vía intercelular influida por las uniones GAP puede actuar junto con las interacciones celulares logradas por la liberación de factores de crecimiento y su consecuente unión a receptores de membrana para coordinar la embriogénesis y la morfogénesis.^[15] (Fig 4.)

3. OBJETIVOS

- Estudiar la capacidad inductora del Fgf8 en la morfogénesis del SNC
- Incrementar el conocimiento de la regulación de la Cx43 en el desarrollo temprano del SNC.
- El objetivo a largo plazo es averiguar si los morfógenos utilizan transmisores intercelulares, como las conexinas que constituyen las uniones GAP, para formar los gradientes de actuación que se observan de manera extracelular.
- El objetivo a corto plazo y en el que se focaliza este estudio es si el morfógeno Fgf8 necesita de la Cx43 para su inducción.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Modelo animal

Se elige como modelo animal para este experimento el embrión de ave, en concreto, el pollo. Los modelos de investigación con embriones de pollo están a la orden del día por las ventajas que supone trabajar con ellos.

Son animales de los cuales existe una amplia bibliografía en cuanto a su fisiología puesto que se han criado como animales domésticos durante muchos años. Los huevos fertilizados de pollo son baratos y se desarrollan en 20-21 días. Estos embriones producidos son resistentes y crecen fuera de la madre pudiendo mantenerse fácilmente en incubadores comerciales adaptables al laboratorio, lo que reduce los costes de mantenimiento.

Otra de las ventajas de utilizar embriones de pollo es el acceso al embrión durante su desarrollo, siendo numerosos los experimentos que se pueden realizar que impliquen la manipulación quirúrgica, como es el caso del presente trabajo. Por último, la compra y cuidados de huevos fecundados

es muy barata en comparación con la gestión de embriones de otras especies de vertebrados.

Finalmente, al ser vertebrados, el desarrollo de los embriones (Fig 5.) en los primeros estadios es muy similar al de los humanos proporcionando valiosas percepciones sobre el desarrollo del sistema nervioso, demostrando cómo migran y se diferencian las células. [25, 26]

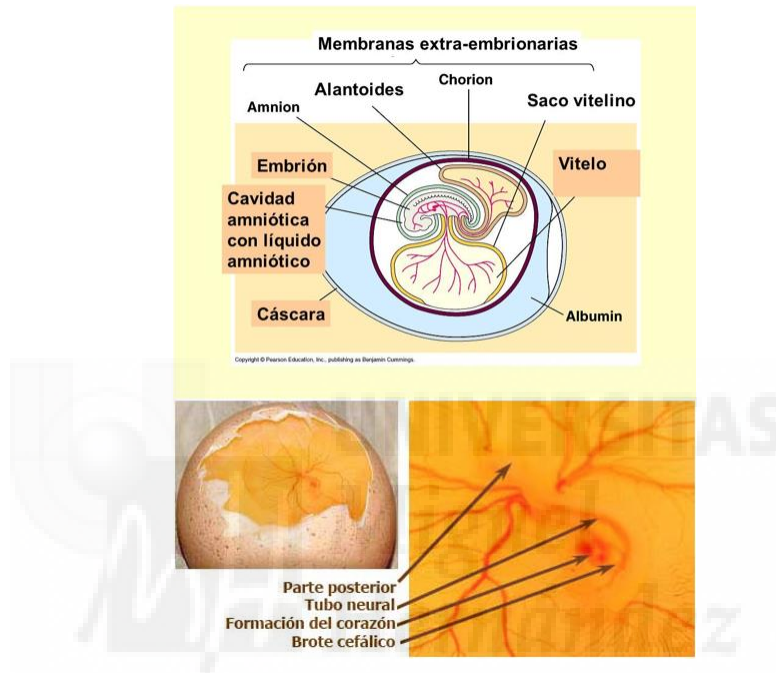


Fig 5.- Desarrollo del embrión en el interior del huevo.

La clasificación de los estadios en los que se va encontrando el embrión de pollo durante su desarrollo fue propuesta en 1951 por Viktor Hamburger y Howard L. Hamilton, adoptando el nombre de ambos como la clasificación Hamburger-Hamilton (HH). Esta clasificación divide el desarrollo del embrión en 46 etapas desde su fecundación hasta el nacimiento del pollo basándose en los cambios que va sufriendo durante su desarrollo. [27] (Tabla1 – Fig 6.)

Estadios Hamburger-Hamilton	Edad	Identificación del estadio
9+ a10-	Ca. 33 h	8-9 somitas, pliegue amniótico anterior
10	33 – 38 h	10 somitas, 3 vesículas primarias del cerebro
11	40 – 45 h	13 somitas, 5 neurómeros del cerebro posterior
12	45 – 49 h	16 somitas, telencéfalo

Tabla 1.- Estadios Hamburger-Hamilton

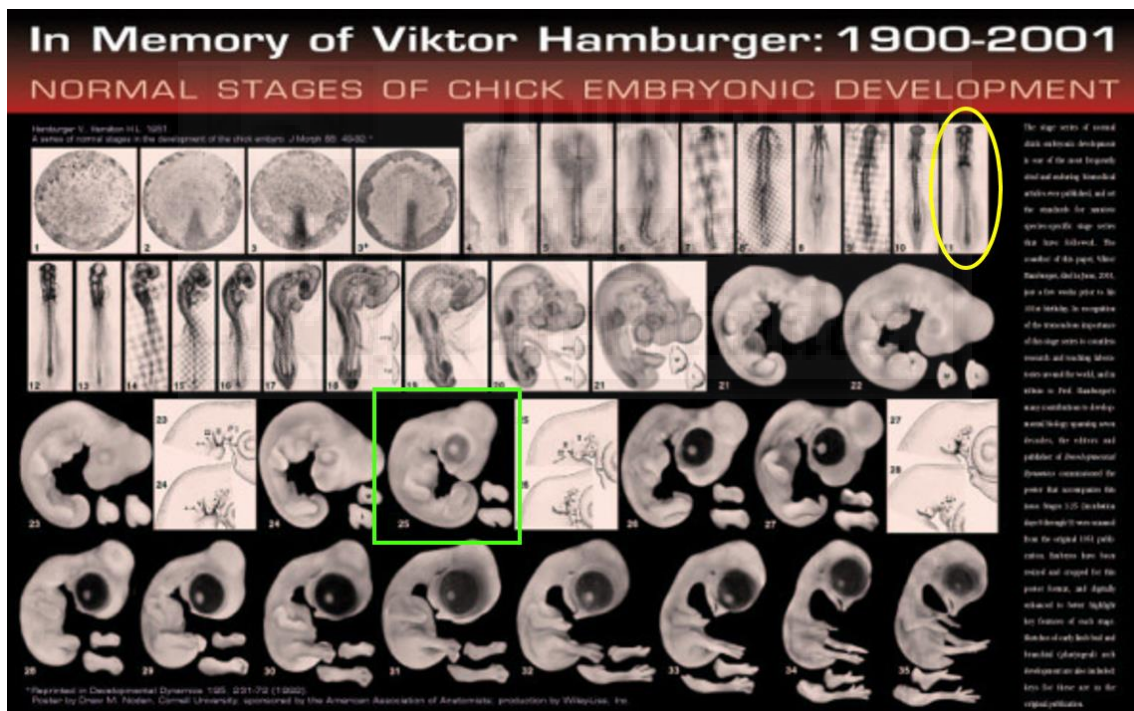


Fig 6.- Etapas normales del desarrollo embrionario del pollo. Señalado con un óvalo amarillo el estadio en el que se realizaron las manipulaciones, HH11. Señalado con un cuadrado verde el estadio en el que se recoge y fija el embrión para realizar el proceso inmunohistoquímico, HH25. [28]

Durante el experimento se trabaja con embriones HH11 en los que se destaca la formación de las tres vesículas primarias del cerebro telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo.

Los huevos se compran ya fecundados cuando llegan al laboratorio, se mantienen en la nevera a 4°C para frenar el desarrollo hasta el momento en que se incubarán hasta que estén en el estadio correcto. (Fig 7)

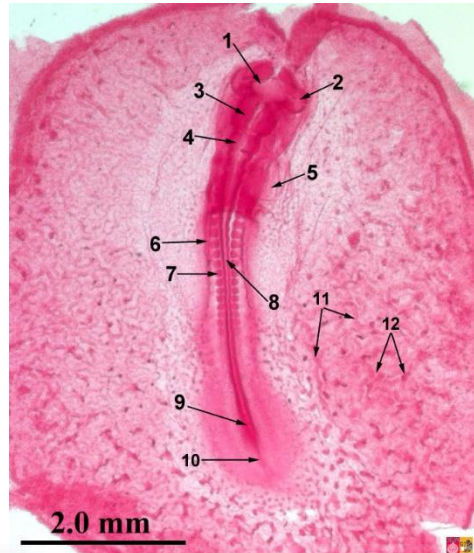


Fig.7.- Embrión de pollo de 36 horas tras la fecundación. 1. Prosencéfalo. 2.Vesícula ocular. 3.Mesencéfalo. 4.Rombencéfalo. 5.Corazón. 6.Mesodermo lateral. 7.Somita. 8.Columna vertebral. 9.Sinus rhomboidalis. 10.Raya primitiva. 11.Vaso sanguíneo pequeño. 12.Islas de sangre. [29]

4.2 Implantación ectópica de Fgf8 mediante microbolitas de heparina en el mesencéfalo.

Materiales

- | | |
|----------------------------------|--|
| - Soporte para huevo | - Goma para pipeteo |
| - Tijeras | - Capilares |
| - Jeringa y aguja de 10 ml | - Placas Petri |
| - Vaso de precipitados | - Aguja de tungsteno |
| - Celo | - Bolas de heparina impregnadas con Fgf8 |
| - Tinta china | - Lupa Leica MZ6 con luces KL1500 LCD (Schott) |
| - Medio Tyrode's con antibiótico | |

El primer paso es preparar la incubadora en la que permanecerán los huevos, se desinfectan con etanol (EtOH) 70° las paredes, el suelo y la puerta, así como los soportes y bandejas que mantendrán los huevos. por su eficacia

como bactericida, además, se pulveriza una sustancia biocida en las esquinas del fondo y puerta. Se colocan en el suelo dos bandejas con agua y unos mililitros de un aditivo microbiocida para mantener la humedad del ambiente.

Por otro lado, se prepara el medio Tyrode's al 60% de stock1 (Tyrode's); 20% del stock2 (Glucosa); 20% del stock3 (H_2CO_3); también se añade antibiótico (penicilina/estreptomicina) como conservante del medio. El procedimiento tuvo lugar de la siguiente forma:

1. Con la punta de la tijera se abre un pequeño orificio en un lado del huevo, ni muy horizontal ni muy perpendicular a la orientación de incubación.
2. Se extraen 2-3 ml de clara y cubrimos el huevo con celo, procurando que el orificio quede totalmente tapado para evitar que entre el aire y se seque o contamine el huevo y se abre una ventana en la cáscara con las tijeras de aproximadamente 2 cm de diámetro.
3. Con medio mezclado con tinta china se tinte la parte inferior del embrión para crear un contraste. Mucha cantidad de tinta puede ser tóxica e impedir el posterior desarrollo del embrión.
4. Se comprueba el estadio. Si es correcto, se abre una ventana de trabajo, en la membrana superficial que cubre al embrión, con la aguja de tungsteno. Luego se hace un pequeño ojal en el mesencéfalo del embrión evitando atravesar el embrión o dañarlo de manera innecesaria. (Fig 8.)

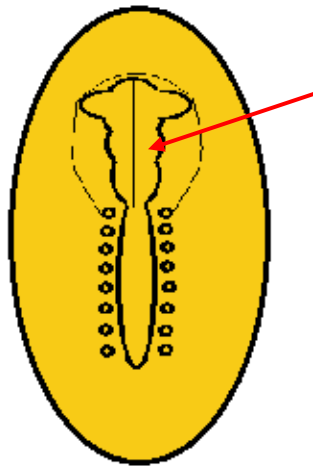


Fig 8.- Dibujo del embrión en estadio HH11. La flecha señala el lugar de implantación de la bola, en el mesencéfalo, en la parte más distal y posterior posible.

5. Se captan las bolas ya preparadas con una gomita y un capilar manteniendo la bola en la punta del capilar sin perderla. Luego, se enfoca de nuevo el embrión y se introduce la bola con ayuda de la aguja de tungsteno.
6. Con la bola en su sitio, se añade medio Tyrode's por encima con cuidado de que no se mueva la bola y se tapa con celo la ventana sin dejar huecos por el cual se pueda colar el aire y contaminar o secar el huevo. Se deja en la incubadora para que se desarrolle durante 48 horas. (Fig 9.)

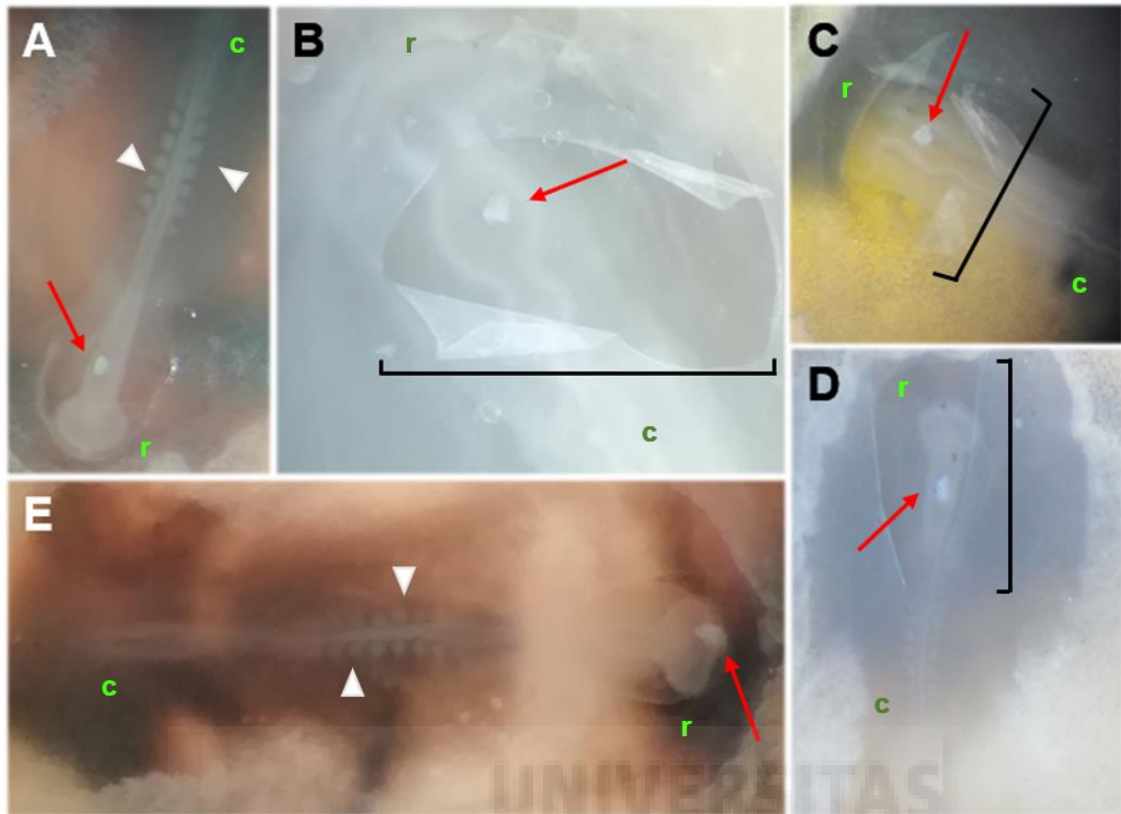


Fig 9.- Embriones de pollo a estadio HH11 con bead implantado. (A) Embrión de pollo de estadio HH10 temprano donde se comienza a distinguir las 3 vesículas primarias con bolita implantada en el que se pueden observar los somitas. (B, C) Embrión de pollo HH11 con bolita implantada en el mesencéfalo, se distinguen las 3 vesículas primarias y se aprecia la ventana de trabajo en la membrana amniótica. (D) Embrión de pollo de estadio HH10 temprano donde se comienza a distinguir las 3 vesículas primarias con bolita implantada, también se aprecia la ventana de trabajo en la membrana amniótica. (E) Embrión estadio HH11 con bolita implantada en el que se aprecian los somitas, la cola y las vesículas primarias en el encéfalo. *Abreviaturas: Flecha roja: localización del bead; Cabeza de flecha blanca: somitas; barra negra acota la ventana de trabajo; r: rostral; c: caudal.*

En la figura 9 podemos ver ejemplos de algunas imágenes de las manipulaciones llevadas a cabo en el laboratorio. Como se puede observar, no todos se encuentran en el mismo estadio de desarrollo pese a haber sido tratados en las mismas condiciones de humedad y temperatura, esto puede ser visto como un indicador de la calidad del propio embrión.

4.3 Extracción de los embriones implantados tras incubación

Materiales

- Tijeras de punta redondeada
- Pinza recta para disección
- Pinza recta punta fina
- Pinza punta fina, extremo en curva
- Espumadera pequeña
- PBS 1%
- PFA 4%
- Placas Petri
- Placas multipocillos

Pasadas 48 horas desde la implantación, se extraen los embriones del huevo, con cuidado de no romperlo, se elimina la membrana en contacto más íntimo con el embrión, para que se fijen correctamente, y se lava en la solución tampón fosfato salino 1% (PBS) unas 3 veces sobre placa multipocillos. A continuación, se fija con paraformaldehído (PFA) al 4% durante toda la noche, en la nevera de 4°C (Fig 10.)

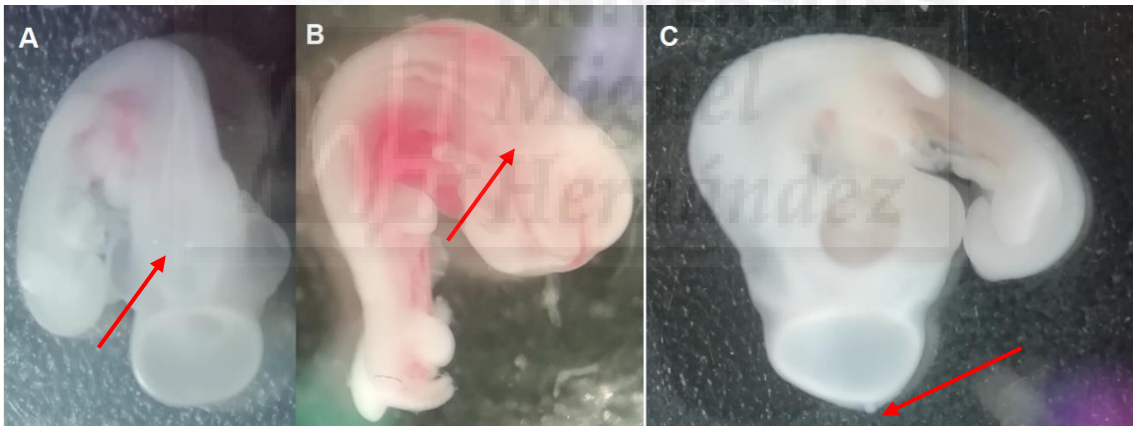


Fig 10.- Embriones extraídos tras 48 horas de incubación, estadio (HH25). Las flechas rojas señalan la posición del *bead*. En este estadio se distinguen las articulaciones del codo y rodilla, comienzan a marcarse los surcos digitales en las alas y el tercer dedo del pie en la pierna.

4.4 Inclusión en agarosa y cortes seriados

Materiales

- Matraz Erlenmeyer con agarosa en PBS
- Placas Petri
- Espumadera pequeña
- PBS 1%
- Cuchillas
- Pincel
- Placas multipocillos
- Loctite Super Glue – 3
- Insertos para placas multipocillos
- Vibratomo Leica VT1000 S

Al día siguiente de la fijación en PFA, se eliminan los restos de PFA mediante lavados en PBS 1X. Se utiliza agarosa al 4%, previamente preparada calentándola mediante golpes de microondas de 30 segundos para conseguir que quede transparente y sin grumos.

Colocamos los embriones en una placa Petri con la agarosa en posición totalmente horizontal, esto será sustancial a la hora de obtener los cortes totalmente transversales. Es importante secarlos un poco en papel para que se fijen bien a la agarosa y que no se suelten cuando hagamos los cortes.

Cuando se seca, se corta la agarosa en forma de pirámide para facilitar la estabilidad a la hora de realizar los cortes seriados en el vibratomo (Fig 11.)

Los parámetros del vibratomo que se utilizan son velocidad 3,5 mm/s; frecuencia de 4,5 Hz y grosor de 120µm. Conforme van saliendo los cortes del tejido se recogen y pasan a un pocillo con inserto para que no se pierda el corte. Los cortes con *bead* pasarán a pocillos limpios para no perderlos y mezclarlos con el resto del embrión.

Los cortes que no tiene bola son rechazados y los seleccionados pasan a una placa multipocillos de 24, en la que cada pocillo es más pequeño y por tanto se necesitará menos cantidad de producto.

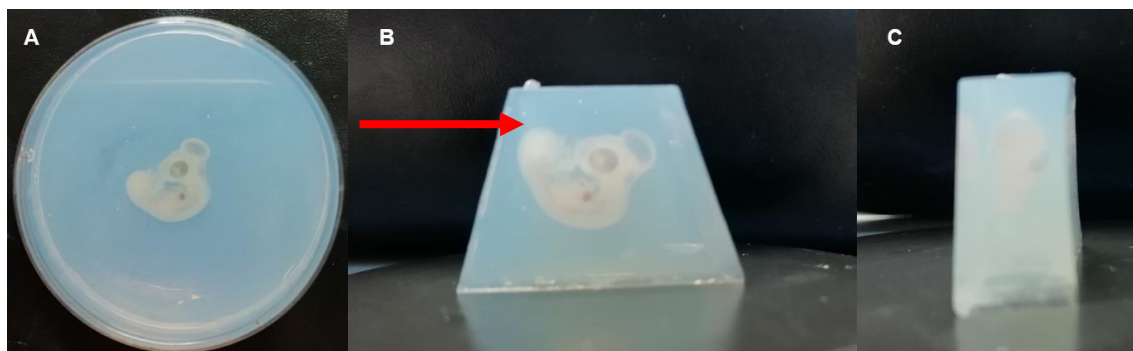


Fig 11.- Diferentes vistas del embrión incluido en agarosa. (A) Embrión incluido en la placa Petri, vista de planta. **(B)** Embrión preparado para corte, vista de alzado. La flecha indica la dirección del corte. **(C)** Embrión preparado para corte vista de perfil.

4.5 Inmunohistoquímica de cortes flotantes

Materiales

- | | |
|-----------------------|-------------------------------|
| - Placa multipocillos | |
| - Agitador | - PBS 1% |
| - Tubos eppendorf | - PBS-T 0.05% |
| - Micropipetas | - Bloqueo con BSA y Lysina |
| - Frasco de cristal | - Anticuerpo Cx43 (primario) |
| - Vaso de preparados | - Anticuerpo GAR (secundario) |
| - Papel aluminio | - Complejo AB |
| - Pipetas pasteur | - DAB |

El proceso de inmunohistoquímica en cortes flotantes se realiza en dos días. Primero, realizamos una serie de 3-4 lavados con PBS 1x ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,08M, Panreac 141678.1214 y NaCl 0,15M, Panreac 121659.1211), de unos 10 minutos, sobre los cortes con las bolas, en una placa multipocillos de 24, sin inserto. Llevaremos mucho cuidado para que no se suelte ninguna bola, y en cada paso del proceso comprobamos que éstas sigan estando.

Una vez finalizados los lavados, preparamos un bloqueo de albúmina de suero salino (BSA, Sigma A2153) al 0.1% y 10% de Lysina 1M (Sigma L5626) sobre PBS 1x, por último, añadimos Azida sódica (Sigma S2002) como

conservante. Añadimos el bloqueo y lo dejamos durante aproximadamente 1 hora para que la unión antígeno-anticuerpo sea lo más específico posible y evitar que aparezca mucho ruido de fondo.

Pasado este tiempo, preparamos el anticuerpo primario (Ab 1º), en nuestro caso, el anticuerpo seleccionado es un anticuerpo Cx43 de conejo de la empresa Cell Signaling #3512. ^[30] Se utiliza una dilución 1:100 con el Ab Cx43 y BSA y lo dejamos incubando toda noche en movimiento constante y a 4°C.

Al día siguiente, recuperamos el Ab 1º con cuidado y lo guardamos en el congelador para el próximo uso. Realizamos lavados con PBS 1x en los dos primeros ensayos, el resto de ensayos utilizamos PBS-Tritón al 0.05% para eliminar el exceso de anticuerpo y preparamos el anticuerpo secundario (Ab 2º), un suero de cabra policlonal anti-conejo en concentración final 1:200. Se incubaba en movimiento constante aproximadamente 1 hora.

Pasado el tiempo, se deja incubar una hora con el complejo ABC a 1:500 en PBS tapado con aluminio para evitar la exposición a la luz. Este complejo está formado por un primer reactivo de avidina (A), una glicoproteína que se unirá al reactivo B (peroxidasa biotinilada) y a la biotina del Ab 2º. Es importante preparar el complejo con tiempo antes de la incubación con los cortes, para que la unión de la avidina con la biotina-peroxidasa sea buena. ^[31]

Tras esto, se realizan 3-4 lavados con PBS 1x, esta vez sin el detergente (triton) porque se adhiere al reactivo del revelado y no se observaría nada.

Para el revelado se prepara una solución de PBS 1x con 1% de 3-3'Diaminobenzidine tetrehydroc (DAB, Acros Oganics W0572M) 1:10 en PBS 1x y 0,003% de H₂O₂ para la detección mediante un precipitado marrón. Se debe llevar cuidado por la toxicidad del compuesto DAB y su reactividad frente a la luz, por ello mismo se trabajará especialmente con guantes y aluminio cubriéndolo todo. Se deja revelando 5-10 minutos en movimiento para que se impregne bien, si tras este tiempo, el precipitado marrón que se forma por la reacción del DAB con la peroxidasa se ve lo suficiente se frena la reacción extrayendo la solución de revelado y lavando con PBS 1x.

El material no desechable que ha estado en contacto con el DAB se lleva a una cubeta con lejía, mínimo 20 minutos para desactivar el compuesto carcinógeno.

El proceso que se ha realizado es una técnica que se basa en el uso de anticuerpos específicos para detectar la presencia de una proteína. La reacción está basada en la reacción antígeno-anticuerpo. Se utiliza un método indirecto en el que la señal se amplía superponiendo sucesivas capas de anticuerpos y marcadores. (Fig 12.)

Esta técnica permite identificar la localización de una sustancia específica reconociendo su ubicación tisular o citológica. Puede ser aplicable a la caracterización de líneas celulares, proteínas secretadas por células, receptores de membrana, gradientes de concentración, etc. De este modo se pueden identificar los marcadores antigénicos característicos de una línea celular, identificar células que secretan una proteína, receptores de membrana, gradientes de concentración tisulares o células que han respondido a una hormona.

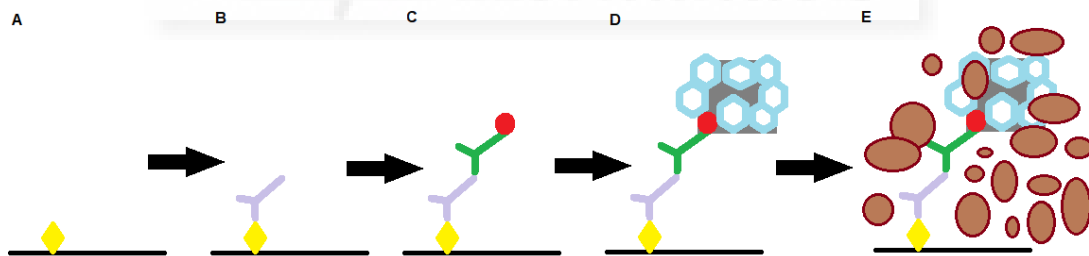


Fig 12.- Esquema de una inmunohistoquímica. (A) Proteína que se quiere identificar en tejido tisular (Cx 43 en corte de embrión de pollo). **(B)** Anticuerpo primario unido a la proteína (Ab anti-Cx 43 de conejo). **(C)** Anticuerpo secundario contra el primario (Ab suero de cabra policlonal anti-conejo). **(D)** Unión del complejo avidina-biotina-peroxidasa. **(E)** Resultado de la reacción enzimática con el revelado.

5. RESULTADOS

En el presente trabajo experimental se han utilizado un total de 125 huevos de gallina fecundados, se ha estudiado la relevancia de la proteína morfogenética FGF8 en la inducción de la Cx43 mediante la implantación de “*beads*” de heparina impregnados en FGF8 en el tubo neural de un embrión de pollo de 40 horas de gestación.

En cada sesión de manipulación experimental que hemos realizado, se han empleado 30 huevos, de los cuales 15 se manipularon en posición horizontal y 15 de manera vertical por las posibles ventajas que conllevaría el no tener que extraer clara y la apertura de una ventana algo más pequeña. No obstante, no se obtuvo ningún beneficio pues los embriones de los huevos que se abrieron de manera vertical se encontraban en posiciones inaccesibles desde el punto de vista experimental, posiblemente por el hecho de haber sido incubados en posición horizontal.

La primera sesión fue de aprendizaje, para familiarizarme con la técnica y el instrumental del laboratorio. En la cual aprendí cómo se abría la cáscara de un huevo, se extraía la clara, se inyectaba la tinta china por debajo del embrión y cómo se rasgaba la membrana amniótica.

En la segunda sesión, de los 20 huevos manipulados, a 11 se les insertó el *bead*. Ninguno logró superar las 48 horas de supervivencia dada la dificultad de la técnica en sí misma y a la falta de antibiótico suficiente que se añade en el medio previo a la manipulación en el medio empleado.

Se realizaron 4 pruebas más (125 huevos en total) en las que se logró implantar *beads* en 41 embriones; 34 no lograron la implantación por diferentes motivos. De los 41 implantados, sobrevivieron 26 tras las 48 horas de incubación. Una vez terminado el proceso y después de la fijación en PFA 4% y el seccionamiento en cortes transversales con vibrátomo se obtuvieron 13 cortes que incluían *bead* implantado en el cerebro, los mismos a los que se les aplicó el proceso de inmunohistoquímica en cortes flotantes contra conexina 43.

Como se puede observar en el esquema (Fig 13), en un total de 52 embriones con implante, solo la mitad sobrevivió lo suficiente para poder fijarlos y realizar los cortes; de estos, se obtuvieron cortes válidos del 50%. Es decir, solo un cuarto de los embriones implantados llegó a la fase de revelado. El porcentaje de éxito del trabajo ha sido de un 3,2% teniendo en cuenta las imágenes obtenidas con resultados óptimos *versus* el número de huevos utilizados.

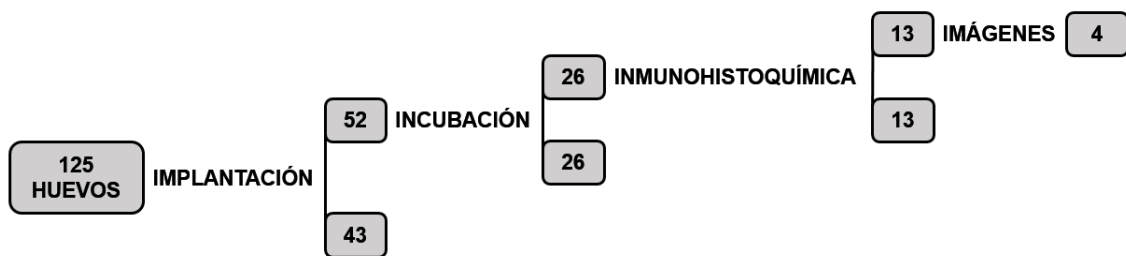


Fig 13.- Diagrama de uso de huevos durante el proyecto

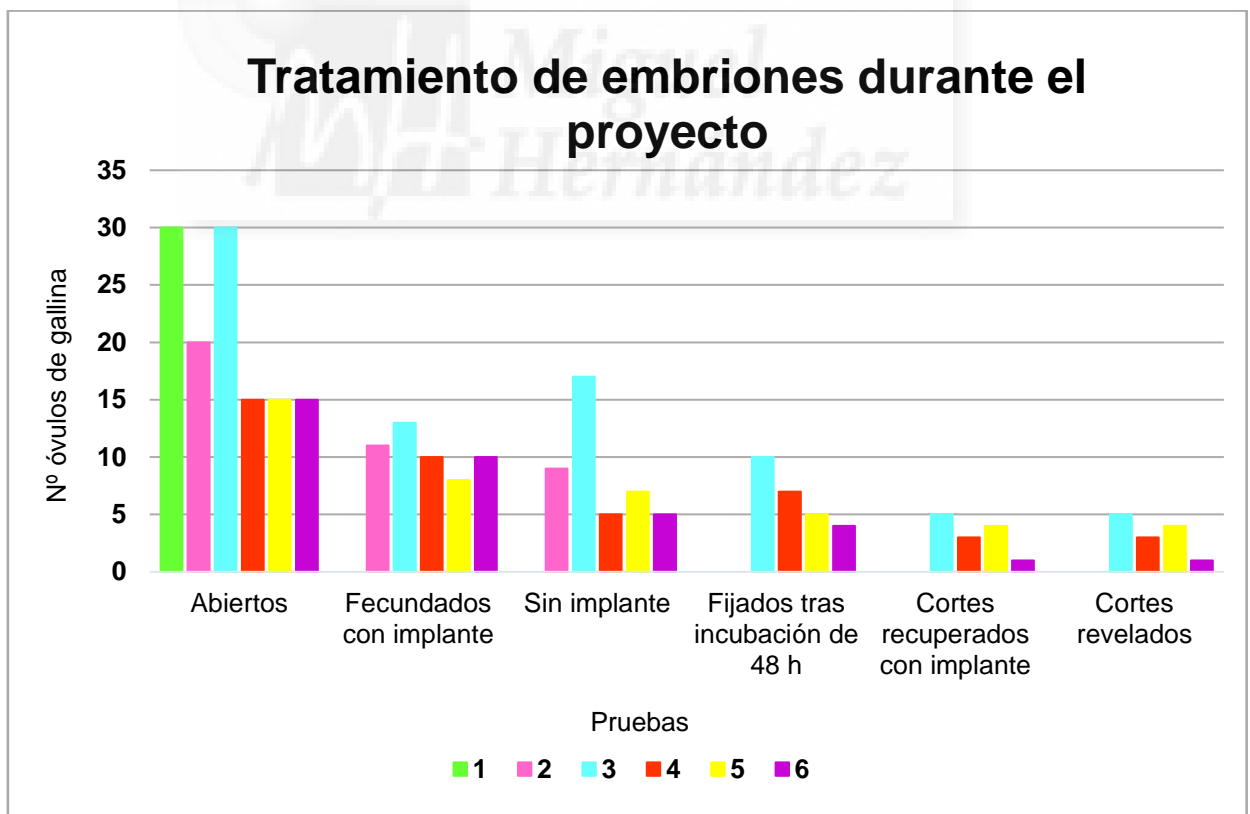
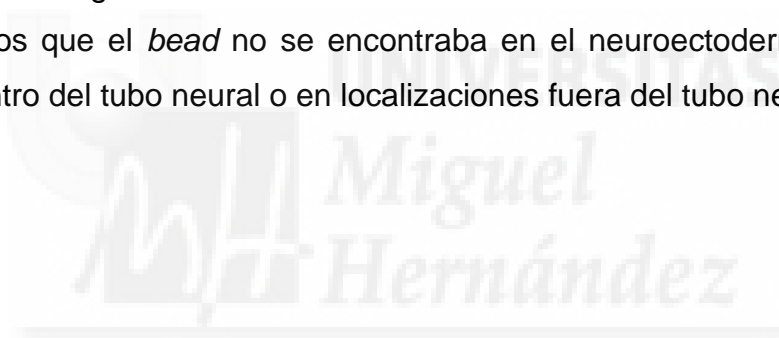


Gráfico 1.- Tratamiento de embriones de pollo durante el proyecto

En el gráfico destaca la tendencia a la baja que sufre el número de embriones durante las distintas fases del ensayo, estas pérdidas pueden ser debidas entre otras razones a encontrar huevos sin fecundar o en un estadio demasiado temprano en el que no se puede trabajar; toxicidad de la tinta, contaminación por otros factores biológicos o físicos; *beads* que se sueltan al contacto con la cuchilla o durante la manipulación en el proceso inmunohistoquímico.

Cabe destacar que, de los cortes revelados, se seleccionaron aquellos en los que realmente se apreciaba un cambio producido por la proteína, pues a pesar de llegar hasta el final con el *bead* en el tejido, la localización en la que se encuentre es muy importante. Durante el proceso de implantación, el neuróporo anterior todavía se encuentra abierto, esto quiere decir que el *bead* se puede mover de sitio según va desarrollándose el embrión. Se descartaron aquellos cortes en los que el *bead* no se encontraba en el neuroectodermo, o estaba situado dentro del tubo neural o en localizaciones fuera del tubo neural.



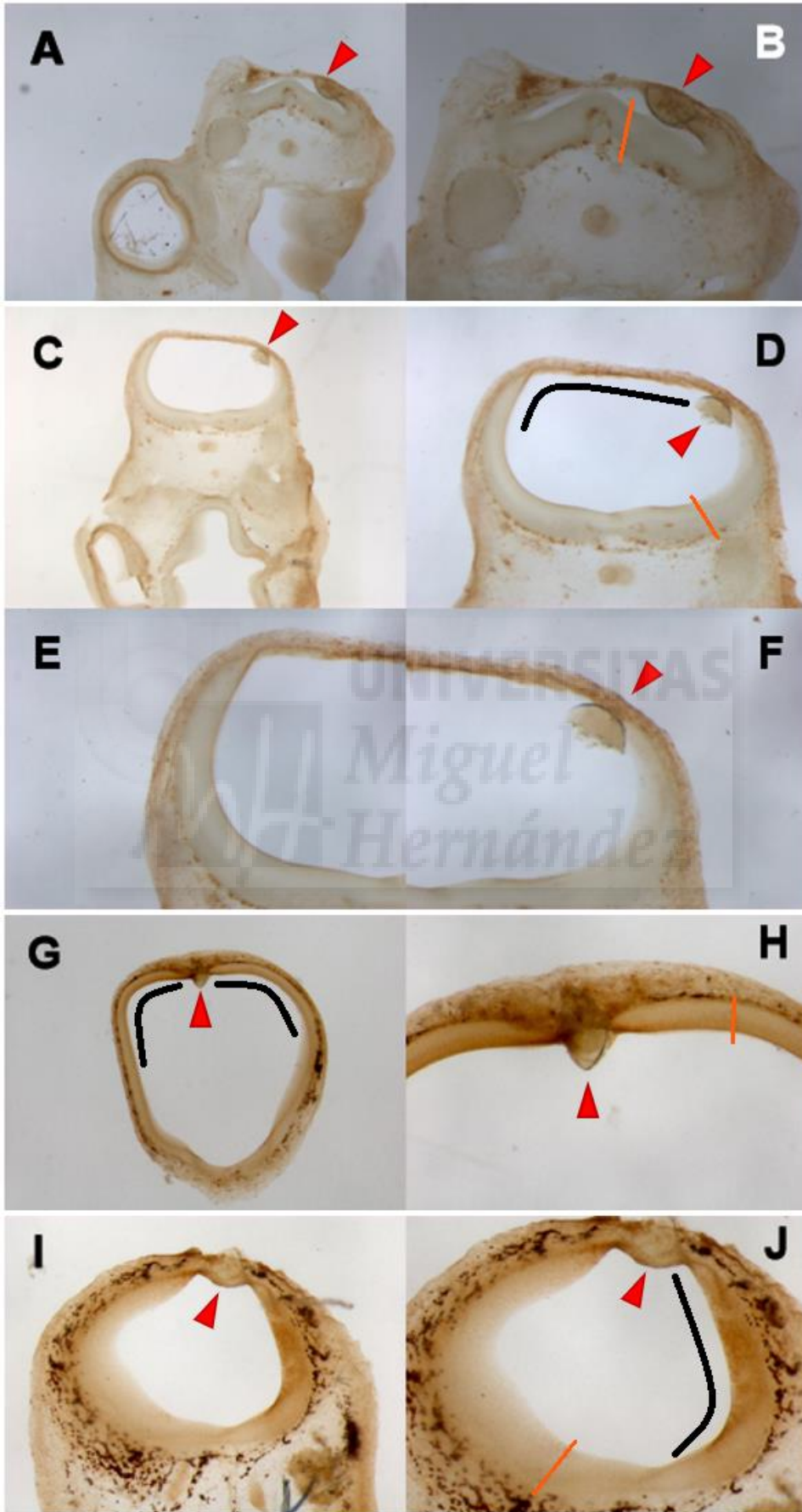


Fig 14.- Cortes transversales de embrión de pollo con inserción de bead de heparina impregnado en Fgf8 en el neuroepitelio. La cabeza de flecha señala la posición del *bead* en el corte. La línea negra indica la tinción positiva a la inmunohistoquímica. La raya naranja acota el neuroepitelio. Estos cortes fueron tratados mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra la conexina 43 (Cx43).

En las imágenes se muestran varios cortes revelados con el *bead* insertado en el tejido neural, en los que se ha estimulado la inducción ectópica de Cx43 y con ello, la formación posibles placas de conexones que pudieran comunicar las células debido a la proteína morfogenética.

En el ensayo se ha analizado la capacidad inductora de la proteína FGF8 en cerebros de pollo embrionario de estadio HH11 mediante la implantación, en el mesencéfalo, de un *bead* de heparina impregnado en dicha proteína. En el estadio en el que se trabaja, en el embrión se aprecia la formación de las 3 vesículas primarias, y es en la zona posterior del mesencéfalo donde interesa introducir la bola por su proximidad al Organizador del Istmo (IsO) (Fig 14.), uno de los principales responsables de la expresión de Fgf8.

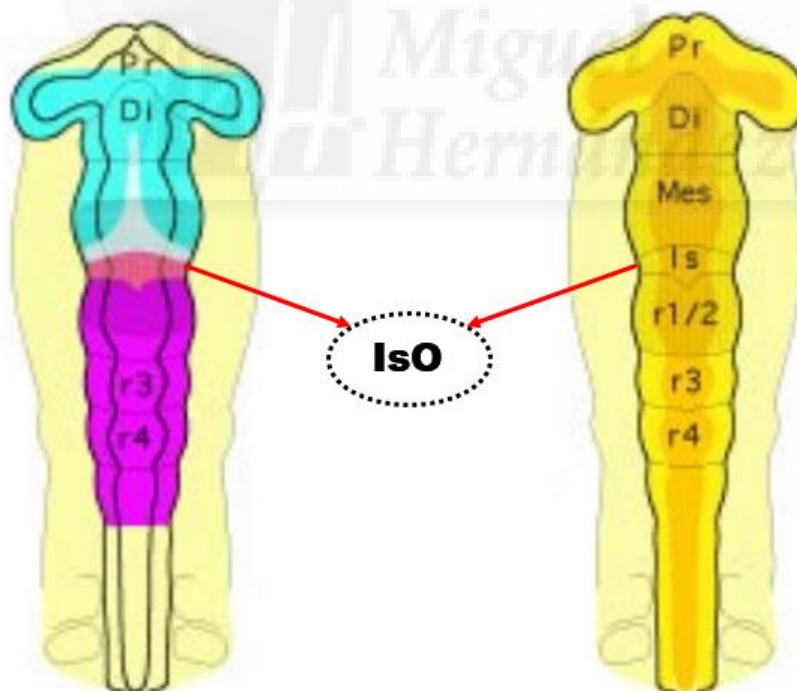


Fig 15.- Localización del organizador istmíco en embrión de pollo a estadio HH11.^[32]

Al introducir la perlita en una zona donde su presencia no es natural, se genera una serie de cambios morfogénéticos en las células en contacto con la proteína impregnada en ella, generando una nueva cadena de señalización parecida a la ocurrida en el organizador ístmico y por lo tanto la formación de una frontera molecular entre dos genes reguladores que acabará por especificar la formación de un IsO ectópico. La aparición de un nuevo organizador implicará el desarrollo de vesículas extra (duplicaciones) lo que producirá, a largo plazo, malformaciones en el tubo neural del pollo.

Como se puede observar en la figura 14, las imágenes A, C, G, I son diferentes muestras de cortes transversales del embrión de pollo con inserción de la perlita de heparina impregnada con Fgf8. En estas imágenes podemos apreciar una zona más oscura, dentro del neuroepitelio, en las proximidades de la bolita, positiva a la inmunohistoquímica lo que quiere decir que en esas zonas hay conexina 43. No obstante, si observamos el neuroepitelio más alejado de la inserción, la tinción es negativa, no hay conexina 43. Esto significa que, de manera natural, dentro del neuroepitelio del mesencéfalo no debe haber conexina 43 y que ha sido inducida de manera ectópica por el morfógeno Fgf8.

Por otro lado, las imágenes B, D, H, J son ampliaciones de las primeras en las que se aprecia mucho más esta tinción. Se ha querido repetir la imagen C mucho más ampliada para verdaderamente contraponer ambas partes y observar las diferencias entre ambos lados.

Cabe destacar que hay zonas externas al neuroepitelio (mesénquima) que también han sido tintadas, pues muchas de esas zonas tienen conexina 43 de manera endógena y no se ha podido eliminar del todo el ruido de fondo.

6. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Por la literatura, se sabe que el factor de crecimiento fibroblástico Fgf8 tiene la capacidad de impulsar una serie de cascadas de activación génicas que modifican el destino celular de aquellos tejidos con los que se topa. En este trabajo se ha tratado de esclarecer la capacidad que tiene el factor morfogenético Fgf8 en la redefinición genética dentro del tubo neural de pollo embrionario respecto a la inducción de conexina 43.

Mediante técnicas de manipulación *in ovo* se utilizaron 125 embriones de pollo de aproximadamente 40 horas de gestación, en la mayoría de los cuales se introdujeron bolitas de heparina impregnadas en Fgf8 en la zona del mesencéfalo. Por la dificultad de la técnica el porcentaje de éxito ha sido muy bajito. No obstante, en estudios de la misma índole como es el caso del estudio de García-López R *et. al.* (2009) se emplearon alrededor del millar de quimeras para obtener resultados del mapa de destino del tubo neural del pollo embrionario.^[33]

Se escogió esta técnica porque a pesar de lo dificultoso de la misma, cuenta con grandes ventajas como es la rapidez de desarrollo del embrión, en 21 días se gesta el pollo; es barata pues la compra, mantenimiento y materiales empleados es relativamente barato; se puede dirigir y planificar según nuestras necesidades y la manipulación experimental es sencilla.

Cabe destacar que la implantación de la bolita no siempre se implantaba en el neuroepitelio mesencefálico ya que, al ir desarrollándose el embrión, la bolita recorre el tubo neural provocando en muchas ocasiones la expulsión del tejido e implantación en el mesénquima, o por el contrario la introducción en el tubo neural. En ocasiones lograba implantarse en el neuroepitelio, pero no en el mesencéfalo, siendo ésta la zona en la que interesaba la implantación puesto que es un territorio afín a Fgf8, pero cuya fuente se encuentra situada más caudalmente, en el Organizador Ístmico.

Al incluir Fgf8 en una zona ectópica de Cx43, se ha demostrado la capacidad de inducción de esta proteína. Es decir, se ha observado por primera

vez que la inclusión de Fgf8 provoca la inducción de conexina 43, una proteína muy importante en la formación de uniones GAP y en la comunicación intercelular. Por tanto, podemos decir que el morfógeno necesita de la Cx43 para continuar formando gradientes y activando cascadas de señalización para la reorganización del SNC.

Conocer más nuestro sistema nervioso y las moléculas que están implicadas o son esenciales en la formación del mismo puede servirnos en un futuro para averiguar en qué momento del desarrollo se ha producido alguna enfermedad o a qué ha sido debida.

Quizás pueda ser útil para prevenir dichas enfermedades o para crear una terapia basada en técnicas como la utilizada en el proyecto que permita modificar las anomalías o malformaciones que se produzcan durante el desarrollo embrionario bien por enfermedades congénitas o bien por factores ambientales antes de que se produzca un daño irreversible en el embrión.

Conociendo los pasos que se van dando en la gestación de un embrión podremos adelantarnos a cualquier dificultad o detectarla a tiempo sin que llegue a perjudicar a la madre o el feto.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Reig German, Concha Miguel L. Impronta Genómica y Desarrollo Embrionario. *Int. J. Morphol.* 2012; 30(4): 1453-1457. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022012000400029&lng=es. // <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022012000400029>
2. Pouplana R.; Barril X.; Luque F. J. Química computacional en diseño de fármacos. *LifeSciencesLab* 2009; (003): 28-31
3. Lynch, S. (2017). Diseño y desarrollo de los fármacos. Recuperado 28 agosto, 2019, de <https://www.msmanuals.com/es-es/hogar/f%C3%A1rmacos/introducci%C3%B3n-a-los-f%C3%A1rmacos/dise%C3%B1o-y-desarrollo-de-los-f%C3%A1rmacos>
4. Oropesa-Nuñez, R., & Jáuregui-Haza, U. J. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas Nanoparticles as drug carriers: characteristics and perspectives. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 2016; 43(3).
5. Rodríguez, F. B. Desarrollo embrionario del sistema nervioso central y órganos de los sentidos: revisión/Embryonic Central Nervous System and Sense Organ Development. *Universitas Odontológica*. 2012; 31(66)
6. Olivé, M. L. P. Neurobiología del desarrollo temprano. *Contextos Educativos. Revista de Educación*. 2013; (4), 79-94
7. Smith, J. L., & Schoenwolf, G. C. Neurulation: coming to closure. *Trends in neurosciences*. 1997; 20(11), 510-517.
8. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Neuroanatomía. Editorial Médica Panamericana; 2008
9. Martínez, S. Mecanismos generales del control molecular de la formación de las regiones del cerebro durante el desarrollo. *Boletín del ECEMC*. 2012; (1), 9-16.
10. Echevarría, D., Vieira, C., Gimeno, L., & Martínez, S. Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain research reviews*. 2003; 43(2), 179-191.

11. Rojas, M., Signore, I. A., & Mejías, R. Morfógenos durante el desarrollo embrionario de vertebrados. *International Journal of Morphology*. 2014; 32(1), 319-326.
12. Tabata, T., & Takei, Y. Morphogens, their identification and regulation. *Development*. 2004; 131(4), 703-712.
13. Garda, A. L., Echevarría, D., & Martínez, S. Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmic organizer. *Mechanisms of development*. 2001; 101(1-2), 111-118.
14. Bosone, C., Andreu, A., & Echevarria, D. GAP junctional communication in brain secondary organizers. *Development, growth & differentiation*. 2016; 58(5), 446-455.
15. Yun, Y., Won, J., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., *et al.* Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *Journal of tissue engineering*. 2010; 1(1), 2181242.
16. Wikipedia contributors, editor. FGF8 [monografía en internet]. San Francisco, EEUU: Fundación Wikimedia; 2019. Disponible en: <https://en.wikipedia.org/wiki/FGF8>
17. Crossley, P. H., & Martin, G. R. The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*. 1995; 121(2), 439-451.
- 18.
19. Kar, R., Batra, N., Riquelme, M. A., & Jiang, J. X. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012; 524(1), 2-15.
20. Evans, W. H., & Martin, P. E. Gap junctions: structure and function. *Molecular membrane biology*. 2002; 19(2), 121-136.
21. Suzhi, Z., Liang, T., Yuexia, P., Lucy, L., Xiaoting, H., Yuan, Z., *et al.* Gap junctions enhance the antiproliferative effect of microRNA-124-3p in glioblastoma cells. *Journal of cellular physiology*. 2015; 230(10), 2476-2488.

22. Rozental, R., Giaume, C., & Spray, D. C. Gap junctions in the nervous system. *Brain Research Reviews*. 2000; 32(1), 11-15.
23. Wikipedia contributors, editor. GJA1 [monografía en internet]. San Francisco, EEUU: Fundación Wikimedia; 2019. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/GJA1>
24. Contreras, J., Martínez, P., Santos, I., & Rojo, C. El embrión de pollo como modelo de experimentación. Dpto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Facultad de Veterinaria. UCM. 2013
25. Hamburger V. and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*. 1951; 88(1): 49-92. PMID 24539719
26. Olea, G., & Sandoval, M. Desarrollo embrionario de *Columba livia* (Aves: Columbiformes) desde una perspectiva altricial-precoz. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2012; 25, 3-13.
27. Radboud Univeristy Nijmegen. (2011, 1 diciembre). Embryology of chicken: 33-36 h. Recuperado 28 agosto, 2019, de <https://www.vcbio.science.ru.nl/en/virtuallessons/embryology/chicken-33-36h/>
28. Cell Signaling Technology, Inc. (s.f.). CST - Connexin 43 Antibody. Recuperado 28 agosto, 2019, de <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/connexin-43-antibody/3512>
29. Bonacic S., Cristián. Características biológicas y productivas de los camélidos sudamericanos. *Avances en Medicina Veterinaria*. 1991; Vol.6(2).
30. Martinez, S. The isthmus organizer and brain regionalization. *International Journal of Developmental Biology*. 2003; 45(1), 367-371.
31. Garcia-Lopez, R., Pombero, A., & Martinez, S. Fate map of the chick embryo neural tube. *Development, growth & differentiation*. 2009; 51(3), 145-165.