



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA MORFOGÉNESIS TEMPRANA DEL TUBO NEURAL: ESTUDIO EXPERIMENTAL DE FGF8 EN EL DESARROLLO DEL HIPOTÁLAMO

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2015

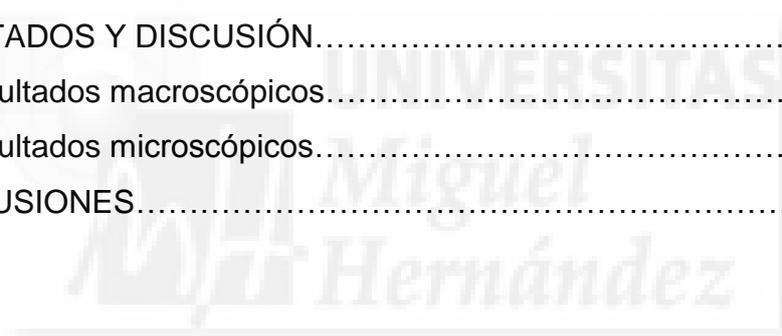
Autor: María Teresa Marín Tur

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Diego Echevarría Aza

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 2.1. Neurulación. Subdivisiones longitudinales..... | 3 |
| 2.2. Regionalización rostro-caudal y segmentación del tubo neural. Morfogénesis del tubo neural..... | 5 |
| 2.3. Hipotálamo e hipófisis y sus funciones..... | 12 |
| 2.4. Objetivos..... | 20 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 21 |
| 3.1. Modelo animal..... | 21 |
| 3.2. Obtención y procesamiento de embriones..... | 21 |
| 3.3. Técnicas histológicas..... | 22 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 26 |
| 4.1. Resultados macroscópicos..... | 26 |
| 4.2. Resultados microscópicos..... | 27 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 34 |



Índice de abreviaturas:

A: Placa alar

ABas: Núcleo anterobasal

ac: Comisura anterior

ACTH: Hormona adrenocorticotropa

ADH: Hormona antidiurética

ANR: Anterior Neural Ridge

AH: Hipotálamo anterior

AHy: Adenohipófisis

AP: Antero-posterior

Arc: Núcleo hipotalámico arcuato/arqueado

B: Placa basal

BMP: Bone Morphogenetic Protein

Cb: Cerebelo

ch: Quiasma óptico

chp: Plexo coroideo

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

Cx: Corteza

DMH: Núcleo hipotalámico dorsomedial

DV: Dorso-ventral

EP: Epitálamo

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

FP: Placa del suelo

FSH: Hormona estimuladora del folículo

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

H: Hipotálamo.

HC: Hipocampo

IC: Colículo inferior

Inf: Infundíbulo hipofisario

Is: Istmio

ISO: Isthmic Organizer/Organizador ístmico

LH: Núcleo hipotalámico lateral

LH: Hormona luteinizante

mb: Mesencéfalo

ME: Eminencia media
ML: Medio-lateral
MM: Núcleos mamilares
MnMRM: Núcleo retromamilar medial, parte media
mtg: Tracto mamilotegmental
NHy: Neurohipófisis
OB: Bulbo olfatorio
on: Nervio óptico
opt: Tracto óptico
P: Puente
Pa: Núcleo hipotalámico paraventricular
pc: Comisura posterior
PH: Hipotálamo posterior
PIH: Hormona inhibidora de prolactina
PO/POA: Núcleo hipotalámico preóptico
PrTh: Pretálamo
PT: Pretectum/pretecho
RM: Núcleo retromamilar
RP: Placa del techo
SC: Colículo superior
SCh/SCH: Núcleo hipotalámico supraquiasmático
SHH: Sonic Hedgehog
sm: Estría medular del tálamo
SN: Sistema nervioso
SNC: Sistema nervioso central
SNP: Sistema nervioso periférico
SO/TSO: Núcleo hipotalámico supraóptico
Th: Tálamo
TRH: Hormona liberadora de tirotrópina
TSH: Hormona estimulante del tiroides
VMH: Núcleo hipotalámico ventromedial
ZLI: Zona Limitans Intratalámica
3v: Tercer ventrículo

1. RESUMEN

Entender cómo se desarrolla correctamente el sistema nervioso central (SNC) continúa siendo una asignatura muy importante para todo investigador. Durante el desarrollo temprano del cerebro se produce una serie de combinaciones de factores de transcripción y moléculas secretadas al espacio extracelular que actúan de forma orquestada para dar lugar a la morfología y función del cerebro tal como lo entendemos. La carencia de alguna de estas informaciones lleva consigo alteraciones que bien pueden ser sutiles o por el contrario importantes y que provocan que nuestro cerebro desencadene una serie de disfunciones y neuropatologías.

Es por tanto fundamental entender cómo se relacionan entre sí estas moléculas y qué importancia tienen durante las fases tempranas del desarrollo embrionario. Entre ellas se encuentra el morfógeno FGF8 (factor de crecimiento fibroblástico 8), el cual desempeña un papel fundamental en la especificación y desarrollo del tubo neural.

En concreto, el proyecto experimental de este Trabajo Fin de Grado se ha basado en entender el papel de este morfógeno en una región de suma importancia para el farmacéutico: la región hipotalámica, órgano endocrino por excelencia para el control autónomo y metabólico de nuestro cuerpo. Ello ha sido posible por medio del estudio y descripción anatómica de cerebros de embrión de ratón control y mutante hipomorfo para FGF8 severo (*Fgf8^{neo/null}*).

Tal y como se verá a continuación, la falta de función de *Fgf8* conduce a la desaparición, fusión y modificación de diversas estructuras cerebrales fundamentales para el correcto funcionamiento del SNC. El embrión no siempre será viable, que éste se implante dependerá de en qué grado se vea afectada la cantidad total de Fgf8. Por tanto, la pérdida de estructuras o regiones, y por ende de funciones, es *Fgf8* dosis-dependiente.

2. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso (SN) constituye el sistema de control más importante del organismo y, junto con el sistema endocrino, desempeña la mayoría de las funciones de regulación. Se divide en sistema nervioso central (SNC), formado por el encéfalo y la médula espinal, y sistema nervioso periférico (SNP), compuesto por los pares craneales que salen del encéfalo y los nervios raquídeos, procedentes de la médula espinal.

El SNC es uno de los sistemas más complejos del cuerpo humano y tiene una importancia decisiva en el control de variadas funciones corporales. Pese a su relevancia, existe un notable desconocimiento del tema.

Una de las mejores especies animales para el estudio del desarrollo embrionario del SNC es el ratón, de modo que éste constituirá nuestro modelo experimental.

Actualmente la Neuroembriología anatómica constituye una asignatura pendiente aún para muchos, siendo ésta indispensable, al igual que comprender sus bases moleculares con el fin de lograr entender determinadas patologías y la etiología de éstas.

Al hilo de la falta de conocimiento que existe sobre el sistema nervioso y teniendo en cuenta el importante papel que desempeña en multitud de funciones corporales, resulta necesario ahondar en el tema.

Respecto al hipotálamo, se ha constatado que existe hipo o hiperactividad de muchos de sus sistemas funcionales en diversas enfermedades. Se produce una serie de cambios que no se conocen bien en su mayoría y que resultan de interés desde el punto de vista terapéutico. Por tanto, su complejidad morfofuncional y su capacidad para dirigir los sistemas reguladores del organismo hacen del hipotálamo un interesante a la par que necesario objeto de estudio.

2.1. Neurulación. Subdivisiones longitudinales.

2.1.1. Neurulación

Tras la formación de la blástula o cigoto tiene lugar una etapa del desarrollo embrionario conocida como gastrulación, la cual da origen a las capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo).

La formación del tubo neural de vertebrados se denomina neurulación y corresponde a 20-28 días de desarrollo en el ser humano. Este fenómeno consiste en la transformación de la placa neural en un tubo mediante la fusión de los pliegues neurales (Figura 1) y tiene lugar tras la gastrulación.

El proceso de neurulación puede ser dividido en cuatro estadios diferentes:

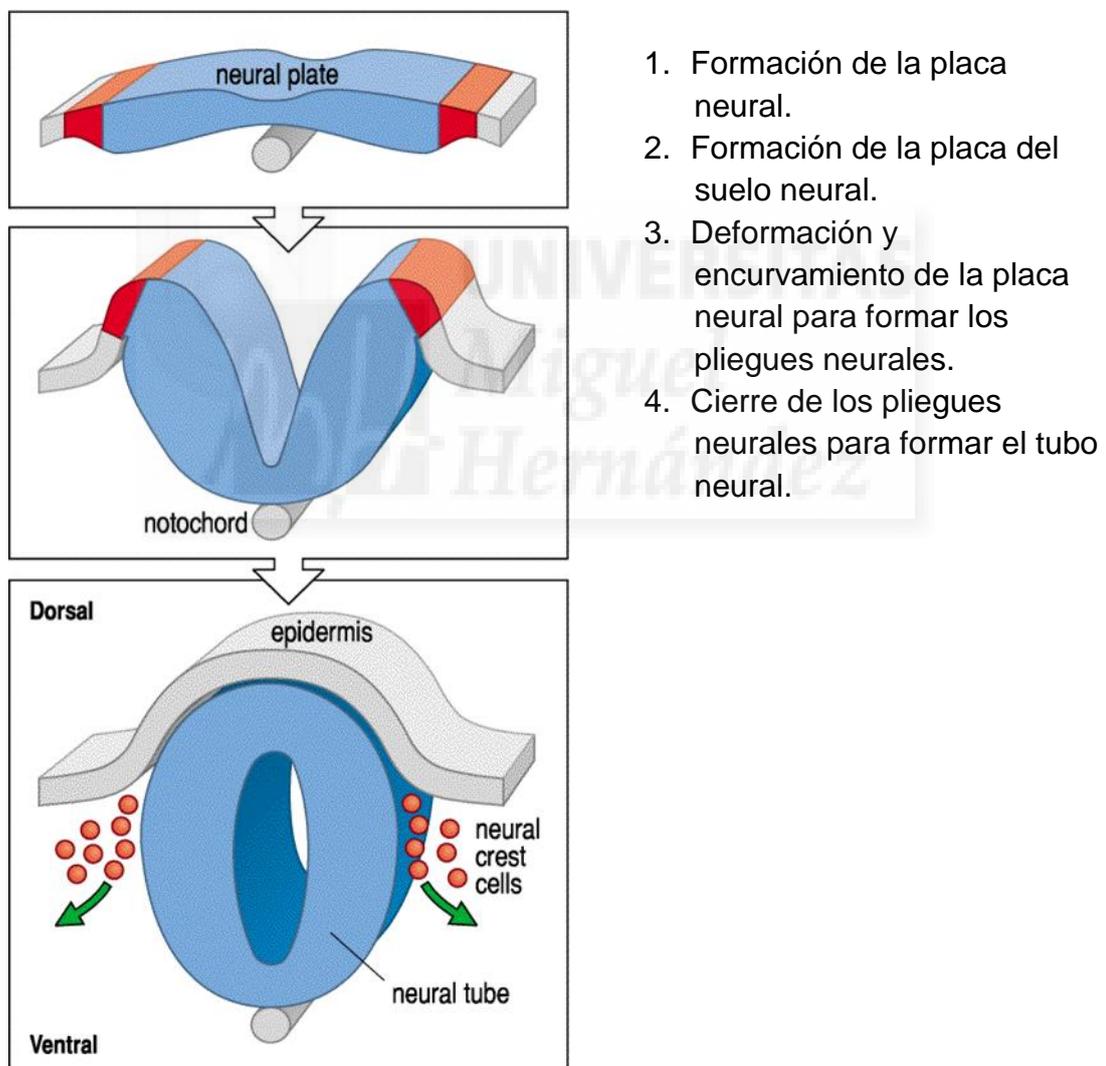


Figura 1. Proceso de neurulación (imagen modificada de Nature Reviews Neuroscience ⁽¹⁾).

¹ Gammill LS, Bronner-Fraser M. Neural crest specification: migrating into genomics. Nat Rev Neurosci. 2003 Oct; 4 (10): 795-805.

De manera simultánea a la transformación de las células de la placa neural y las crestas neurales en células cilíndricas, que conduce a la elevación de la placa neural, se produce una serie de cambios relacionados con la adhesividad y morfología celulares. Dicho cambio de adhesividad entre las células de la placa neural se traduce en un alargamiento de la misma con aparición progresiva de territorios neurales más caudales.

En rasgos generales se produce una reorganización del citoesqueleto (microtúbulos y microfilamentos) de las células neuroepiteliales de la placa neural. Como consecuencia de lo anterior, la forma plana inicial de esta placa se torna inestable haciendo necesario que ésta se repliegue sobre sí misma. De este modo se elevan las crestas neurales y se forma inicialmente un canal neural para posteriormente cerrarse conduciendo a la formación del tubo neural. Es importante que este proceso culmine con el cierre completo del tubo neural; primero se produce el cierre del neuroporo anterior y a continuación el del neuroporo posterior. Un fallo en el cierre completo del tubo neural se manifiesta en espina bífida (caudal) y/o labio leporino, entre otras malformaciones patológicas ⁽²⁾.

Cuando se produce la fusión del tubo neural, las células que componen la cresta neural no participan en dicha fusión. Éstas además de proliferar también migran en diversas direcciones. Las células más cercanas al tubo neural se diferencian en células sensitivas ganglionares. Aquellas que quedan en posición prevertebral o cerca de los grandes vasos se diferencian en neuronas de los ganglios simpáticos. Y las que migran más lejos forman las neuronas de los ganglios parasimpáticos, yuxtaviscerales e intramurales. Aparte de los derivados neuronales de la cresta neural existen otros tipos celulares también derivados de ella ⁽²⁾.

² Puellas López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Neuroanatomía. Editorial Médica Panamericana; 2008.

2.1.2. Subdivisiones longitudinales

La especificación de territorios longitudinales diferentes dentro del epitelio neural se debe a la distribución gradiente de moléculas morfogenéticas que dirigen los procesos histogénéticos.

Mientras que el mesodermo axial (placa precordial y notocorda) induce la ventralización, el epitelio extraneural que cubre el tubo neural dorsalmente constituye una fuente de efectos inductores dorsalizantes.

Tras el fenómeno de neurulación es posible distinguir cuatro regiones longitudinales (Figura 2):

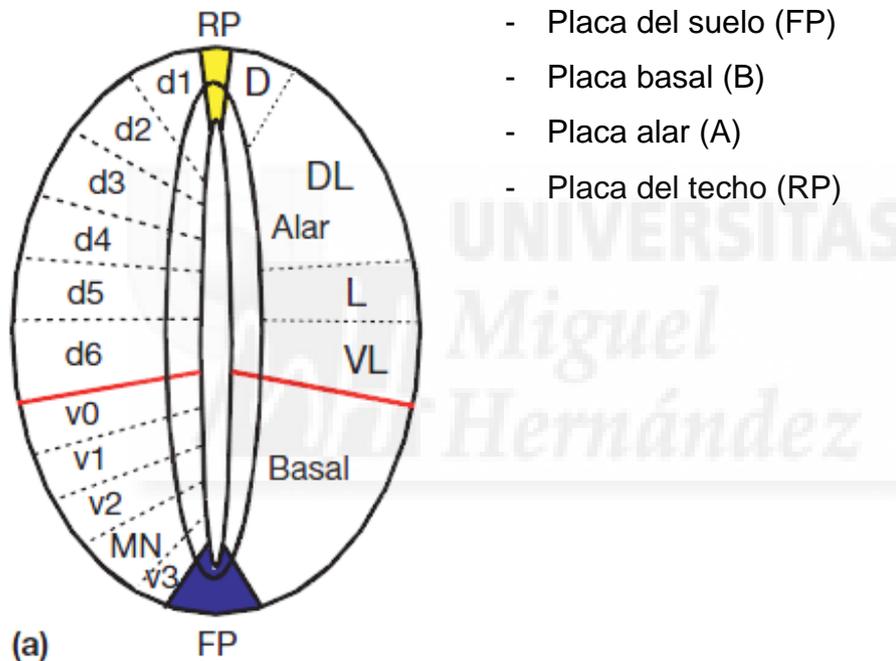


Figura 2. Dominios longitudinales del tubo neural ⁽³⁾.

2.2. Morfogénesis del tubo neural: regionalización rostro-caudal y segmentación.

2.2.1. Organización morfológica del tubo neural

En la mayoría de vertebrados el tubo neural temprano es una estructura bastante recta y alargada. Sin embargo, incluso antes de que su porción posterior se haya formado completamente, la porción más anterior del tubo neural experimenta cambios drásticos.

³ Puelles L. Plan of the Developing Vertebrate Nervous System. In: Rubenstein J, Rakic P, editors. Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS: Comprehensive Developmental Neuroscience. University of Murcia, Murcia, Spain: Elsevier; 2013. p. 187-209

Tras la aparición de las vesículas ópticas es posible distinguir tres regiones o vesículas primarias: cerebro anterior (prosencefalo), cerebro medio (mesencefalo) y cerebro posterior (rhombencefalo).

Conforme avanza el desarrollo cerebral embrionario las regiones anteriormente citadas se subdividen hasta distinguir un total de cinco regiones a lo largo del tubo neural (Figura 3). El prosencefalo primario se subdivide en prosencefalo secundario (telencefalo e hipotálamo) y diencefalo. Por otra parte, el rhombencefalo primario se subdivide en metencefalo y rhombencefalo.

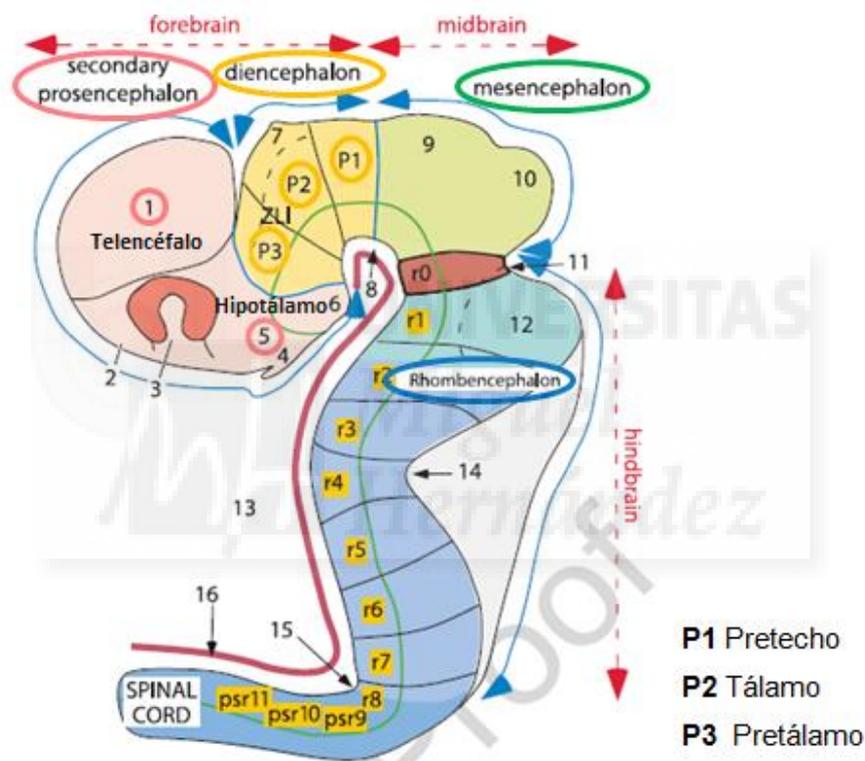


Figura 3. Organización segmentaria del tubo neural (imagen modificada del modelo prosomérico ⁽⁴⁾).

La teoría neuromérica ⁽²⁾ predice que la segmentación del tubo neural consiste en la subdivisión de éste en segmentos (neurómeros), los cuales deben ser transversales al eje longitudinal del tubo neural y con características celulares y moleculares únicas o lo que es lo mismo con competencias histogenéticas diferentes. Todos los segmentos neurales comparten un patrón dorso-ventral

⁴ Martínez S, Puelles E, Echevarría D. Ontogeny of the Vertebrate Nervous System. In: Galizia CG, Lledo PM, editors. Neurosciences - From Molecule to Behavior: a University Textbook. Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 47-61.

independientemente de su posición antero-posterior, es decir, cada una de estas regiones consta de placa del suelo, placa basal, placa alar y placa del techo (Figura 2).

En el prosencéfalo dichos neurómeros reciben el nombre de prosómeros, mientras que en el rombencéfalo son denominados rombómeros y pseudorombómeros, y en el mesencéfalo mesómeros.

Este patrón de regionalización rostro-caudal llamado el modelo prosomérico ⁽⁵⁾ es un paradigma empleado para entender la regionalización molecular del tubo neural de la mayoría de vertebrados y que permite establecer comparaciones topológicas entre especies .

El modelo prosomérico al ser un paradigma ha sufrido cambios a lo largo de los años. Según la última revisión ⁽⁶⁾ del profesor Luis Puelles, Catedrático de Medicina de la Universidad de Murcia y promotor de este modelo, el prosencéfalo secundario (telencéfalo e hipotálamo) no se subdivide en prosómeros. Respecto al diencefalo, éste consta de tres dominios transversales: pretectum (p1), tálamo (p2) y pretálamo (p3), más la eminencia talámica.

Esta concepción embriológica difiere del concepto clásico de diencefalo, que consideraba el hipotálamo como base del diencefalo. Otra de las diferencias que es posible apreciar respecto al modelo prosemérico inicial es la desaparición de los prosómeros 4-6, los cuales pasan a formar parte del hipotálamo y, por ende, del prosencéfalo secundario.

A nivel de mesencéfalo también aplica el concepto teórico de mesómeros. Un informe de Hidalgo-Sanchez et al. (2005) identifica el preistmo como un dominio transversal del mesencéfalo caudal histológicamente distinto situado

⁵ Puelles L, Harrison M, Paxinos G, Watson C. A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. Trends in neurosciences. 2013 Oct; 36(10):570-8.

⁶ Puelles L, Rubenstein JL. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. Trends Neurosci. 2003 Sep; 26(9):469-76.

entre los colículos inferiores y el istmo que expresa *Otx2* y *Pax2* pero no marcadores ístmicos como *Fgf8* ⁽⁷⁾.

Respecto al rombencéfalo, es posible apreciar morfológicamente subdivisiones neuroméricas durante la neurulación. Consta del segmento ístmico, siete rombómeros (r1-r7) y cuatro pseudorombómeros ("r8"- "r11") ⁽⁸⁾. El proceso de segmentación del rombencéfalo se regula mediante la expresión de genes *Hox*, que codifican información posicional a lo largo del eje antero-posterior.

2.2.2. Organización molecular del tubo neural

Durante el estadio de placa neural es posible observar subdivisiones moleculares que no regiones morfológicas.

Como ya vimos en un apartado previo, existen moléculas que determinan la ventralización y dorsalización del tubo neural. Estas proteínas se secretan al medio extracelular produciendo un gradiente (gradiente morfogenético) en el territorio vecino. En la formación del patrón dorso-ventral, y por tanto en la determinación de los ejes longitudinales, nos encontramos con SHH (Sonic Hedgehog) -ventralizante- (Figura 5) y BMP (Bone Morphogenetic Protein) -dorsalizante-.

Con respecto a la proteína SHH, se produce diferente respuesta inductiva a ella según la región de la placa neural. Esta proteína se expresa en todo el mesodermo axial induciendo entre otros factores de transcripción la expresión de *Nkx2.1* en la placa neural prosencefálica (precursor del desarrollo hipotalámico) ⁽⁹⁾.

Otra señal inductora que genera diferente respuesta molecular en diferentes niveles del eje longitudinal y transversal lo constituye la proteína FGF8. Dicha proteína se expresa en el istmo, en el polo anterior de la placa neural, en la

⁷ Martínez S, Puelles E, Puelles L, Echevarría D. Molecular Regionalization of the Developing Neural Tube. Watson C, Paxinos G, Puelles L, editors. In *The Mouse Nervous System*. San Juan, Alicante, Spain: Elsevier;2012. p. 2-15.

⁸ Cambrero F, Puelles L. Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras. *J Comp Neurol*. 2000 Nov; 427(4):522-45.

⁹ Qiu M, Shimamura K, Sussel L, Chen S, Rubenstein JL. Control of anteroposterior and dorsoventral domains of *Nkx-6.1* gene expression relative to other *Nkx* genes during vertebrate CNS development. *Mech Dev*. 1998 Mar; 72(1-2):77-88.

placa comisural y en otras regiones fuera del tubo neural.

En el telencéfalo FGF8 induce *Bf1* (gen importante en el desarrollo de las vesículas telencefálicas) en el borde anterior de la placa neural.

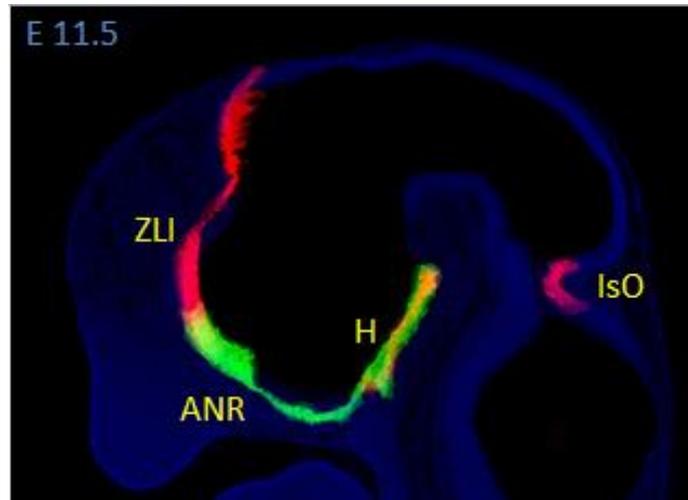


Figura 4. Expresión de NKX2.1 y FGF8 en cerebro de ratón E 11.5.

FGF8 figura marcado en rojo mientras que NKX2.1 en verde. Es posible apreciar la expresión simultánea en la región hipotalámica (en naranja). ANR: Anterior Neural Ridge; ZLI: Zona Limitans Intrathalamica; IsO: Isthmic Organizer; H: Hipotálamo.

La proteína codificada por el gen *Fgf8* pertenece a la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Los miembros de dicha familia poseen actividades mitogénicas y de supervivencia celular además de estar involucrados en una variedad de procesos biológicos entre los que se incluye el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis, la reparación de tejidos, el crecimiento de tumores y la invasión ⁽¹⁰⁾.

En el humano adulto, FGF8 se expresa en el riñón, el testículo, la próstata, la mama, los leucocitos de sangre periférica y la médula ósea ⁽¹¹⁾.

Sin embargo, durante el desarrollo embrionario, su expresión es más amplia. El patrón de expresión de FGF8 durante el desarrollo embrionario de ratón sugiere que la función de FGF8 es importante en la morfogénesis de las

¹⁰ Finklestein SP, Plomaritoglou A. Growth factors. In: Miller LP, Hayes RL, editors. Head Trauma: basic, preclinical, and clinical directions. New York; Chichester: Wiley-Liss; 2001. p. 165-87.

¹¹ Tanaka A, Furuya A, Yamasaki M, Hanai N, Kuriki K, Kamiakito T, et al. High frequency of fibroblast growth factor (FGF) 8 expression in clinical prostate cancers and breast tissues, immunohistochemically demonstrated by a newly established neutralizing monoclonal antibody against FGF8. Cancer Res. 1998 May 15; 58(10):2053-6.

extremidades, del sistema nervioso central, del sistema cardiaco y de los órganos urogenitales ⁽¹²⁾.

Cabe destacar también que la expresión de FGF8 es esencial en la gastrulación ya que la pérdida homocigótica de FGF8 conduce a la letalidad embrionaria temprana ⁽¹³⁾.

Además de expresarse en las regiones previamente citadas, *Fgf8* también se expresa en la región anterior neural (ANR) y en la porción más ventral de la región hipotalámica (Figura 4). En esta región ventral del prosencéfalo secundario se expresa, entre otros factores de transcripción, *Nkx2.1*, el cual es inducido por FGF8 ⁽¹⁴⁾. La función de *Fgf8* en esta región todavía no se ha descrito completamente.

Importancia de los organizadores secundarios

Es sabido que el fenómeno de modelado AP (antero-posterior) es el responsable de originar zonas transversales, cada una de ellas con competencias histogenéticas diferentes. De manera simultánea se producen fenómenos de señalización gradual a lo largo del eje ML que dan lugar a dominios alineados longitudinalmente, los cuales posteriormente representarán las zonas longitudinales DV (dorso-ventrales) del tubo neural ⁽⁷⁾.

La evidencia existente respecto a sitios de control morfogénico en lugares específicos del tubo neural conduce al concepto de los organizadores secundarios, que regulan la identidad y polaridad regional de las zonas neuroepiteliales vecinas.

La función de los organizadores secundarios consiste en liberar uno o más morfógenos (moléculas difusibles) con una dirección y rango particulares

¹² Crossley PH, Martin GR. 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 Feb; 121(2): 439-51.

¹³ Trumpp A, Depew MJ, Rubenstein JL, Bishop JM, Martin GR. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes Dev*. 1999 Dec; 13(23): 3136-48.

¹⁴ Shimamura K, Rubenstein JL. Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development*. 1997 Jul; 124(14):2709-18.

estableciendo gradientes que pueden ser interpretados en términos de regulación diferencial de la transcripción genómica de las células competentes dentro del rango de acción. Posteriormente, su actividad refina identidades neuronales locales a lo largo de los ejes AP o DV.

En el tubo neural se han identificado tres organizadores secundarios (Figura 5): ANR (Anterior Neural Ridge; polo anterior neural), localizado en la región más rostral del prosencéfalo secundario, ZLI (Zona Limitans Intratálámica), situado en el diencefalo, y por último, IsO (Organizador Ístmico) en el límite mesencéfalo-rombencéfalo (Figuras 4 y 5).

Cabe destacar que mientras que se dispone de mucha literatura referente a los procesos moleculares y celulares relacionados con la actividad de IsO responsables de la regionalización del cerebro medio y cerebro posterior, se conoce menos acerca de la regionalización y la actividad diencefálica ZLI. Respecto a la regulación ejercida por ANR y la compartimentalización telencefálica se sabe menos aún si cabe.

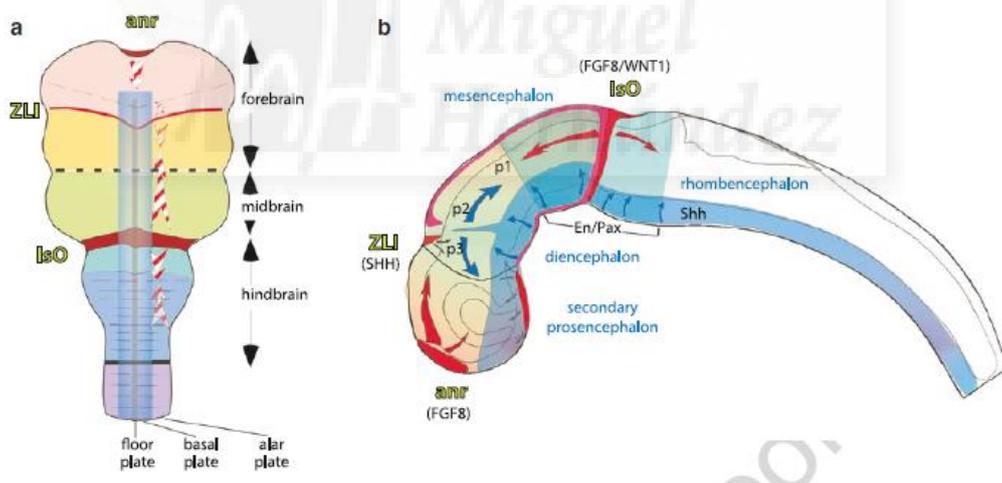


Figura 5. Especificación del organizador secundario y señales durante la regionalización del tubo neural ⁽⁴⁾.

Ya que este trabajo se centra en la región hipotalámica, es necesario profundizar algo más sobre el organizador secundario ANR.

Este organizador es una estructura morfológicamente definida situada en el límite entre la parte más rostral de la placa neural y el ectodermo no neural. Es fundamental para el correcto desarrollo del prosencéfalo secundario (telencéfalo e hipotálamo). De entre los factores de crecimiento fibroblástico

expresados en el ANR destaca *Fgf8*, que se produce en estadios muy tempranos del desarrollo neural y está involucrado en la especificación y proliferación de los dominios telencefálicos anteriores, así como en la regionalización y polaridad del prosencéfalo anterior (telencéfalo, vesículas ópticas e hipotálamo). Respecto a *Fgf8*, éste también se expresa en la región más ventral (suelo) del primordio hipotalámico. Se carece de información acerca de su función en esta región tan importante para el metabolismo autonómico del ser humano.

Otros genes tales como el ya mencionado *Shh* y *Nkx2.1* muestran un importante rol en la regionalización y en la especificación celular en el telencéfalo ventral ⁽¹⁵⁾. *Shh* se expresa tanto en la placa del suelo como en la placa basal del prosencéfalo secundario, aunque secundariamente se borra su expresión en la zona tuberal ⁽²⁾.

Nkx2.1 es un gen homeobox necesario para el desarrollo del hipotálamo y del cerebro anterior ventral que se halla regulado por *Shh* ⁽¹⁵⁾.

2.3. Hipotálamo e hipófisis y sus funciones

Como ya se ha comentado anteriormente, el hipotálamo se encuentra anatómicamente en la región prosencefálica secundaria. Esta región contiene los centros nerviosos del hambre y la sed, de la regulación de la temperatura corporal y de la secreción hormonal de la hipófisis. Además, los centros hipotalámicos contribuyen a la regulación del sueño, la vigilia, la excitación y emociones tales como ira, temor, dolor y placer. A través de sus conexiones con el bulbo raquídeo del tronco cerebral el hipotálamo ayuda a provocar las respuestas viscerales ante distintos estados emocionales. En esta regulación de la emoción, el hipotálamo actúa junto con el sistema límbico.

2.3.1. Hipotálamo y sus funciones

El hipotálamo es un territorio prosencefálico situado rostralmente al diencefalo. Siempre ha sido difícil de comprender y ha generado multitud de opiniones dispares. Un claro ejemplo de ello es que no siempre se consideró territorio

¹⁵ Echevarría D, Vieira C, Gimeno L, Martínez S. Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Research Reviews*. 2003 Oct; 43(2):179-91.

prosencefálico secundario ventral, sino que previamente se creía diencefálico ventral. Además, durante un largo tiempo se creyó en la idea errónea del eje longitudinal rectilíneo del prosencéfalo. La visión embriológica más moderna del prosencéfalo sustituye este eje por uno curvo tal que el límite alar-basal termina justamente detrás del quiasma óptico. La región preóptica se incluye en el subpalio telencefálico. Se extiende, pues, desde la región del quiasma óptico (límite anterior) hasta el borde caudal de los cuerpos mamilares (límite posterior). Está situado debajo del tálamo y encima de la hipófisis (conectado a través del tallo hipofisario), formando el suelo y la parte inferior de las paredes laterales del tercer ventrículo.

El hipotálamo es un territorio heterogéneo ya que contiene porciones de placa del suelo, placa basal y placa alar.

Microscópicamente está constituido por células nerviosas pequeñas que se distribuyen formando núcleos. La anatomía de todos estos núcleos es muy compleja debido a la gran cantidad de ellos, a los límites imprecisos que tiene muchas veces, y a sus múltiples conexiones. Además se encuentra dividido en dos zonas por el fórnix: la zona medial, subdividida en 4 regiones (preóptica, supraóptica, tuberal y mamilar) y la zona lateral.

A continuación nombraremos los núcleos principales o mejor definidos (Figuras 6 y 7) y sus funciones:

1. Núcleos laterales (LH): relacionados con el hambre.
2. Preóptico (PO): participa en la regulación del sistema parasimpático.
3. Supraóptico (SO): responsable de la producción de ADH.
4. Paraventricular (Pa): responsable de la producción de oxitocina.
5. Hipotalámico anterior (AH): centro de la sed y termorregulador que responde al calor.
6. Supraquiasmático (SCh): implicado en la regulación del ciclo circadiano.
7. Ventromedial (VMH): centro de la saciedad.
8. Arqueado o infundibular (Arc): interviene en la conducta emocional y actividad endocrina.
9. Núcleos mamilares (MM): participan en el sistema límbico (conducta emocional y memoria reciente).

10. Hipotalámico posterior (PH): función simpática y centro termorregulador que responde al frío.

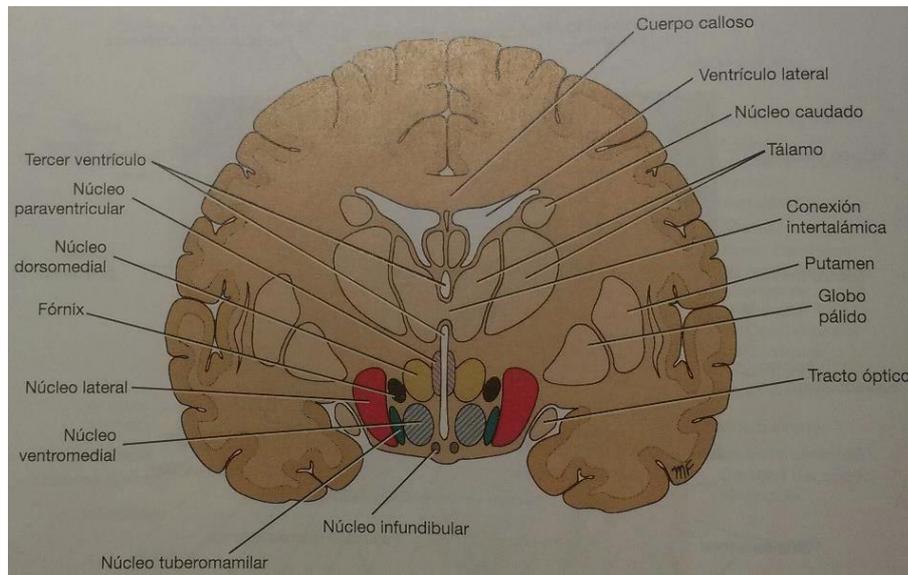


Figura 6. Corte coronal de cerebro humano.

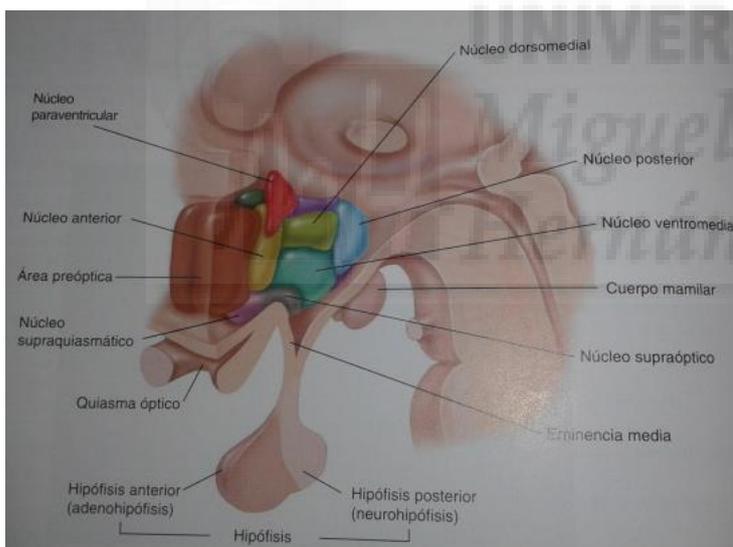


Figura 7. El hipotálamo en el humano ⁽¹⁶⁾. Visión tridimensional de la región hipotalámica mostrando los diferentes núcleos.

Su función es, en esencia, controlar la homeostasis corporal permitiendo el correcto funcionamiento y mantenimiento del organismo, estableciendo las respuestas apropiadas de control mediante la integración de sus informaciones nerviosas y químicas. Además, desempeña un papel vital en el comportamiento emocional.

¹⁶ Ira Fox S. Fisiología humana. Décima edición. Madrid, España: Mc Graw Hill; 2008.

Principales vías de conducción:

El hipotálamo recibe información de todo el organismo a través de conexiones neuronales, torrente sanguíneo y líquido cefalorraquídeo. Recibe muchas fibras aferentes procedentes de las vísceras, de la membrana mucosa olfatoria, de la corteza cerebral y del sistema límbico. Estas conexiones son numerosas y complejas pero es de entender que recibe y manda información de todo el resto del cerebro.

El hipotálamo a la vez que recibe información de cada parte del cuerpo cambia y reajusta continuamente las funciones del organismo. Su cometido es adaptar al individuo al entorno y a la situación donde éste se encuentre.

2.3.1.1. Regulación de los ritmos circadianos

En el interior del hipotálamo anterior se hallan los núcleos supraquiasmáticos (SCh). Estos núcleos contienen neuronas que actúan como “células reloj”.

El SCh es considerado la principal región del encéfalo que regula los ritmos circadianos del cuerpo. Sin embargo, para que funcionen adecuadamente estas neuronas reloj, deben sincronizarse sus actividades a los ciclos día/noche.

Los vertebrados no mamíferos poseen en sus encéfalos células fotosensibles capaces de detectar la luz que pasa a través de sus cráneos. No ocurre del mismo modo en los vertebrados mamíferos, en los cuales los ciclos diarios de luz y oscuridad influyen sobre el SCh por medio de vías desde la retina y la capa nerviosa de los ojos hasta el hipotálamo (vías retinohipotálamicas).

Parece ser que las células de diversos órganos del cuerpo (corazón, hígado y riñones), poseen “genes reloj” semejantes a los del SCh que producen su propio ritmo circadiano. Sin embargo, para entrenar la actividad circadiana de las células no expuestas a la luz al ciclo día/noche estos relojes periféricos deben ajustarse por un reloj principal que no es otro que el núcleo supraquiasmático del hipotálamo.

El SCh influye sobre los ritmos circadianos del cuerpo, en parte a través de conexiones nerviosas con otras regiones del cerebro y a través de su regulación de la glándula hipofisaria, que secreta hormonas que estimulan otras glándulas endocrinas. También el SCh controla la secreción de la

hormona melatonina por la glándula pineal. Dicha hormona es considerada el principal regulador de los ritmos circadianos.

2.3.1.2. Regulación del sistema autónomo

Ciertas áreas del cuerpo humano contienen osmorreceptores que estimulan la sed y la liberación de hormona antidiurética (ADH) por la hipófisis posterior. El hipotálamo es también el lugar donde se encuentra el “termostato corporal”. El enfriamiento experimental del hipotálamo preóptico-anterior produce tiritona (una respuesta motora somática) y termogénesis (una respuesta motora simpática). El calentamiento experimental de esta zona del hipotálamo produce hiperventilación (estimada por los nervios motores somáticos), vasodilatación, salivación y secreción sudorípara (reguladas por los nervios simpáticos).

2.3.1.3. Regulación de la glándula hipofisaria

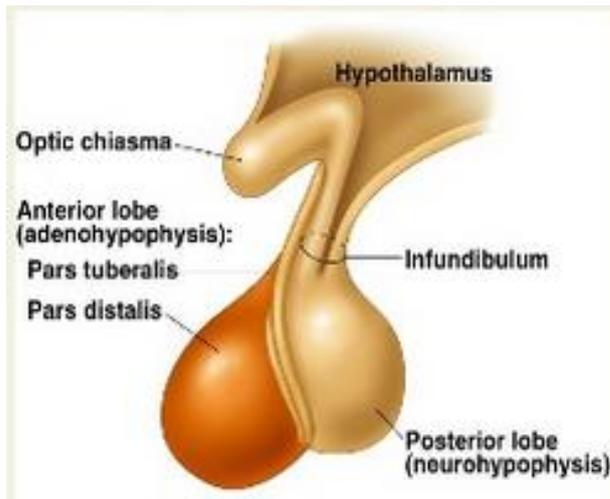
La hipófisis se encuentra inmediatamente por debajo del hipotálamo (Figura 8). De hecho, su porción posterior deriva de una evaginación embrionaria del hipotálamo y toda la hipófisis permanece en contacto con éste a través de un tallo.

Las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo producen dos hormonas: la hormona antidiurética (ADH, vasopresina) y la oxitocina. Estas dos hormonas se transportan por los axones del haz hipotalámico-hipofisario hasta la neurohipófisis (hipófisis posterior), donde quedan almacenadas para ser liberadas en respuesta a la estimulación hipotalámica.

La oxitocina estimula las contracciones del útero durante el parto y la ADH favorece la reabsorción de agua en los riñones, reduciendo así el volumen de orina excretada.

Las neuronas del hipotálamo también producen otras hormonas conocidas como hormonas liberadoras y hormonas inhibidoras (Tabla 1), que son transportadas hasta la adenohipófisis (hipófisis anterior) por la sangre. Estas hormonas hipotalámicas liberadoras e inhibidoras regulan la secreción de la hipófisis anterior y, a través de ella, las secreciones de otras glándulas endocrinas (Figura 9).

2.3.2. Hipófisis



La hipófisis o glándula pituitaria se encuentra en la parte inferior del cerebro. Está unida al hipotálamo por una estructura denominada infundíbulo.

Esta glándula endocrina está dividida estructural y funcionalmente en lóbulo anterior (adenohipófisis) y lóbulo posterior (neurohipófisis) (Figura 8).

Figura 8. Estructura de la hipófisis ⁽¹⁶⁾.

Ambas partes tienen orígenes embrionarios diferentes. La adenohipófisis procede de una invaginación del tejido epitelial (la bolsa de Rathke) que migra hacia arriba desde la cavidad bucal embrionaria, mientras que la neurohipófisis se forma como una prolongación del tejido cerebral ⁽¹⁶⁾.

En la hipófisis posterior se almacenan y liberan hormonas que en realidad produce el hipotálamo, mientras que la hipófisis anterior produce y secreta sus propias hormonas. No obstante, la hipófisis anterior está regulada por hormonas segregadas por el hipotálamo y también por los efectos de retroacción inducidos por las hormonas de los órganos diana.

La adenohipófisis del adulto está constituida por dos partes: la parte distal, también denominada hipófisis anterior, que tiene una configuración redondeada y que representa la zona de la glándula con mayor carácter endocrino, y la parte tuberal, que es una extensión delgada en contacto con el infundíbulo.

La neurohipófisis es la parte neural de la glándula pituitaria. Está constituida por la parte nerviosa, también denominada hipófisis posterior, que está en contacto con la adenohipófisis y con el infundíbulo. El infundíbulo está formado por fibras nerviosas junto con pequeñas células de tipo neuroglia denominadas pituicitos.

Control hipotalámico de la hipófisis posterior

Los núcleos hipotalámicos supraópticos (SO) y paraventriculares (Pa) son glándulas endocrinas ya que son los responsables de la síntesis de la hormona antidiurética y de la oxitocina. Estas hormonas son transportadas por los axones del conducto hipotálamo-hipofisario hasta la hipófisis posterior, lugar en el que permanecen almacenadas para su posterior liberación. Por tanto, la hipófisis posterior es más un órgano de almacenamiento que una glándula verdadera.

Control hipotalámico de la hipófisis anterior

La hipófisis anterior (adenohipófisis) secreta hormonas que regulan otras glándulas endocrinas. A su vez, la secreción hormonal de la hipófisis anterior está controlada por hormonas secretadas por el hipotálamo.

Respecto a las hormonas de liberación e inhibición producidas por las neuronas hipotalámicas, éstas se transportan hasta las terminaciones axonales localizadas en la porción basal del hipotálamo, es decir, hasta la eminencia media. Existe pues un sistema porta hipotálamo-hipofisario.

Estas hormonas regulan las secreciones de la hipófisis anterior. La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) estimula la secreción de TSH mientras que la hormona liberadora de corticotropina (CRH) estimula la secreción de ACTH, en ambos casos por parte de la hipófisis anterior. Una única hormona de liberación, la hormona liberadora de las gonadotropinas, o GnRH, estimula la secreción de ambas gonadotropinas (FSH y LH) por parte de la hipófisis anterior. La secreción de prolactina y de hormona de crecimiento por la hipófisis anterior está regulada por hormonas hipotalámicas de carácter inhibitorio denominadas hormona inhibidora de prolactina (PIH) y somatostatina, respectivamente.

En relación a las hormonas producidas por la hipófisis anterior, la hormona corticotropina (ACTH), la hormona estimulante del tiroides (TSH) y las gonadotropinas (FSH y LH) estimulan la corteza suprarrenal, la glándula tiroides y las gónadas, respectivamente, para la secreción de sus hormonas. Dichas hormonas ejercen además un efecto trófico sobre sus glándulas diana. Concentraciones elevadas de hormonas de la hipófisis anterior inducen

hipertrofia de los órganos diana, mientras que las concentraciones bajas hacen que los órganos a los que van dirigidas presenten atrofia.

| Glándula endocrina | Hormonas principales | | Órganos principales diana | Efectos principales |
|--------------------|---|--|----------------------------|---|
| Hipotálamo | Liberadoras | <ul style="list-style-type: none"> - CRH - GnRH - TRH - GHRH | Hipófisis anterior | Regulan la secreción hormonal de la hipófisis anterior. |
| | Inhibidoras | <ul style="list-style-type: none"> - PIH - Somatostatina | | |
| Adenohipófisis | Tróficas: | | Otros órganos | Estimulan el crecimiento y el desarrollo de los órganos diana |
| | <ul style="list-style-type: none"> - GH - TSH - ACTH - FSH - LH - PRL | | Glándulas endocrinas | Estimulan la secreción de otras hormonas |
| Neurohipófisis | Antidiurética (ADH) | | Riñones y vasos sanguíneos | Estimula la retención de agua y la vasoconstricción |
| | Oxitocina | | Útero y glándulas mamarias | Estimula la contracción del útero y de las unidades secretoras mamarias |

Tabla 1. Cuadro resumen de las principales hormonas producidas por hipotálamo e hipófisis.

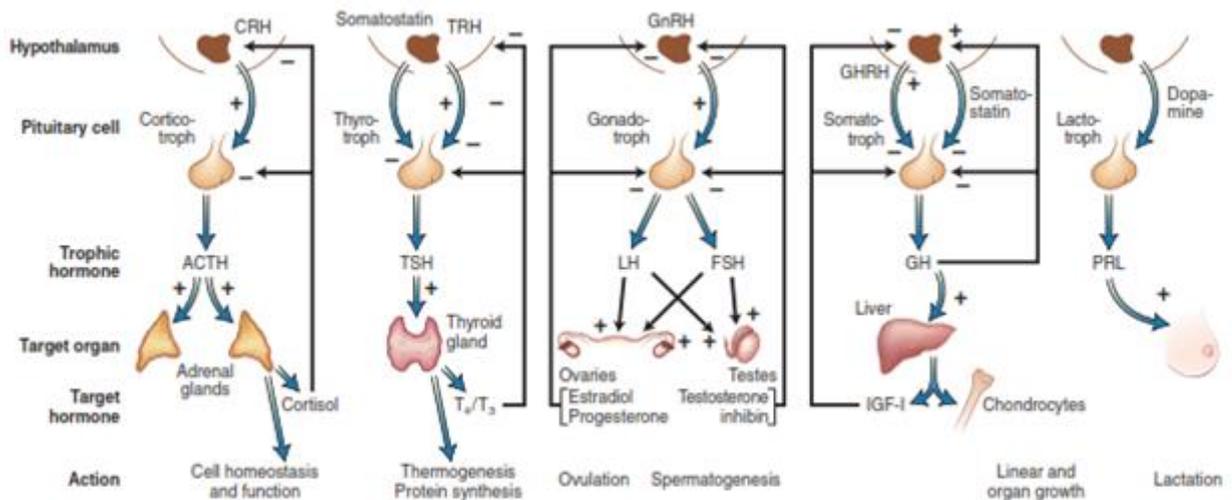


Figura 9. Diferentes ejes hipotálamo-hipofisarios.

Por último, tras analizar su localización, estructura y funciones se puede concluir que el hipotálamo es el órgano regulador del organismo por excelencia, siendo esencial para la supervivencia y reproducción de la especie. Cualquier mínimo fallo o lesión en él puede dar lugar a múltiples repercusiones en todo el organismo.

Podría tratarse, pues, de un centro de dianas farmacológicas para multitud de fármacos, pero es un campo de investigación muy amplio ya que, como se ha comentado anteriormente, interviene en una gran cantidad de funciones y los límites no siempre están bien definidos.

2.4. Objetivos

- Identificar las diversas estructuras y núcleos que componen el Sistema Nervioso Central, particularmente el hipotálamo, mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas.
- Estudiar la importancia de FGF8 en la morfogénesis temprana del tubo neural.
- Estudiar las modificaciones estructurales y anatómicas que tienen lugar en la región hipotálamica e hipofisis como consecuencia de la disminución de la función de *Fgf8* al 20% (mutante *Fgf8^{neo/null}*).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Modelo animal

El modelo animal utilizado para este experimento es un ratón.

Se han empleado dos líneas de ratones transgénicos obtenidos del animalario del Instituto de Neurociencias. Ambas líneas tienen insertados dentro de sus secuencias intrónicas de *Fgf8* dos cassetes neo (resistentes a neomicina)¹⁷. Dichos cassetes cuando se combinan entre sí pueden producir determinados fallos en la transcripción y posterior traducción de la proteína, de tal manera que el ratón resultante (el embrión en nuestro caso) se desarrolla con niveles inferiores a los normales. Este cruce por tanto permite obtener un hipomorfo de FGF8 en el cual se consigue que la producción de la molécula se encuentre afectada en un 80% (hipomorfo severo) o en un 60% (hipomorfo leve) dependiendo de cómo esté constituido el cassette neo.

En el presente estudio experimental se ha empleado el cruce de ratones neo y neo/delta⁽¹⁸⁾ y la recombinación de ambas líneas transgénicas ha permitido la obtención de un ratón mutante hipomorfo para FGF8 severo (*Fgf8*^{neo/null}) -sólo un 20% de la proteína en el organismo-.

3.2. Obtención y procesamiento de embriones

3.2.1. Extracción y fijación de embriones

Los embriones empleados (en total tres) ya se encontraban en el laboratorio. Ya habían sido extraídos y fijados con anterioridad.

Para la fijación, los embriones se aislaron del útero en el estadio E17.5 con la ayuda de una lupa estereoscópica y se fijaron en PBS 1x (NaCl 13mM, Sigma S3014; KCl 0.3mM, Sigma P9541; Na₂HPO₄ 1mM, Sigma S3264 y KH₂PO₄ 0.2mM, Sigma P9791) con PFA (paraformaldehído) al 4% durante una noche a 4 °C. Una vez fijados, los embriones se lavaron con PBS 1x y fueron deshidratados de forma gradual con etanoles crecientes (25%, 50%, 75% y 100%) y almacenados en este último etanol a - 20 °C hasta su posterior uso.

¹⁷ Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet.* 1998 Feb; 18(2):136-41.

¹⁸ Chi CL, Martinez S, Wurst W, Martin GR. The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development.* 2003 Jun; 130(12): 2633-44.

3.2.2. Inclusión y sección de embriones

3.2.2.1. Microtomo de parafina

Esta técnica consiste en incluir los embriones en parafina (Gemcut emerald paraffin, Spiele no. 24364-1) para realizar secciones en el micrótopo. Para ello, los embriones han de ser previamente lavados un par de veces con butanol 100% (Panreac 14.682.1211) un tiempo variable según el estadio, sin sobrepasar nunca las 2 horas. El butanol, miscible en parafina, sustituirá al etanol 100% en el que estaban almacenados.

Posteriormente, los embriones se pasan a parafina líquida a 56°C y se realizan al menos, 6 cambios de 30 minutos, que nos permiten eliminar por completo el butanol y que se produzca una buena inclusión del tejido. Después de los sucesivos cambios, los embriones se orientan dentro de un molde según el plano a estudiar y se dejan a temperatura ambiente para que la parafina solidifique. Así pues, los embriones quedan dentro de un bloque de parafina sólida que nos permite hacer secciones con el micrótopo.

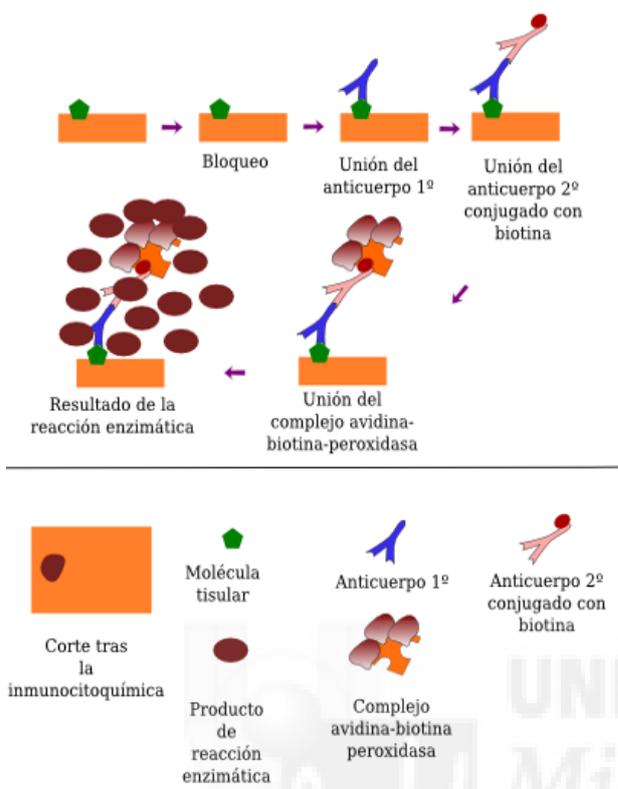
Las secciones de 12,0 µm se montan en portas (Superfrost plus, Thermo Scientific, J1800AMNZ) de forma seriada con una dilución de etanol al 17,5% a unos 40°C para que el tejido se extienda de forma correcta. Una vez el tejido queda perfectamente estirado, el etanol es eliminado y los portas se dejan secar una noche a 37°C y se almacenan a temperatura ambiente para su posterior estudio.

3.3. Técnicas histológicas

3.3.1. Inmunohistoquímica en cortes de parafina

La inmunohistoquímica (Figura 10) es un procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a una sustancia que se quiere identificar (anticuerpo primario). Estos anticuerpos pueden tener unida una enzima o ésta puede encontrarse unida a un anticuerpo secundario que reconoce y se une al primario. Aplicado a un tejido orgánico, el anticuerpo primario se une específicamente al sustrato y se aprovecha la actividad enzimática para visualizar la unión. De esta manera se consigue un complejo sustrato-anticuerpos-enzima unido al lugar donde se

encuentre el sustrato y mediante la activación de la enzima con la adición de su sustrato se genera un producto identificable donde se encuentre el complejo.



Esta técnica permite identificar la localización de una sustancia específica permitiendo identificar su localización tisular o citológica. 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 (con anticuerpos específicos para las vías de señalización intracelular).

Figura 10. Esquema de una inmunohistoquímica.

La técnica histológica previamente explicada permite detectar la expresión de proteínas. Para ello, en primer lugar las secciones de tejido se desparafinan y posteriormente se rehidratan. Para desparafinar las secciones de tejido se incuban a 65°C durante 25 minutos para fundir la parafina, y se hacen dos pases de xilol de 25 minutos cada uno para acabar de eliminarla por completo. Después, el tejido se rehidrata en alcoholes decrecientes empezando por 2 pases de etanol 100%, 2 de etanol 96%, 1 de etanol 70% y 1 de agua, durando 10 minutos cada pase.

Las secciones se lavan con PBS 1x, se fijan con PFA 4% durante 10 minutos y se lavan 10 minutos con PBS 1x y con PBS-T (PBS 1x con 0.1% tween 20, Sigma P7949). Una vez hidratadas, se hacen tres lavados con PBT ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.08M, Panreac 141678.1214 y NaCl 0.15M, Panreac 121659.1211 con 0.075% Triton-X100, Sigma X100) de 10 minutos y se

hierven en un microondas 4 veces a 750W de potencia durante 3 minutos con citrato sódico pH 6 0.01M para facilitar la exposición del epítipo de interés. Después del hervido, se hacen 3 lavados con PBT de 10 minutos y se inactiva la peroxidasa endógena incubando con H₂O (Normapur 23619.297) al 1.5% en PBT durante 30 minutos. Una vez inactivada, se lava de nuevo con PBT y se bloquea durante 1 hora en PBT con 0.1% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma A2153) y 10% de lisina 1M (Sigma L5626). Por último, las secciones se incuban con el anticuerpo anti-calbindina policlonal de rabbit a una concentración final de 1:2000 en PBT con 0.1% BSA y 0.01% azida (Sigma S2002) durante toda la noche.

A la mañana siguiente, se hacen 3 lavados con PBT de 10 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incuba durante 1 hora con un anticuerpo secundario conjugado con biotina a 1:200 en PBT. En este caso, para la reacción de calbindina se empleó un suero de cabra policlonal anti-conejo (anticuerpo secundario) a una concentración final de 1:500.

El exceso de anticuerpo secundario se elimina con otros 3 lavados de PBT durante 10 minutos y se incuba durante 1 hora con el complejo ABC (Vectastain PK-4000) a 1:500 en PBT. Este complejo está formado por peroxidasa biotinilada y por avidina, una glicoproteína que se unirá a la biotina de la peroxidasa y a la del anticuerpo secundario. El último paso consiste en añadir una solución de Tris pH7 0.01M con 1% de 3-3´Diaminobenzidine tetrahydroc (DAB, Acros Organics W0572M) y 0.003% de H₂O₂ que permitirá la detección mediante un precipitado marrón.

En este estudio experimental, el anticuerpo primario empleado es la anti-calbindina. La calbindina es una proteína de unión al calcio que pertenece a la superfamilia de la troponina C y funciona como tampón de calcio citosólico. Se encuentra en el cerebro, el riñón, el intestino y los islotes pancreáticos.

La mayoría de neuronas colinérgicas en mono y prosencéfalo basal humano son inmunorreactivas para calbindina-D-28, una calbindina dependiente de

vitamina D. Se trata de una proteína que ha demostrado ser un útil marcador de células migratorias tangenciales durante el desarrollo cortical en ratones ⁽¹⁹⁾. Este anticuerpo por tanto permite observar indirectamente qué ocurre en determinadas regiones cerebrales mediante el marcaje del tejido. Gracias a ello es posible establecer qué cambios se han producido a nivel de la región hipotalámica (región estudiada) entre otras.

Una vez llevado a cabo el último paso, que conduce a la obtención de un precipitado marrón, se procede a cubrir los portaobjetos empleando el medio de montaje Eukitt® y posteriormente se dejan secar.

Para poder cubrir las muestras de tejido de cerebro de ratón se utilizan cubreobjetos, los cuales permiten proteger las muestras, además de proporcionar un camino óptico claro. El medio de montaje anteriormente citado permite obtener una imagen más contrastada después de la tinción, lo que ayuda a enfocar mejor la muestra y mejora por tanto la calidad del análisis. Además permite almacenar las muestras durante un largo período de tiempo.

Una vez preparadas las muestras el siguiente paso consistió en capturar imágenes digitales del tejido procesado. Para ello se utilizó un microscopio Leica equipado con una cámara digital.

¹⁹ Jiménez D, López-Mascaraque L, De Carlos JA, Valverde F. Further studies on cortical tangential migration in wild type and Pax-6 mutant mice. J Neurocytol. 2002 Sep-Nov; 31 (8-9):719-28.

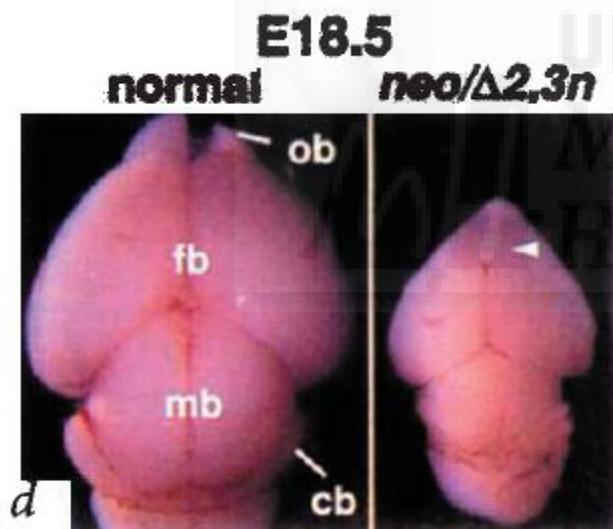
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente proyecto se ha analizado macroscópicamente y microscópicamente el resultado de la carencia parcial de FGF8 en el cerebro de un ratón embrionario de 17.5 días de gestación (E17.5). En concreto, se ha centrado el estudio en el análisis de las poblaciones hipotalámicas, ya que durante el desarrollo temprano FGF8 se expresa en dicha región, particularmente en la zona más ventro-medial.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el ratón a estudio es un embrión mutante $neo/\Delta 2,3n$ ($Fgf8^{neo/null}$) en el que se ha reducido la función de FGF8 al 20%.

En total se procesaron y estudiaron los cerebros de tres embriones pero las imágenes que figuran a continuación corresponden a uno de ellos.

4.1. Resultados macroscópicos



Aunque los embriones ya habían sido extraídos previamente al inicio de este proyecto, sí fue posible observar antes de ser incluidos en parafina que su tamaño era considerablemente reducido. El hocico se encontraba muy reducido y no se apreciaban bien los ojos, siendo éstos más pequeños que los de un embrión control.

Figura 11. Comparación de un cerebro de ratón E18.5 silvestre y uno $neo/\Delta 2,3n$ ⁽¹⁷⁾.

El cerebro no pudo examinarse, ya que posteriormente a la inclusión en parafina del embrión, se iba a cortar la cabeza entera con el fin de preservar en las mejores condiciones posibles la región hipotalámica. De hecho, en cualquier extracción del cerebro, la hipófisis (adenohipófisis y neurohipófisis) queda íntimamente unida a la silla turca y cubierta por la tienda de la hipófisis (una pequeña lámina circular horizontal de duramadre que forma el techo de la silla turca).

Sin embargo y con ayuda de la base de datos Medline fue posible describir el aspecto macroscópico del mutante hipomorfo “severo” para *Fgf8* (Figura 11).

Tal y como es posible apreciar en la imagen (Figura 11), en un embrión de ratón E18.5 *neo/Δ2,3n* el cerebro difiere del de un embrión silvestre por la falta de mesencéfalo (mb) y cerebelo (Cb), y por el pequeño tamaño generalizado de todo el cerebro. Cabe destacar también la falta del surco interhemisférico en el telencéfalo rostral (cabeza de flecha) ⁽¹⁷⁾. Esto indica que posiblemente en la región prosencefálica rostral aparece una holoprosencefalía o fusión de los hemisferios telencefálicos. Del mismo modo, sólo se aprecia un bulbo olfatorio muy reducido.

El cerebro de mutante *neo/Δ2,3n* (*Fgf8^{neo/null}*), sometido a estudio en este trabajo, presenta un tamaño inferior al de un cerebro de ratón silvestre. FGF8 es una molécula secretable implicada en la especificación, proliferación y regionalización. Su ausencia total no permite al embrión desarrollarse, ni siquiera implantarse en el útero, pero una dosis inferior a la normal, como es el caso de este hipomorfo, permite estudiarlo en estadios embrionarios y observar su reducción generalizada y la ausencia aparente de algunas subdivisiones. El grado de pérdida de tejido parece ser *Fgf8* dosis-dependiente ⁽¹⁸⁾.

4.2. Resultados microscópicos

Continuando con el estudio de la región hipotalámica, macroscópicamente (y desde el exterior) no fue posible observar ningún fenotipo relacionado con el hipotálamo. Sin embargo, el reducido tamaño del animal conduce a suponer que sea posible la existencia de una afectación del hipotálamo como órgano inductor del crecimiento óseo. De hecho, el hipotálamo influye sobre la adenohipófisis, la cual sintetiza y secreta hormona del crecimiento, y puede que tanto la adenohipófisis como la neurohipófisis se encuentren alteradas (eje hipotálamo-hipofisario).

A continuación se muestran una serie de imágenes de distintos cortes (sagitales y coronales) de cerebro de embrión y tinciones (calbindina -Calb 1- y violeta de cresilo -VC-).

4.2.1. Cortes sagitales

Para el estudio microscópico fue necesario analizar tanto el cerebro de ratón control (silvestre) como el de ratón mutante ($neo/\Delta 2,3n$), y compararlos entre sí.

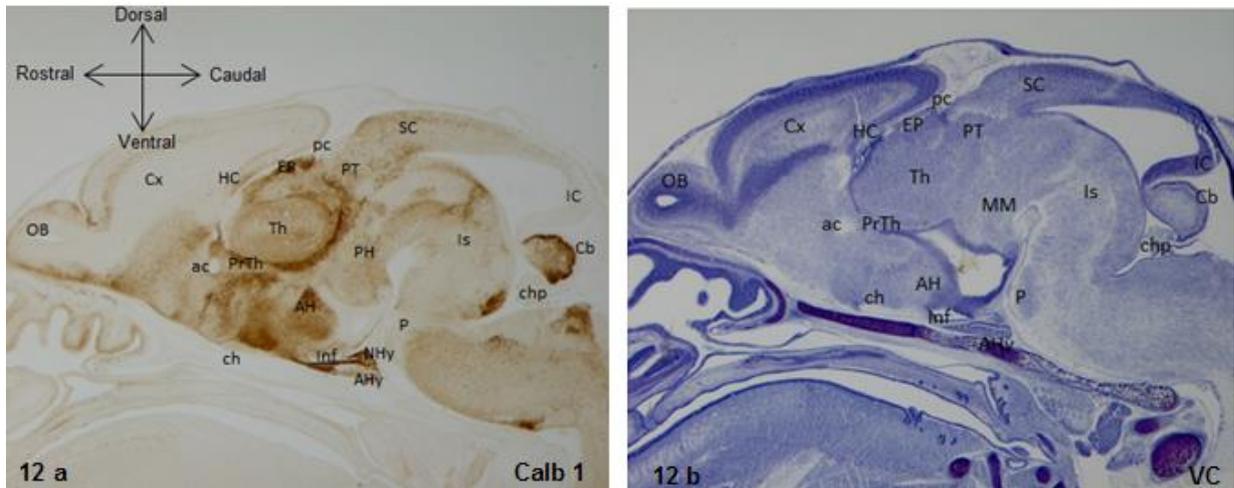


Figura 12. Corte sagital medio de cerebro de ratón E17.5 silvestre. a. Tinción de calbindina. b. Tinción de violeta de cresilo.

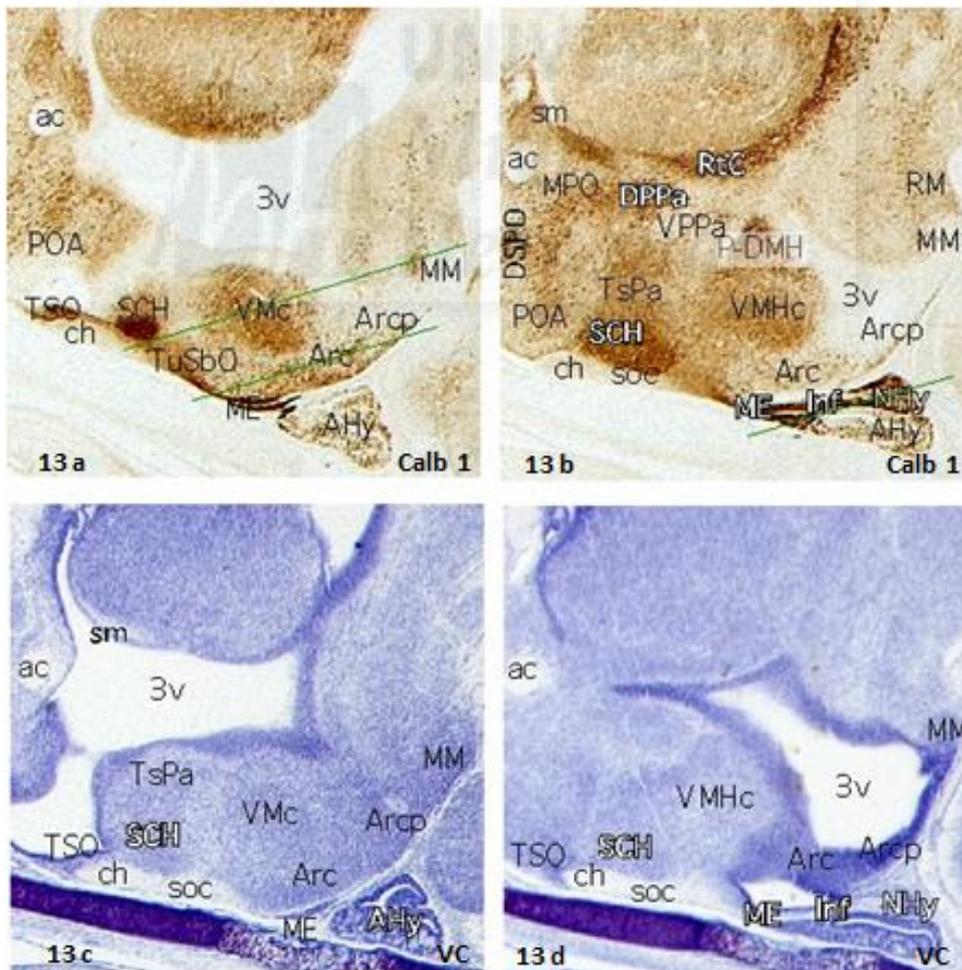


Figura 13. Corte sagital de cerebro de ratón E17.5 silvestre: región hipotalámica e hipófisis. a. y b. Tinciones de calbindina. c. y d. Tinciones de violeta de cresilo.

Tal y como se aprecia en la Figura 12 la tinción de la muestra con calbindina nos permite distinguir diversas estructuras. A la izquierda se halla el bulbo olfatorio (OB). Situado dorsalmente se encuentra el colículo superior (SC), que forma parte del mesencéfalo (mb). Continuando en dirección caudal es posible apreciar el colículo inferior (IC) y a continuación el cerebelo (Cb).

Limitando con el colículo superior (SC) se encuentra el pretecho (PT), que forma parte del diencéfalo (Di) junto con el tálamo (Th) y el pretálamo (PrTh), los cuales se encuentran ventral y rostralmente al pretecho (PT).

Otra de las regiones que se marcan intensamente con esta tinción, concretamente en el prosencéfalo secundario, es el hipotálamo anterior (AH). Adyacente a él se encuentra el hipotálamo posterior (PH). Ventral al hipotálamo anterior se distingue la hipófisis (adenohipófisis -AHy- y neurohipófisis -NHy-) y el infundíbulo (Inf). Rostral al infundíbulo se halla la eminencia media (EM). Por último, y situado rostralmente a la hipófisis, se halla el quiasma óptico (ch).

En la Figura 13 es posible apreciar diversos núcleos hipotalámicos tales como el supraóptico (SO), el supraquiasmático (SCh), el arqueado o arcuato (Arc), el ventromedial (VMH) y los núcleos mamilares (MM) y retromamilares (RM).

No ocurre lo mismo con el cerebro de ratón hipomorfo severo para *Fgf8* (*Fgf8^{neo/null}*), donde es posible observar que se producen alteraciones a nivel del hipotálamo (Figura 14), además de en otras regiones.

Aparte de la apreciable reducción de tamaño macroscópica observada y comparándolo con el tejido control, el sistema hipofisario se encuentra alterado. En concreto, no es posible apreciar la morfología de la neurohipófisis (NHy), la cual es positiva para calbindina. Sin embargo, en este caso la adenohipófisis (AHy) se conserva. Otra estructura que parece verse comprometida en estos ratones mutantes es el quiasma óptico (ch). Muestra de ello es que en el ratón silvestre, es decir, en condiciones normales, se aprecia bajo la tinción de calbindina un espacio apenas marcado (prácticamente blanco) situado rostralmente al infundíbulo, que corresponde al quiasma óptico, mientras que en el mutante no puede apreciarse bien.

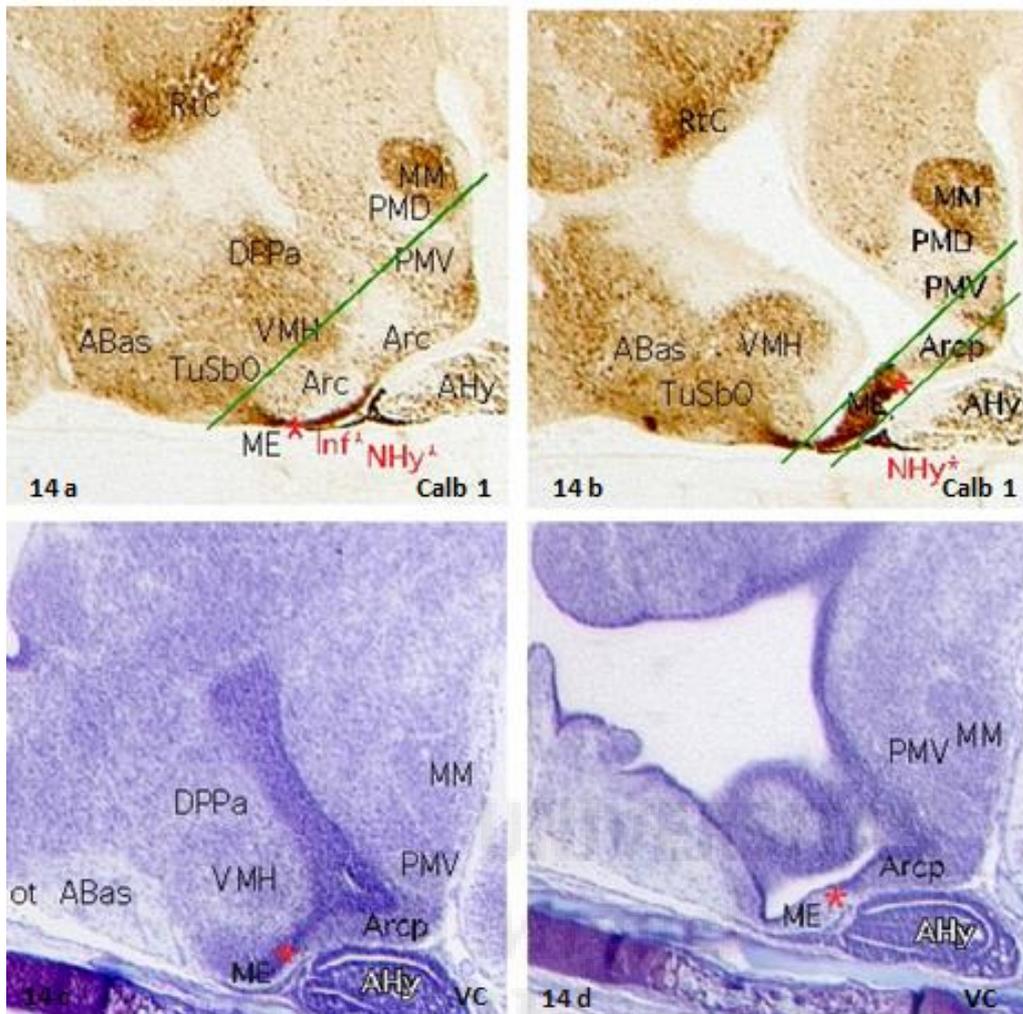


Figura 14. Cortes sagitales de cerebro de ratón *FgF8^{neo/null}* (hipomorfo *Fgf8* severo) E17.5. a. y b. Tinciones de calbindina. c. y d. Tinciones de violeta de cresilo.

En este tipo de corte (sección sagital) es posible distinguir en la región mamilar la parte dorsal del núcleo preamamilar (PMD) y también la parte ventral (PMV) (Figura 14 a y b).

4.2.2. Cortes coronales (horizontales al hipotálamo)

Con el fin de poder establecer con mayor precisión qué estructuras se ven afectadas por la expresión reducida de *Fgf8* recurrimos a cortes coronales, los cuales son horizontales al hipotálamo.

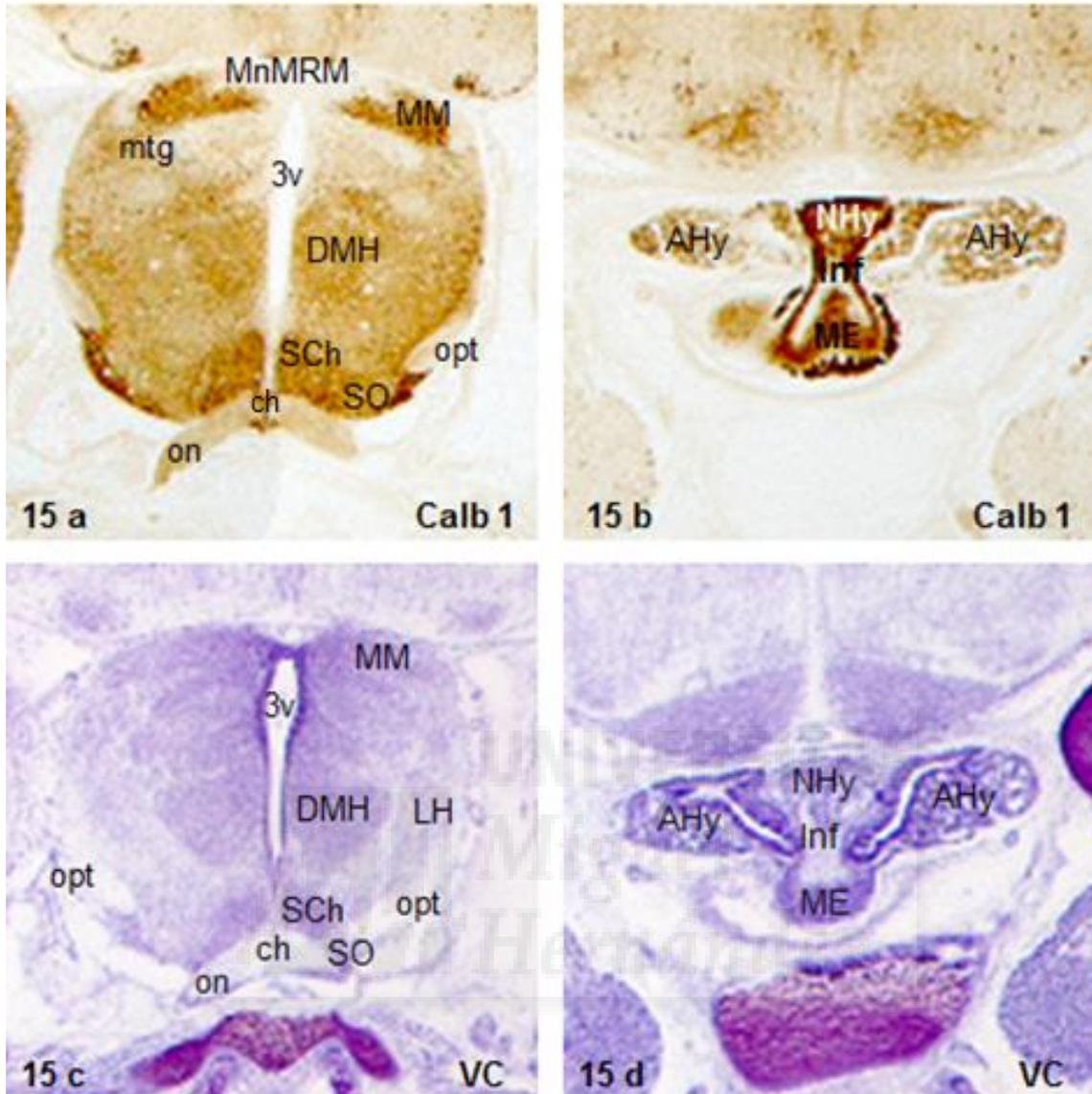


Figura 15. Cortes coronales de cerebro de ratón control (horizontales al hipotálamo). a. y b. Tinciones de calbindina. c. y d. Tinciones de violeta de cretino.

Son diversas las estructuras que pueden distinguirse en las tinciones de los cortes coronales mostrados arriba (Figura 15). Prestando atención a la primera tinción de calbindina (Figura 15a) es posible distinguir la región mamilar (MM, MnMRM, mtg). Continuando en dirección rostral se encuentran diversos núcleos hipotalámicos, el nervio óptico y ya en posición más rostral el quiasma óptico (ch). La segunda tinción de calbindina (Figura 15b) permite apreciar estructuras más ventrales y rostrales que las de la tinción previa. Una de estas estructuras es la adenohipófisis (AHy), la cual se halla rodeando a la

neurohipófisis (NHy). Siguiendo en dirección rostral se halla el infundíbulo (Inf) y la eminencia media (ME).

Respecto a las estructuras previamente citadas se aprecia que en la tinción de violeta de cresilo (VC) el marcaje es menos intenso que en el caso de la calbindina. Un ejemplo de ello es la región mamilar, que no se muestra tan marcada como en el caso de la calbindina. Comparando ambas tinciones entre sí hay zonas que aparecen marcadas con la calbindina pero no ocurre lo mismo con el cresil violeta, como es el caso del nervio óptico (on) y del quiasma (ch).

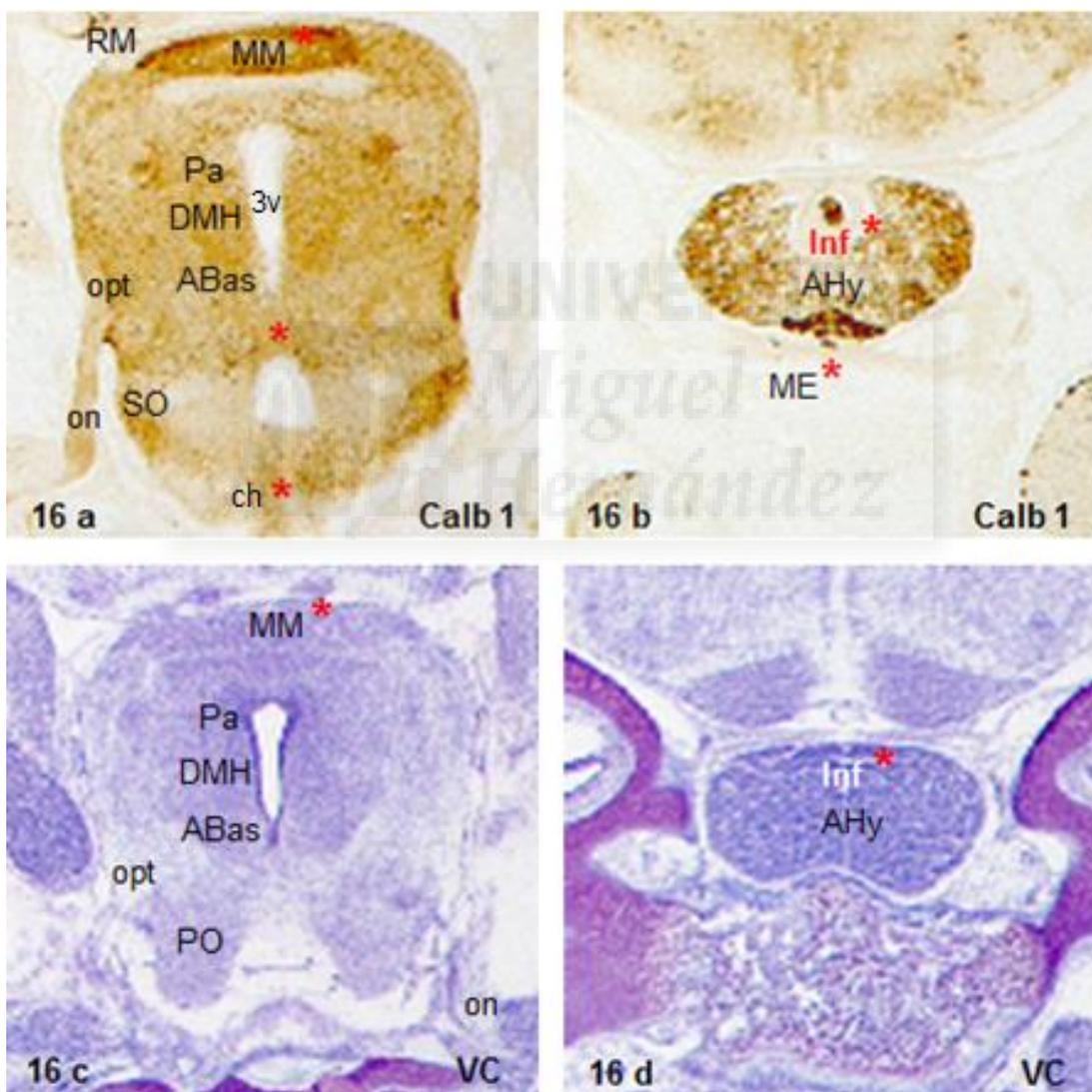


Figura 16. Cortes coronales de cerebro de ratón mutante hipomorfo severo (*Fgf8neo/null*) (horizontales al hipotálamo). a. y b. Tinciones de calbindina. c. y d. Tinciones de violeta de cresilo.

Comparando la Figura 16, perteneciente a un mutante hipomorfo severo, con la imagen anterior (Figura 15) es posible apreciar que se produce una serie de cambios como consecuencia de la disminución de expresión de *Fgf8* y por tanto de su función. Cabe recordar que el mutante en cuestión ha sufrido una disminución de la función de dicho morfógeno del 80%.

Tanto en la tinción de calbindina (Figura 16a) como en la de cresil violeta (Figura 16c) en la zona más caudal se puede observar como los cuerpos mamilares se han fusionado.

En la zona medial, a nivel del tercer ventrículo (3v) también se produce una fusión de modo que éste se reduce en cuanto a tamaño (Figura 16a).

Respecto a la región lateral se observa que el nervio óptico (on) penetra en el SNC de manera ipsilateral completa, es decir, no se produce el entrecruzamiento de los nervios por lo que este mutante carece de quiasma óptico (Figura 16a). También desaparece el núcleo supraquiasmático (SCh), el cual está implicado en la regulación del ciclo circadiano.

La neurohipófisis (NHy) desaparece tal como puede observarse en la Figura 16b y respecto al infundíbulo sólo se conserva un vestigio no funcional.

Rostral a ambas estructuras debería hallarse también la eminencia media (ME), la cual desaparece en respuesta a la disminución severa de la cantidad de *Fgf8* a la que ha sido sometido el ratón mutante.

5. CONCLUSIONES

En el estudio experimental que nos ocupa se ha analizado el rol de *Fgf8* en el correcto desarrollo del SNC. Una vez realizada la descripción anatómica en embriones de ratón cuyos niveles de *Fgf8* se encontraban afectados, en este caso en un 80%, se puede afirmar que el papel desempeñado por la proteína FGF8 es fundamental para la especificación y correcto desarrollo de diversas estructuras encefálicas entre las que se encuentra la neurohipófisis, la eminencia media, el quiasma óptico, núcleos hipotalámicos, el cerebelo, el mesencéfalo caudal, etc.

Como morfógeno que es FGF8, se entiende también que las alteraciones apreciadas en los embriones de ratón mutante analizados respecto a los embriones se producen de modo gradienta.

Es sabido que un ratón mutante que presenta el 50% de los niveles de FGF8 no muestra ningún fenotipo, de modo que puede vivir tal como lo haría un ratón silvestre cuyos niveles son normales ⁽¹⁸⁾. Sin embargo, este no es el caso que nos ocupa. Respecto a la región hipotalámica y la hipófisis, estas son sensibles, aunque no tanto como el mesencéfalo y el rombencéfalo, a la función de FGF8 ya que en el caso del hipomorfo severo (*Fgf8^{neo/null}*), en el que se expresa el 20% de *Fgf8*, tiene lugar la desaparición de estructuras relevantes y la fusión de otras tantas.

En relación al sistema hipofisario, *Fgf8* resulta de gran importancia a nivel funcional, ya que a pesar de expresarse el 20% de esta proteína, desaparece prácticamente en su totalidad la neurohipófisis y sólo se conserva un vestigio no funcional de infundíbulo. Cabría esperar, pues, alteraciones hormonales a nivel del eje hipotálamo-hipofisario. También se produce la desaparición de la eminencia media, la cual tiene una gran importancia fisiológica.

Otra estructura que parece verse afectada es el núcleo supraquiasmático, que constituye el centro primario de regulación de los ritmos circadianos mediante la estimulación de la secreción de melatonina por la glándula pineal.

Cabe destacar también la desaparición del quiasma óptico que conduciría a defectos del campo visual.

Por tanto, probablemente se trate de ratones que posean multitud de alteraciones hormonales y por ende fisiológicas además de problemas visuales entre otros. Estas alteraciones, junto con otras relativas a diferentes regiones del cerebro, suponen que los mutantes sometidos a estudio con carencia de FGF8 no puedan sobrevivir una vez nacidos y que por lo tanto no podamos entender por ahora la falta de función específica solo en el hipotálamo. La solución podría hallarse en la tecnología de recombinación Cre-LoxP.

