

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO DE FIN DE GRADO EN MEDICINA



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE NEURONAS EOMES
POSITIVAS EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL
RATÓN

AUTOR: LORENTE HERNÁNDEZ, MARIELA

TUTOR: EDUARDO DE PUELLES MARTÍNEZ DE LA TORRE

COTUTOR: ABRAHAM ANDREU CERVERA

DEPARTAMENTO Y ÁREA: HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA – ANATOMÍA Y
EMBRIOLOGÍA HUMANA

CURSO ACADÉMICO: 2023- 2024

Convocatoria de Febrero.

1. Tabla de contenido

1. RESUMEN	2
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	6
I. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	6
II. MIGRACIONES NEURONALES	7
III. EMINENCIA PRETALÁMICA	8
IV. TIPOS NEURONALES	10
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	10
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
I. RATONES.....	11
II. INMUNOFUORESCENCIA	12
6. RESULTADOS	15
7. DISCUSIÓN.....	21
I. NATURALEZA DE NEURONAS EOMES POSITIVAS SEGÚN NEUROTRANSMISOR.....	21
II. EXPRESIÓN DE EOMES EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SNC DEL RATÓN	23
8. CONCLUSIONES	24
9. BIBLIOGRAFÍA.....	25



1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El Sistema Nervioso Central (SNC) es el centro de control del cuerpo humano. Es importante conocer su desarrollo embrionario para abordar cuestiones de salud, neurociencia y comportamiento humano. Es necesario destacar la importancia de las migraciones neuronales, especialmente las tangenciales que se proyectan desde la eminencia pretalámica (PThE), y los principales neurotransmisores involucrados en la comunicación neuronal, centrándonos en el glutamato y el ácido gamma-aminobutírico (GABA).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS: Conociendo la existencia de neuronas migradas tangencialmente desde la PThE, se investigará la naturaleza neurotransmisora de las neuronas migradas en ratones transgénicos, evaluando los neurotransmisores contenidos por neuronas *Eomes* positivas. Además, se determinará el momento de aparición de estas células durante el desarrollo embrionario del SNC.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se emplearon tres líneas de ratones transgénicos. Se realizó inmunofluorescencia en cortes cerebrales de ratones *Eomes^{Cret/flox}* para determinar el momento de aparición de las neuronas *Eomes* positivas durante el desarrollo embrionario, con marcaje para *Eomes* (GFPn) junto con GABA. Se realizó triple inmunofluorescencia en ratones *Eomes^{mTnG}* con marcaje para *Eomes* (GFPn, RFpC) junto con GABA o glutamato.

RESULTADOS: El análisis de los cortes de cerebro de ratones *Eomes^{mTnG}* E18.5 revela la distribución de neuronas *Eomes* positivas y la expresión de marcadores GABAérgicos y glutamatérgicos en diferentes regiones cerebrales, incluyendo la corteza, el septo, el hipocampo y el mesencéfalo. Se observa marcada presencia de neuronas *Eomes* en corteza e hipocampo, así como poblaciones de neuronas GABAérgicas en áreas como el núcleo estriado y la formación reticular. Además, se comparan los patrones de expresión de *Eomes* en diferentes etapas del desarrollo embrionario, destacando cambios en su distribución a lo largo del tiempo.

DISCUSIÓN: Las neuronas *Eomes* positivas, originadas en la PThE, muestran una diversidad de neurotransmisores, migrando tangencialmente hacia diversas regiones cerebrales. Este fenómeno refleja la heterogeneidad observada en otras migraciones tangenciales, con poblaciones tanto glutamatérgicas como GABAérgicas.

La expresión del gen *Eomes* en el desarrollo embrionario del SNC del ratón disminuye progresivamente, con variaciones significativas según la región cerebral y el momento de la inyección de Cre. Además, se identifican migraciones tardías de poblaciones *Eomes* positivas hacia regiones como el hipocampo y la formación reticular mesencefálica.

CONCLUSIÓN: Las neuronas *Eomes* positivas, derivadas en su mayoría de la PThE, muestran diversidad de neurotransmisores, reflejando la variabilidad observada en otras migraciones neuronales tangenciales. Además, la expresión del gen *Eomes* disminuye durante el desarrollo embrionario del SNC en ratones, con variaciones significativas en su distribución según la región cerebral y el momento de la inyección de Cre.

Palabras clave: Sistema Nervioso Central, Desarrollo embrionario, *Eomes*, Eminencia pretalámica (PThE), Ácido gamma-aminobutírico (GABA), Glutamato

2. ABSTRACT

INTRODUCTION: The Central Nervous System (CNS) is the control center of the human body. Understanding its embryonic development is crucial for addressing issues in health, neuroscience, and human behavior. It is important to highlight the significance of neuronal migrations, especially tangential migrations projected from the prethalamic eminence (PThE), and the key neurotransmitters involved in neuronal communication, focusing on glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA).

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES: Given the existence of tangentially migrated neurons from the PThE, the neurotransmitter nature of migrated neurons in transgenic mice will be

investigated, assessing the neurotransmitters contained by *Eomes* positive neurons. Additionally, the timing of appearance of these cells will be determined.

MATERIALS AND METHODS: Three lines of transgenic mice were used to investigate CNS embryonic development. Immunofluorescence was performed on brain sections of *Eomes*^{Cret/flox} mice to determine the timing of appearance of *Eomes* positive neurons during embryonic development with labeling for *Eomes* (GFPn) along with GABA. Triple immunofluorescence was performed on *Eomes*^{mTnG} mice with labeling for *Eomes* (GFPn, RFPc) along with GABA or glutamate.

RESULTS: Analysis of brain sections from E18.5 *Eomes*^{mTnG} mice reveals the distribution of *Eomes* positive neurons and the expression of GABAergic and glutamatergic markers in different brain regions, including the cortex, septum, hippocampus, and mesencephalon. Marked presence of *Eomes* neurons is observed in the cortex and hippocampus, as well as populations of GABAergic neurons in areas such as the striatum and reticular formation. Additionally, expression patterns of *Eomes* are compared at different stages of embryonic development, highlighting changes in its distribution over time.

DISCUSSION: *Eomes* positive neurons, originating mainly from the PThE, exhibit a diversity of neurotransmitters, tangentially migrating to various brain regions. This phenomenon reflects the heterogeneity observed in other tangential migrations, with both glutamatergic and GABAergic populations. The expression of the *Eomes* gene in the embryonic development of the mouse CNS progressively decreases with significant variations depending on the brain region and the timing of Cre injection. Late migrations of *Eomes* positive populations to regions such as the hippocampus and mesencephalic reticular formation are identified.

CONCLUSION: *Eomes* positive neurons, mostly derived from the PThE, display neurotransmitter diversity, reflecting the variability observed in other tangential neuronal migrations. Additionally, the expression of the *Eomes* gene decreases during embryonic CNS

development in mice, with significant variations in its distribution depending on the brain region and the timing of Cre injection.

KEYWORDS: Central Nervous System, Embryonic Development, *Eomes*, Prethalamic eminence (PThE), Gamma-Aminobutyric Acid (GABA), Glutamate.



3. INTRODUCCIÓN

I. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El Sistema Nervioso Central (SNC) es una estructura fundamental del Sistema Nervioso, que comprende el cerebro y la médula espinal. Funciona como el centro de procesamiento y control del cuerpo humano, supervisando y coordinando diversas funciones fisiológicas y comportamientos. El entendimiento profundo del SNC es esencial para abordar una variedad de temas relacionados con la salud, la neurociencia y la conducta humana.¹

Aparece al inicio de la tercera semana de desarrollo como una placa de ectodermo engrosado: la placa neural, situada en región medio-dorsal. Sus bordes laterales se elevan para constituir los pliegues neurales, que más tarde formarán el tubo neural. Una vez iniciada la fusión, los extremos abiertos del tubo neural forman los neuroporos craneal y caudal.²

El extremo cefálico del tubo neural muestra tres dilataciones, conocidas como vesículas cerebrales primarias: el prosencéfalo o cerebro anterior, el mesencéfalo o cerebro medio y el rombencéfalo o cerebro posterior. Este último producirá el pliegue cervical en su unión con la médula espinal y el pliegue cefálico en la región del cerebro medio. Hacia la quinta semana del desarrollo ya aparecen cinco vesículas secundarias: el prosencéfalo da lugar al prosencéfalo secundario y diencefalo, el mesencéfalo permanece y el rombencéfalo da origen la región pontina y la región bulbar.^{1,2}

Del prosencéfalo secundario derivarán los hemisferios cerebrales, las vesículas ópticas y el hipotálamo e hipófisis. El diencefalo contendrá el tálamo. El mesencéfalo dará lugar a los colículos anteriores, relacionados con la visión y posteriores, asociados a la audición. De la región pontina se desarrollará el cerebelo y el puente y la región bulbar dará lugar al bulbo raquídeo.²

II. MIGRACIONES NEURONALES

La migración neuronal es el proceso mediante el cual las neuronas, una vez que salen del ciclo mitótico, abandonan la capa ventricular para ocupar la capa del manto y llegan a su lugar de diferenciación definitiva. La magnitud del desplazamiento migratorio del soma neuronal hasta llegar a su destino final es equivalente frecuentemente a distancias considerables. Se definen dos tipos de migración neuronal, de acuerdo con la orientación y dirección, aunque hay clases de neuronas que realizan ambos tipos de migración en diferentes fases de su diferenciación inicial.¹

La migración radial es el movimiento desde la capa ventricular a la capa del manto, siguiendo la dirección radial del neuroepitelio circundante. Es el tipo de migración más importante en el encéfalo de los mamíferos, siendo especialmente importante para la formación de estructuras corticales. Por otro lado, la migración tangencial es el movimiento paralelo a la superficie del tubo neural, dentro de la capa del manto. Estas pueden ser profundas (periventricularmente o en el espesor del manto) o superficiales (como en el caso de las migraciones masivas procedentes del labio rómbico, como la oliva inferior, núcleos pontinos y granos del cerebelo).¹

Otras migraciones tangenciales masivas ocurren desde las eminencias ganglionares medial y lateral del telencéfalo hacia la corteza cerebral, antes de ingresar las neuronas por movimiento radial.¹

En este trabajo se estudian las corrientes de migración tangencial desde la eminencia pretalámica hasta los núcleos que proyectan a la habénula, para lo que se emplea la expresión de un gen específico de esta estructura, el gen *Eomes*.

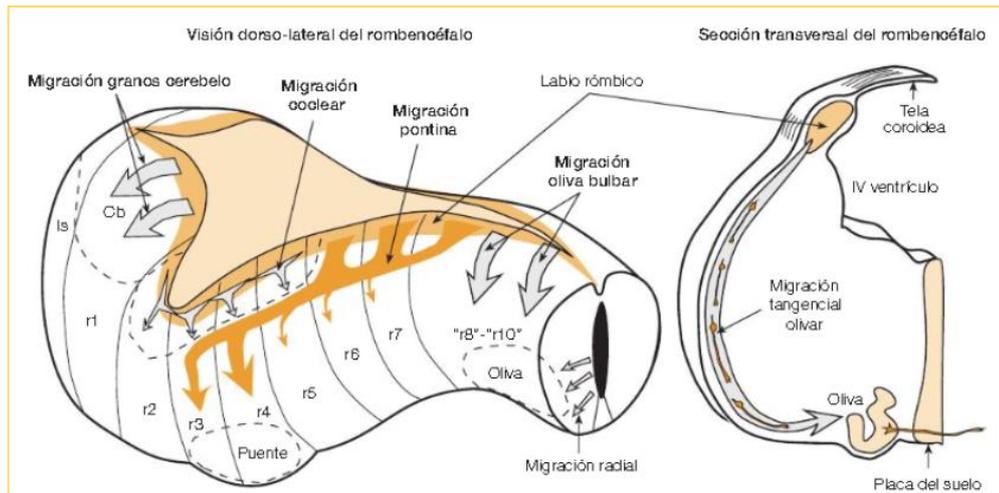


Figura 1. Migraciones tangenciales superficiales procedentes del labio rómbico.¹

III. EMINENCIA PRETALÁMICA

La eminencia pretalámica (PThE), a menudo mal denominada “eminencia talámica”, es una región diencefálica en la frontera telencefálica-hipotalámica y el dominio de la estría terminalis. Es reconocida por su relación con la vía de la estría medular, formando el núcleo cama de la estría medular antes de ingresar a la región talámica habenuar. Distintos estudios identifican la PThE en etapas temprano-intermedias del desarrollo, volviéndose indistinguible en etapas posteriores, por lo que no se puede identificar en la gran mayoría de los atlas cerebrales de adultos.³

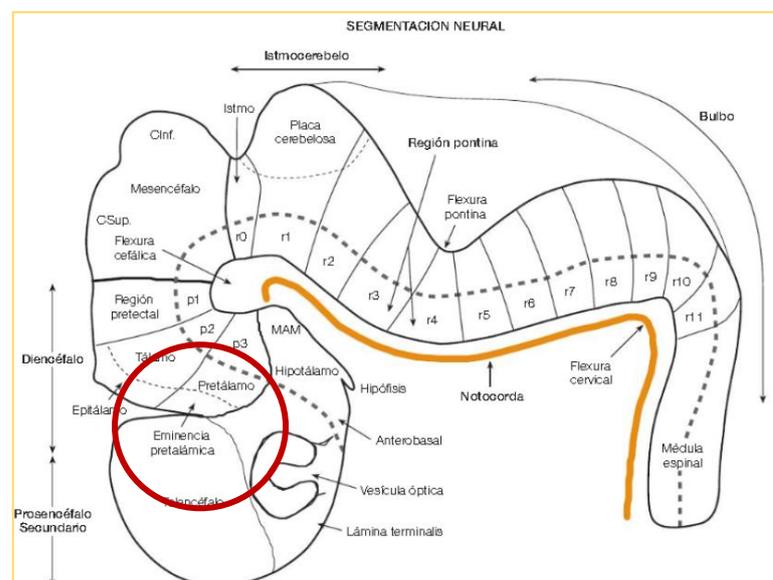


Figura 2. Flexuras del tubo neural y partición dorsoventral y anteroposterior donde se indica la ubicación de la eminencia pretalámica (PThE).¹

En distintos estudios, se ha buscado seguir el aparente destino del primordio Tbr1-positivo de la eminencia hasta su estadio final, observando cómo la población disminuye progresivamente, aparentemente por la migración tangencial de los derivados neuronales a objetivos vecinos o distantes dentro del prosencéfalo secundario (hipotálamo y telencéfalo).³

En el marco revisado del cerebro prosomérico, la PThE se define como un subdominio alar del prosencéfalo diencefálico. Molecularmente, se distingue de las áreas alares pretalámicas más ventrales por mostrar marcadores específicos, entre los que encontramos el gen Tbr2, que nos interesará de forma especial en este estudio. Este perfil molecular permite la diferenciación de la PThE de las áreas adyacentes del tálamo, telencéfalo e hipotálamo.³

A medida que progresa el desarrollo, surgen múltiples corrientes neuronales migratorias de la PThE que expresan marcadores característicos de la eminencia. Estas corrientes penetran en distintas regiones: en la amígdala extendida, la banda diagonal subpalial, los dominios preópticos y toda la placa septal comisural y el área hipotalámica ventricular. Diversos estudios también han descrito una posible migración neuronal desde el PThE hacia el subpalio, así como una subpoblación de neuronas Cajal-Retzius que invaden la capa 1 del isocórtex en desarrollo. Otras poblaciones también pueden colonizar el bulbo olfatorio accesorio y el núcleo del tracto olfatorio lateral. Se ha descrito que estas migraciones ocurren en oleadas a lo largo del desarrollo.³

En las etapas tempranas, la PThE, en su zona más dorsal, presenta un perfil molecular que la distingue del resto de la placa alar pre-talámica: no produce neuronas GABAérgicas y, en cambio, expresa marcadores génicos consistentes con la generación local de neuronas glutamatérgicas.³

Las neuronas que derivan de la PThE son muy variadas. En general, en mamíferos genera neuronas relacionadas con el sistema de procesamiento olfativo y comportamientos relacionados con las emociones, como el miedo y la ansiedad.⁴

IV. TIPOS NEURONALES

Las neuronas son células especializadas del sistema nervioso que desempeñan un papel fundamental en la transmisión de información dentro del cuerpo. Son la unidad básica del sistema nervioso, y forman redes complejas que permiten la comunicación rápida y eficiente entre diferentes partes del cuerpo. Se distinguen por los distintos tipos de neurotransmisores que producen.⁵

Muchas moléculas orgánicas pequeñas actúan como neurotransmisores, como aminoácidos (glutamato y glicina, entre otros). En este trabajo, nos centraremos en la revisión de los neurotransmisores estudiados:

- **GABA**: el ácido gamma-aminobutírico (GABA) media la mayoría de la inhibición sináptica rápida en el cerebro, a través de la activación de receptores GABA. Se encuentra en todas las regiones del cerebro. Uno de los sistemas donde se ubican neuronas GABAérgicas es en los ganglios basales, con importantes neuronas GABAérgicas de proyección desde el núcleo estriado al globo pálido, del estriado a la sustancia negra reticulada y desde el globo pálido y la sustancia negra reticulada al tálamo, siendo todas vías inhibitorias.⁵
- **GLUTAMATO**: el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro de mamíferos. La transmisión rápida mediada por este neurotransmisor es responsable de la excitación sináptica de la mayoría de las neuronas cerebrales, por lo que se encuentra en todo el cerebro. Las neuronas piramidales de la corteza serían un ejemplo de neuronas glutamatérgicas.⁶

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Conociendo que se producen corrientes migratorias tangenciales desde la PThE, que pueden expresar marcadores específicos de esta eminencia entre los que encontramos Eomes o Tbr2, se propone el estudio de la naturaleza de estas neuronas migradas tangencialmente según

su neurotransmisor. En la misma línea, se propone conocer el momento de la aparición de estos derivados en el desarrollo embrionario del ratón.

Por tanto, el objetivo será doble: por un lado, estudiar en un modelo de ratón transgénico el tipo de neurotransmisor que contienen las neuronas Eomes positivas. Por otro lado, estudiar en otro modelo diferente de ratón transgénico el momento de aparición de estos derivados Eomes positivos en el desarrollo embriológico del SNC del ratón.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

I. RATONES

En este trabajo se han empleado tres líneas de ratones genéticamente modificadas:

- La cepa *Eomes^{mTomH2BGFP}* (*Eomes^{mTnG}*). En estos la proteína tdTomato está unida a la membrana (mT) y una proteína GFP al núcleo H2B (nG). En estos ratones, las neuronas positivas a este gen presentan fluorescencia: los núcleos aparecen marcados en verde y los axones en rojo.
- Una línea reportera *TdTomato^{flox/flox}* con proteína roja fluorescente, que requiere la acción de la endonucleasa Cre para ser expresada.
- La cepa *Eomes^{CreT/+}*, heterocigota para la endonucleasa CreT.

Se combinan la línea reportera y la cepa *EomesCreT/+*, dando lugar a crías *EomesCreT/flox*, que marcarán el gen Eomes en rojo fluorescente de forma indeleble desde el momento de la inyección de Cre.

En este caso, se inyectaron los ratones en los estadios 12.5, 14.5 y 16.5, siendo todos los ratones sacrificados en el estadio E18.5.

El estudio se ha centrado en estadios embrionarios tardíos. En los ratones, el esperma del macho coagula dentro de la vagina en forma de “tapón vaginal” relativamente duro, que persiste de 6 a 12 horas. Debido a este tapón, la hembra del ratón puede ser fecundada solo por un

macho. La presencia del tapón vaginal permite calcular la edad de los embriones. La hembra queda embarazada por la noche y se empiezan a contar los días a la mañana siguiente. La gestación dura entre 18.5 y 19.5 días en hembras primíparas, y entre 19 y 21 en las multíparas.

En este estudio se han usado cerebros previamente seleccionados, diseccionados y deshidratados. En primer lugar, se incluyeron en agarosa para ser cortados en el vibratomo. Para esto, se prepara una solución de agarosa al 1% en PBS y se introduce en una placa donde se colocan los cerebros en la posición deseada, vertiendo hielo diluido para su solidificación.

Una vez obtenidos los bloques de agarosa, se realizan cortes coronales en láminas de 100 micras en el vibratomo, que es un instrumento con un brazo mecánico que vibra de forma horizontal, con una cuchilla y un porta-muestras que se moviliza mecánicamente y está sumergido en PBS (tampón fosfato salino similar al líquido extracelular de los mamíferos). Los cortes quedan flotando en el PBS y se recogen con un pincel, clasificándolos en una placa.

Toda manipulación de animales vivos ha sido realizada por personal autorizado.

II. INMUNOFLUORESCENCIA

Seguidamente, se realiza la inmunofluorescencia. El objetivo es ampliar la señal de fluorescencia ya presente en este tipo de ratones, para detectar las neuronas positivas al gen Eomes en el microscopio de fluorescencia y proceder a su estudio. Se trata de una técnica de inmunodetección que emplea anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula. El protocolo de la técnica dura dos días, puesto que requiere incubación del tejido durante una noche. Todos los lavados se realizan en agitación. En este caso, se utilizan dos anticuerpos para cada proteína: el primario, que se une directamente a la proteína que queremos detectar, y el secundario, que se unirá de forma específica al primario y presenta la molécula fluorescente para señalarlo. En este caso, se realizaron dos inmunofluorescencias:

1. INMUNOFLUORESCENCIA 1

En los cortes de ratones *Eomes^{CreT/flox}*, inyectados en E12.5, E14.5 y E16.5 y extraídos en E18.5.

- **Anticuerpos primarios en IHQ GABA:**

α -GAD65/67-rabbit en dilución 1:750 extraído de conejo.

α -RFP-rat en dilución 1:500 extraído de rata.

- **Anticuerpos secundarios:**

Antirat- Alexa 488 en dilución 1:500 en verde.

Antirabbit- Alexa 594 en dilución 1:500 en rojo.

2. INMUNOFLUORESCENCIA 2

En los cortes de ratón *Eomes^{mTnG}*, se realiza una triple inmunofluorescencia.

- **Anticuerpos primarios en IHQ ML8A:**

VGLUT-guinea pig en dilución 1:4000 extraído de cobaya.

RFP-rabbit en dilución 1:500 extraído de conejo.

GFP-chicken en dilución 1:500 extraído de pollo.

- **Anticuerpos secundarios en IHQ ML8A:**

Antiguinea- Alexa 647 en dilución 1:500 en rojo lejano.

Anti-rabbit- Alexa 594 en dilución 1:500 en rojo.

Antichicken – Alexa 488 en dilución 1:500 en verde.

- **Anticuerpos primarios en IHQ ML8B:**

α -GAD65/67-rabbit en dilución 1:750 extraído de conejo.

α -RFP-rabbit en dilución 1:500 extraído de conejo.

GFP-chicken en dilución 1:500 extraído de pollo.

- **Anticuerpos secundarios en IHQ ML8B:**

Antirabbit- Alexa 647 en dilución 1:500 en rojo lejano.

Antirat- CyC3 en dilución 1:500 en rojo.

Antichicken – Alexa 488 en dilución 1:500 en verde.

DIA 1:

El protocolo comienza con lavados en PBS-T (PBS 1% + tritón 0,1%) con un detergente (tritón). Se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno. A continuación, se deja incubar 30 minutos en una solución de H₂O₂ 1.5% en PBS-T, con el fin de bloquear la peroxidasa endógena. La incubación debe realizarse en oscuridad, ya que la enzima se inactiva con la luz. Tras este tiempo, se realizan 6 lavados de 5 minutos para eliminar los restos y se deja aproximadamente una hora en una solución de bloqueo. Esta solución está compuesta por BSA 1% (0.5g BSA + 50ml PBS-T) + lisina 1M en coplin blanco, y bloquea las uniones inespecíficas del anticuerpo con otras proteínas. Finalmente, se deja la muestra en agitación, incubando en los anticuerpos primarios hasta el día siguiente, diluidos en bloqueo según la formulación expuesta en el apartado anterior.

DÍA 2:

Al día siguiente, se realizan 6 lavados de 5 minutos en PBS-T y se introduce la muestra en la solución de anticuerpos secundarios, dejándola una hora. Los anticuerpos se diluyen en PBS-T. Seguidamente, se realizan de nuevo 6 lavados de 5 minutos en PBS-T y se deja 5 minutos en DAPI 1:5000 en PBS-T, que contiene una proteína que se une específicamente a los núcleos de todas las células y las marca en azul. Finalmente, se lava de nuevo con PBS-T tres veces.

Este proceso se realiza con cortes flotantes en placas con 6 pocillos. A continuación, se deben montar los cortes en los portaobjetos, en orden correcto, fijarlos con un cubreobjetos y Mowiol. Una vez montados, se observan al microscopio de fluorescencia los resultados, obteniendo imágenes de los experimentos. Las imágenes fueron captadas por el microscopio de fluorescencia Thunder Imaged y procesadas por la aplicación Fiji. Obtenemos, de esta forma, imágenes de cada corte coronal en los cuatro canales disponibles.

6. RESULTADOS

Comenzamos el análisis de cortes de cerebros de ratones *Eomes^{mTnG}* E18.5, realizados con el vibratomo en la figura 3. Todos los cortes son coronales, de distintas regiones cerebrales. En la figura se muestran tres niveles de cortes: rostral, medial y caudal, centrándonos en las diferentes tinciones de marcadores realizadas con inmunohistoquímica.

En primer lugar, observamos el corte coronal más rostral, identificado mediante la comisura anterior, expresando a la vez los diferentes marcajes. En primer lugar, podemos apreciar los marcajes de *Eomes*: verde nuclear *EomesGFPn*, mostrando los somas de las neuronas *Eomes* positivas y marcaje citoplasmático en rojo *EomesRFPc*, de forma que se pueden observar los axones de estas. En este corte en concreto, se emplea el marcaje para *Gad1* que muestra en rojo lejano (blanco) las neuronas GABAérgicas y, por último, en azul, el DAPI (Fig 3A).

Centrándonos en las neuronas que expresan *Eomes*, podemos ver en primer lugar los somas en verde (Fig 3B), observando cómo la mayor parte de estos se concentran en la corteza (Cx), distribuidas en todas las capas, y en el núcleo triangular del septo (Ts). En rojo, por su parte, observamos los axones (Fig 3C), distribuidos en la corteza de forma más profunda, el núcleo triangular del septo y mostrando en este caso su presencia en la comisura anterior (ac). También podemos apreciar de rojo intenso el tracto olfatorio lateral (LOT).

Seguidamente, nos centraremos en la clasificación de estas neuronas dependiendo del neurotransmisor que contengan. En la figura 3D podemos apreciar las neuronas con *Gad1*, es decir, GABAérgicas, de forma que se distribuyen principalmente en el núcleo estriado (St). También podemos ver neuronas GABAérgicas en la corteza, que se corresponden con las interneuronas. Por último, en el marcaje de las neuronas glutamatérgicas con *vGlut2* (Fig 3E) observamos la relevante positividad de la corteza para este tipo de neuronas, siendo positivo para estas también el núcleo triangular del septo (Ts).

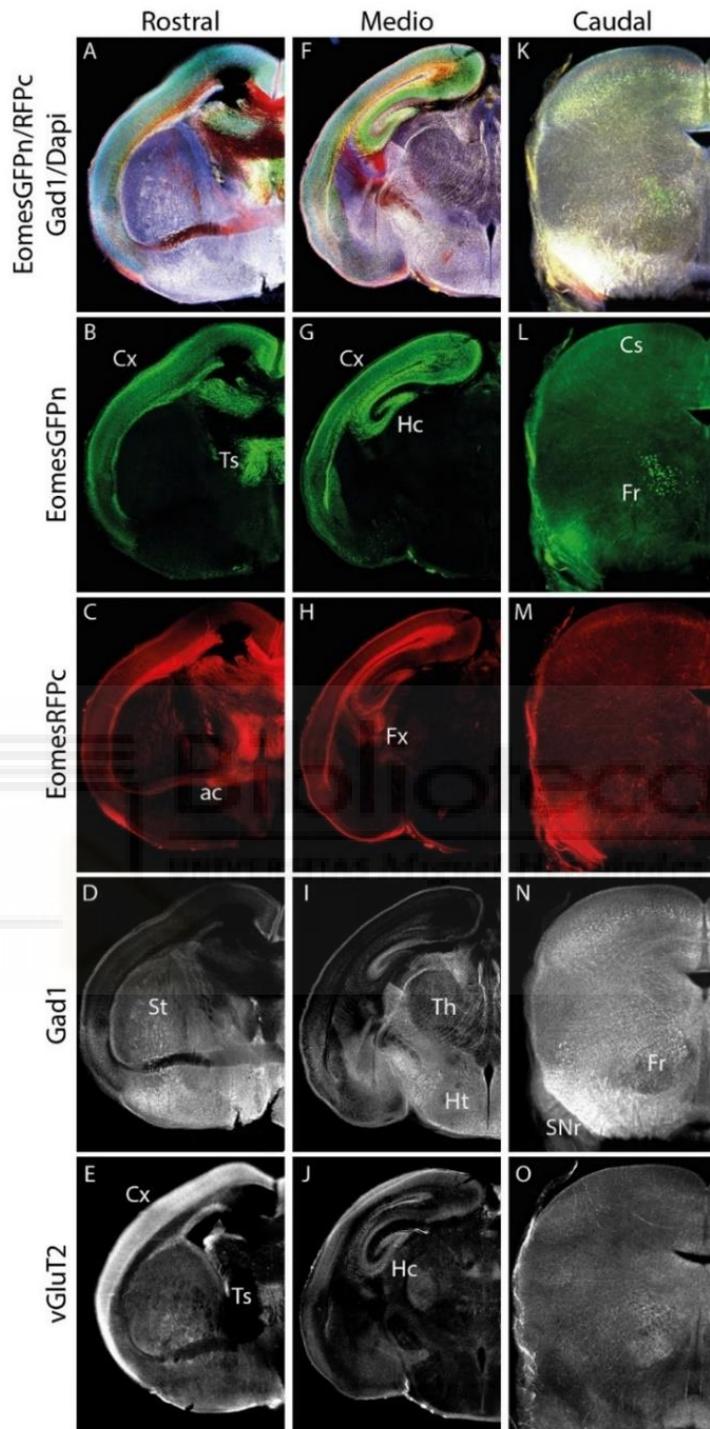


Figura 3: Cortes coronales rostrales, medios y caudales de un cerebro de ratón *Eomes^{mTnG}* en estadio 18.5, con marcaje verde para GFPn, rojo para RFPc, azul para DAPI y blanco para Gad1. Cortes diferentes del mismo cerebro y región similar con marcaje blanco para vGluT2 (E, J, O). Cx: corteza; Ts: Triangular del septo; ac: comisura anterior; St: núcleo estriado; Hc: hipocampo; Fx: fórnix; Th: tálamo; Ht: hipotálamo; Cs: colículo superior; Fr: formación reticular; SNr: Sustancia Negra Reticulada.

A continuación, describimos el nivel medio de los cortes, en el cual observamos, entre otras estructuras, el tálamo, hipotálamo, hipocampo y fórnix. Del mismo modo que en el corte rostral, el primero de ellos muestra los diferentes marcajes juntos, los que detallaremos a continuación y el DAPI, que tiñe los somas neuronales (Fig 3F).

Respecto a la distribución de las neuronas Eomes positivas en este corte coronal, observamos los somas en verde (Fig 3G), con mayor presencia de estos en la corteza (Cx) y en el hipocampo (Hc), con un marcaje pronunciado en el giro hipocampal. Si nos centramos en los axones de estas células (Fig 3H), se pueden apreciar fibras córtico-fugales, pudiendo observar el fórnix y sus proyecciones desde el hipocampo.

Respecto a la clasificación de las neuronas en GABAérgicas y glutamatérgicas, vemos el marcaje de Gad1 en el hipotálamo (Fig 3I), así como debemos destacar la ausencia de neuronas GABAérgicas en el tálamo, predominantemente glutamatérgico. También en este corte podemos apreciar las interneuronas GABAérgicas de la región pretalámica. En el corte con marcaje de vGlut2, observamos el giro hipocampal (Hc) y la corteza con marcaje principalmente glutamatérgico (Fig 3J).

Por último, procedemos a describir el nivel más caudal. Del mismo modo que los dos niveles anteriores, primeramente, vemos el corte con todos los marcajes empleados (Fig 3K), donde observamos el mesencéfalo.

Centrándonos en la distribución de las neuronas Eomes positivas, observamos poblaciones positivas de forma marcada en la formación reticular (Fr) en marcaje verde (Fig 3L), sin tractos definidos identificables en la zona del mesencéfalo. (Fig 3M).

En este caso, el mesencéfalo muestra positividad para neuronas GABAérgicas en la sustancia negra reticulada (SNr), superficial a la compacta, relacionada con los circuitos de los ganglios de la base. También apreciamos positividad gabaérgica en la formación reticular, así

como en la capa del colículo superior (Fig 3N). Respecto a las neuronas glutamatérgicas (Fig 3O), apreciamos positividad en el núcleo rojo.

A continuación, analizaremos los cortes de los ratones *Eomes^{CreT/flox}*, que expresan Eomes en distintos momentos del desarrollo embrionario. En las figuras 2, 3 y 4 encontramos cortes de cerebro de ratón de vibratomo, todos coronales. Seleccionados tres niveles, rostral, medio y caudal. En primer lugar, observamos los cortes con Eomes (verde), Gad1 (rojo) y DAPI en azul al mismo tiempo. En verde, observamos los somas de las neuronas que expresan Eomes (*EomesGFPn*) y la tinción de neuronas GABAérgicas en rojo (*Gad1*).

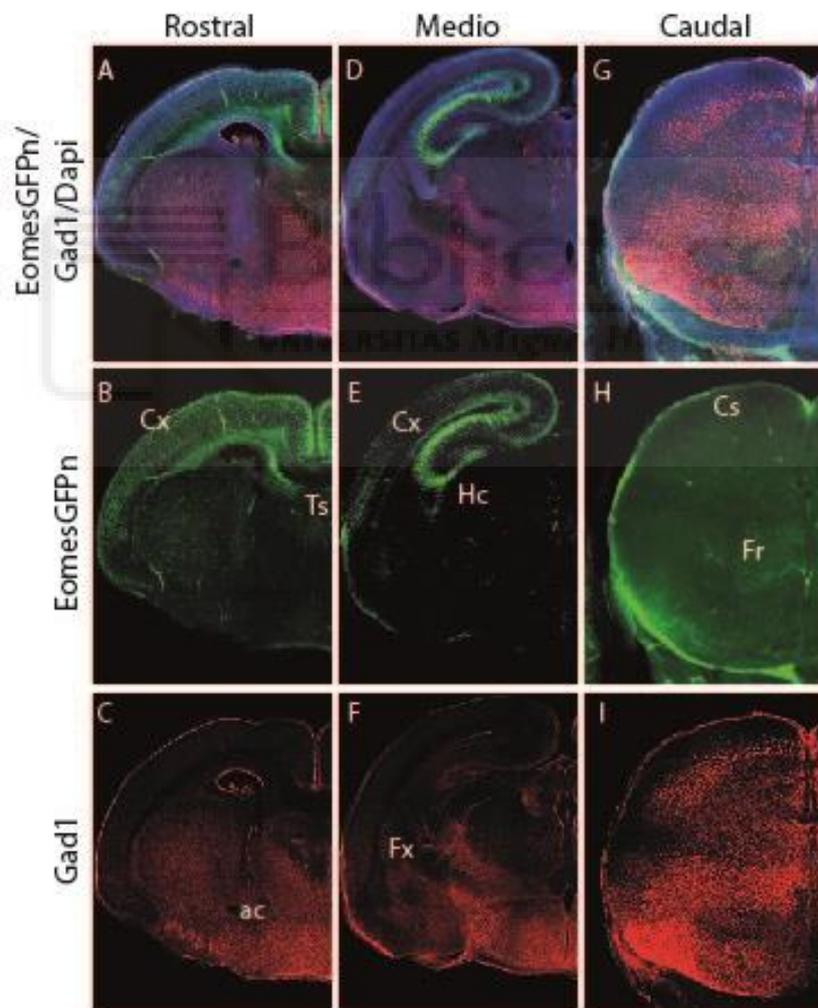


Figura 4: Cortes coronales rostrales, medios y caudales de un cerebro de ratón *Eomes^{CreT/flox}* inyectados en estadio 12.5 y extraídos en estadio 18.5, con marcaje verde para GFPn, azul para DAPI y rojo para Gad1. Cx: corteza; Ts: Triangular del septo; ac: comisura anterior; Hc: hipocampo; Fx: fórnix; Cs: colículo superior; Fr: formación reticular.

Seguidamente, analizaremos los cortes rostrales.

Comenzamos comparando la expresión de Eomes dependiendo del momento en el que han sido inyectados los embriones con Cre. En primer lugar, vemos los embriones inyectados en estadio 12.5 (Fig 4).

En los ratones inyectados en estadio 12.5, a nivel rostral (Fig 4A) observamos importante marcaje de estas neuronas en la corteza (Cx), pudiendo observar sus somas en todas las capas de esta en color verde (Fig 4B) También observamos población Eomes positiva en el triangular del septo (Ts). A nivel medio (Fig 4D), podemos encontrar una positividad más evidente para Eomes en el giro hipocampal (Fig 4E), además del ya comentado marcaje de los somas en la corteza (Cx). Por último, en un nivel más caudal (Fig 4G), no encontramos en este estadio positividad para neuronas Eomes en el mesencéfalo (Fig 4H).

Seguidamente, analizaremos los embriones inyectados en estadio 14.5 (Fig 5). A nivel rostral (Fig 5A), podemos apreciar en este caso una positividad ligeramente menor en la corteza (Cx) para Eomes en comparación con el E12.5 (Fig 5B). También se puede observar el marcaje de estas neuronas en el triangular del septo (Ts). A nivel medio (Fig 5D), observamos la máxima intensidad de Eomes en el hipocampo (Hc), además de la expresión de estas neuronas en la corteza (Fig 5E). Por último, a nivel caudal (Fig 5G) continuamos sin poder apreciar positividad para neuronas Eomes en el mesencéfalo (Fig 5H).

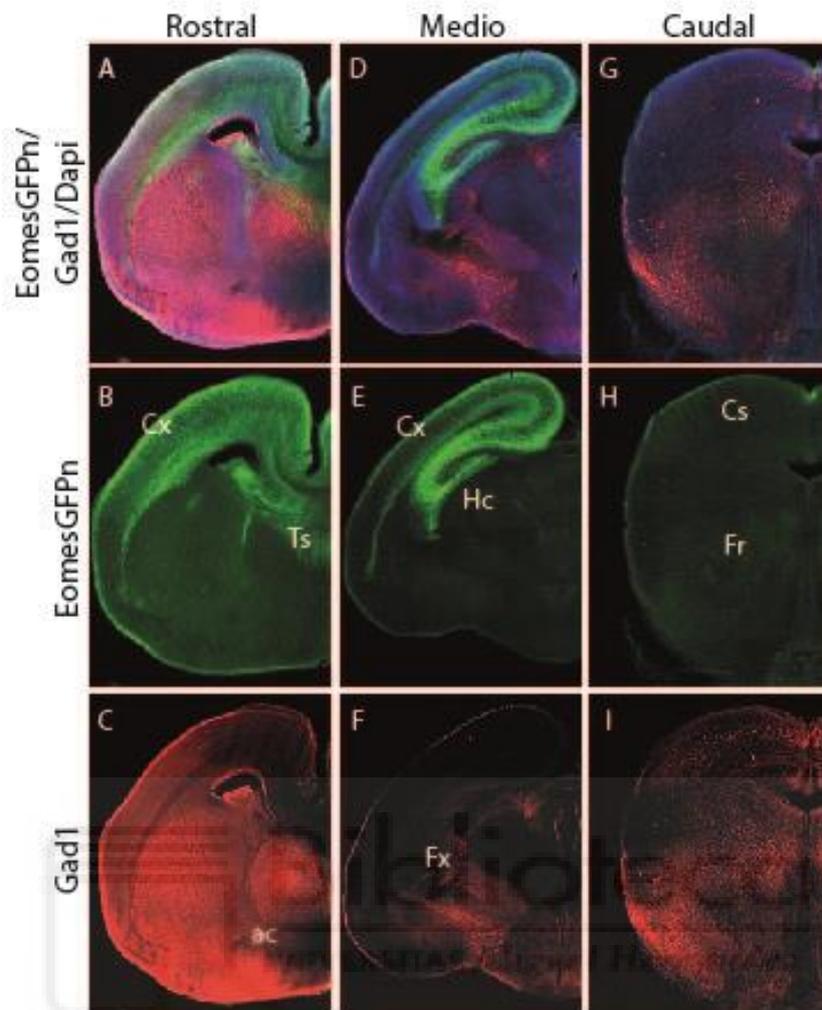


Figura 5: Cortes coronales rostrales, medios y caudales de un cerebro de ratón *Eomes^{CreT/flox}* inyectados en estadio 14.5 y extraídos en estadio 18.5, con marcaje verde para GFPn, azul para DAPI y rojo para Gad1. Cx: corteza; Ts: Triangular del septo; ac: comisura anterior; Hc: hipocampo; Fx: fórnix; Cs: colículo superior; Fr: formación reticular.

Por último, nos centraremos en los cortes de ratones inyectados en la semana 16.5 (Fig 6). A nivel rostral (Fig 6A) podemos ver la importante disminución en comparación con estadios anteriores de las poblaciones de Eomes en la corteza (Cx), de forma que apenas se pueden apreciar somas en la misma (Fig 6B). El triangular del septo (Ts) mantiene positividad para Tbr2. A nivel medial (Fig 6D) se puede observar del mismo modo como hay un marcaje menos intenso para Eomes en la corteza (Cx) y en el hipocampo (Hc), con positividad menos intensa en el giro hipocampal (Fig 6E) en comparación con E14.5. Por último, en el nivel más caudal (Fig 6G) es donde se observa mayor positividad para Eomes en la formación reticular (Fr), siendo una población más tardía que las anteriores (Fig 6H).

Respecto a las neuronas GABAérgicas, podemos confirmar su distribución cortical, que corresponde principalmente a la población de interneuronas en la corteza cerebral del ratón (Fig 6C, Fig 6C, Fig 6C).

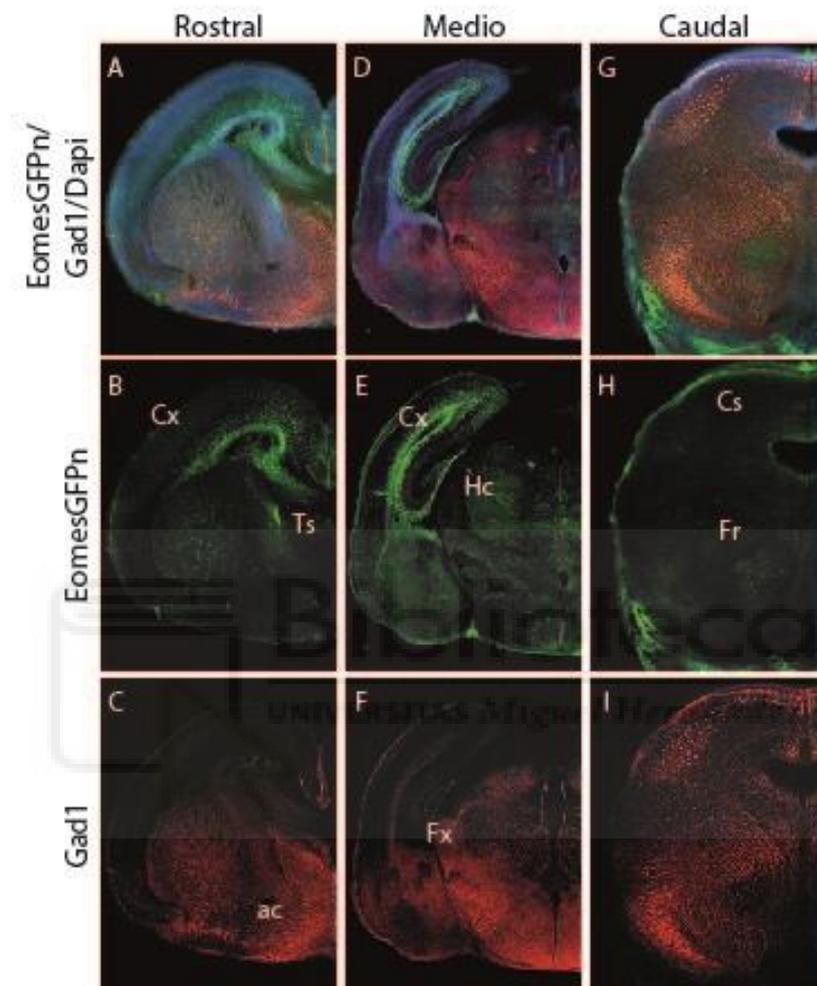


Figura 6: Cortes coronales rostrales, medios y caudales de un cerebro de ratón *EomeCreT/lox* inyectados en estadio 16.5 y extraídos en estadio 18.5, con marcaje verde para GFPn, azul para DAPI y rojo para Gad1. Cx: corteza; Ts: Triangular del septo; ac: comisura anterior; Hc: hipocampo; Fx: fórnix; Cs: colículo superior; Fr: formación reticular.

7. DISCUSIÓN

I. NATURALEZA DE NEURONAS EOMES POSITIVAS SEGÚN NEUROTRANSMISOR

De forma general, las neuronas se desplazan hasta su ubicación final en el córtex mediante dos tipos de migración: la radial (perpendicular a la superficie ventricular) y la tangencial (las

neuronas se desplazan en trayectorias paralelas a la superficie ventricular). En general, las neuronas corticales glutamatérgicas se generan en la zona ventricular y alcanzan su posición final a través de la migración radial, mientras que las interneuronas corticales, GABAérgicas, llegan al córtex mediante migración tangencial. Aunque se creía que solo las interneuronas corticales GABAérgicas migraban tangencialmente desde las eminencias ganglionares subpiales, ahora se sabe que algunas poblaciones de neuronas glutamatérgicas, entre las que podemos encontrar las células Cajal-Retzius, las neuronas de la subplaca y las neuronas transitorias de la placa cortical también migran tangencialmente. El núcleo premamilar ventral en el hipotálamo sería un ejemplo de estructura con población heterogénea, encontrando una variedad de tipos celulares glutamatérgicos y diferentes proyecciones en el adulto.^{7,8}

Esto se relaciona con los resultados obtenidos en este estudio, de forma que podemos encontrar migraciones tangenciales de derivados de Eomes que incluyen neuronas tanto excitatorias como inhibitorias. En la corteza, encontramos neuronas Eomes positivas que son evidentemente glutamatérgicas, así como podemos ver marcaje de neuronas GABAérgicas, constituyendo las interneuronas corticales.

La PThE en pollo expresa marcadores génicos consistentes con la generación local de neuronas glutamatérgicas. Además, los núcleos septales medial y lateral son ricos en neuronas GABAérgicas, mientras que el núcleo triangular del septo (Ts) está enriquecido con neuronas glutamatérgicas. Esto queda evidenciado en nuestro estudio en las diferentes imágenes, observando las poblaciones glutamatérgicas en el Ts (Fig 3E), siendo estas derivados de Eomes.³

Por otro lado, a nivel medio, el desarrollo del giro dentado implica a Eomes, tanto en las células Cajal-Retzius derivadas del hemisferio cortical, que guían la migración de progenitores y neuronas hacia el giro hipocampal, como en los progenitores intermedios que dan lugar a las neuronas granulares. En ausencia de Tbr2, la formación de la fisura hipocampal es anormal. Es por esto por lo que esperamos encontrar positividad para Eomes en el giro hipocampal, lo que

confirmamos con la inmunofluorescencia (Fig 3G, 3H). Además, estas células granulares son las neuronas excitadoras de glutamato dominantes en el giro dentado, cuyas propiedades de membrana se alteran con el tratamiento crónico con el antidepresivo fluoxetina, estando relacionadas con la depresión inducida por la inflamación. La positividad para glutamato en nuestro estudio se corresponde con la literatura hasta el momento (Fig 3J).^{9,10}

En el nivel más caudal, la positividad para Eomes en la formación reticular mesencefálica la sugiere como derivada de la PThE. Las neuronas GABAérgicas de esta estructura se han relacionado con la inhibición de neuronas en el puente que generan el sueño paradójico, entre otras funciones. En nuestro estudio, observamos la positividad para Gad1 en esta estructura (Fig 3N).

Como respuesta al primer objetivo del estudio, se debe resaltar la heterogeneidad neuronal en cuanto a neurotransmisor empleado en las neuronas derivadas de Eomes.

II. EXPRESIÓN DE EOMES EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SNC DEL RATÓN

La población neuronal derivada de la PThE es, inicialmente, densa y masiva. A medida que se produce el desarrollo embriológico del SNC, podemos ver una aparente disminución y dispersión de estas neuronas, dando lugar dos posibilidades: la muerte celular o la migración tangencial de muchas neuronas derivadas de la PThE.³

Siguiendo la línea de distintos estudios que ya confirman estas migraciones tangenciales, describiendo estas en tres corrientes principales hacia el hipotálamo, subpalio y áreas septocomisurales, se planteó conocer el momento en el desarrollo en el que ocurren estas migraciones. Gracias al empleo de ratones transgénicos con Cre, se pudieron marcar de forma indeleble las poblaciones neuronales que expresaban Eomes en un momento determinado, de forma que se puede analizar, una vez finalizado el desarrollo embrionario del SNC del ratón, hacia dónde migran las poblaciones de Eomes en el cerebro más maduro.¹¹

En primer lugar, en el estadio 12.5, destaca la densidad de neuronas Eomes positivas en la corteza, mientras que si la inyección se realiza en estadios más tardíos (14.5 y 16.5), vamos viendo una progresiva desaparición de estas, lo que confirma la inactivación del gen a lo largo del desarrollo embriológico (Fig 4B, 5B, 6B).

Centrándonos en el nivel medio, destacamos el hipocampo. El marcaje más intenso cuando la inyección se realiza en el estadio 14.5 sugiere migraciones más tardías en el giro dentado que en la corteza. En el estadio 16.5 observamos cómo el marcaje es menos intenso (Fig 4G, 5G, 6G).

Por último, cuando la actividad de la endonucleasa tiene lugar en estadios más tardíos (16.5), lo más destacable es la población de la formación reticular, que se puede observar únicamente en este estadio de los tres estudiados. Esta población es probable que se genere en el mesencéfalo, no siendo derivada de la PThE, ya que no hay migraciones descritas desde la PThE hasta regiones tan caudales. (Fig 4H, 5H, 6H).

8. CONCLUSIONES

Por lo tanto, podemos concluir:

- Los derivados Eomes positivos, procedentes de la PThE, no muestran homogeneidad en cuanto a neurotransmisores, como ya ocurre en otras zonas cerebrales con migraciones neuronales tangenciales, de forma que podemos encontrar poblaciones tanto GABAérgicas como glutamatérgicas.
- La expresión del gen Eomes va desapareciendo durante el desarrollo embriológico del SNC en el ratón, siendo su expresión de distinta magnitud dependiendo de la zona del cerebro y del momento de la inyección de Cre.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Puellas-López L, Martínez-Pérez S, Martínez de la Torre M. Neuroanatomía. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2008.
2. Nieuwenhuys R, Voogd J, Huijzen CV, Puellas López L. El sistema nervioso central humano. 4a ed. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2009.
3. Alonso A, Trujillo CM, Puellas L. Longitudinal developmental analysis of prethalamic eminence derivatives in the chick by mapping of TBR1 in situ expression - brain structure and function [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2020 [cited 2024 Jan 20]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00429-019-02015-3>
4. Watanabe K, Irie K, Hanashima C, Takebayashi H, Sato N. Diencephalic progenitors contribute to the posterior septum through rostral migration along the hippocampal axonal pathway [Internet]. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2024 Jan 20]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-30020-9>
5. Giménez C, Zafra F, Aragón C. Pathophysiology of the glutamate and the glycine transporters: New therapeutic targets [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2018 [cited 2024 Jan 20]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30536363/>
6. Ochoa-de la Paz LD, Gullías-Cañizo R, D´Abril Ruíz-Leyja E, Sánchez-Castillo H, Parodí J. The role of GABA neurotransmitter in the Human Central Nervous System, physiology, and pathophysiology. Rev. Mex. Neurocienc [Internet]. 2021 Apr [cited 2024 Jan 20]; 22 (2): 67-76. . Available from: <https://doi.org/10.24875/rmn.20000050>.
7. Accogli A, Addour-Boudrahem N, Srour M. Chapter 4 - Neurogenesis, neuronal migration, and axon guidance. En: Gallagher A, Bulteau C, Cohen D, Michaud JL, editores. Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2020. p. 25-42. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444641502000046>
8. López-González L, Alonso A, García-Calero E, de Puellas E, Puellas L. Tangential intrahypothalamic migration of the mouse ventral premamillary nucleus and FGF8

- signaling [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2021 [cited 2024 Jan 20]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34095148/>
9. Hodge RD, García AJ, Elsen GE, Nelson BR, Mussar KE, Reiner SL, et al. TBR2 expression in Cajal-Retzius cells and intermediate neuronal progenitors is required for morphogenesis of the dentate gyrus [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2013 [cited 2024 Jan 20]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23447624/>
 10. Wang J, Yang Y, Liu J, Qiu J, Zhang D, Ou M, et al. Loss of sodium leak channel (NALCN) in the ventral dentate gyrus impairs neuronal activity of the glutamatergic neurons for inflammation-induced depression in male mice [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2023 [cited 2024 Jan 20]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36796706/>
 11. Alonso A, Trujillo CM, Puelles L. Quail-chick grafting experiments corroborate that TBR1-positive eminential prethalamic neurons migrate along three streams into hypothalamus, subpallium and Septocommissural areas [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2021 [cited 2024 Jan 20]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33544184/>



INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)

Elche, a 25/11/2023

Nombre del tutor/a	Eduardo De Puelles Martínez de la Torre
Nombre del alumno/a	Mariela Lorente Hernández
Tipo de actividad	Adherido a un proyecto autorizado
Título del 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)	ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE NEURONAS EOMES POSITIVAS A LAS POBLACIONES DEL SISTEMA LÍMBICO
Evaluación de riesgos laborales	No solicitado/No procede
Evaluación ética humanos	No solicitado/No procede
Código provisional	231115092802
Código de autorización COIR	TFG.GME.EDPMDLT.MLH.231115
Caducidad	2 años

Se considera que la presente actividad no supone riesgos laborales adicionales a los ya evaluados en el proyecto de investigación al que se adhiere. No obstante, es responsabilidad del tutor/a informar y/o formar al estudiante de los posibles riesgos laborales de la presente actividad.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: **ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE NEURONAS EOMES POSITIVAS A LAS POBLACIONES DEL SISTEMA LÍMBICO** ha sido realizada en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere ninguna evaluación adicional. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, **se autoriza** la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Jefe de la Oficina de Investigación Responsable
Vicerrectorado de Investigación y Transferencia

Información adicional:

- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización de este trabajo debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.

La información descriptiva básica del presente trabajo será incorporada al repositorio público de Trabajos fin de Grado y Trabajos Fin de Máster autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández. También se puede acceder a través de <https://oir.umh.es/solicitud-de-evaluacion/tfg-tfm/>

