

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO FIN DE MÁSTER EN TERAPIA OCUPACIONAL
EN NEUROLOGÍA



Estudio experimental sobre la influencia del factor de transcripción Pou4f1 sobre el desarrollo embrionario del complejo habenular

Autor: Vidal Fuentes, Verónica

Número de expediente: 124

Tutor: De Puelles Martínez De La Torre, Eduardo

Cotutora: Company Devesa, Verónica

Departamento de Anatomía y Embriología humana

Curso Académico 2017-2018

Convocatoria de Junio

ÍNDICE:

	Página:
Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
Hipótesis	11
Objetivo	11
Metodología	12
Resultados	18
Discusión	22
Conclusiones	24
Bibliografía	25



RESUMEN

Introducción: El factor de transcripción Pou4f1 es un gen de identidad neural, altamente expresado en el sistema nervioso periférico sensorial y en diversos núcleos del sistema nervioso central, en donde se incluye el complejo habenular. Puesto que el gen está presente en dicha estructura, se sospecha que la falta del factor afectaría al desarrollo embrionario de la habénula.

Hipótesis del trabajo: La falta del factor de transcripción Pou4f1 provoca alteraciones en el desarrollo embrionario del complejo habenular.

Objetivo: Estudiar el efecto de la falta de función del factor de transcripción Pou4f1 durante el desarrollo embrionario del complejo habenular.

Material y Métodos: Se ha realizado un estudio de diversas muestras embrionarias de la habénula de ratones mutantes, en estadios embrionarios de 12.5, 13.5 y 18.5 días, y han sido comparadas con sus respectivas muestras control. Este estudio se ha efectuado utilizando la técnica de inmunohistoquímica contra las proteínas GAD67 y β -GAL y la técnica de hibridación in situ en parafina con una sonda de ARN antimensajero específica para Pou4f1.

Resultados: En los estadios estudiados se observa una drástica disminución de las células habenulares mediales, viéndose afectada su determinación y diferenciación neuronal, se detecta un cambio morfológico general del complejo habenular, viéndose reducido el territorio de la habénula medial, lo que provoca una reorganización de la habénula lateral.

Conclusiones: Se confirma la hipótesis de que el factor de transcripción Pou4f1 es necesario para el correcto desarrollo y diferenciación de las neuronas del complejo habenular.

Palabras Clave: habénula, POU4F1, desarrollo embrionario.

ABSTRACT

Introduction: The transcription factor Pou4f1 is a gene of neural identity, highly expressed in the peripheral sensory nervous system and in several central nervous system areas, where the habenular complex is included. It is suspected that the lack of the factor could affect the habenula embryonic development because this gene is present in the structure.

Work hypothesis: The lack of the transcription factor Pou4f1 causes alterations in the embryonic development of the habenular complex.

Objective: To study the effect of the lack of function of the transcription factor Pou4f1 during the embryonic development of the habenular complex.

Material and Methods: A study of several embryonic samples of the habenula's mutant mice was carried out, in 12.5, 13.5 and 18.5 embryonic stages, and have been compared with their respective control samples. This study was carried out using the immunohistochemistry technique against the GAD67 and β -GAL proteins and the paraffin in situ hybridization technique with an anti-messenger RNA probe specific for Pou4f1.

Results: Studied stages showed a medial habenular cells dramatic decrease, being affected its determination and neuronal differentiation. A general morphological malformation of the habenular complex is detected, seeing the territory of the medial habenula reduced, which causes a reorganization of the lateral habenula.

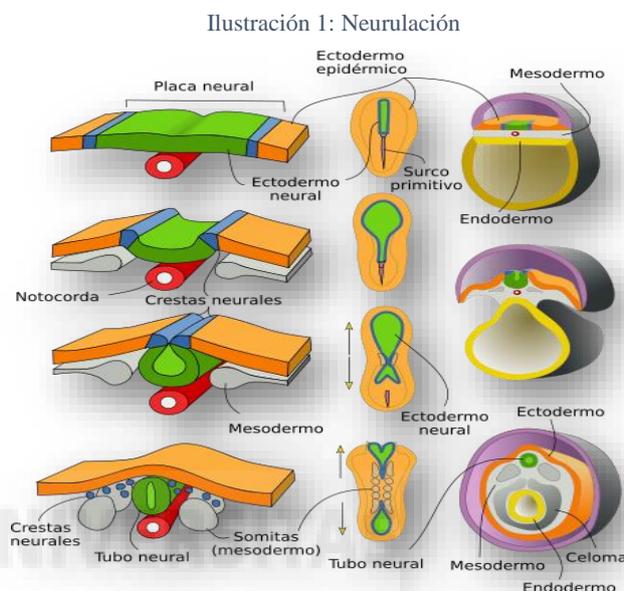
Conclusions: The hypothesis that the transcription factor PouF41 is necessary for the correct development and differentiation of the neurons of the habenular complex is confirmed.

Keywords: habenula, POU4F1, embryonic development.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario del sistema nervioso central, como un sistema separado, se inicia aproximadamente 18 días después de la fecundación en humanos, con la fase de gastrulación, en donde se establecerán las tres capas germinativas primitivas: ectodermo, mesodermo y endodermo, a partir de las cuales se diferenciarán los tejidos, órganos, sistemas y aparatos del organismo ^(1,2).

Durante la gastrulación, el ectodermo da lugar al tejido de la placa neural, por medio de un proceso llamado neurulación, caracterizado por la formación del tubo neural, que terminará formando la cresta neural y el sistema nervioso central, que posteriormente dará lugar al encéfalo y medula espinal (Ilustración 1).



Fuente: www.neurocirugiacontemporanea.com

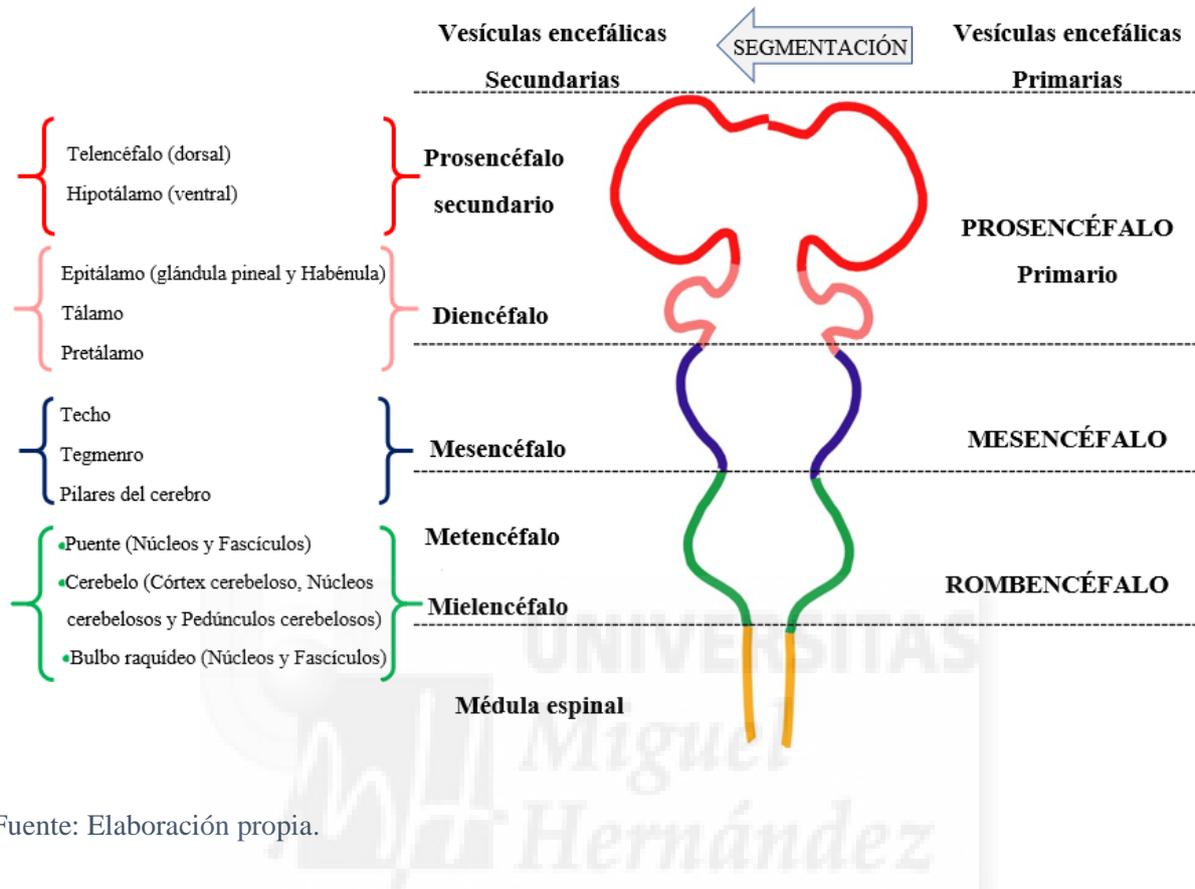
Tras la formación del tubo neural comienza el proceso de proliferación y diferenciación de los neuroblastos para dar lugar a las neuronas y células gliales, una vez finalizado el proceso, las neuronas migran desde la zona ventricular hasta los lugares en donde se asentarán definitivamente. ^(3,4)

Desde el punto de vista embriológico, este conjunto se desarrolla a partir de tres vesículas encefálicas primarias para:

- El cerebro posterior: dará lugar al rombencéfalo.
- El cerebro medio: dará lugar al mesencéfalo.
- El encéfalo anterior: dará lugar al prosencéfalo, éste a su vez está dividido en diencefalo y telencéfalo.

Del prosencéfalo se desarrollan el telencéfalo y el diencefalo, el mesencéfalo permanece como tal, mientras que del rombencéfalo se desarrollan el puente, el cerebelo y el bulbo raquídeo. El puente y el cerebelo también tienen una denominación común bajo el término metencéfalo (Ilustración 2). ^(5,6)

Ilustración 2: Vesículas encefálicas y estructuras que se desarrollan a partir de ellas



Fuente: Elaboración propia.

La estructura anatómica en donde se centrará el estudio es en el complejo habenular, situado en el epitálamo. Se caracteriza por ser una pequeña acumulación de sustancia gris medial a la parte caudal del tálamo dorsal, que se extiende desde la superficie pial hasta la superficie ventricular del epitálamo.

La estría medular, el tracto habenulointerpeduncular y el complejo habenular constituyen en conjunto un sistema diencefálico de conducción dorsal, a lo largo del cual los impulsos prosencefálicos son transmitidos hacia la porción rostral del tronco del encéfalo. ⁽³⁾

Algunos de los componentes anatómicos principales que forman parte del sistema límbico comprenden la circunvolución subcallosa, la circunvolución parahipocampal, la formación del hipocampo, la habénula, el núcleo amigdalino, los tubérculos mamilares y el núcleo talámico anterior entre otros. ^(7,8)

El sistema límbico está directamente vinculado con las emociones y la motivación para realizar una determinada acción, de igual modo, se relaciona con el comportamiento, el proceso de aprendizaje y la memoria, que implica un alto contenido afectivo. ⁽⁹⁾

El complejo habenular, es una pequeña estructura cerebral bilateral ubicada en el extremo dorsal del diencefalo y está compuesto por una porción medial (MHb) "límbica" y una lateral (LHb) "motora", gran parte de sus proyecciones se dirigen al tronco encefálico, destacando las proyecciones al striatum dopaminérgico, y recibe entradas del prosencéfalo límbico, constituyendo una diafonía entre el cerebro anterior límbico y algunas vías moduladoras ascendentes. ⁽¹⁰⁾

La habénula es considerada como un centro de emociones, que desempeña papeles críticos en la regulación de diversos tipos de comportamientos relacionados con las emociones, incluida la ansiedad, el miedo, el estrés y el comportamiento maternal, además de formar parte de la nocicepción, ritmos circadianos, y los mecanismos de aprendizaje y recompensa entre otras funciones.

Esta estructura supone una estación de relevo, en donde las entradas de estímulos relevantes para la emoción se transfieren a la habénula a través de los ganglios basales y el sistema límbico. Por otro lado, se proyecta a dos sistemas neuromoduladores principales, el sistema dopaminérgico y el sistema serotoninérgico, debido a estas interacciones, se ha sugerido que el LHb está involucrado en el desarrollo y la progresión de las enfermedades psiquiátricas y las adicciones a las drogas. ^(11,12)

Uno de los factores que se encuentran en el complejo habenular es el factor de dominio pou, en concreto el gen Pou4f1 (también conocido como Brn3a / Brn-3.0), es un gen de identidad neural, altamente expresado en el sistema nervioso periférico, neuronas sensoriales primarias de los ganglios de la raíz craneal y dorsal, y en neuronas específicas del sistema nervioso central (SNC) caudal. Este gen, tiene un patrón de expresión complejo altamente específico en donde se incluye entre otras estructuras la habénula medial y lateral. ^(13,14)

Justificación

La causa principal para realizar este estudio experimental es la relevancia de un adecuado desarrollo del complejo habenular que está involucrado en diferentes funciones del sistema límbico y su disfunción está asociada con depresión, esquizofrenia, psicosis inducida por drogas e incluso problemas cognitivos y motores.

A través de este estudio se pretende asegurar el papel clave que juega el factor de transcripción Pou4f1 en el desarrollo embrionario del complejo habenular, arrojando luz a la principal causa de los posibles déficits y lesiones derivados del deficitario funcionamiento de la habénula, provocado por un defecto en el desarrollo de esta, por ello, es primordial que mediante la investigación se concluya la trascendencia de dicho gen, para dar con las posibles repercusiones emocionales, cognitivas y motoras que puedan sufrir los afectados por la malformación del complejo habenular.

Las lesiones de la habénula pueden provocar respuestas motrices deficientes, además de precisar un mayor tiempo de reacción. Estos efectos pueden ser mediados indirectamente por la conexión de la LHb a las neuronas de dopamina en el SNC, de hecho, sin las neuronas de dopamina los humanos y la mayoría de los animales no pueden iniciar voluntariamente movimientos, como se puede apreciar en pacientes y en animales con la enfermedad de Parkinson. Varias líneas de evidencia indican que las neuronas LHb inhiben a las neuronas de dopamina: la estimulación eléctrica de la LHb inhibe la actividad de las neuronas de dopamina en el SNC y las lesiones de la habénula aumentan la liberación de dopamina en la corteza cerebral y el cuerpo estriado. ⁽¹⁵⁾ Esto sugiere que la hiperactividad motora inducida por las lesiones de la habénula en ratas, pueden deberse a la eliminación de la inhibición de las neuronas de dopamina.

Estudios recientes han revelado que las neuronas dopaminérgicas pueden recibir estas señales relacionadas con la recompensa del LHb, como por ejemplo un estudio funcional de MRI (fMRI), en el cual sujetos humanos realizaron una tarea de predicción de movimiento, mostró que la habénula (además del cíngulo anterior, la corteza e ínsula) se activó cuando un sujeto recibió comentarios que indicaban

que su respuesta en la tarea estaba mal. ⁽¹⁶⁾ Los resultados descritos anteriormente sugieren que el LHB contribuye para reforzar el aprendizaje a través de inhibidores de acción sobre las neuronas de dopamina.

En vista de lo expuesto anteriormente, se pone de manifiesto la necesidad de investigar sobre el factor de transcripción Pou4f1, indagando su repercusión en la formación y desarrollo del complejo habenular, de esta forma supondría un punto de partida para próximas investigaciones sobre las posibles limitaciones en los circuitos e informaciones que dependen de esta estructura en personas que sufren limitaciones congénitas de la habénula, que podrían ser el origen principal de enfermedades como el Parkinson, la depresión y la predisposición al consumo de sustancias adictivas que inciden directamente en los centros de recompensa.



HIPÓTESIS

La falta del factor de transcripción Pou4f1 provoca alteración en el desarrollo embrionario del complejo habenular.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la falta de función del factor de transcripción Pou4f1 durante el desarrollo embrionario del complejo habenular.



METODOLOGÍA

El presente estudio se ha llevado a cabo durante el periodo de tiempo comprendido entre el 18 de octubre de 2017 y el 21 de mayo de 2018 en el laboratorio 138 del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández. Se ha realizado un estudio observacional descriptivo, consistente en el análisis neuroanatómico de una serie de muestras pertenecientes al prosencéfalo primario de embriones de ratón. El estudio se basó en realizar una comparativa entre las muestras representativas de ratones utilizados como control y ratones mutantes, en donde no se expresa el factor de transcripción Brn3a/Pou4f1, para comprobar las posibles implicaciones de dicho gen en el desarrollo del complejo habenular.

Se escogieron estadios embrionarios de 12.5 y 13.5 días, tiempo en donde se produce la formación del complejo habenular, y de 18.5 días, momento previo al nacimiento, en donde la estructura de la habénula ya está completamente formada.

Los ratones utilizados fueron heterocigotos y homocigotos, el primero utilizado como control, ya que uno de sus alelos porta la proteína β -GAL (beta galactosidasa) y el otro alelo es normal (el común para toda la población) y el segundo ratón lleva dos alelos nulos para el gen de Brn3a/Pou4f1. ⁽¹³⁾

Origen de las muestras

Los animales fueron obtenidos del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche, en concreto del animalario de la Unidad de Sant Joan de dicho servicio. Este animalario sigue el control ISO 9001/2008 y mantiene una excelente calidad en sus instalaciones y mantenimiento de las líneas animales. La manipulación de los ratones fue llevada a cabo por personal acreditado. El estudio se ha efectuado siguiendo estrictamente la normativa que rige la experimentación con animales y el uso de organismos modificados genéticamente (Real Decreto 53/2013, Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea). Esta experimentación recibió el visto bueno del Órgano evaluador de proyectos de la Universidad Miguel Hernández de Elche y la aprobación de la Generalitat Valenciana.

Criterios de selección

Como único criterio de selección de los embriones se ha tenido en cuenta ser de la línea genética correspondiente (ratón mutante con dos alelos nulos para Brn3a/Pou4f1 y ratón heterocigoto como control con un alelo para la proteína β -GAL y otro alelo normal) y estar en el estadio de desarrollo embrionario necesario (E12.5, E13.5 y E18.5).

El protocolo que se siguió para la realización de las muestras fue el siguiente: primero, se realizó el procesamiento de las muestras, a continuación, se inició un proceso de inmunohistoquímica y tras éste, se llevó a cabo un proceso in situ de hibridación en parafina, a continuación, se muestran detalladamente los procesos de preparación de las muestras y el desarrollo de las técnicas empleadas.

Procesado de muestras

Con el objetivo de obtener las muestras se utilizaron hembras preñadas en los días 12.5, 13.5 y 18.5 a las que se sacrificó por dislocación cervical. A continuación, se procedió a aislar los embriones del útero con la ayuda de una lupa estereoscópica (modelo LEICA® EZ4D). Seguidamente fueron limpiados en una solución salina de PBS (Phosphate Buffered Saline) e inmediatamente se procedió a su fijación en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS donde permanecieron a 4°C durante 24 horas. Tras la fijación, las muestras se lavaron en PBS (se realizaron 2 cambios de 40 minutos) y a continuación fueron deshidratadas progresivamente en etanol 25%, 50%, 70% y 100% (1 cambio de 40 minutos en cada alcohol excepto en el de 100% que se realizaron 2) y almacenados hasta su posterior selección y uso. Con el objetivo de incluirlas en parafina, las muestras fueron lavadas en etanol 100% durante 10 minutos. Después se aplicó la técnica de inclusión en parafina en donde fueron incubados en butanol 2 horas para retirar toda traza de etanol (no miscible con la parafina). A continuación, las muestras fueron incubadas en parafina líquida a 58°C, donde se realizaron 4 o 5 cambios de parafina con el fin de eliminar totalmente los restos de butanol.

Una vez incluida la muestra, se depositó en un molde de plástico con forma de cubo donde se dejó solidificar la parafina a temperatura ambiente. Tras solidificar la parafina, se extrajo el bloque del molde y se procedió a su sección, realizándose los cortes con un microtomo (Microm HM 335 E®).

El grosor de cada sección se fijó en 7µm. Posteriormente se procedió a la realización de distintas técnicas (inmunohistoquímica e hibridación in situ en parafina) para comenzar el estudio de las muestras, cabe destacar que con cada una de las muestras se repitió el proceso completo un total de 3 veces, ya que en histología si tres muestras coinciden en el mismo resultado, se considera que los datos obtenidos son representativos.

Técnica de Inmunohistoquímica

Esta técnica permite detectar una variedad de antígenos presentes en las células (en este caso neuronas). Se basa en aplicar un anticuerpo primario al tejido que reconozca la proteína de interés, para después añadir un anticuerpo secundario conjugado con biotina que reconozca el anticuerpo primario, amplificando así la señal y posibilitando el revelado posterior. En este caso las proteínas a estudiar fueron GAD67 (decarboxilasa de glutamato 1; marcador de neuronas gabaérgicas, proporcionado por Chemicon, referencia MAB5406, disolución 1:500) y β-GAL (beta galactosidasa; marcador del alelo mutante de Brn3a/Pou4f1, proporcionado por ABCAM, referencia ab16997, disolución 1:500). Los cortes de parafina fueron desparafinados en xilol durante una noche. Al día siguiente los cortes fueron rehidratados en una serie decreciente de alcoholes al 100%, 96%, 70% hasta agua. Cada paso fue de 10 minutos. Posteriormente se procedió a una técnica de re-exposición de los epítomos. La técnica consiste en la aplicación de calor por hervido en un tampón de citrato sódico a 0,01M en agua. Después del tratamiento, los cortes fueron lavados en PBS con Tritón-X-100 (PBST) al 0,1% para eliminar los restos de citrato sódico y comenzar a permeabilizar la muestra.

A continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena del tejido con H₂O₂ durante 30 minutos a temperatura ambiente en un coplin protegido de la luz. Y para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se utilizó lisina al 10% en PBST.

El anticuerpo primario se incubó a la concentración indicada en albúmina de suero bovino (BSA) al 1% con azida al 0,1% en PBST. Se dejó actuar durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se recuperó el anticuerpo primario y se lavaron los portaobjetos varias veces en PBST. Se usó el anticuerpo secundario biotinilado a 1:200 de concentración en PBST durante una hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados en PBST se añadió el complejo AB (Avidin Biotin Complex) de Vector Laboratories(R) a la concentración de 1:300 en PBST. Este complejo contiene avidina y la peroxidasa del rábano biotinilada. La avidina tiene una gran afinidad por la biotina y forma un complejo donde se unen la peroxidasa biotinilada a la avidina dejando al menos un sitio de unión libre para la biotina del anticuerpo secundario. Al añadirlo a los portaobjetos, la avidina se une al secundario biotinilado y ancla la peroxidasa al lugar de expresión de la proteína. Para el revelado se usó como sustrato de la peroxidasa 1 ml de diaminobenzidina (DAB) con H₂O₂ al 0,6% por cada 100ml de PBS. La reacción enzimática provoca la insolubilidad del DAB y que se produzca un precipitado de color marrón. La reacción se paró con PBS y se deshidrataron los portaobjetos en una serie creciente de etanoles hasta llevarlos a 100% etanol, desde donde se pasaron a xilol, para luego montarlos con Eukitt(R) (cubreobjetos) y dejarlos secar varios días en una estufa a 37°C.

Técnica de Hibridación in Situ en parafina

Con el fin de comprobar que en los embriones mutantes para Pou4f1 no se producía ARN mensajero para dicho gen, procedimos a realizar hibridación in situ con una sonda de ARN antimensajero marcada con uracilos con digoxigenina específica para Pou4f1. Esta molécula de ARN se une específicamente con el ARN mensajero y nos permite comprobar su presencia en el tejido.

- Primer día del proceso

En primer lugar, se desparafinó las muestras para posteriormente pasar las muestras a un coplin, en donde se realizaron dos lavados de PBS, con una duración de 5 minutos cada uno y sucesivamente, se realizaron dos lavados de PBT con una duración de 5 minutos cada uno.

Inmediatamente, comenzó el proceso de digestión con pK 4 mg/ml en PBS, en donde las muestras permanecieron durante 7 minutos en el interior del coplin con la disolución con pK a 37°C en una estufa. Acto seguido, se procedió a postfijar en PFA al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. El último paso de la digestión consistió en realizar tres lavados de PBT, con una duración de 5 minutos cada lavado.

Sucesivamente se inició la prehibridación, para ello, se preparó la cámara de hibridación y se utilizó papel de filtro y una solución compuesta por: 50 ml de Formamida, 5 ml de SCC y 45ml de H₂Odd,

También se realizó el Buffer de hibridación compuesto por: 2,5 ml de Salt al 10%, Formamida desionizada 12,5 ml, tRNA 10 mg/ml 500ml, Agua sigma 2 ml y Dextran Sulfato al 50% 5 ml, y se depositó 500 ml de Buffer de hibridación en cada porta, dejándolos reposar dos horas a temperatura ambiente.

Después se preparó la solución de sonda y se incubaron los portaobjetos durante toda la noche a 65°C en cámara de hibridación.

- Segundo día del proceso

Se efectuó el lavado de las muestras con una solución de lavado compuesta por: 75ml de Formamida al 50%, 7,5 ml de SCC, 150ml de Tween al 0,1% y 67,5 ml de H₂Odd, y se introdujeron a 65°C en una estufa durante 30 min.

A continuación, se trataron con 100 ml del compuesto MABT al 5%, 0,5ml de Tween y 400 ml de H₂Odd a cada muestra y se dejó actuar durante 30 minutos, este proceso se realizó 2 veces.

Después se aplicó el bloqueo, una solución compuesta por BBR (agente bloqueante) al 2%, Suero bovino al 20% y MABT, se echó 500µl por porta de esta solución aplicado de forma horizontal y se dejó actuar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo contra la digoxigenina durante toda la noche.

○ Tercer día del proceso

Se realizó 4 lavados de 30 minutos cada uno a temperatura ambiente con el compuesto MABT 1x. A continuación, se realizó el revelado con NTMT (NaCl 100mm, Tris HCl pH 9,5 100Mm, MgCl₂ 50 Mm y Tween al 0,1%) durante 30 minutos y, por último, se incubó con NBT Y BCIP (sustratos de la fosfatasa alcalina) en NTMT. La reacción se paró con varios lavados en PBT 1X. Como último paso el tejido se cubrió con un cubreobjetos con Eukitt.

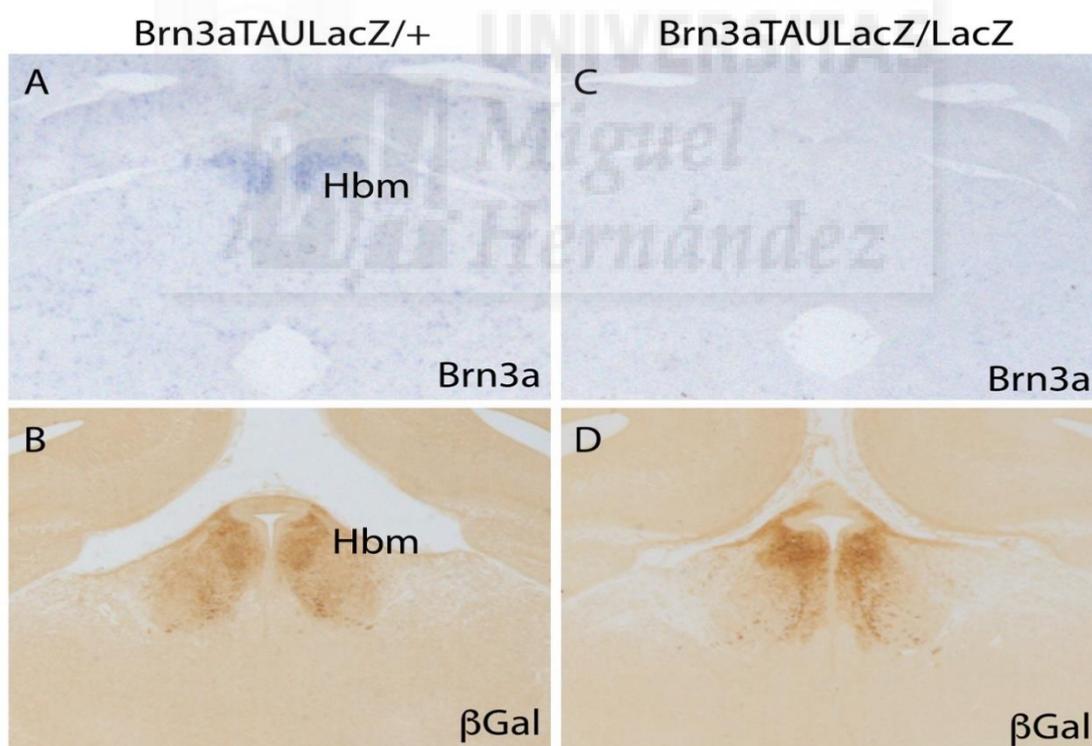
Para visualizar las muestras se utilizó el microscopio estereoscópico modelo LEICA(R) MZ 16FA (motorizado) y una cámara digital LEICA(R) DFC550. Se trataron las imágenes con Adobe Photoshop CS6 y se montaron las figuras con Adobe Illustrator CS6.



RESULTADOS

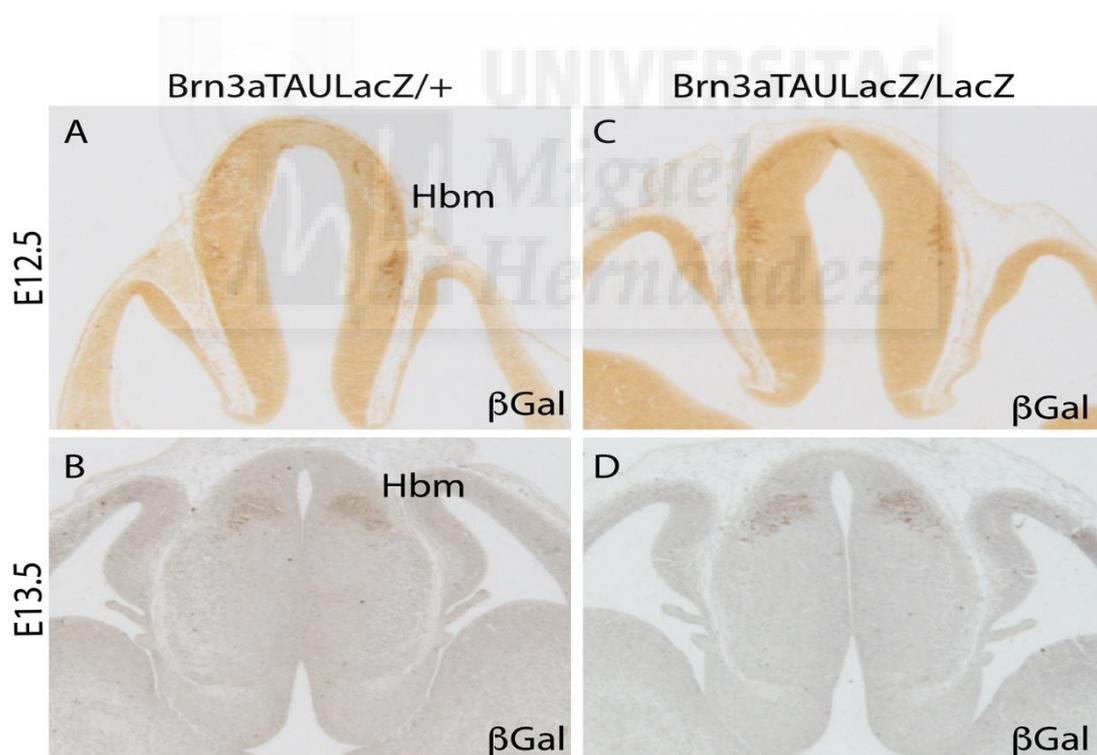
Realizamos una hibridación in situ usando ratones heterocigotos, como control, y homocigotos. En el ratón heterocigoto, observamos que el ARN mensajero se generaba con normalidad ya que estos embriones contienen un alelo para β -Gal marcador del alelo mutante de *Brn3a/Pou4f1* y un alelo común. (Fig. 1A). En un corte paralelo realizamos una inmunohistoquímica contra la proteína β -Gal. Al contener un alelo mutante pudimos observar la presencia de la proteína y como esta coincidía plenamente con la localización del ARN mensajero (Fig. 1B). En el ratón homocigoto, no fuimos capaces de detectar ninguna traza del ARN mensajero (Fig. 1C). Al comprobar la distribución de la proteína β -gal pudimos ver como se distribuye por el mismo territorio con algunas diferencias (Fig. 1D).

Figura 1: Corte coronal del complejo habenular en estadio 18.5



Por otro lado, nos planteamos comprobar el desarrollo temprano de la habénula, comparando el embrión control con el mutante. Pudimos observar que comienza a partir del estadio embrionario de E12.5. Mediante inmunohistoquímica contra la proteína β -Gal, apreciamos una pequeña distribución de células positivas para Brn3a, lo que sugiere que la génesis del complejo habenular comienza en este estadio embrionario. (Fig. 2A). Si comparamos el resultado con el embrión mutante, se parecía una distribución similar sin que pudiéramos detectar ninguna malformación aparente (Fig. 2C). Si avanzamos un día en el desarrollo embrionario, vimos como las células habenulares se disponen de forma ordenada en el área en donde en un futuro, se localizará tanto la habénula lateral como la medial. (Fig. 2B). En el ratón homocigoto, al examinar la disposición de las células se advierte que se encuentran en la misma área, aunque presentan sutiles diferencias en cuanto al agrupamiento de las células para Brn3a (Fig. 2D).

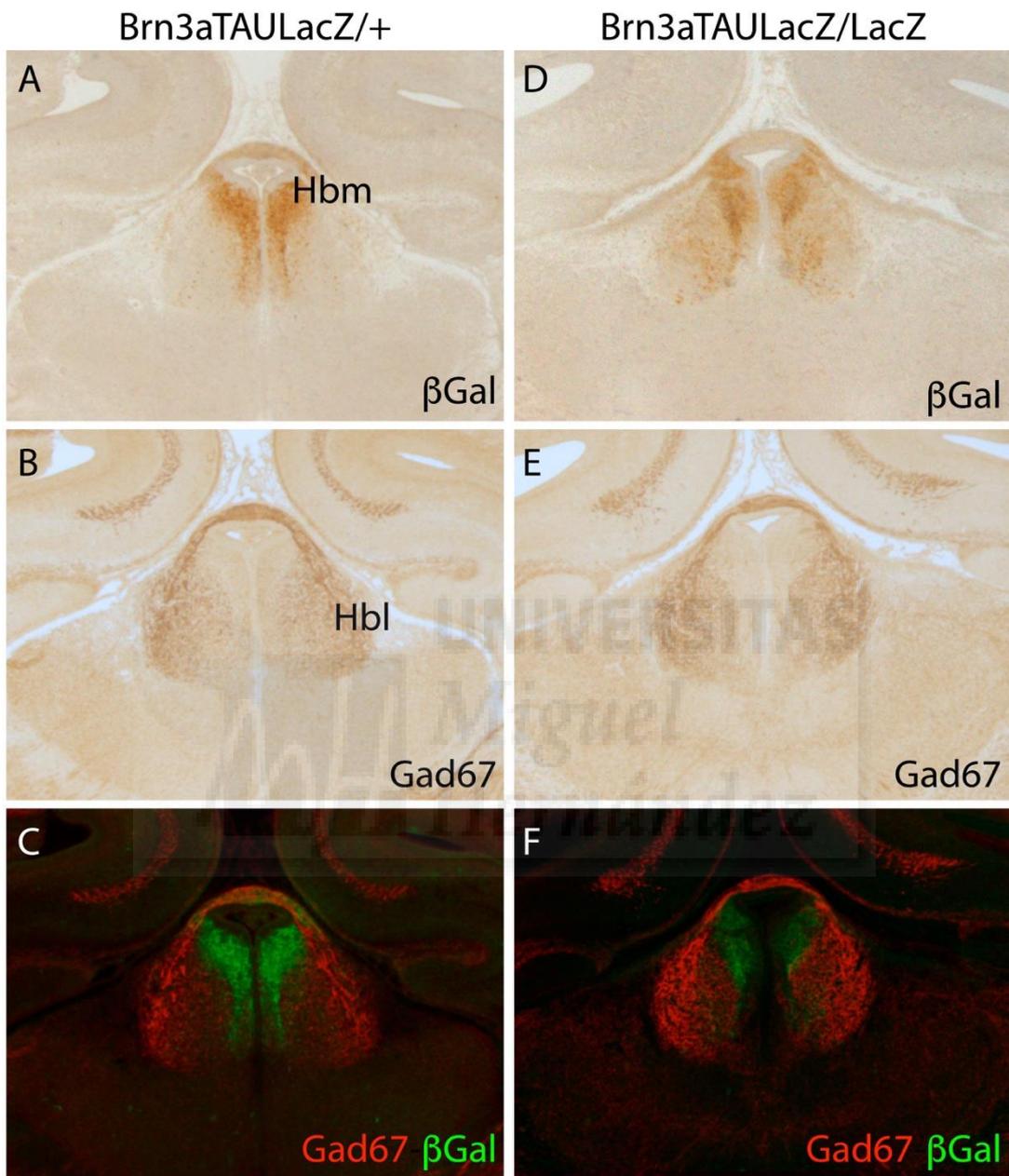
Figura 2: Cortes coronales de la formación de la habénula en estadios E12.5 y E13.5



A continuación, procedemos a analizar la morfología de la habénula, se realizó la técnica de inmunohistoquímica en donde se utilizaron dos marcadores, la proteína β -GAL que identifica la habénula medial y Gad67 que identifica la habénula lateral. En este caso la proteína a estudiar fue β -GAL, marcador del alelo mutante de Brn3a/Pou4f1, en el ratón heterocigoto se observa que la morfología es la adecuada, ya que las células se disponen cerca de la línea media y están pegadas al ventrículo. (Fig. 3A). Se aprecia una adecuada disposición de las células de la habénula lateral mediante la proteína GAD67. (Fig. 3B).

Se realizó un fotomontaje de las figuras 3A y 3B, en donde se aplicó coloraciones para diferenciar claramente la habénula lateral (rojo) de la habénula medial (verde), mediante la fusión de ambas imágenes se observa una correcta disposición de las células que forman el complejo habenular. (Fig. 3C). Para el ratón homocigoto, se aprecia mediante la proteína β -GAL la disposición anómala de las células que formarían la habénula medial, viéndose reducido su territorio. (Fig. 3D). Se aprecia, mediante la proteína Gad67, que para el ratón homocigoto el territorio de la habénula lateral se ha prolongado considerablemente. (Fig. 3E). En el fotomontaje se aprecia explícitamente que al fusionar las figuras 3D y 3E, el territorio de la habénula medial se ha visto disminuido considerablemente y en contra posición el territorio de la habénula lateral se ha visto aumentado, abarcando gran parte del área que pertenecía originariamente a la habénula medial. (Fig. 3F).

Figura 3: Fotomontaje del complejo habenular



DISCUSIÓN

En primer lugar, al no detectar ninguna traza del ARN mensajero en el ratón homocigoto nos indica que el ratón es nulo para la función del gen, si no hay mensajero no hay proteína.

Por otro lado, se ha podido demostrar que la presencia de la proteína β -GAL nos indica que las neuronas que expresan el gen Pou4f1 no mueren por la ausencia de la misma, aunque la distribución algo anómala nos indica que se ha producido alguna alteración en la estructura del complejo habenular, con las consiguientes consecuencias que supondrá esto en el posterior desarrollo del embrión.

Asimismo, se puede confirmar que el nacimiento del complejo habenular se inicia en el estadio embrionario de E12.5 días. Esto permite deducir la importancia del papel del factor de transcripción Brn3a, para que se produzca una correcta determinación y diferenciación de las neuronas que formarán la habénula.

De manera análoga, se aprecia que la falta del gen Brn3a/Pou4f1 provoca una disposición anómala de las células que formarían la habénula medial, viéndose una reducción considerable de su territorio, lo que provoca una reorganización de la habénula lateral, invadiendo gran parte del área perteneciente a la habénula medial. Este hecho, nos reafirma que la falta de Brn3a provoca fallos en la determinación y diferencia de las células habenulares mediales, lo que conlleva una repercusión directa en las funciones en donde participa el complejo habenular.

Sin embargo, la ausencia del factor de transcripción para Brn3a no afecta a la diferenciación de las células habenulares laterales, por lo que se confirma que la falta de este factor solo afecta a las células habenulares mediales, aunque cabe destacar que, para próximas líneas de investigación, se debería crear un ratón homocigoto que tuviese inhibido el factor de transcripción POU4F1, únicamente en el complejo habenular, ya que este factor se expresa en otras áreas.

Con respecto a la clara disminución de la distribución de células habenulares mediales puede haber dos posibles alternativas: por un lado, que se produzca una menor diferenciación de las poblaciones neuronales que dependen de Brn3a, o que la falta de este factor de transcripción provoque la apoptosis

de las células habenulares laterales, a consecuencia de ello, las células habenulares laterales se reorganizarían cubriendo el espacio de la habénula medial.

Viendo los resultados obtenidos me llevan a plantearme que el fallo se ha producido en la tasa de proliferación, ya que en los estadios embrionarios iniciales el desarrollo es adecuado y a medida que avanza el desarrollo se aprecian cambios morfológicos.

Este modelo de ratón puede ser muy interesante para estudiar alteraciones del sistema límbico, ya que la alteración morfológica que muestra es sutil y seguramente es similar a la que puedan aparecer en pacientes con trastornos en este sistema. Es una buena herramienta para trabajos futuros en donde implique problemas conductuales, de aprendizaje y obtención de recompensas entre otros.



CONCLUSIONES

El objetivo de estudio se ha logrado, queda confirmada la hipótesis de que el factor de transcripción Pou4f1 es necesario para el correcto desarrollo y diferenciación de las neuronas de la habénula medial.

Sin embargo, no se ha podido esclarecer el mecanismo exacto que provoca la malformación del complejo habenular ya que podría estar relacionado con la disminución en la diferenciación de las neuronas habenulares mediales o causar directamente la apoptosis de estas células.



BIBLIOGRAFÍA

1. Carlson BM. Gametogenesis. En: Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access. Elsevier Health Sciences; 2012. p. 3-15.
2. Romeo Casabona CM. Legislación. En: Romeo Casabona CM. Genética humana. Buenos aires, Argentina. Editorial Astrea;1995. p. 21-41.
3. Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. Sections Perpendicular to the Axis of de Brain Stem. En: Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. The human central nervous system: a synopsis and atlas. Amsterdam, Netherlands. Editorial Springer Science & Business Media; 2007. p. 47-51.
4. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre, M. Morfogénesis temprana del SNC: inducción neural y neurulación. Cresta neural. Vesiculación y segmentación. Incurvación del eje neural. En: Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre, M. Neuroanatomía. Madrid. Editorial Médica Panamericana;2008. p. 43-52.
5. Latarjet M, Ruiz Liard A. Encéfalo. Generalidades y definiciones. En: Latarjet M, Ruiz Liard A. Anatomía humana, Vol.1. Médica Panamericana, 2004; 2004. p. 154-202.
6. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Introducción a la neuroanatomía. En: Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus: texto y atlas de anatomía. Cabeza y neuroanatomía. Editorial Médica Panamericana, 2007; 2006. p. 172-84.
7. Snell RS. La formación reticular y el sistema límbico. En: Snell RS. Neuroanatomía clínica. Editorial Médica Panamericana; 2007. p. 314-5.
8. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D. Las emociones. En: Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D. Neurociencia. 3rd. Editorial Médica Panamericana; 2007. p. 761-85.

9. Peña-Casanova J. Bases neurobiológicas de las funciones cognitivas: hacia una integración de niveles. En: Peña-Casanova J. Neurología de la conducta y neuropsicología. Ed. Médica Panamericana; 2007. p. 27-32.
10. Hikosaka O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nature reviews neuroscience*. 2010;11(7):503. p. 505-513.
11. Geisler S, Trimble M. The lateral habenula: no longer neglected. *CNS spectrums*. 2008;13(6). p. 484-89.
12. Viswanath H, Carter AQ, Baldwin PR, Molfese DL, Salas R. The medial habenula: still neglected. *Frontiers in human neuroscience*. 2014;7:931. p. 1-6.
13. Eng SR, Gratwick K, Rhee JM, Fedtsova N, Gan L, Turner EE. Defects in sensory axon growth precede neuronal death in Brn3a-deficient mice. *J Neurosci*. 2001;21(2). p. 541-49.
14. Xiang M, Gan L, Zhou L, Klein WH, Nathans J. Targeted deletion of the mouse POU domain gene Brn-3a causes selective loss of neurons in the brainstem and trigeminal ganglion, uncoordinated limb movement, and impaired suckling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(21). p. 11950-5.
15. Nishikawa T, Fage D, Scatton B. Evidence for, and nature of, the tonic inhibitory influence of habenulointerpeduncular pathways upon cerebral dopaminergic transmission in the rat. *Brain Res*. 1986;373(1-2). p. 324-36.
16. Ullsperger M, von Cramon DY. Error monitoring using external feedback: specific roles of the habenular complex, the reward system, and the cingulate motor area revealed by functional magnetic resonance imaging. *J Neurosci*. 2003;23(10). p. 4308-14.