



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE NEURONAS CATECOLAMINÉRGICAS MIGRATORIAS
DEL MESENCÉFALO DORSAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA

Biól. Daniela Ávila González

DIRECTORES DE TESIS

DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA

DRA. ELISA TAMARIZ DOMÍNGUEZ

CAMPUS UNAM-JURIQUILLA QUERÉTARO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por Daniela Ávila González, cuyo título es: “Caracterización de neuronas catecolaminérgicas migratorias del mesencéfalo dorsal” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Secretario (Tutor)

Dr. Alfredo Varela Echavarría

Vocal

Dr. Enrique Salas Vidal

Suplente

Dra. Y. Sofía Díaz Miranda

Suplente

Dr. Gerardo Rojas Piloni

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con el apoyo y fondos de IMPULSA-UNAM02, DGAPA 217810-21, CONACYT 82482 y Beca CONACYT (231731 y 173228).

Agradezco por el apoyo técnico a Elsa Nydia Hernández Ríos, Martín García Servín; Lorena Ortiz Martínez, Omar González Hernández, Ramón Martínez Olvera, Alberto Lara Ruvalcaba, Leonor Casanova Rico y María de Lourdes Lara.

Agradezco a Claudia M. García-Peña y a Amaya Miquelajáuregui por su participación en este proyecto, quienes han demostrado que con entusiasmo, perseverancia y dedicación se obtienen trabajos de calidad y serendipias que pueden llegar a tener repercusiones en campo de la investigación.

Agradezco a mis tutores, al Dr. Alfredo Varela Echavarría y a la Dra. Elisa Tamariz, por sus asesorías, por incluirme en su proyecto de investigación y completar parte de esta historia emotiva que son las células TH⁺ migratorias y por enseñarme que el hacer ciencia consiste en trabajar de forma apasionada entre los límites de lo conocido y lo desconocido.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	4
II. ANTECEDENTES	6
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS.....	20
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
VII. RESULTADOS	24
VIII. DISCUSIÓN	30
IX. CONCLUSIONES	35
X. FIGURAS Y PIES DE FIGURAS	36
XI. BIBLIOGRAFÍA	60

RESUMEN

Las primeras neuronas catecolaminérgicas se detectan en el romboencéfalo y en el mesencéfalo ventral de embriones de rata por la expresión de hidroxilasa de tirosina (TH) entre los estadios (E) 12 y E14. En nuestros estudios detectamos en estadios más tempranos (E11) en la zona del mesencéfalo dorsal, la presencia de una población de células TH⁺ cuya morfología y orientación sugirió que migraban tangencialmente hacia el rombencéfalo. El objetivo de este trabajo fue dilucidar el origen y destino de esta población, caracterizar su fenotipo e identificar los posibles mecanismos que permiten su desplazamiento. Utilizando el trazador celular fluorescente CFDA (diacetato de carboxifluoresceína), se marcaron células en el mesencéfalo dorsal en embriones de rata en cultivo y posteriormente se analizó su migración. Se observaron células CFDA⁺/TH⁺ desplazadas caudalmente, algunas de las cuales llegaron hasta el rombencéfalo. Se encontró que estas células TH⁺ no expresan marcadores de neuronas noradrenérgicas y del locus coeruleus (β -hidroxilasa de dopamina, Phox2a, Phox2b y DCC), pero expresan el marcador mesencefálico Otx2, cuya expresión se detiene poco antes de migrar al rombencéfalo. También se observó que las células migratorias están siempre asociadas a axones del tracto mesencefálico del V par craneal (TmesV), revelado por inmunotinción con β -III-Tubulina y DCC. Esta estrecha aposición sugiere que las células TH⁺ del mesencéfalo dorsal utilizan el TmesV como sustrato para la migración neurofílica.

ABSTRACT

The first catecholaminergic neurons are detected in the embryonic rat hindbrain and ventral midbrain by the expression of tyrosine hydroxylase (TH), between stages (E) 12 and E14. In the present study we detected at an earlier stage (E11) the presence of a dorsal midbrain population of TH⁺ cells whose morphology and orientation suggested that it migrates tangentially to the hindbrain. Our aim was to elucidate the origin and fate of these neurons, characterize their phenotype and identify possible mechanisms for their displacement. Using a fluorescent cell tracer (CFDA), cells were labeled in the dorsal midbrain of rat embryos in culture and then their migration was analyzed. CFDA⁺/TH⁺ cells were observed to migrate caudally, some of which reached the hindbrain. These TH⁺ cells do not express markers of noradrenergic neurons and of the locus coeruleus (β -hydroxylase dopamine, Phox2a, Phox2b and DCC), but express the midbrain marker Otx2, whose expression stops before migratory cells reach the hindbrain. We also observed that migratory cells are always associated with axons of the mesencephalic tract of the fifth cranial nerve (TmesV), revealed by immunostaining with β -III-Tubulin and DCC. This close apposition suggests that the TH⁺ cells of the midbrain dorsal use TmesV as a substrate for neurophilic migration.

ABREVIACIONES

A	Adrenalina
AP	Anteroposterior
BMP	Proteína morfogénica del hueso
CAMs	Moléculas de adhesión celular
CFDA	Diacetato de 6-carboxifluoresceína
DCC	“Deleted in colorectal cancer”
DA	Dopamina
DBH	β -hidroxilasa de dopamina
DV	Dorsoventral
E	Días embrionarios
Gbx2	Factor de transcripción “Gastrulation brain homeobox 2”
HIS	Hibridación in situ
LC	Locus coeruleus
MD	Mesencéfalo dorsal
MV	Mesencéfalo ventral
NA	Noradrenalina
NCA	Neurona catecolaminérgica
Otx2	Factor de transcripción “Orthodenticle homeobox 2”
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos
PFA	Paraformaldehído
r1	Rombómera 1
SCN	Sistema Nervioso Central
Shh	Sonic hedgehog
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TH	Hidroxilasa de tirosina
TmesV	Tracto mesencefálico del V par craneal
VTA	Área ventral tegmental

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace décadas se conoce en el sistema nervioso central (SNC) la presencia de poblaciones discretas de neuronas catecolaminérgicas (NCAs) que producen neurotransmisores como dopamina (DA) y noradrenalina (NA) (Dahlstroem y Fuxe, 1964; Hökfelt, 1984). La importancia de estas neuronas radica en su participación en diferentes procesos cognitivos, motores y sensoriales así como su asociación con desórdenes neurológicos como la enfermedad de Parkinson, déficit de atención, depresión, epilepsia y esquizofrenia (Berridge y Waterhouse, 2003; Klockgether, 2004).

Existe amplia información sobre la distribución anatómica de las NCAs en el SNC de algunos vertebrados amniotes (mamíferos, aves y reptiles) y anamniotes (anfibios y peces) en la etapa adulta. Sin embargo, se tiene sólo un conocimiento fragmentario de los procesos de especificación y diferenciación que ocurren en el desarrollo embrionario, así como los mecanismos de migración y proyección axonal para la formación de estos núcleos catecolaminérgicos y el establecimiento de conexiones neuronales con las demás estructuras que conforman el SNC.

Durante el desarrollo del SNC, las NCAs pueden ser identificadas por la expresión de hidroxilasa de tirosina (TH) y se ha observado su generación en todas las vesículas del encéfalo en desarrollo (prosencefalo, mesencefalo y rombencefalo) entre los estadios gestacionales 12 y 14 (E12-14) en embriones de rata, así como en E9-E12 en el ratón (Voorn et al., 1988; Pattyn et al., 2000; Marin et al., 2005). También se ha observado migración de NCAs en el mesencefalo y rombencefalo durante el desarrollo embrionario. Por ejemplo, en embriones de ratón E11-13 células TH⁺ de la zona ventricular se desplazan radial y lateralmente hacia la parte basal del mesencefalo donde posteriormente forman parte de los núcleos dopaminérgicos A9 y A10 (Kawano et al., 1995; Ohyama et al., 1998). En el rombencefalo se ha demostrado la migración de neuronas noradrenérgicas de la zona dorsal de la placa alar hacia la placa basal dentro de la rombómera 1 (r1) dando lugar con ello al Locus coeruleus (LC) (Aroca et al., 2006).

La migración no sólo es un fenómeno particular de las NCAs en el desarrollo; también se presenta en otros tipos neuronales en las diferentes vesículas del cerebro embrionario así como en etapas adultas (Rakic, 1990; Ghashghaei et al., 2007). El estudio de estas neuronas ha permitido la identificación de diversas moléculas involucradas en la migración llevando a cabo funciones de quimioatracción, repulsión, motogénicas y de adhesión celular (Metin et al., 2008).

En estudios de nuestro laboratorio se ha detectado la presencia de neuronas TH⁺ ubicadas en la región dorsal del mesencéfalo (MD) en embriones de rata E11. Estas células parecen formar una corriente de migración alineada a lo largo del sulcus limitans que separa la placa alar de la placa basal del tubo neural. Los procesos celulares que emergen de estas neuronas apuntan hacia zonas caudales del mesencéfalo. También en estos mismos trabajos se identificó la asociación de estas neuronas a fibras axonales del tracto mesencefálico del quinto par craneal (TmesV) lo que sugiere una migración neurofílica. En un estudio previo se describió la presencia del mRNA de TH en la zona dorsal del mesencéfalo de embriones de ratón E13 (Marin et al., 2005) que fue atribuida a neuronas que forman el núcleo dopaminérgico A11. Sin embargo, esta expresión ocurre comparativamente más tarde que la detectada por nosotros en embriones de rata y en el adulto la ubicación del núcleo A11 es en el diencefalo. Debido a que no existe información respecto a la presencia de NCAs en migración provenientes del mesencéfalo, el objetivo de este trabajo fue determinar su origen y su destino, caracterizar su fenotipo así como el tipo de migración que presentan.

II. ANTECEDENTES

II.1.- Desarrollo del tubo neural

El SNC se origina a partir de la región anterior del tubo neural el cual se divide a lo largo de su eje antero-posterior (AP) en diferentes vesículas: prosencéfalo (telencéfalo y diencéfalo), mesencéfalo y rombencéfalo. Cada una de estas regiones posee una identidad molecular específica y da lugar a diferentes tipos celulares y estructuras cerebrales (Puelles y Rubenstein, 2003). Los mecanismos por los que se establecen las distintas regiones del cerebro en su eje anteroposterior (AP) no han sido dilucidados por completo (Wurst y Bally-Cuif, 2001). Se sabe, sin embargo, que la determinación de la identidad regional y el destino neuronal son controlados en parte por centros organizadores que secretan morfógenos que median su efecto a través de receptores de membrana específicos en el tejido adyacente. Estos morfógenos controlan la diferenciación del tejido dependiendo de su regulación tanto espacial como temporal a lo largo del tubo neural (Kutejova et al., 2009).

El modelo más reciente sobre el establecimiento del eje AP, propone que el organizador de la gástrula inhibe la señalización de las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) lo que permite la inducción hacia tejido neural anterior, y este tejido anterior (que será el prosencéfalo) es subsecuentemente mantenido por el endodermo anterior visceral. Posteriormente, el nodo de Hensen, derivado del organizador de la gástrula, induce tejido neural posterior a través del mismo mecanismo de inhibición de la señalización de BMPs (Levine y Brivanlou, 2007).

En el primordio de la médula espinal es donde mejor se conoce el papel de los morfógenos que controlan la diferenciación dorso-ventral (DV) del tejido neural. En la parte ventral, la placa del piso del tubo neural es inducida por la notocorda, de la cual se secreta Sonic hedgehog (Shh), y posteriormente Shh también se expresará en la placa del piso formando un gradiente de concentración decreciente en dirección dorsal por difusión planar en el neuroepitelio. En el lado dorsal, la placa del techo produce diferentes moléculas señalizadoras como los miembros de la familia del Factor de crecimiento transformante beta (TGF β), BMP4, 5 y 7 y proteínas de la familia Wnt

(Zhuang y Sockanathan, 2006). Estos morfógenos forman gradientes decrecientes desde sus sitios de síntesis modulando la expresión de genes que codifican para diferentes factores de transcripción como las proteínas proneurales (también llamadas de clase bHLH por “basic helix-loop-helix”) y las proteínas con homeodominio (HD). Las proteínas proneurales son necesarias para iniciar el desarrollo de los linajes neurales y promover la generación de progenitores comprometidos a diferenciarse, regulando los aspectos generales de la identidad neuronal. A su vez, los factores HD especifican la identidad de los subtipos neuronales (Bertrand et al., 2002). La expresión diferencial de estos factores de transcripción resulta en la generación de dominios discretos a lo largo del eje DV del tubo neural. La intersección de los patrones regionales longitudinales con estos dominios DVs tiene como consecuencia que cada región del encéfalo en desarrollo tenga una composición única de genes activados que determinarán el fenotipo y función de las diferentes células que de ella derivan (Wurst y Bally-Cuif, 2001). Por ejemplo, como se muestra en el esquema de la Fig. 1, el resultado de las interacciones entre diferentes señales en la región del istmo, tiene como resultado la formación de las neuronas dopaminérgicas del núcleo de la sustancia nigra en el mesencéfalo ventral, las neuronas serotoninérgicas que conformarán el núcleo del Rafé en el rombencéfalo ventral, y las neuronas noradrenérgicas del Locus coeruleus en la rombómera (r1).

II.1.1 El organizador del límite entre el mesencéfalo y rombencéfalo

Entre el mesencéfalo y rombencéfalo se presenta una constricción conocida como la zona del istmo, la cual posee propiedades de organizador, es decir, orquesta el destino celular de las células adyacentes del mesencéfalo posterior y rombencéfalo anterior (Joyner et al., 2000). En el organizador del istmo se expresan las proteínas Wnt1 en el lado mesencéfálico y el factor de crecimiento fibroblástico-8 (Fgf8) en el lado rombencefálico. Estas son las moléculas principales a las cuales se les ha atribuido la capacidad organizadora del istmo. La expresión inicial de cada morfógeno se da en un territorio que expresa uno de los dos factores de transcripción del tipo homeodominio, Otx2 y Gbx2, los cuales se expresan con patrones definidos desde estadios tempranos. Otx2 se expresa en la región anterior del tubo neural, del telencéfalo hasta el

mesencéfalo, mientras que Gbx2 se expresa en la región anterior del rombencéfalo (Echevarria et al., 2003). Experimentos de pérdida y ganancia de función en ratones han revelado que estos genes poseen actividad de represión mutua (Broccoli et al., 1999; Millet et al., 1999) que genera un límite preciso entre sus dominios de expresión, activando la expresión de Fgf8 y definiendo, por tanto, la posición del organizador del istmo (Raible y Brand, 2004). La inducción de Fgf8 se da aproximadamente entre E8-8.5 en ratones en el borde anterior del territorio Gbx2, pero menos de 24 horas después su expresión se restringe en forma de anillo en la constricción del istmo que separa el mesencéfalo y la r1. Un segundo factor, Wnt1, es inducido ampliamente en E8.5 en el mesencéfalo (en territorio Otx2), y en E9.5 su expresión se limita a la línea media dorsal y ventral del mesencéfalo así como en un anillo adyacente a la expresión de Fgf8 (Joyner et al., 2000; Mason et al., 2000; Zervas et al., 2004).

II. 2. Migración neuronal

La migración estereotípica de las neuronas durante el desarrollo es esencial para su integración en circuitos neurales funcionales en el SNC. Clases específicas de neuronas migran en distintas direcciones hasta alcanzar su destino final en áreas particulares del cerebro. Las distintas rutas y modos de migración también podrían facilitar la diferenciación final de distintas clases de neuronas que son parcialmente determinadas en el momento de su nacimiento al abandonar la zona ventricular. El reconocimiento específico célula-célula y las interacciones a través de proteínas de adhesión entre las neuronas, glía y las señales inductivas que se dan durante la migración podrían activar eventos de señalización intracelular influenciando distintas identidades neuronales (Ghashghaei et al., 2007).

Durante el desarrollo temprano del encéfalo, la migración neuronal se puede definir de dos tipos: radial y tangencial (Fig. 2). En la migración radial, las neuronas utilizan las prolongaciones de la glía radial como andamiaje para su migración desde la zona ventricular hasta las zonas más marginales del neuroepitelio (Rakic, 1990). La migración a lo largo de las fibras de la glía radial ocurre además en regiones donde las células están organizadas en capas, tales como en la corteza cerebral, el cerebelo y el hipocampo (Rakic, 1971; de Carlos et al., 1996). En la migración tangencial las

neuronas no requieren de una interacción específica con los procesos de las células de la glía radial, moviéndose de forma paralela a la superficie pial del encéfalo (Nadarajah y Parnavelas, 2002; Ghashghaei et al., 2007). Este tipo de migración comprende diferentes tipos de movimiento celular que difieren en el tipo de sustrato utilizado; por ejemplo, en algunos casos las neuronas que migran tangencialmente siguen axones en crecimiento hasta llegar a su destino final en un modo de migración denominado "neurofílico". En otros casos, las neuronas no siguen sustratos celulares específicos sino que se dispersan de manera individual o en cadenas migratorias (Marin y Rubenstein, 2003; Ghashghaei et al., 2007). Independientemente del tipo de migración, las células que se mueven tangencialmente no parecen respetar los límites regionales del cerebro en desarrollo y migran a través de las diferentes subdivisiones del telencéfalo e incluso atraviesan largas vías axonales (Letinic y Rakic, 2001; Chen et al., 2007).

II.2.1 Migración tangencial

El ejemplo mejor conocido de migración neuronal tangencial en vertebrados superiores es el de las neuronas provenientes de la eminencia ganglionar (EG) que alcanzan el núcleo estriado y la corteza cerebral donde se diferencian a interneuronas (Anderson et al., 1997; Tamamaki et al., 1997). La parte medial da origen a la mayoría de las interneuronas GABAérgicas de la corteza y del hipocampo, mientras que células precursoras en la EG lateral generan neuronas que alcanzan el estriado, el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio y las células granulares y periglomerulares del bulbo olfatorio (Wichterle et al., 2001). Las interneuronas migran tangencialmente a través de la zona intermedia o zona marginal y se ha propuesto que pueden interactuar con axones corticofugales (Denaxa et al., 2001). Las señales extracelulares que controlan la migración tangencial pueden agruparse en tres categorías: 1) señales que regulan la motilidad de las neuronas en migración, 2) señales direccionales que guían la migración de las neuronas hacia sus lugares de destino y 3) señales de "paro" que suprimen la movilidad (Polleux y Anton, 2005).

Se han descrito varios factores neurotróficos expresados a lo largo de la ruta de migración de las interneuronas de la corteza como el factor de crecimiento de

hepatocitos y el factor neurotrófico derivado de la glía (Polleux et al., 2002). Se ha demostrado que señales que participan en la guía axonal desempeñan un papel en la dirección de la migración de las interneuronas de la EG a la corteza. Los factores quimiorrepelentes Sema3A y Sema3F se expresan en la región posmitótica del manto del estriado en desarrollo y las interneuronas en migración de la EG expresan sus receptores neuropilina (Npn1) y neuropilina 2 (Npn2) (Marin et al., 2001; Tamamaki et al., 2003).

Un ejemplo de migración tangencial en el rombencéfalo, es el de las neuronas del núcleo facial que se origina en la rombómera 4 y se desplazan hacia la rombómera 6 ó 7. En estas neuronas se regula la expresión de genes que codifican para proteínas de membrana, como TAG-1, Ret y Cadherina, y esta regulación es dependiente de su localización en r4, r5 ó r6 (Garel et al., 2000).

El ejemplo mejor conocido de migración neurofílica lo constituyen las neuronas GnRH que se originan en la placoda nasal y se desplazan sobre axones vomeronasales hasta llegar a su destino final en el hipotálamo. Estos axones expresan el receptor DCC, además de otras proteínas de adhesión como nCAM y TAG1 (Saghatelian, 2009).

En lo que respecta a la migración de NCAs, se sabe que las células dopaminérgicas del mesencéfalo ventral, después de generarse en la zona ventricular, migran ventralmente a través de los procesos de la glía radial y posteriormente de manera tangencial utilizando como andamio fibras nerviosas (Kawano et al., 1995). La molécula de adhesión L1, se expresa transitoriamente en las fibras dispuestas tangencialmente que coinciden con la migración de las neuronas DA, que a su vez expresan proteoglicano de condroitín sulfato 6B4, una molécula que se une *in vitro* a L1. Esto sugiere que existe una relación heterofílica entre las neuronas DA 6B4⁺ y fibras L1, mediando la migración tangencial de las neuronas DA (Ohyama et al., 1998).

Otro ejemplo de migración de NCAs es el de las células noradrenérgicas del Locus coeruleus (LC). Estas células migran dentro de la r1, de la placa alar hacia la placa basal que posteriormente será el tegmentum dorsolateral del puente del tallo cerebral (Aroca et al., 2006). Las neuronas NA expresan DCC, el receptor de netrina, y en embriones knockouts carentes de DCC, no ocurre su migración tangencial, y se

distribuyen en el puente rostral y en el cerebelo. Por lo tanto, DCC es un factor clave para la regulación de la migración tangencial de las neuronas NA del LC (Shi et al., 2008).

II.3.Sistema catecolaminérgico en el cerebro adulto

Las principales CAs que actúan como neurotransmisores en el SNC son la dopamina (DA), la noradrenalina (NA) y la adrenalina (A), derivadas del aminoácido L-tirosina. La presencia de CA en poblaciones discretas de neuronas en el SNC fue descrita por Dahlstrom y Fuxe (1964), quienes sugirieron que la DA y NA se sintetizaban en neuronas que conformaban doce núcleos distribuidos desde la médula oblongata hasta el hipotálamo y que se liberaban como neurotransmisores. Poco después, se adicionaron otros cinco núcleos localizados en el diencéfalo, el bulbo olfatorio y la retina, así como tres grupos de neuronas que liberan A, en el tallo cerebral (Hökfelt et al., 1984).

El sistema catecolaminérgico (Fig. 3) participa en diferentes procesos conductuales y fisiológicos como el ciclo de vigilia-sueño, actividad motora, ansiedad, estrés, aprendizaje y memoria. La disminución o ausencia de las NCs se asocia con desórdenes neurológicos como la enfermedad de Parkinson, déficit de atención, depresión, epilepsia y perturbación en los ciclos circadianos (Berridge y Waterhouse, 2003; Klockgether, 2004). Las NCs se identifican por la expresión de TH la cual convierte a la tirosina en L-3,4-dihidroxifenil alanina (L-DOPA). Los subtipos de estas neuronas se pueden determinar usando como marcadores a las enzimas que sintetizan a las diferentes catecolaminas. Mediante la L-DOPA descarboxilasa la DOPA se transforma en DA. En células NAs la DA es transformada en NA por medio de la enzima β -hidroxilasa de dopamina (DBH: “dopamine β hydroxylase”). En células As, la NA es metilada por acción de la enzima fenil-N-metil transferasa (PNMT, “phenyletanolamine N-methyl transferase”) y se convierte en A (Siegel, 2006).

II.3.1 Núcleos noradrenérgicos en el adulto

Las neuronas que sintetizan NA se originan en el rombencéfalo y en etapas adultas se localizan a nivel del bulbo raquídeo y de la protuberancia o puente de Varolio. El grupo de células A1 en la región ventrolateral caudal del bulbo raquídeo y el A2 del núcleo del tracto solitario (NTS), junto con una contribución relativamente menor del grupo A5 y A7, dan lugar a una de las vías noradrenérgicas ascendentes de mayor relevancia: el haz noradrenérgico ventral que se dirige rostralmente innervando el hipotálamo. También se han descrito proyecciones descendentes bulboespinales desde los grupos A1 y A2 (Ungerstedt, 1971). Uno de los núcleos noradrenérgicos de mayor importancia es el locus ceruleus (LC) constituido por el grupo celular A6. Los axones de estas neuronas forman extensas ramas colaterales que proyectan ampliamente a lo largo de trayectos bien definidos. Este núcleo, con una menor aportación de los grupos A5 y A7, origina otra gran vía ascendente noradrenérgica: el haz noradrenérgico dorsal que cursa rostralmente emitiendo proyecciones al hipotálamo lateral, núcleos talámicos, amígdala, hipocampo y corteza frontal. Las proyecciones descendentes del LC inervan algunas estructuras del tronco encefálico y la médula espinal (Nygren y Olson, 1977).

II. 3.2 Núcleos adrenérgicos en el adulto

Los grupos celulares adrenérgicos son tres (C1, C2 y C3) y están restringidos al bulbo raquídeo. El grupo C1, de gran importancia en la regulación central de la presión arterial, se localiza en la región rostral ventrolateral del bulbo y está intercalado con células noradrenérgicas del sistema tegmental lateral. Las neuronas adrenérgicas del grupo C1 inervan rostralmente diversos núcleos hipotalámicos y caudalmente el núcleo intermedio lateral de la médula espinal. El grupo C2, se sitúa en el NTS, proyectando a los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo y al LC. Además, se encuentra en las regiones en las cuales también se localizan neuronas noradrenérgicas de la médula dorsal. El grupo C3 se localiza en el fascículo longitudinal medial al nivel de la médula oblonga. (Fuller, 1982).

II. 3.3 Núcleos dopaminérgicos en el adulto

Los grupos neuronales dopaminérgicos del SNC se designan desde A8 hasta A17 y se localizan en el mesencéfalo, en el diencefalo y en el telencéfalo (Dahlstroem y Fuxe, 1964). En el mesencéfalo incluyen a las neuronas de la región retrorubral (A8), el VTA (A10) y de la sustancia negra *pars compacta* (A9), las cuales envían proyecciones a tres regiones principales: el estriado (núcleos caudado y putamen), la corteza límbica (entorrinal, prefrontal media y cíngulo) y otras estructuras límbicas (septum, tubérculo olfatorio, núcleo accumbens, amígdala y corteza piriforme). De estos grupos se originan las tres vías dopaminérgicas más importantes, la *vía nigroestriatal*, la *vía mesolímbica*, y la *vía mesocortical*. En el diencefalo se localiza el núcleo A11 (en el hipotálamo posterior) y sus proyecciones descienden hacia áreas autonómicas del tallo cerebral y la médula espinal cuya función aún no está bien entendida. Las neuronas incertohipotálamicas del núcleo A13 (zona incerta) proyectan hacia diferentes áreas del hipotálamo y de la amígdala, mientras que las neuronas del A12 (núcleo arcuato) y A14 (núcleo hipotalámico para y periventricular) inervan la eminencia media del hipotálamo y la hipófisis, formando parte del *sistema tuberohipofisario/tuberoinfundibular*. La conectividad del grupo A15 localizado en el hipotálamo ventral y lateral aún no está establecida. El grupo A16 se sitúa en el bulbo olfatorio y el A17 en células interplexiformes en la retina (Prakash y Wurst, 2006). En el siguiente apartado nos enfocaremos a la formación de los núcleos NAs del rombencéfalo y DAs del mesencéfalo en el desarrollo embrionario, puesto que nuestra población de estudio es detectada dentro de esas regiones del tubo neural.

II. 4. Formación de grupos catecolaminérgicos en el desarrollo embrionario

Como se mencionó anteriormente, durante el desarrollo en los vertebrados, el tubo neural se divide en tres vesículas principales: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. En este apartado nos enfocaremos a la formación de los NCAs solamente del mesencéfalo y rombencéfalo por ser los más conocidos y puesto que nuestra población neuronal de estudio se ha detectado transitoriamente dentro de estas dos vesículas. El primordio del rombencéfalo se divide a lo largo de su eje antero-

posterior en una serie de metámeras llamados rombómeras. A lo largo del desarrollo del SNC la expresión diferencial de genes dentro de cada rombómera establece dominios específicos de diferenciación neuronal. La r1, en proximidad con el organizador del istmo, dará lugar a una serie de estructuras del tallo cerebral, como los núcleos sensoriales del trigémino, parabigeminal, parabranchial, del lemnisco lateral, el vestibular superior, el primordio del cerebelo, así como uno de los centros noradrenérgicos principales en el SNC, el locus coeruleus (Liu et al., 2010). En el mesencéfalo, los neuroblastos de la placa alar migran y forman los colículos superior e inferior (tectum) al igual que el TmesV. Por otra parte, la placa del piso del mesencéfalo dará origen a neuronas dopaminérgicas, las del área tegmental ventral (VTA) se posicionan en la zona del manto, mientras que las de la sustancia nigra se ubican en una región más ventrolateral, en su mayoría en la placa basal (tegmentum) (Puelles, 2007).

II.4.1 Desarrollo de los núcleos dopaminérgicos del mesencéfalo ventral

La generación de neuronas dopaminérgicas que conforman los núcleos A8, 9 y 10 a partir de células progenitoras se puede dividir en tres etapas en base a la expresión de diferentes marcadores moleculares:

a) Determinación de la especificidad regional, b) diferenciación temprana y c) diferenciación tardía. Hasta hace algunos años, la única molécula conocida para marcar específicamente neuronas progenitoras DA en el mesencéfalo era la deshidrogenasa de retinoaldehído Aldh1 a1 (Raldh 1), aunque recientemente se ha reportado también que el factor de transcripción 1 alfa de la familia de las proteínas homeóticas LIM (Lmx1a) es un marcador temprano de precursoras DA mesencefálicas (Jönsson ME 2009; Cai J 2009). Por otra parte, varios morfógenos y factores de transcripción que regulan el desarrollo de las neuronas DA postmitóticas se han identificado. Shh y FGF8, claves para la diferenciación del eje dorso-ventral y el eje antero-posterior (Ye et al., 1998), son requeridos para la inducción de neuronas DA antes de E9.5 en embriones de ratón. Además, Wnt1 (Prakash et al., 2006) y TGF- β (Farkas et al., 2003) también juegan un papel en la especificidad a neuronas DA. Factores como Nurr1, Lmx1b, Pitx3 y En1/En2 se han caracterizado como factores de transcripción en el desarrollo de las

neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo ventral (Ang, 2006). Las neuronas mDA inmaduras inician la expresión de Nurr1 y de En1/2 durante el paso de diferenciación temprana (Alberi et al., 2004). Nurr1 está implicado en el mantenimiento de las neuronas DA del mesencéfalo ventral (Smits et al., 2003), además de ser requerido para la expresión de la TH, el transportador 2 vesicular de monoaminas (Vmat2) y el transportador de dopamina (DAT). En la diferenciación tardía, alrededor del día E11.5 las neuronas expresan Pitx3, TH y la descarboxilasa del aminoácido aromático (Aadc) la cual convierte a la L-DOPA en dopamina, además de expresar los demás marcadores que se expresan durante la diferenciación temprana (Smidt et al., 2004). El marcador molecular utilizado para diferenciar las subpoblaciones dopaminérgicas (A8-10) del mesencéfalo en ratón durante su desarrollo es Pitx3. Las neuronas ventrolaterales (A8 y A10) expresan Pitx3 antes de expresar TH, mientras que la población dorsomedial (A9) expresa TH antes que Pitx3 en E12.5, aunque ya para el día E13.5, todas las células TH⁺ del mesencéfalo expresan Pitx3 (Maxwell et al., 2005).

II.4.2 Desarrollo del núcleo Locus coeruleus en el rombencéfalo

Phox2a y Phox2b son genes con un dominio homeobox que se expresan en las neuronas noradrenérgicas del sistema nervioso tanto central como periférico (Tiveron et al., 1996). Phox2b controla la diferenciación del LC. Phox2a, en cambio, se ha descrito para la diferenciación de todos los centros noradrenérgicos del cerebro. En etapas postnatales de ratón, todas las neuronas DBH⁺ en A1, A2, A5 y A7 co-expresan Phox2a y Phox2b, mientras que en el LC se expresa únicamente Phox2a. Durante el desarrollo, en la formación del LC en la r1, la expresión de Phox2a inicia alrededor de E9.5 en embriones de ratón y la de Phox2b pocas horas después. Estudios en los que se analiza la expresión de Phox2a y Phoxb incorporando bromodeoxiuridina indican que ambos genes se activan en precursoras del LC. Phox2a se expresa en la zona del manto pero se han detectado núcleos Phox2a⁺ en la zona ventricular que posiblemente corresponden a células precursoras que han salido del ciclo mitótico y comienzan a migrar a la capa del manto, mientras que Phox2b se ha detectado tanto en la región ventricular como en la zona del manto. La expresión de Phox2b es transitoria, se desvanece alrededor del E11.5 en ratón mientras que Phox2a continúa hasta el

nacimiento y en la etapa adulta. En E13.5 *Phox2b* ya no se expresa en el LC, sin embargo, su expresión se mantiene en una población cercana en la formación reticular. La inactivación de *Phox2a* en ratones conduce a la agénesis del LC, pero se mantienen intactos los otros centros noradrenérgicos (A7, A5, A2 y A1). Por otra parte, estudios con hibridaciones in situ para TH o DBH, llevaron a comprobar que no sólo A7, A5, A2, A1 y el LC desaparecieron en embriones carentes de *Phox2b*, sino que además no se detectaron en la región rostral del rombencéfalo células expresando DBH, TH ni *Phox2a*. La excepción fueron algunas células de las áreas A1 o A2, las cuales expresaban también *Phox2a*, mostrando que *Phox2a* es suficiente para la expresión de DBH en el rombencéfalo caudal (Pattyn et al., 1997; Pattyn et al., 2000; Shi et al., 2008; Coppola et al., 2010).

Las células progenitoras del locus coeruleus (LC) derivan de la placa alar de la r1 y migran de manera tangencial hasta llegar a su lugar de destino en el tegmentum dorsolateral del puente de Varolio (Aroca et al., 2006). Varias moléculas han sido implicadas en el desarrollo del LC, entre ellas, las BMPs que son secretadas de la placa del techo e inician la especificación neuronal noradrenérgica a través de la inducción de la expresión de *Mash1* en células progenitoras. *Mash1* activa a los genes *Phox2a* y *Phox2b*, que posteriormente activarán a los genes de DBH y TH (Guo et al., 1999). Además, factores como Tlx3, el receptor cinasa de tirosina TrkB y sus ligandos BDNF y NT-4 son necesarios para el desarrollo del LC (Hornbruch et al., 2005). Se ha reportado que el receptor DCC es expresado en las neuronas del LC y que es determinante para su correcto desarrollo. En embriones de ratón knockout para DCC, la especificación de las neuronas del LC ocurre de forma normal y, sin embargo, hay irregularidades en su migración tangencial, dirigiéndose aberrantemente hacia el puente de Varolio o hacia el cerebelo (Shi et al., 2008).

II. 5. Neuronas TH⁺ no catecolaminérgicas

En las dos últimas décadas se ha reportado en el SNC de primates superiores y roedores tanto en fase adulta como en el desarrollo la presencia de neuronas TH⁺ con un fenotipo catecolaminérgico parcial. Se ha identificado un grupo de neuronas que sintetizan DA pero carecen de un sistema de recaptura por vesículas (son Vmat2⁻) y se

les ha denominado “neuronas TH no-exocíticas”. Este tipo de neuronas se ha encontrado en el estriado, bulbo olfatorio, corteza, el área postrema, el núcleo del tracto solitario y el núcleo motor dorsal del nervio vago (Weihe et al., 2006; Ugrumov, 2009). Un segundo grupo de neuronas TH⁺ sintetiza únicamente L-DOPA, y no posee AADC y VMAT2. Se ha propuesto que estas neuronas TH⁺, AADC⁻, VMAT⁻, llamadas dopaérgicas, pueden tener su función durante el desarrollo del sistema nervioso, al suplir de L-DOPA a neuronas TH⁻ AADC⁺ capaces de sintetizar DA y aparentemente, liberar al neurotransmisor por exocitosis (Ugrumov et al., 2004). Estas neuronas se han identificado en el área supraóptica, el hipotálamo para y periventricular, el núcleo paraventricular talámico, la habénula, núcleo parabraquial, corteza y médula espinal (Weihe et al., 2006).

II. 6. Expresión transitoria de TH en el desarrollo embrionario

Desde que se empezó a usar a la enzima TH como el marcador para distinguir células catecolaminérgicas y más recientemente, también a las que presentan un fenotipo catecolaminérgico parcial, no sólo se ha logrado la detección temprana de los núcleos catecolaminérgicos en desarrollo, sino que se ha observado una expresión transitoria de células TH en diferentes etapas del desarrollo embrionario.

En uno de los primeros estudios que se hicieron sobre la ontogenia de TH en embriones de ratón, utilizando como gen reportero Lac-Z expresado por el promotor de TH y la subsecuente expresión de β -gal, se observó la expresión transitoria de TH desde E9.0, en los primordios de los ganglios sensoriales glossofaríngeo (IX) y del vago (X). En E9.5-10.5 la expresión se extiende a los primordios de los ganglios geniculado (VII) y trigémino (V). Al mismo tiempo, se observó en E9.5 la expresión de β -gal en distintas regiones como el prosencéfalo ventral, mesencéfalo ventral y dorsolateral y rombencéfalo rostral, alcanzando su pico máximo en E10; para E13.5 la expresión desaparece por completo en todas esas regiones mencionadas, excepto la expresión que persiste en el mesencéfalo ventral (que serían los núcleos dopaminérgicos en la sustancia nigra y el área ventral tegmental así como la región de rostralateral TH que será posteriormente el núcleo LC) (Son et al., 1996).

En etapas más tardías (E16-P10 aprox.) se observa la presencia de neuronas con un fenotipo similar al dopaminérgico, expresando TH pero careciendo de otras proteínas como AADC y VMAT2. Esta expresión transitoria de neuronas TH⁺ se observa en el núcleo olfatorio anterior, núcleo del lecho de la estría terminalis, en el núcleo central de la amígdala, en el estriado y neocorteza. Se ha postulado que la desaparición de la inmunoreactividad a células TH⁺ en el desarrollo embrionario puede ser resultado de: 1) la degeneración de estas neuronas que expresan TH; 2) el apagado de la expresión de TH a medida que transcurre el desarrollo y 3) el decremento en la síntesis de TH de tal manera que la TH intracelular se vuelve indetectable con métodos inmunohistoquímicos (Ugrumov, 2009).

En cuanto a estudios con hibridación in situ (HIS), se ha analizado la expresión del ARNm de TH en etapas tempranas del desarrollo en embriones de ratón; se observó que en los estadios E10-12, el ARNm de TH se expresa en una amplia región continua del neuroepitelio que se extiende a través del mesencéfalo, las prosómeras 1-3, que comprenden el diencefalo y el prosencefalo secundario (hipotálamo y telencefalo dorsal) (Puelles y Rubenstein, 2003). Sin embargo, a partir del día E12.5 la expresión de TH en estas regiones decrece y se restringe a las regiones que corresponden a los núcleos dopaminérgicos (A8 a A15). Además de estos núcleos previamente descritos, el ARNm de TH se observa en las regiones de la eminencia ganglionar media y lateral, así como en la capa del manto del istmo y en una región media dorsoventral que se extiende longitudinalmente del mesencéfalo a la prosómera 2, así como un grupo neuronal entre la prosómera 1 y 2, ambas atribuidas al núcleo A11 dorsal (ver Fig. 4). Todas estas regiones anteriormente mencionadas, especialmente la región del A11d, se observan a partir de E10.5 pero después de E14.5 la detección de TH por HIS ya no es posible (Marin et al., 2005).

II. 6.1 Expresión transitoria de TH en neuronas del mesencéfalo dorsal (MD)

En estudios previos de nuestro laboratorio se observó que en embriones de rata E11 existe una población de neuronas que expresan TH en la parte dorsal del mesencéfalo (Fig. 5) y que por su morfología y orientación parecen migrar caudalmente

de manera tangencial (Fig. 6). Como se mencionó anteriormente, Marín et al, (2005), describieron la presencia del mRNA de TH en el mesencéfalo dorsal (MD) al surco limitans atribuyendo esta expresión al núcleo A11 del diencefalo; sin embargo el patrón de migración rostro-caudal observado en nuestro laboratorio no coincide con la ubicación final en el diencefalo descrita por Marin et al (2005).

Utilizando la técnica de doble inmunofluorescencia (IFs) para TH⁺ y para el marcador de neuronas β -III-Tubulina (β -III-Tub), se observó que la expresión de TH en la zona dorsal del mesencéfalo inicia en el estadio 10.5 (Fig. 6D) y que los cuerpos y fibras neuronales β -III-Tub⁺ que corresponden al TmesV orientan sus procesos hacia zonas caudales (Fig 6F). Además, se observó a las neuronas TH⁺ en cercanía a las fibras β -III-Tub⁺ (Fig. 6C-H). Por otra parte, la proyección ortogonal obtenida por microscopía confocal, mostró que efectivamente existen fibras Tub- β III⁺ adyacentes o en estrecho contacto con neuronas TH⁺ (Fig. 7A), lo que sugiere que las TH⁺ del MD usan el TmesV como andamiaje y por lo tanto podrían usar un mecanismo neurofílico para migrar (Fig. 7B, flechas). Los somas del TmesV corresponden a las primeras neuronas que se originan en el mesencéfalo dorsal y sus axones forman una proyección temprana que se origina en el estadio E10 en embriones de rata y E9 en embriones de ratón. Los axones que conforman el TmesV proyectan ventralmente desde el MD, viran caudalmente al nivel del sulcus limitans y posteriormente atraviesan longitudinalmente el mesencéfalo hasta llegar a inervar el núcleo del trigémino en el romboencéfalo (Mastick y Easter, 1996; Hunter et al., 2001).

En el presente trabajo se analizó la población TH⁺ del mesencéfalo dorsal y sus mecanismos y ruta de migración.

III. HIPÓTESIS

Las neuronas TH⁺ presentes en el MD entre los estadios E10-12 migran a la región rostral del rombencéfalo, incorporándose a algunos de los núcleos catecolaminérgicos de esa zona, utilizando axones del tracto mesencefálico del V par craneal (TmesV) para su desplazamiento.

IV. OBJETIVOS

1. Analizar la migración de las neuronas TH⁺ del mesencéfalo dorsal.
2. Caracterizar fenotípicamente a las neuronas TH⁺ presentes en el mesencéfalo dorsal en varias etapas de su migración.
3. Estudiar la interacción de las neuronas TH⁺ del mesencéfalo dorsal con axones del TmesV durante su migración.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para identificar el origen y destino de las neuronas TH⁺ del MD se hicieron marcajes con el trazador fluorescente CFDA en embriones de rata de los estadios E11 y E11.5, cultivando los embriones por 24 horas. De cada embrión se extrajo el cerebro y se sometió a inmunofluorescencia para TH⁺.

Para caracterizar el fenotipo de las neuronas TH⁺ del MD se hicieron inmunofluorescencias para diferentes marcadores de mesencéfalo y poblaciones noradrenérgicas como Otx2, DBH, Phox2a, Phox2b y DCC.

Para estudiar los mecanismos de interacción de las neuronas TH⁺ con tractos axonales se llevó a cabo dobles inmunofluorescencias para TH y para el componente del citoesqueleto β -III-Tubulina, en neuroepitelios completos y cortes coronales/sagitales de embriones E11.5.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Animales experimentales

Embriones de rata Wistar de 11, 11.5 y 12 días de gestación fueron extraídos para la obtención del neuroepitelio completo. Los neuroepitelios se fijaron en PFA 3.5% en PBS 1x (Gibco, 70011-044.) por 2 horas y posteriormente se incubaron con anticuerpos primarios, ya sea completos o en cortes sagitales y coronales. Para la obtención de cortes, los neuroepitelios se dejaron toda la noche en PBS con 30% sacarosa, después de haber sido fijados con PFA 3.5%. Los neuroepitelios se

incluyeron en Tissue-Tek (Sakura Finetek, Torrance) y se congelaron a -20°C hasta ser cortados por medio de un criostato para obtener cortes sagitales y coronales de $20\ \mu\text{m}$.

VI.2. Marcajes con diacetato de carboxi-fluoresceína (CFDA)

Para estudiar la ruta migratoria de las neuronas TH^+ del MD, se hicieron marcajes con diacetato de carboxi-flouresceína (CFDA SE, 557 M.W., V12883 Invitrogen, Eugene, Oregon) en el MD del neuroepitelio de embriones completos y posteriormente se cultivaron por 24h (de Carlos et al., 1996) utilizando en procedimiento siguiente: Ratas gestantes con embriones de E11 y E11.5 fueron anestesiadas y su útero se expuso por medio de una incisión longitudinal en el abdomen. Los embriones se extrajeron del útero, se colocaron en cajas Petri estériles con una solución de Ringer exponiendo el saco vitelino. El saco vitelino fue parcialmente abierto procurando mantener íntegras las arterias y venas del mismo así como al embrión adherido al cordón umbilical teniendo cuidado de no romper la placenta. Los embriones fueron inyectados en el MD (Fig. 8) con una solución 10mM de CFDA en DMSO con ayuda de un dispositivo de presión bajo un microscopio de disección. Los embriones inyectados fueron transferidos a un pequeño frasco con 4ml de medio de cultivo, el cual se colocó durante 24 horas en un rotor situado en una incubadora a 36°C con una mezcla de gases con 95% O_2 y 5% CO_2 . Para los cultivos, el suero de rata fue previamente obtenido por centrifugación de sangre a $2177\ \text{xg}/10\ \text{min}$ inmediatamente después de haber sido extraída de ratas hembra. El suero se filtró a través de un filtro con poro de $0.45\ \mu\text{m}$ y se le agregó glucosa a una concentración final de 2 mg/ml y 200 IU/ml de penicilina-estreptomicina [Gibco, BRL, Grand Island, NY] (de Carlos et al., 1996). Los embriones fueron monitoreados de manera continua para comprobar que seguían vivos, por medio de la observación del latido del corazón. Al finalizar el período de incubación, los embriones fueron fijados en PFA al 3.5% toda la noche y al día siguiente se extrajeron los neuroepitelios los cuales fueron sometidos a IFs para TH.

VI.3. Inmunohistoquímica

VI.3.1.- Inmunofluorescencia en neuroepitelio completo

Embriones de rata Wistar de 10.5, 11 y 12 días de gestación fueron extraídos de la madre y se fijaron en PFA 3.5% por 2 h. Posteriormente se les extrajeron los neuroepitelios y se lavaron seis veces con PBS, con una duración de 10 min cada lavado. El tejido se bloqueó con suero de cabra o de caballo al 10% por 30 min y se añadió el anticuerpo primario diluido en PBS con Tritón X-100 (al 0.1% para las proteínas de membrana ó al 0.3% para los factores de transcripción) (JT Baker, BK-x198-07) y suero de cabra o caballo al 10% ó 5%, dejando incubar toda la noche a 4°C. Después, los neuroepitelios fueron expuestos a anticuerpos secundarios, todos a concentraciones 1:1000 en PBS durante una hora. Al término de la incubación, los neuroepitelios fueron lavados 6 veces con PBS y se cortaron a lo largo de las líneas media dorsal y ventral; los hemiserebros resultantes se montaron planos en portaobjetos con la superficie pial hacia arriba usando DABCO-glicerol (concentración de DABCO 1% [Sigma, D-2522], glicerol 9%) como medio de montaje. Se obtuvieron micrografías con un microscopio confocal Nikon y se hicieron reconstrucciones utilizando el programa Adobe Photoshop CS2.

VI.3.2.- Inmunofluorescencia en cortes

Cortes sagitales, coronales y transversales de 20 µm se obtuvieron utilizando el criostato y se colocaron en portaobjetos (Superfrost™ Plus Slides, 48311-703) los cuales se dejaron secar por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS por 5 min cada lavado. Se bloqueó con suero de cabra o caballo al 5% por 30 min y se añadió el anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en PBS (con Tritón X-100 al 0.1% y suero de cabra al 5%, dejando incubar toda la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras se expusieron a anticuerpos secundarios, todos a concentraciones 1:1000 en PBS durante una hora. Al término de la incubación los portaobjetos fueron lavados 4 veces con PBS. Se eliminó el PBS y se les agregó 125 µl de DABCO-glicerol. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-TH [1:1000]

(Pel-Freez, P40101-0) hecho en conejo; anti-TH [1:150] (Pel-Freez, P60101-0) hecho en oveja; anti-DBH [1:500] (Millipore, MAB308) hecho en ratón; anti-Otx [1:500] (Abcam, ab21990) hecho en conejo; anti-Phox2a [1:400] (Abcam, ab54847) hecho en ratón; anti-Phox2b [1:400] (Abcam, ab94979) hecho en conejo; y anti- β -III-Tub [1:2000] (Covance, MMS-435P) hecho en ratón. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, A11029), anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, A11034), anti-IgG de oveja acoplado a Alexa488 (Invitrogen, 11015), anti-IgG de ratón acoplado a Cy3 (Jakson-IR, 715166151) y anti-IgG de conejo acoplado a Cy3 (Jakson, 711165152).

VI.3.3.-Inmunoperoxidasa

Se utilizó un anticuerpo primario anti-TH [1:1000] (Pel-freez) hecho en conejo y un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (Jakson, 111-036-003). Los neuroepitelios se fijaron en PFA 3.5% por 2 h y posteriormente se lavaron cuatro veces con PBS, con una duración de 10 min cada lavado. Se hizo otro lavado con una solución de PBS, Tritón X-100 al 0.1% y peróxido de hidrógeno al 30% por 2h. Se bloqueó con suero de cabra o caballo al 10% en PBS por 30 min y se añadió el primer anticuerpo. El anticuerpo primario fue diluido en una solución de PBS con Tritón X-100 (al 0.1% ó 0.3%) y suero de cabra o caballo al 10%, incubando a 4°C toda la noche. Al día siguiente se lavó 6 veces con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario 2h a 4°C. Se utilizó diaminobencidina como sustrato para la enzima peroxidasa, incubando 2h a temperatura ambiente. Por último se añadió peróxido de hidrógeno 30%, dejando incubar por 30 min y se hicieron 3 lavados finales de PBS.

VI. 4 Microscopía confocal

Para la obtención de imágenes se utilizó el Microscopio Confocal Nikon Eclipse E-600 módulo PCM 2000, con un software de captura simple PCI by Compix y el Microscopio Confocal Zeiss Axiovert 200 LSM 510 con un software de captura LSM 510 Meta by Zeiss. Se realizaron secuencias en plano X,Y,Z, reconstrucciones y proyecciones ortogonales. Utilizando el programa Adobe Photoshop CS2 se procesaron las imágenes y se hicieron estudios de co-localización.

VII. RESULTADOS

VII.1.-Presencia de células TH⁺ en el mesencéfalo dorsal de embriones de rata

Con el propósito de identificar la ventana de tiempo en la cual se observa la presencia de células TH⁺ en la zona dorsal del mesencéfalo, se hicieron dobles IFs para β -III-Tub⁺ y TH⁺ en embrionarios de rata de diferentes estadios, tanto en cerebros completos y hemi-cerebros, como en cortes sagitales y coronales. A partir de E11.0, poco después del cierre del tubo neural, se encontraron las primeras células TH⁺ distribuidas a lo largo del mesencéfalo por encima del sulco limitans, desde la región caudal del diencefalo adyacente al límite con el mesencéfalo y hasta la r1 en el rombencéfalo (Fig. 9A). El montaje de hemi-cerebros completos permitió visualizar a esta población desde vistas laterales, lo que reveló una morfología con procesos axonales cortos orientados hacia la r1. Esta morfología y los cambios en la ubicación de la población completa durante el desarrollo, sugieren que siguen una ruta migratoria hacia el rombencéfalo, atravesando la zona del istmo.

Un patrón similar se observó en E11.5 (Fig. 9B) y E12.0 (Fig. 9C), con un aumento en la abundancia de células en E11.5 y una notable reducción en E12. En este estadio se observaron además las primeras neuronas TH⁺ en la región ventral del mesencéfalo. Para E12.5 ya no se detectaron células TH en el MD y la zona del istmo (Fig. 9D), mientras que en el MV y en el rombencéfalo se detectó señal de TH que continúa en estadios posteriores.

Para verificar la especificidad del anticuerpo primario anti-TH hecho en conejo usado en este estudio, se llevó a cabo el mismo experimento usando un anticuerpo hecho en oveja. Con este anticuerpo se encontró el mismo grupo de células TH⁺ en la zona dorsal del mesencéfalo de embriones E11.5 (Fig. 10A).

Para visualizar a la población TH⁺ completa y determinar su localización en el cerebro de manera más precisa, se hizo una tinción con inmunoperoxidasa en el estadio E11, utilizando el neuroeptelio completo, sin disectar en hemi-cerebros y sin montar en plano. Con ello se confirmó la presencia de la población a lo largo del mesencéfalo dorsomedial, en el límite del istmo y en la r1 (Fig. 10B).

Estos resultados confirman la presencia, en embriones de rata, de células que expresan TH y se ubican en el mesencéfalo dorsal en estadios tempranos, lo cual no ha sido reportado anteriormente, y cuya morfología y los cambios en su distribución y localización sugieren que son parte de una población que migra caudalmente hasta la zona rostral del rombencéfalo.

VII.2.-Migración de células TH⁺ del mesencéfalo en dirección al rombencéfalo

Para analizar los patrones de migración de la población de células TH⁺, de la región dorsal del mesencéfalo, se utilizó un marcador fluorescente (CFDA) que atraviesa la membrana celular de las células expuestas al mismo activando con ello su fluorescencia. Este marcador se ha utilizado para marcar células en estudios de migración *in vivo* (Parish 1999).

El marcaje con CFDA se llevó a cabo en embriones de rata de E11 y E11.5 que fueron posteriormente cultivados *in vitro* por 24 horas. Se marcó en diferentes sitios del neuroepitelio: el diencefalo dorsal, en el límite entre el diencefalo y mesencéfalo, y en diferentes puntos del mesencéfalo dorsal (MD) a lo largo del eje AP. Al término del cultivo los embriones se fijaron y fueron sometidos posteriormente a IF para TH para observar si había neuronas que se hubiesen desplazado del sitio de marcaje y si entre ellas se podían identificar células TH⁺.

En el embrión de la Fig. 11 la inyección se hizo en una región intermedia entre la placa alar y la basal, aproximadamente sobre el sulcus limitans que las separa; se pueden apreciar células CFDA desplazadas caudalmente con respecto al sitio de inyección. Se puede observar también que las células que migraron (CFDA⁺) se encuentran dentro del dominio de células TH y que algunas de ellas expresan TH. Estas células CFDA⁺/TH⁺ se observan en la región caudal del mesencéfalo y en esta preparación se observó una célula posterior al istmo en la parte anterior de la r1 (Fig. 11C y D). En las distintas preparaciones realizadas para este experimento (n=8) también se observaron células migratorias que no expresaban TH (cabezas de flecha Fig. 11 y 12).

La Fig. 12 muestra un ejemplo de un hemi-cerebro del estadio E11.5 en el que la inyección de CFDA se llevó a cabo en una zona caudal del mesencéfalo (n=4). Se

observaron varias células que migraron caudalmente hasta la región del istmo y algunas que incluso llegaron hasta el rombencéfalo (Fig. 12B). Nuevamente, entre las células que migraron y que se detectaron en el mesencéfalo y en r1 se observaron células TH⁺ y células TH⁻ (Fig. 12B). Las células TH⁺ que se desplazaron al rombencéfalo convergen con la señal TH de las células migratorias de la r1 que posteriormente conforman el LC (Fig. 12C). La Fig. 13 muestra un neuroepitelio con la inyección en una región más dorsal del mesencéfalo, de donde se observaron células TH⁺ que migraron en dirección ventral y caudal, algunas de las cuales llegaron hasta el rombencéfalo (n=3).

Para determinar el límite rostral de la zona de origen de las células TH⁺ se realizaron marcajes en el diencefalo y en su límite con el mesencéfalo. Inyecciones en la región rostral del pretectum en el diencefalo (n=4) marcaron células que no migraron en dirección caudal y permanecieron en esta neurómera (Fig. 14). En cambio, en el hemiserebro de la Fig. 15A en el que la inyección se realizó en el mesencéfalo anterior, justo en el límite entre diencefalo y mesencéfalo (n=3), se marcaron varias células TH⁺ que migraron caudalmente en la corriente TH⁺ (Fig. 15B). Este sitio de inyección corresponde a la región más rostral de la corriente de células TH⁺.

Estos hallazgos revelaron la existencia de células que migran caudalmente desde diferentes regiones a lo largo del eje AP del dominio TH⁺ del mesencéfalo dorsal y de la región adyacente a la línea media dorsal de la misma vesícula, que el límite rostral del dominio migratorio es en el borde entre el mesencéfalo y diencefalo, y que existe otra población de células migratorias que no expresan TH. Por tal motivo en las descripciones subsecuentes en este texto, se referirá a esta población como la corriente migratoria mesencéfalo-rombencéflica (CM-MR).

VII.3.- Caracterización de las células TH⁺ del mesencéfalo dorsal

Dado que las neuronas TH migratorias de la CM-RM parecen migran caudalmente en dirección al sitio en el que se diferencia el LC, fue necesario analizar si el fenotipo de las primeras era similar al de las neuronas que dan lugar a este núcleo noradrenérgico. Para ello se hicieron dobles IFs de TH con los marcadores noradrenérgicos DBH, Phox2a, Phox2b y DCC (Pattyn et al., 2000; Shi et al., 2008).

En embriones E11.5 se observó que las células TH⁺ de la CM-MR no expresan DBH, a diferencia de las células presentes en la placa alar de la r1 que contiene al LC en desarrollo en donde se encontraron células TH⁺ coexpresando DBH y células que sólo expresan DBH (Fig. 16 y Fig. 17B). Las dobles IFs se repitieron en varios estadios, desde E11.0 hasta E17.0. A partir de E11.0 se observó la expresión de DBH en células de la r1, algunas de ellas también expresaron TH⁺. En la micrografía mostrada en la Fig. 16B se observa que la CM-MR converge con la migración de las células DBH del primordio del LC. Para E12.0 se observa un aumento en el número de células DBH⁺/TH⁺ de la r1, así como una disminución en la abundancia de la población de la CM-MR (Fig. 17C). En E13 ya no se observa la CM-MR: no hay señal de TH en el mesencéfalo dorsal ni en la zona del istmo (Fig. 17D); pero en este mismo estadio se observó en la placa basal de la r1 un grupo de células DBH⁺/TH⁺, que parece ser el grupo celular que da lugar al LC. Se pudo apreciar además la presencia de varios grupos de células TH⁺/DBH⁻ en diferentes regiones del rombencéfalo; un grupo numeroso se detectó justo dorsal al LC y otros menos numerosos en regiones más posteriores en la placa alar (Fig. 18). Posteriormente se analizó la expresión de Phox2a y Phox2b que son marcadores tempranos que permiten determinar el fenotipo noradrenérgico antes de la expresión de DBH. En los estadios E11.0 y E11.5 las células de la CM-MR no expresan Phox2a (Fig. 19A y B). En cambio, sí se observó expresión de Phox2a en la placa alar de la r1 que de acuerdo a descripciones previas (Shi et al., 2008) corresponde a las neuronas migratorias del LC (Fig. 19C).

Para analizar la expresión de Phox2b se llevaron a cabo inmunotinciones en cortes coronales de embriones E11.5 ya que el anticuerpo para esta proteína no funcionó en neuroepitelios completos (Fig. 20). En el mesencéfalo y en la r1 se observaron células TH⁺ en la región pial del neuroepitelio que contiene neuronas y neuroblastos posmitóticos, mientras que las células Phox2b se localizaron en la región ventricular proliferativa y no se observó en las zonas piales en donde se ubican las células TH (Fig. 20B). Por lo tanto no es posible determinar con estos datos si los precursores de las células de la CM-MR expresan Phox2b. Con estos datos podemos señalar que la población migratoria TH⁺ de la CM-MR no presenta un fenotipo noradrenérgico entre el estadio E11.0 y E12.0.

En estudios paralelos se analizó en la CM-MR la expresión de DCC (Fig. 21), el receptor de la molécula guía de axones Netrina1, que se expresa en neuronas del LC (Shi et al., 2008). Las células de la CM-MR no expresan DCC (Fig. 21B), a su vez como se esperaba sí se observó en las células del LC en placa alar de la r1 (Fig. 21C). Se encontró en el mesencéfalo dorsal la presencia de fibras DCC⁺ en el arreglo característico del TmesV, a las que se encontraron asociadas las neuronas TH⁺ de la CM-MR (Fig. 21A). Esto confirma los hallazgos de la interacción de las neuronas TH⁺ con los axones de este núcleo que se describirán en la sección VII.4.

Para analizar aspectos de la identidad de las neuronas TH⁺ de acuerdo a su territorio de origen se analizó en ellas la expresión de Otx2, un marcador del prosencéfalo y el mesencéfalo. Se llevaron a cabo experimentos de inyección de CFDA y se analizó si las células TH migratorias expresaban Otx2. En una inyección de CFDA cercana al istmo se observó que entre las células que migraron caudalmente en el mesencéfalo había células que expresaban Otx2 y otras que no lo expresaban. En cambio, todas las células que migraron a través del istmo y que penetraron hasta el territorio r1, carecían de Otx2 (Fig. 22). Esto sugirió que la expresión de Otx2 se pierde durante el desplazamiento caudal de las neuronas TH. Para analizar directamente esta posibilidad, se analizó la expresión de Otx2 a todo lo largo de la CM-MR (Fig. 23).

Se observó que Otx2 se expresa en todo el prosencéfalo y el mesencéfalo, de acuerdo a lo reportado previamente para este factor de transcripción (Millet et al., 1996). Por otra parte, la mayoría de las células TH⁺ localizadas en la parte más rostral e intermedia de la CM-MR expresan Otx2 (81%±2.82, n=7 y 88%±1.72, n=7, respectivamente) (Fig. 24A, B). En la región caudal del mesencéfalo, sin embargo, ocurre un decremento drástico en el número de células TH⁺ que expresan Otx2 (37.8%±10.76, n=7). Por último, las células TH⁺ de la corriente migratoria que se encuentran adyacentes al istmo y las que se localizan en la r1, carecen de Otx2 (Fig. 24C). Estos resultados indican que las células de la CM-MR expresan Otx2 en el mesencéfalo y que dejan de expresarlo conforme migran caudalmente de tal manera que ninguna de las células que llegan al rombencéfalo expresan este factor transcripcional.

VII.4.- Estudio de la interacción entre las células migratorias TH⁺ y axones del TmesV

El TmesV es una proyección temprana que inicia en el estadio E10 del embrión de rata y se compone de neuronas ubicadas en la región dorsal del mesencéfalo y cuyos axones proyectan ventralmente hacia la región del sulcus limitans y posteriormente en dirección caudal hacia el núcleo del trigémino en el rombencéfalo (Mastick y Easter, 1996) (Fig. 25A).

En el estadio en el que de acuerdo a nuestros resultados aparecen las primeras neuronas TH⁺ de la CM-MR, los axones del TmesV ya han proyectado más caudalmente de la r1 en el rombencéfalo. Utilizando doble IF de TH y β -III-Tub se confirmaron los hallazgos iniciales que dieron lugar a este estudio. Primero, se observó que las células TH⁺ migratorias fueron marcadas con los anticuerpos para β -III-Tub⁺, lo que significa que son neuronas maduras. Además, en todas las muestras (n=6) se observó que todas las neuronas TH⁺ se encontraban adyacentes a fibras β -III-Tub⁺ que no expresan TH y que por su morfología y ubicación característica (Hunter et al., 2001) podemos decir con certeza que corresponden al TmesV (Fig. 25B y 25C). Utilizando microscopía confocal se obtuvieron proyecciones ortogonales de estas preparaciones que consisten en cortes virtuales ortogonales a una serie apilada de cortes ópticos confocales en el eje Z y que permiten la visualización de la cercanía de estructuras que parecen superpuestas. Este tipo de imágenes revelaron que en efecto, todas las neuronas TH⁺ se encuentran en estrecha aposición con las fibras del TmesV (Fig. 25D). Para confirmar esta observación se llevó a cabo IFs de TH y β -III-Tub en cortes histológicos del cerebro completo de embriones E11-12 (Fig. 26 y 27). En cortes coronales en varios niveles del mesencéfalo en E11.0 (Fig. 26D) se observó que la señal TH⁺ estaba adyacente a señal β -III-Tub⁺ lo que indica que las neuronas TH⁺ están en estrecha cercanía con fibras de otras neuronas. Las neuronas TH y los axones que corresponden al TmesV se encontraron en las zonas más superficiales del tubo neural; algunas células TH⁺ se encontraron en zonas intermedias mientras que en la capa más interna (zona ventricular) no se detectó señal de TH ni de β -III-Tub en todos los cortes coronales observados (Fig. 26A-26B). En un estadio más avanzado, en cortes transversales de E12 del mesencéfalo posterior (Fig. 27), se observaron además células TH adyacentes a cuerpos neuronales positivos a β -III-Tub⁺.

Estos resultados muestran que las células TH están en contacto con fibras β -III-Tub y sugieren una relación neurofílica en la que las neuronas TH⁺ migratorias utilizan a los axones del TmesV como sustrato para su migración caudal.

VIII. DISCUSIÓN

Presencia transitoria de células TH en el mesencéfalo dorsal

Durante el desarrollo del SNC, las neuronas que conforman los núcleos dopaminérgicos A8-10 del MV inician la expresión de TH en el estadio E12 en embriones de rata y en E10.5 en ratones (Shults et al., 1990). Esto se ha descrito por medio de inmunohistoquímica detectando la enzima o por HIS, detectando su ARNm.

En estudios recientes hechos en ratones, utilizando el gen reportero lacZ en líneas transgénicas y por HIS, se detectaron células expresando TH en regiones dorsales del mesencéfalo de ratón de E9.5 en un estadio que corresponde aproximadamente al E11 de rata, desapareciendo por completo en días posteriores (Son et al., 1996; Marin et al., 2005). Estas neuronas, sin embargo, no fueron caracterizadas.

En este trabajo demostramos por medio de inmunohistoquímica la presencia temprana (E11.0-E12.0) de células TH⁺ en forma de una corriente continua al nivel del sulcus limitans y a todo lo largo del mesencéfalo, abarcando desde su límite con el diencefalo y extendiéndose más allá de su límite caudal, el istmo; hasta llegar a la parte anterior de la r1 (Fig.9). La morfología de esta población nos sugirió que son células en migración ya que poseen un único proceso corto dirigido en dirección caudal aunado a la observación de que toda la población desaparece gradualmente del mesencéfalo. En efecto, en estudios de marcaje de linajes celulares con un trazador fluorescente (CFDA) en embriones en cultivo, se demostró que estas células migran caudalmente, desplazándose desde el mesencéfalo hasta el rombencéfalo (Fig. 11, 12 y 13). Por lo tanto, se propone que a esta población se le denomine “corriente migratoria mesencéfalo-rombencefálica” (CM-MR), que contiene además células no catecolaminérgicas (Fig. 11C, 12B y 13C).

El marcaje con CFDA en puntos distribuidos a lo largo de la CM-MR mostró el desplazamiento caudal de células TH⁺ y células TH⁻ desde varias regiones que incluyen

desde el límite del mesencéfalo con el diencéfalo (Fig.15), y regiones posteriores del mesencéfalo (Fig. 12 y 13); sin embargo solamente en los marcajes realizados en regiones posteriores del mesencefalo se pueden observar células que llegaron hasta la r1, donde convergen con las células TH⁺ provenientes de la placa alar que forman el LC. Por lo tanto, aunque nuestros hallazgos confirman migración caudal por distancias cortas desde cada punto de marcaje, se requieren estudios adicionales para confirmar la migración desde regiones intermedias o rostrales de la CM-MR hasta la r1. Estudios de trazado de linaje con marcadores fluorescentes o genéticos que permitan dar seguimiento hasta etapas perinatales de las neuronas marcadas en estadios tempranos, arrojarán luz en este respecto.

En embriones de ratón se ha visto que el borde de restricción de linajes celulares entre el mesencéfalo y la r1 se establece entre E8.5 y E9.5, lo que coincide con el establecimiento del organizador del istmo. Si bien en estadios E8.5-9.5 aún se observa el desplazamiento de algunas células del mesencéfalo posterior hacia la r1, para E9.75 se establece por completo el límite del istmo y ya no ocurre la dispersión de células de una región a otra (Zervas et al., 2004). El caso de la CM-MR parece ser diferente ya que es un desplazamiento de células que ocurre en el estadio E11.0-12.0 que equivale a E9.0-10.0 en ratones, cuando ya se han formado los límites de restricción entre estas dos regiones. Esto hace pensar que la migración de la CM-MR se da por mecanismos diferentes a los involucrados en la dispersión temprana. En nuestros estudios obtuvimos evidencia que sugiere que esta migración es neurofílica (ver discusión de este punto más abajo).

Caracterización de la población de células TH de la CM-MR

La convergencia de las células TH⁺ de la CM-MR con la migración del LC nos hizo pensar que las células de la corriente migratoria mesencefálica podría tener un fenotipo noradrenérgico y que podría ser parte del LC. Sin embargo, nuestros resultados indican que esta población no expresa los marcadores que permiten identificar neuronas precursoras del LC como DBH, Phox2a, Phox2b y DCC. Estos marcadores, en cambio, confirmaron la identidad noradrenérgica de las células TH⁺ migratorias de la placa alar de la r1 que forman el LC (Fig. 16- 21). La información

obtenida para Phox2b, sin embargo, no es concluyente puesto que su expresión en el mesencéfalo se observó solamente en las regiones ventriculares cercanas a donde se detectaron las células TH. Es posible, entonces, que las células mitóticas precursoras de la población TH de la CM-MR expresen Phox2b antes de desplazarse a zonas piales del neuroepitelio tal y como sucede con los precursores del LC en r1. Esta posibilidad es consistente con observaciones hechas en embriones de ratón carentes de Phox2b en los que los núcleos catecolaminérgicos de la región rostral del rombencéfalo desaparecen por completo (Pattyn et al., 2000) incluyendo probablemente a las neuronas TH⁺ derivadas de la CM-MR. Sin embargo, a pesar de que no es posible descartar aún la posibilidad de que Phox2b se expresa en precursores de la CM-MR y de que sea requerido para su desarrollo, la falta de expresión de Phox2a, DBH y DCC en estas neuronas, indica claramente que su fenotipo no corresponde al fenotipo noradrenérgico de las neuronas del LC.

Por otro lado, el análisis de la expresión de TH y DBH en E13.0 reveló la presencia de poblaciones de células TH⁺/DBH⁻ ubicadas en regiones más caudales del rombencéfalo, así como en una región dorsal al LC (Fig. 18). En estudios previos se ha descrito, tanto en embriones como en adultos, la presencia de células TH⁺ carentes de DBH en varias regiones del tallo cerebral. Estas regiones corresponden al núcleo parabraquial, la porción dorsomedial del núcleo del tracto solitario, el núcleo motor dorsal del vago y la formación reticular a nivel de la médula (Ugrumov, 2009). De ellos, la localización del núcleo parabraquial coincide con el grupo de células TH⁺/DBH⁻ que observamos adyacente y dorsal al LC por lo que es posible que ese núcleo tenga su origen en las células TH⁺ de la CM-MR.

Identidad regional de la población TH⁺ de la CM-MR

En este estudio se ha demostrado la migración tangencial de neuronas TH que se desplazan desde una región morfogénicamente diferente a la región de su destino final, esto es, del mesencéfalo al rombencéfalo. Como se detalla en la introducción, se conocen casos de poblaciones neuronales que migran dentro de la misma vesícula primaria del cerebro en desarrollo así como de poblaciones que se desplazan de una vesícula cerebral a otra. Ejemplos de migraciones intravesiculares son los neuroblastos

precursores de las interneuronas GABAérgicas en el telencéfalo (Tamamaki et al., 1997), las neuronas precursoras de los núcleos dopaminérgicos A9-A10 en el mesencéfalo (Kawano et al., 1995) y las neuronas que forman el LC dentro del territorio de la r1 (Aroca et al., 2006). Ejemplos de migración inter-vesicular son las células glutamatérgicas que migran del diencéfalo a la amígdala (García-Moreno et al., 2010) y las células que van del pre-tálamo a la corteza medial (Zhao et al., 2008). En el caso de estas células que migran del diencéfalo al telencéfalo así como el de las interneuronas corticales (Denaxa et al., 2001), se ha demostrado que la expresión de genes que confieren identidad regional se mantienen durante su migración. Incluso, esta expresión permitió identificar a las neuronas en su destino final: las primeras expresan el factor de transcripción Otp (García-Moreno et al., 2010) mientras que las segundas expresan el factor Foxb2 (Zhao et al., 2008). En contraste con esos hallazgos, los estudios de la CM-MR revelaron cambios en la expresión de Otx2, un marcador mesencefálico; la mayoría de las células TH⁺ que se ubican en la región rostral de la corriente lo expresan (Fig. 23 y 24A), pero conforme se desplazan hacia zonas más caudales el número de células TH⁺ positivas a Otx2 disminuye a tal grado que justo antes de cruzar el istmo y en r1 todas las células de la corriente son Otx2⁻ (Fig. 24C). No conocemos cómo ocurre la inactivación de este gen pero esto podría ser una respuesta a las moléculas secretadas por el istmo que orquestan los patrones de desarrollo de esa región. Por otro lado, durante la ventana de tiempo en que ocurre la migración, las células del rombencéfalo expresan Gbx2, que es indispensable para el establecimiento del istmo y para el desarrollo de las estructuras cerebrales derivadas de esta región (Rhinn y Brand, 2001; Wurst y Bally-Cuif, 2001; Sunmonu et al., 2011). Como no se ha detectado expresión de Gbx2 en el mesencéfalo en numerosos estudios publicados, es muy probable que la CM-MR no exprese Gbx2. Es posible, sin embargo, que al cruzar hacia el rombencéfalo, y de manera concomitante a la inactivación de Otx2, activen la expresión de este marcador rombencefálico.

Posible mecanismo de migración neurofílica de la población TH⁺

Los análisis de la expresión de TH y β III-Tub en hemi-cerebros, en proyecciones ortogonales y en cortes histológicos muestran que las células TH⁺ de la CM-MR se encuentran en contacto con fibras del TmesV (Fig. 6B, Fig.25, Fig.26 y Fig.27). Esto se observó desde el estadio E11.0 en el cual se detectan las primeras células TH⁺ ubicadas en el mesencéfalo dorsal, y el tracto del TmesV ya ha proyectado hacia el núcleo trigémino, hasta estadios posteriores en los cuales se observa un gran número de células TH (E11.5 y E12.0). En el caso de las neuronas migratorias GnRHérgicas, una interacción similar refleja un mecanismo de migración neurofílica en la que los axones de las neuronas vomeronasales les sirven de sustrato en su trayecto de las placodas olfatorias al hipotálamo (Saghatelyan, 2009). De acuerdo con esto, nuestros resultados sugieren que las células TH⁺ de la CM-MR se desplazan hacia su destino final migrando sobre las fibras del TmesV. Estudios en los que se identifiquen las moléculas involucradas en esta interacción permitirían confirmar esta posibilidad.

Nuestros hallazgos acerca de las células TH⁺ en migración del mesencéfalo al rombencéfalo, así como los de otros estudios a los que se ha hecho referencia en este trabajo, revelan que la migración tangencial ocurre en todas las vesículas primarias del cerebro en desarrollo. Existen migraciones intravesiculares e intervesiculares. En algunos casos se mantiene la expresión de los marcadores de identidad regional, pero en el de la CM-MR descrita en nuestro estudio y quizás en otros aún no estudiados, se cambia su expresión. Algunas neuronas usan axones como sustrato para su migración y otras siguen mecanismos distintos. Todos estos estudios, sin embargo, muestran la diversidad de estrategias que se dan en la migración tangencial y nos permite suponer que es un fenómeno muy frecuente durante el desarrollo del cerebro que subyace su formación e integración funcional.

El conocer a fondo los mecanismos de inicio, mantenimiento y fin de la migración de las neuronas catecolaminérgicas que van del mesencéfalo al rombencéfalo, nos permitiría abordar el estudio de su relevancia funcional en la formación de circuitos neuronales y conocer cómo las alteraciones en esos procesos pueden contribuir a desórdenes neuronales en humanos.

IX. CONCLUSIONES

Estos estudios revelaron en embriones de rata de los estadios E11.0-12.0 la existencia de una corriente de células migratorias del mesencéfalo al rombencéfalo (CM-MR), la cual se compone de células TH⁺ aunque entre ellas se detectó también la presencia de otra población de células migratorias que no expresan TH.

Las células TH⁺ se encuentran distribuidas a lo largo del eje AP del mesencéfalo dorsal por encima del sulcus limitans, cuyo límite rostral es el borde entre el mesencéfalo con el diencefalo y su extremo caudal se encuentra en la r1 en el rombencéfalo.

Los resultados de este trabajo revelan que las células TH⁺ de la CM-MR no tienen un fenotipo noradrenérgico ya que no expresan ninguno de los marcadores específicos analizados por lo que se descarta que sean parte del LC.

A diferencia de la mayoría de los casos de migración estudiados hasta el momento, los estudios de la CM-MR revelaron cambios en la expresión de un marcador de su territorio de origen, Otx2, que se inactiva durante la migración al rombencéfalo. Los resultados muestran que las células TH están en contacto con fibras del TmesV por lo que se propone que el desplazamiento de estas células migratorias es a través de un mecanismo neurofílico que involucra interacción con los axones del TmesV.

X. FIGURAS Y PIE DE FIGURAS

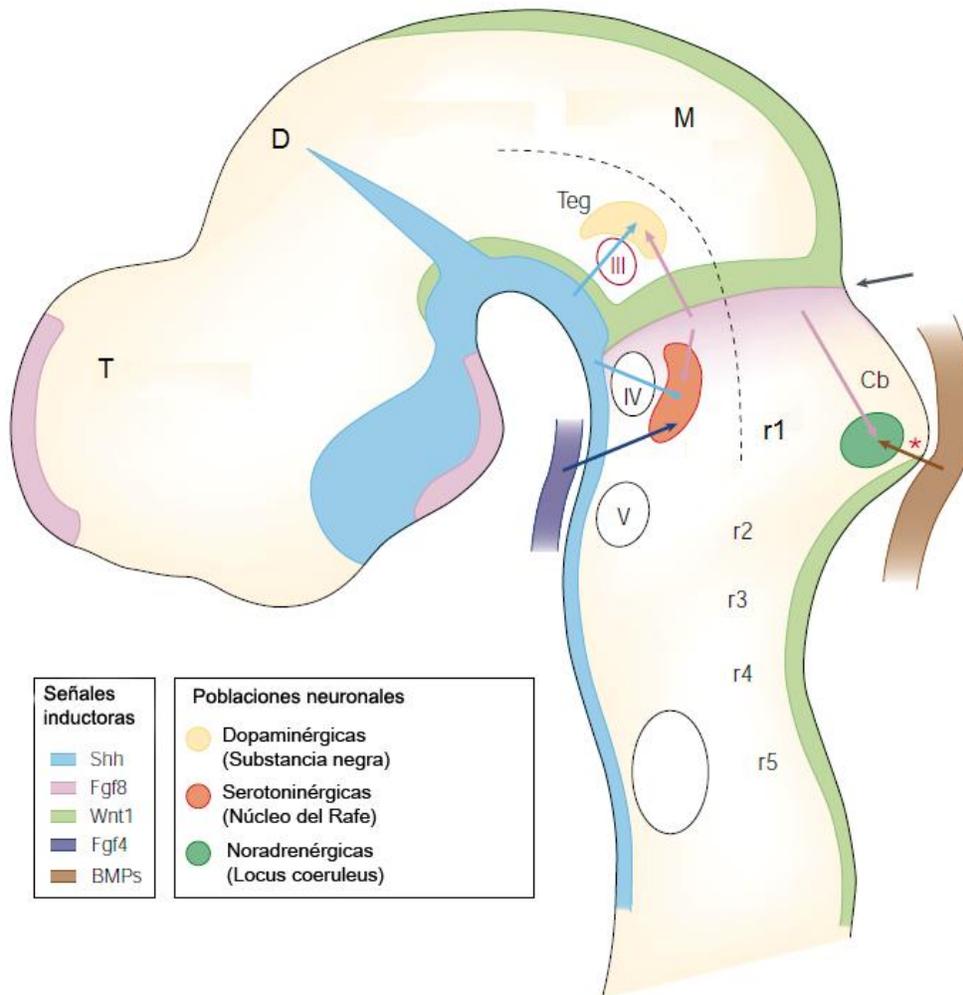


Figura 1. La interacción entre diferentes señales inductoras (morfógenos) definen el patrón de regionalización anteroposterior y dorsoventral y especifica la identidad de diferentes grupos neuronales. Fgf8 se secreta en el organizador del istmo, Shh en la placa del piso, Fgf4 en el mesodermo anterior, los miembros de la familia BMP del ectodermo dorsal no neural y Wnt en la parte dorsal del neuroectodermo. Las neuronas DA del mesencéfalo ventral responden a la señal de Fgf8 y Shh. Las neuronas serotoninérgicas responden a una combinación de Fgf4, Shh, y Fgf8. Las neuronas NA del Locus coeruleus requieren de Fgf8 y BMP4. (BMP, proteína morfogénica del hueso; Cb, cerebelo; Fgf8, factor de crecimiento fibroblástico;

M, mesencéfalo; r, rombómera; Shh, sonic hedgehog; Teg, tegmentum; T, telencéfalo.
Modificado de Wurst and Bally-Cuif, 2001).

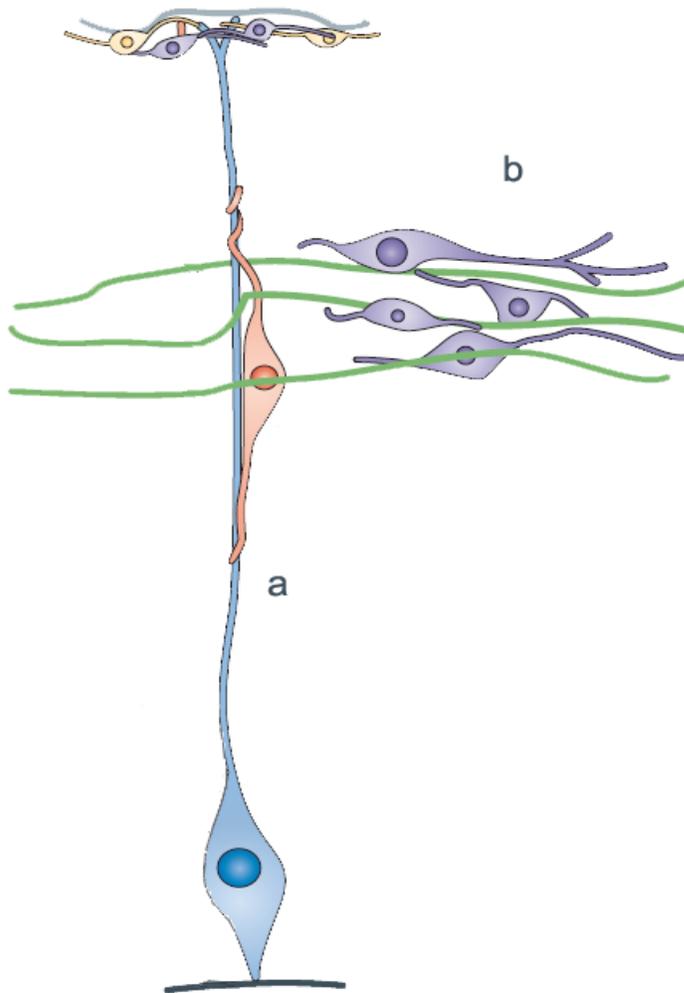


Figura 2. Migración radial y migración tangencial de neuronas en el desarrollo embrionario. A) En la migración radial la neurona (roja) se encuentra en estrecha aposición al proceso de la glía radial (azul). **B)** En zonas intermedias o marginales las neuronas que migran de forma tangencial (moradas) utilizan diversos sustratos como las fibras de otras neuronas (color verde), neuronas de la zona marginal (amarillas) o la membrana pial (gris). Modificado de Ghashghaei et al., 2007.

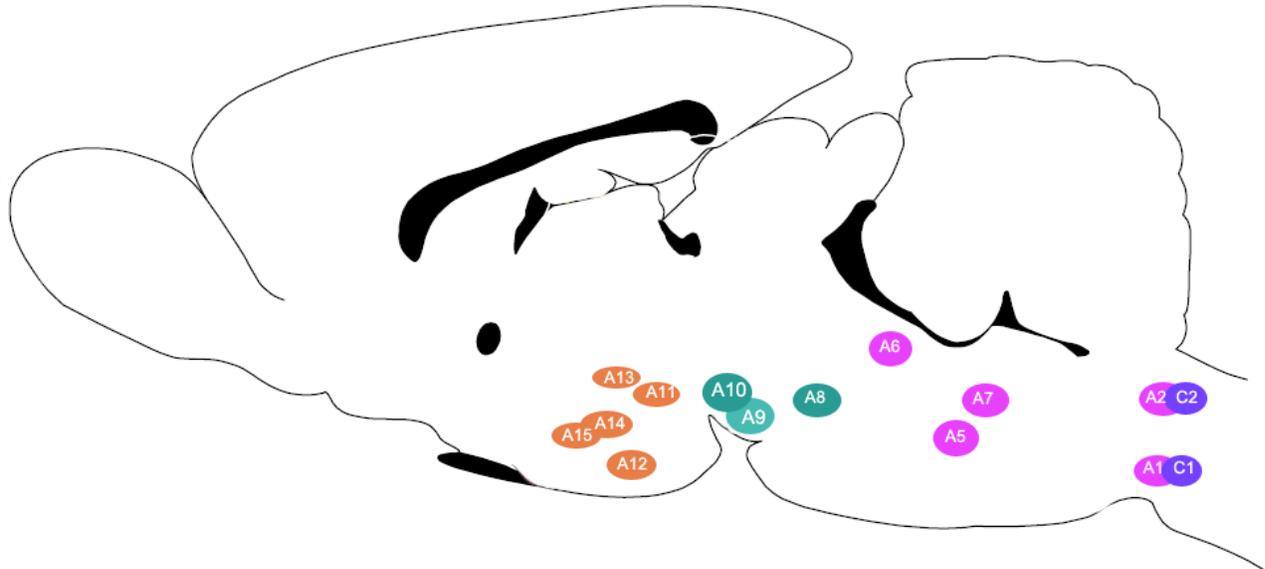


Figura 3. Localización de los diferentes grupos catecolaminérgicos en el cerebro de rata adulto. Las neuronas dopaminérgicas de los grupos A12 y A14 se localizan a lo largo de la pared del tercer ventrículo en el hipotálamo; mientras que A11 y A13 se encuentran en la zona incerta del hipotálamo. En el tallo cerebral se localizan las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (A9), del área retrorubral (A8) y del área tegmental ventral (A10). Las NCAs en la médula dorsal (A2, noradrenérgico y C2, adrenérgico) forman parte del núcleo del tracto solitario. En el bulbo raquídeo ventrolateral (A1, noradrenérgico y C1, adrenérgico) se localizan cerca del núcleo ambiguo. En la protuberancia se encuentran los núcleos noradrenérgicos A5, A7 y A6, que corresponde al LC. No se muestra el núcleo A16 del bulbo olfatorio así como las neuronas DA de la retina (Modificado de Kandel, 2000).

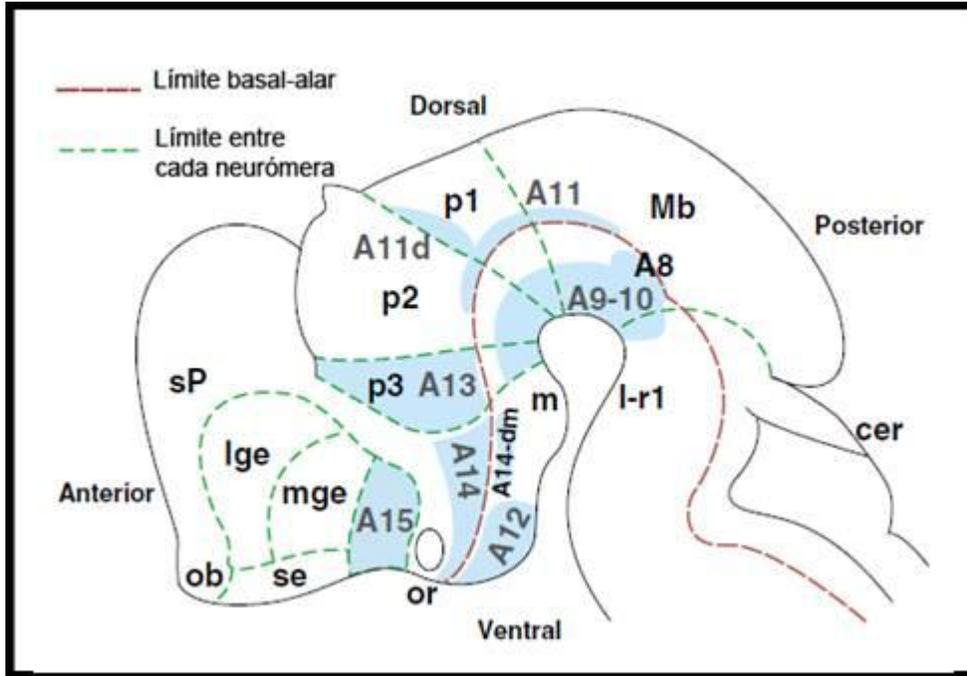


Figura 4. Neuronas dopaminérgicas en el SNC. La ilustración señala la localización de neuronas positivas a TH, correspondientes a los grupos A8-15, en embriones de ratón de días E12.5-E14.5. Los grupos DA son representados en relación a un mapa de neurómeras propuesto por (Puelles y Rubenstein, 2003) y en la subdivisión alar y ventral (el surco limitans). cer, cerebellum; d, dorsal; dm, dorsomedial; l-r1, región del itsmo; lge, eminencia ganglionar lateral; Mb, mesencéfalo; mge, eminencia ganglionar medial; ob, bulbo olfatorio; or; entrada óptica; p, prosómera; sP, prosencefalo secundario.

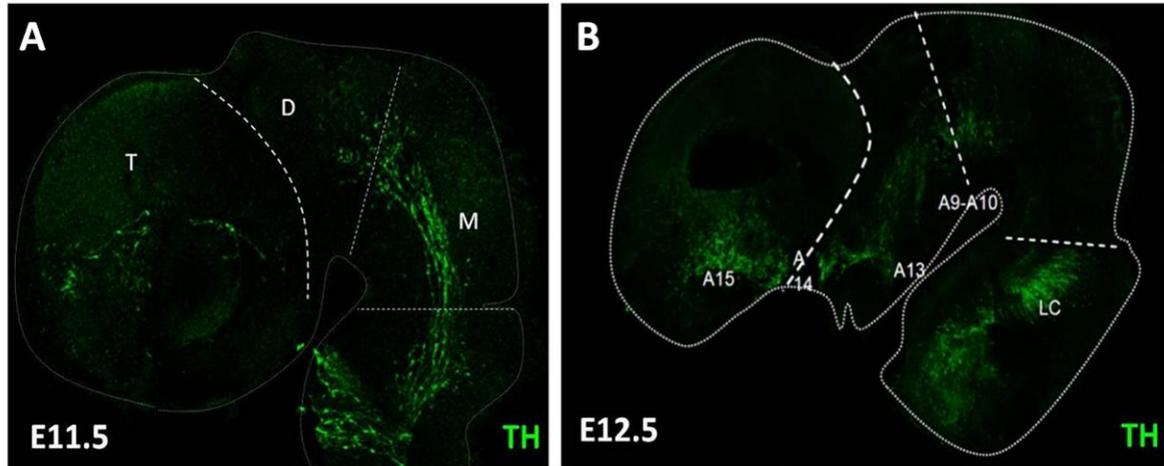


Figura 5. Expresión de neuronas TH⁺ en el mesencéfalo dorsal de neuroepitelio completo de embrión de rata. Micrografías confocales donde se observa en A) células TH⁺ en embrión E11.5 en el mesencéfalo dorsal así como el inicio de la aparición de los núcleos dopaminérgicos A9-10 en el mesencéfalo ventral. B) en embriones E12.5 las células TH⁺ del mesencéfalo dorsal desaparecen, posiblemente migran hacia el Locus coeruleus, mientras que los núcleos A9-10 continúan en proceso de desarrollo. T, telencéfalo; D, diencéfalo; M, mesencéfalo; MD, mesencéfalo dorsal; MV, mesencéfalo ventral; LC, Locus coeruleus. Experimentos y fotos tomadas por García-Peña CM.

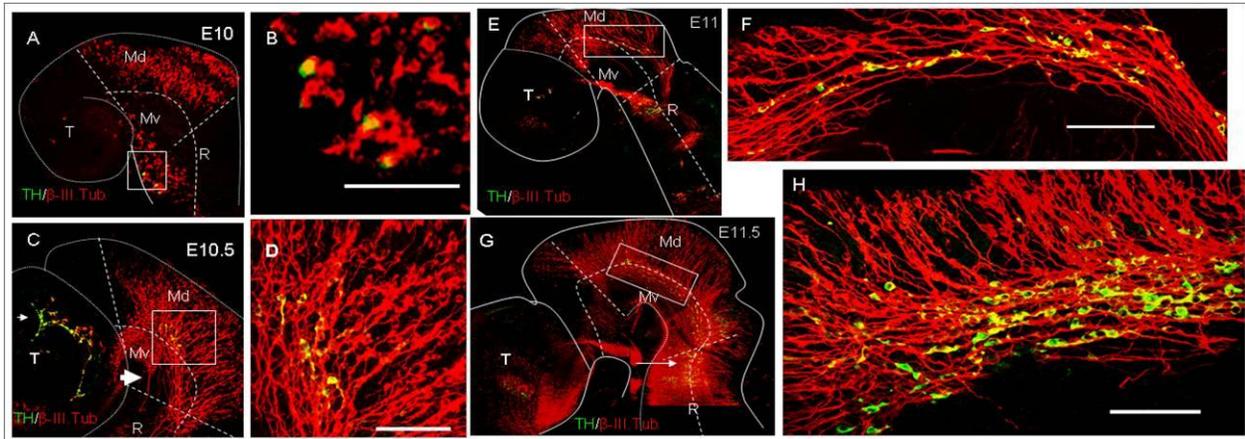


Figura 6. Neuronas TH⁺ asociadas al tracto del TmesV. Micrografías confocales de neuroepitelios completos de embriones de rata doblemente inmunoteñidos para TH (verde) y β-III-Tub (rojo). En **A)** se observa una vista panorámica lateral de la expresión de neurona TH⁺ en la zona ventral del mesencéfalo en el estadio 10 (no sabes si son inmaduras, por otro lado no se observan en A TH⁺ en la zona dorsal), el recuadro indica la zona de magnificación mostradas en B). **C)** Expresión de neuronas TH⁺ en la zona dorsal del mesencéfalo en el estadio 10.5. La proyección del TmesV, identificada por β-II-Tub, comienza a agruparse en fascículos sobre los cuales se observan las neuronas TH⁺. **D)** Magnificación del recuadro mostrado en C, donde se observan neuronas TH⁺ en el TmesV. **E)** Se observa el TmesV agrupado y las neuronas TH⁺ que se disponen sobre este tracto con una morfología alargada que supone migración [que atraviesa el límite del istmo llegando al romboencéfalo]. **F)** Magnificación del recuadro mostrado en E donde se observa la orientación de células TH en la misma dirección que los fascículos Tub⁺ del TmesV, con procesos celulares dirigidos hacia la parte caudal. **G)** En E11.5 se observa una gran concentración de neuronas TH⁺ en forma de corriente (stream) formando un continuo con las células del LC (flecha). **H)** Magnificación de G, se observa mayor cantidad de neuronas TH⁺. Barra de calibración 100μm. Experimentos y fotos tomadas por García-Peña, CM.

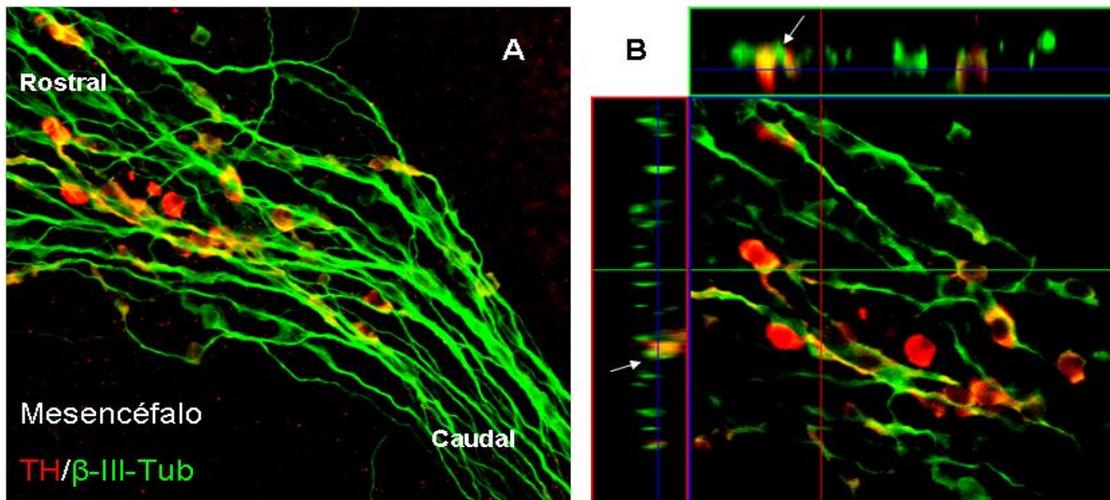


Figura 7. Interacción de TmesV con neuronas TH+ en migración. Micrografías confocales obtenidas de neuroepitelio completos de embrión de rata doblemente inmunoteñidos para B-III-Tub y TH. **A)** Se observan fibras del TmesV B-III-Tub⁺ colocalizando con neuronas TH⁺ en la zona del mesencéfalo. **B)** Proyección ortogonal de secciones de 20µm de ancho total, obtenidas en el plano Z, las flechas muestran las zonas de interacción de neuronas TH⁺ con fibras β-III -Tub⁺ Experimentos y fotos tomadas por García-Peña CM.

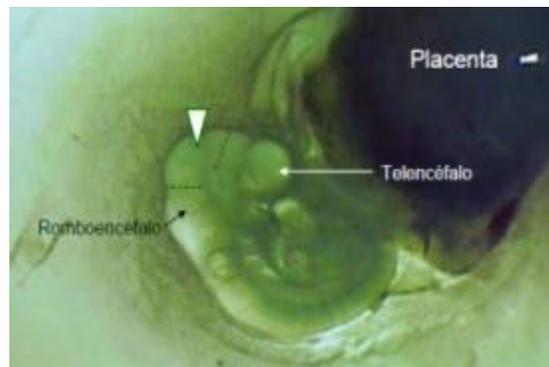


Figura 8. Inyecciones de CFDA en embriones de rata E11.5 cultivados. Micrografía obtenida bajo el microscopio estereoscópico que muestra un embrión recién extraído del útero de la madre el cual será cultivado 24h. La cabeza de flecha blanca señala el mesencéfalo en donde se realizaron las inyecciones con CFDA.

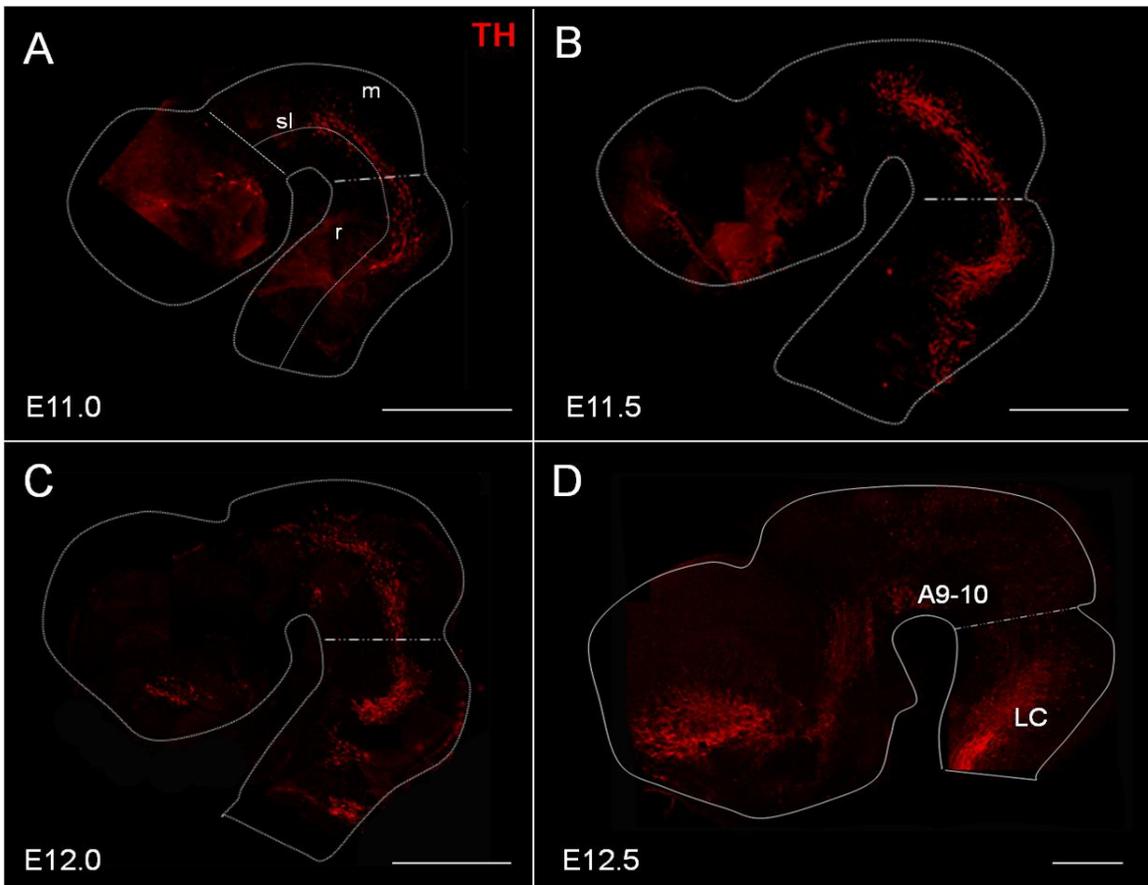


Figura 9. Expresión transitoria de TH en una población de células distribuidas a lo largo del mesencéfalo hasta la r1 en diferentes estadios de desarrollo embrionario. A) Vista panorámica de un hemineuroepitelio en E11.0 donde se observan las primeras células TH ubicadas por encima del sulcus limitans (línea media señalada como sl) a lo largo del MD, la región del istmo y parte de la r1. **B)** En E11.5 continúa la expresión de TH en las regiones ya mencionadas, además se observan las primeras células TH de la placa alar de la r1 correspondientes al primordio del LC. **C)** En E12.0 comienzan a surgir las primeras células TH+ del MV y de los demás núcleos dopaminérgicos de regiones más rostrales, mientras que disminuye el número de células TH+ de la población dorsal observada desde E11.0. **D)** En E12.5 es más notoria la expresión de TH en los sitios de origen de los clásicos núcleos dopaminérgicos y noradrenérgicos. Desaparece la expresión de TH en regiones dorsales del mesencéfalo así como en el istmo. La línea punteada señala la región del Istmo. Barra de calibración 500 μ m.

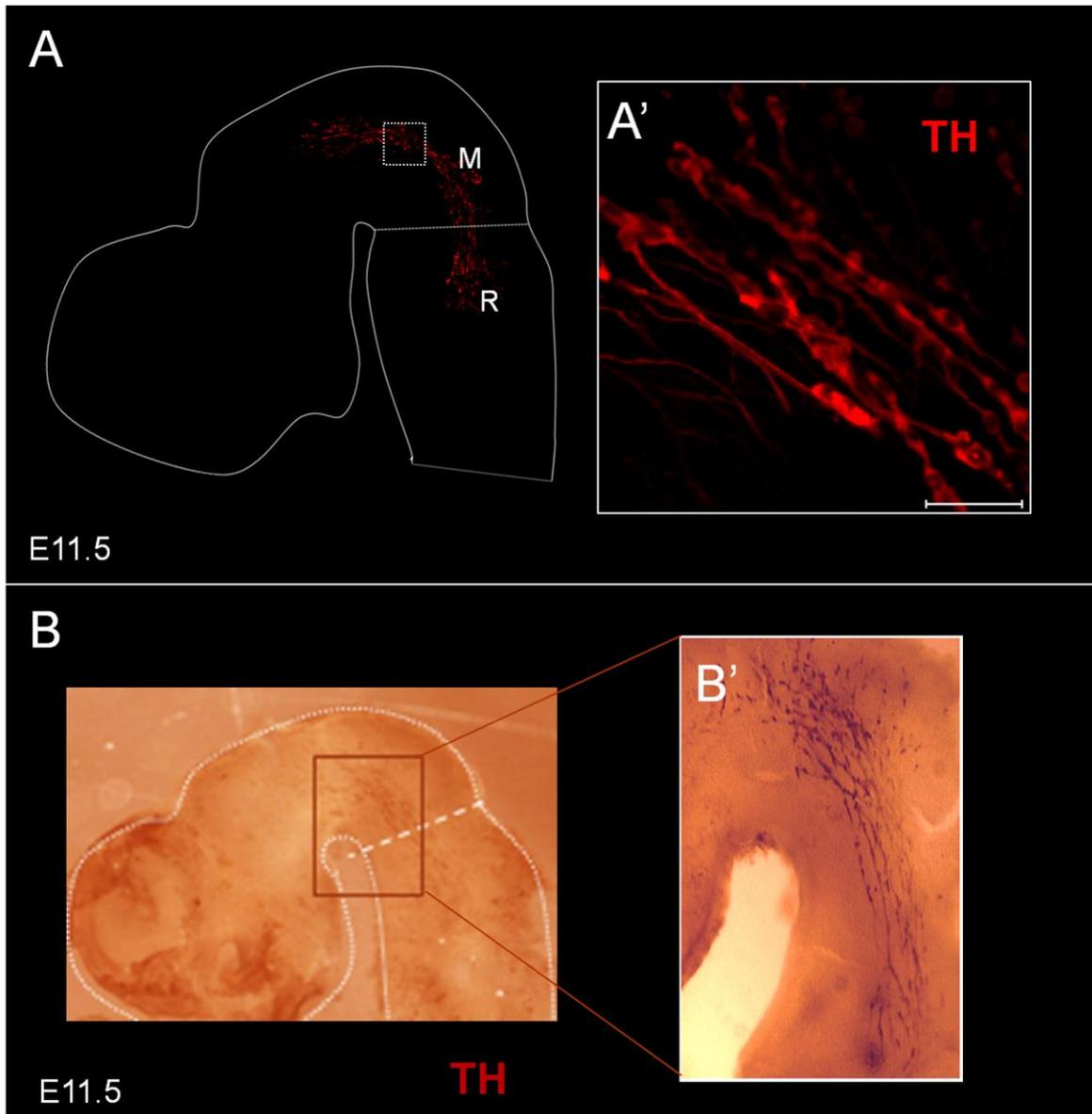


Figura 10. Identificación de la población de células TH+ utilizando otros métodos.

A) Células TH⁺ en el mesencéfalo dorsal y en el rombencéfalo en un embrión E11.5. Se usó un anticuerpo diferente al de los trabajos anteriores, esta vez hecho en oveja. **B)** Neuroepitelio completo visto en campo claro, en donde se observa el mismo fenómeno de células TH⁺ en el mesencéfalo. Para visualizar a estas neuronas se utilizó un anticuerpo acoplado a peroxidasa y no se disectó el neuroepitelio. B') Magnificación de B, se observa las células TH⁺ con el proceso en dirección hacia zonas caudales del neuroepitelio, cruzando aparentemente la zona del istmo. Barras de calibración 50μm.

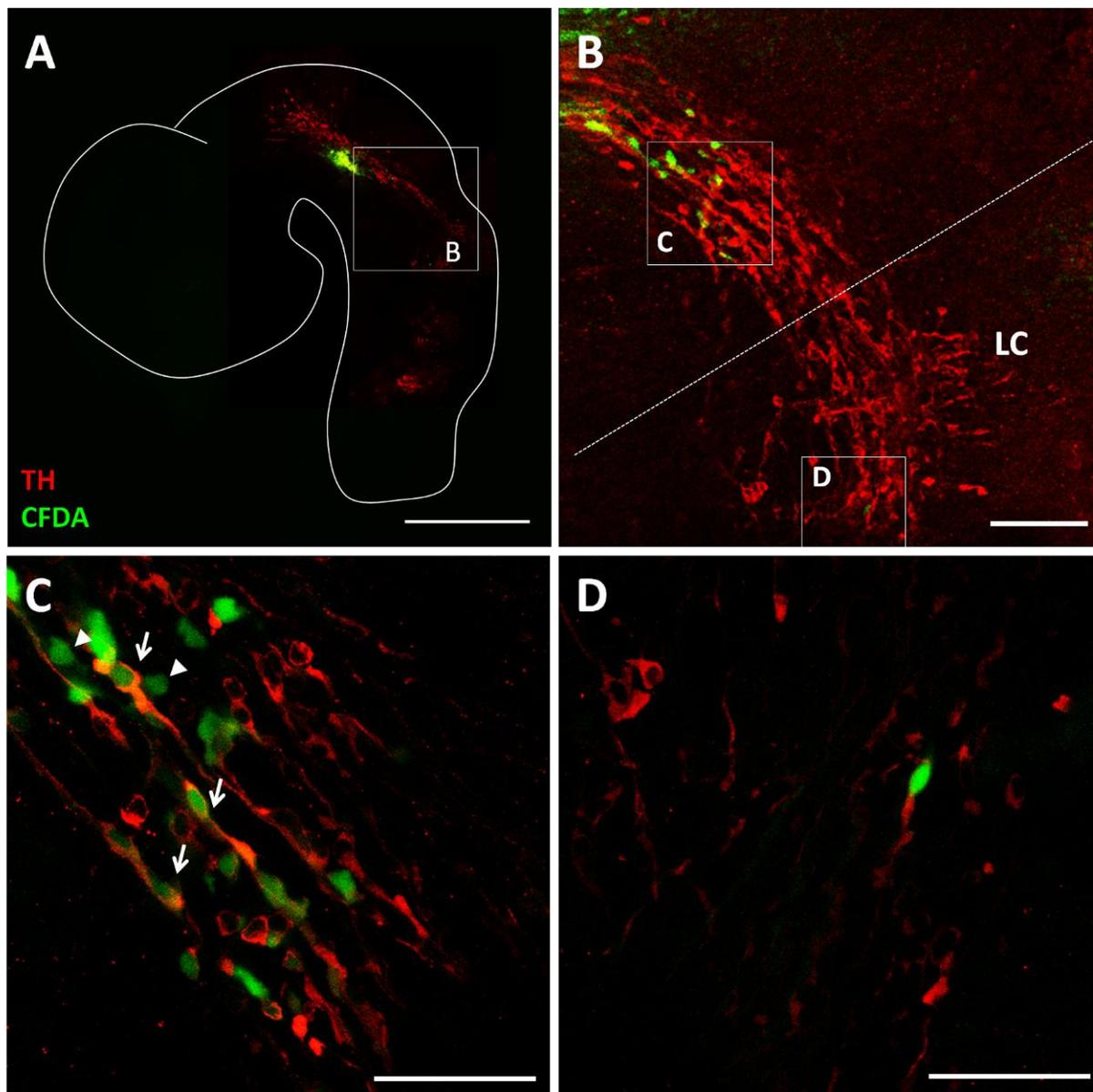


Figura 11. Migración de células TH⁺ del mesencéfalo dorsal. **A)** Sitio de inyección en el mesencéfalo en un embrión E11.5 que fue cultivado 28 h. La inyección fue en el mesencéfalo dorsomedial. Barra de calibración 500 μ m. **B)** Células CFDA⁺ desplazadas del sitio de inyección, localizadas en zonas posteriores del MD. **C)** Acercamiento de B) en donde se aprecia que hay varias células CFDA⁺/TH⁺ (flechas largas), así como células CFDA⁺/TH⁻ (cabezas de flecha). **D)** Acercamiento de la célula CFDA⁺/TH⁺ localizada en la r1 en la ruta de migración de las células TH⁺ que formarán parte del LC. Barra de calibración 50 μ m.

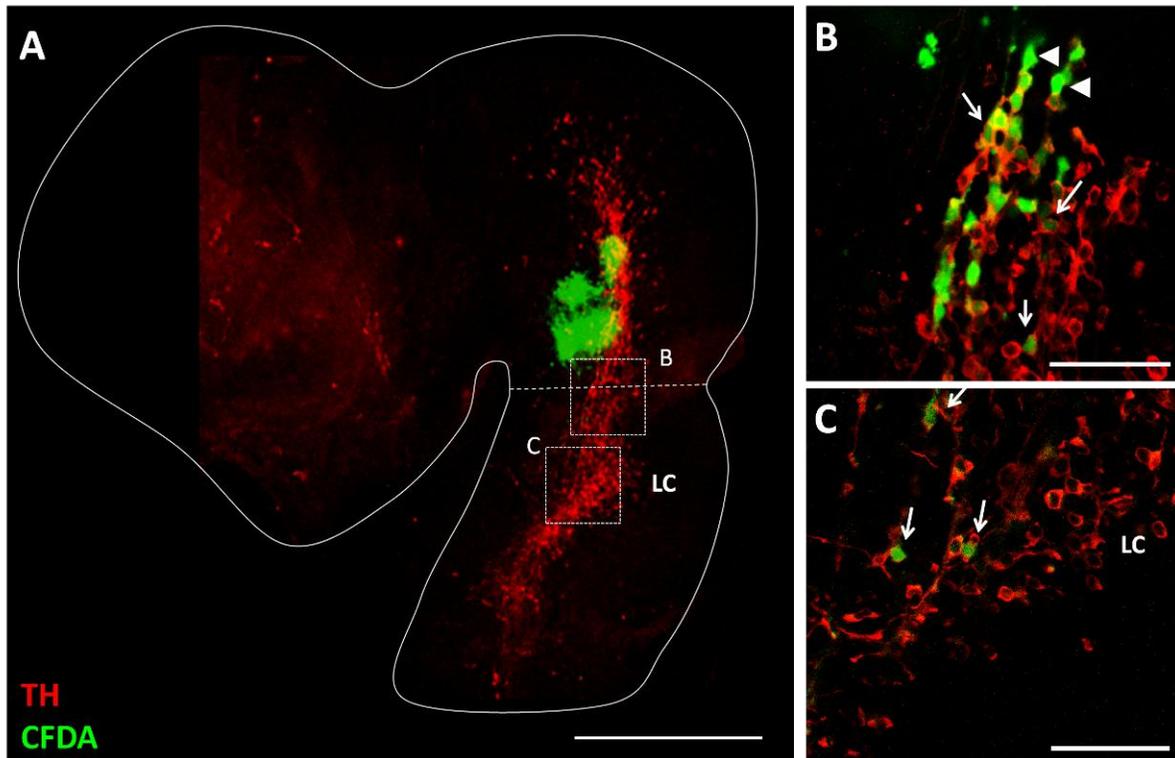


Figura 12. La migración de células TH⁺ del mesencéfalo se incorpora a la migración del LC. A) Sitio de inyección con CFDA en el mesencéfalo en embrión de E11.5 con un período de incubación de 26 h. La inyección se realizó en el mesencéfalo posterior. Barra de calibración 500 μ m. **B)** Células CFDA⁺/TH⁺ localizadas en la zona del istmo y en el rombencéfalo anterior.. **C)** Células CFDA⁺/TH⁺ (flechas) de la CM-MR convergen con la migración de las células TH⁺ del LC. Barra de calibración 50 μ .

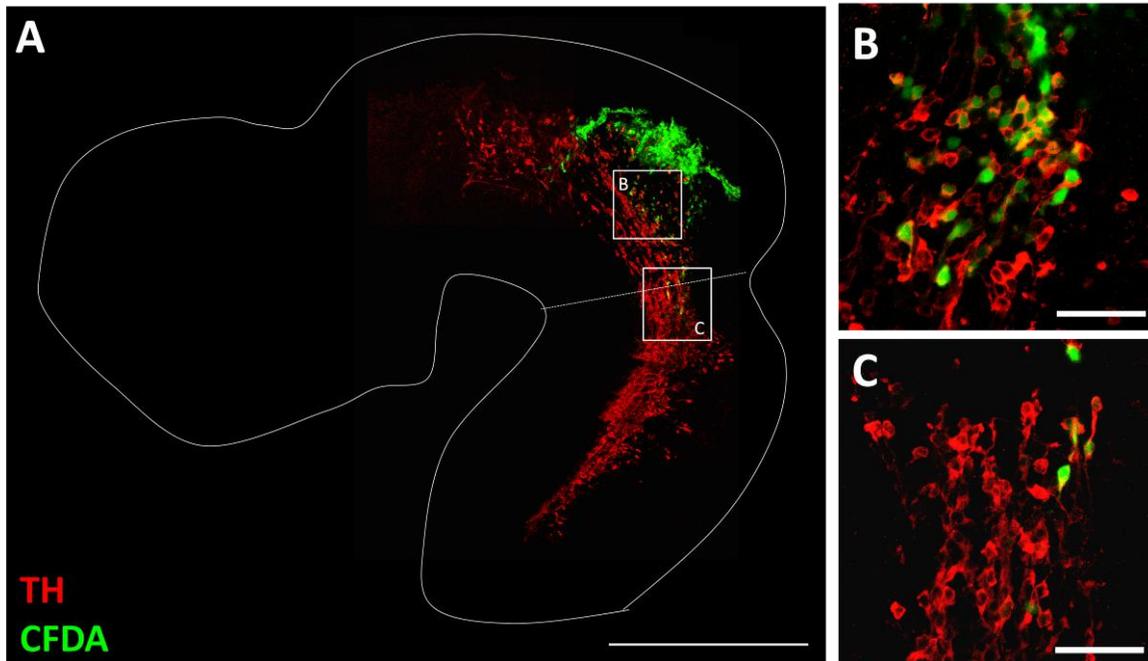


Figura 13. Células CFDA/TH⁺ provenientes de zonas más dorsales del mesencéfalo. **A)** Sitio de inyección en el mesencéfalo en un embrión E11.5 que fue cultivado 24h. A diferencia de los cultivos anteriores, la inyección se realizó en zonas más dorsales del mesencéfalo. Barra de calibración 500 μm . **B)** Células CFDA⁺ desplazadas del sitio de inyección, localizadas en la corriente continua de células TH⁺ del mesencéfalo dorsal, algunas de ellas colocan con CFDA y TH. **C)** Células CFDA⁺/TH⁺ ubicadas en la corriente de células TH que se observan en la zona del istmo y en la parte anterior de r1. Barra de calibración 50 μm

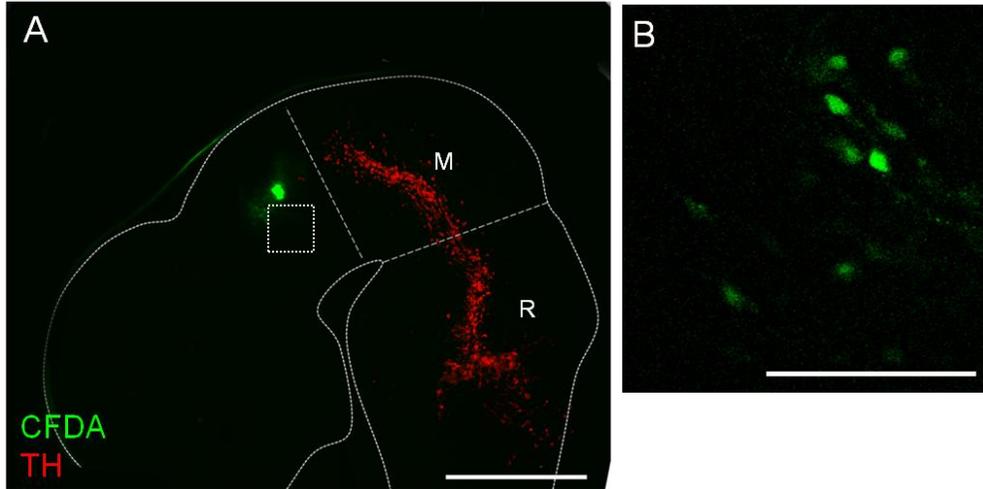


Figura 14. Marcaje CFDA en el diencefalo. (A) En embriones E11.0 se hicieron marcajes en la región del diencefalo. No se observó células CFDA⁺ en formación continua hacia zonas posteriores como en los marcajes anteriores realizados en el mesencefalo. (B) Células marcadas con CFDA localizadas en el diencefalo. Barra de calibración 100 μ .

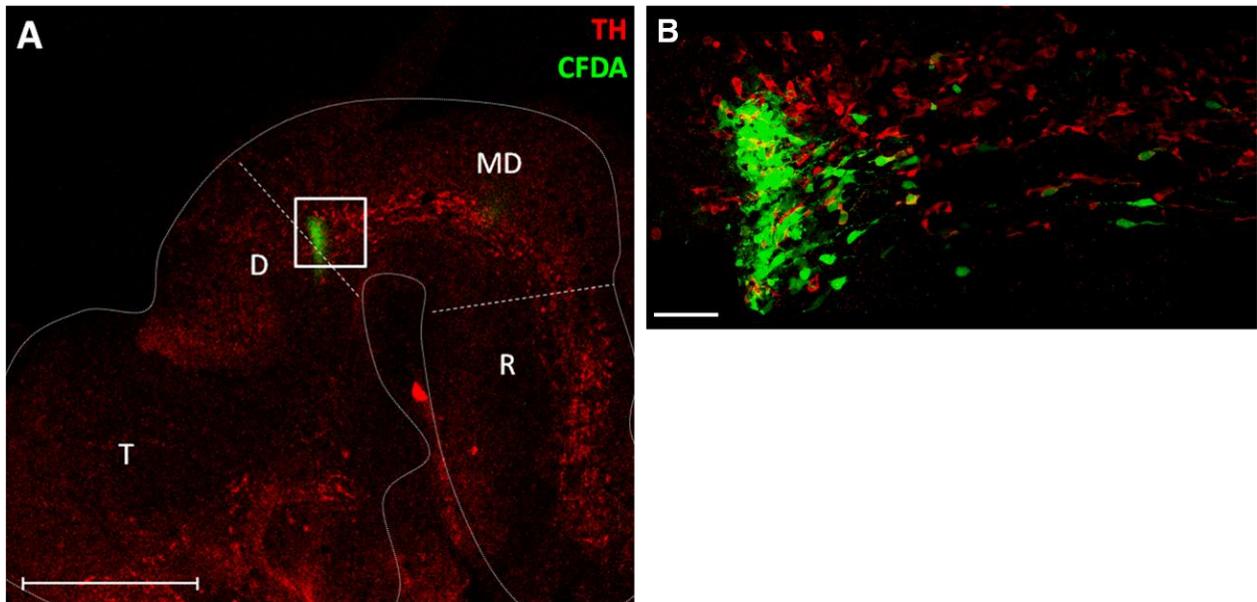


Figura 15. Inyección de CFDA en el límite entre el diencefalo y mesencefalo marca células CFDA⁺/TH⁺. A) Panorámica del sitio de inyección de CFDA, se puede apreciar también la corriente de células TH del mesencefalo dorsal. B) Magnificación de A, en donde se puede apreciar las primeras células TH⁺ de la corriente migratoria ubicadas

en la aparte anterior del mesencéfalo. Algunas células CFDA⁺ colocalizan con TH. Barra de calibración 100 y 50 μ .

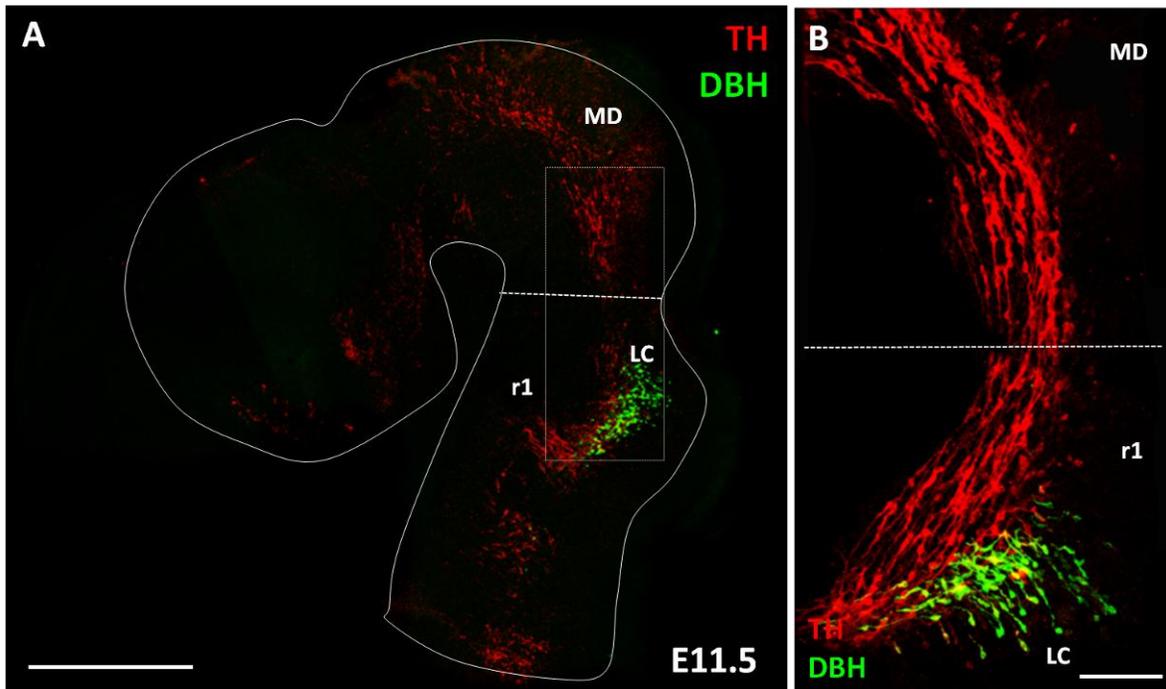


Figura 16. Las células TH⁺ migratorias del mesencéfalo dorsal no expresan DBH.

A) Panorámica de un neuroepitelio de E11.5 en el que se observa el cruce de las células TH⁺ migratorias por la zona del istmo y también se puede apreciar células DBH⁺ en migración dentro de la r1. Barra de calibración 500 μ m. **B)** Las células TH⁺ provenientes del MD no colocalizan con DBH. En cambio, las células que migran desde la placa alar a la placa basal dentro de la misma r1 son TH⁺/DBH⁺; estas células posteriormente formarán el núcleo A6 o LC. Barra de calibración 100 μ m.

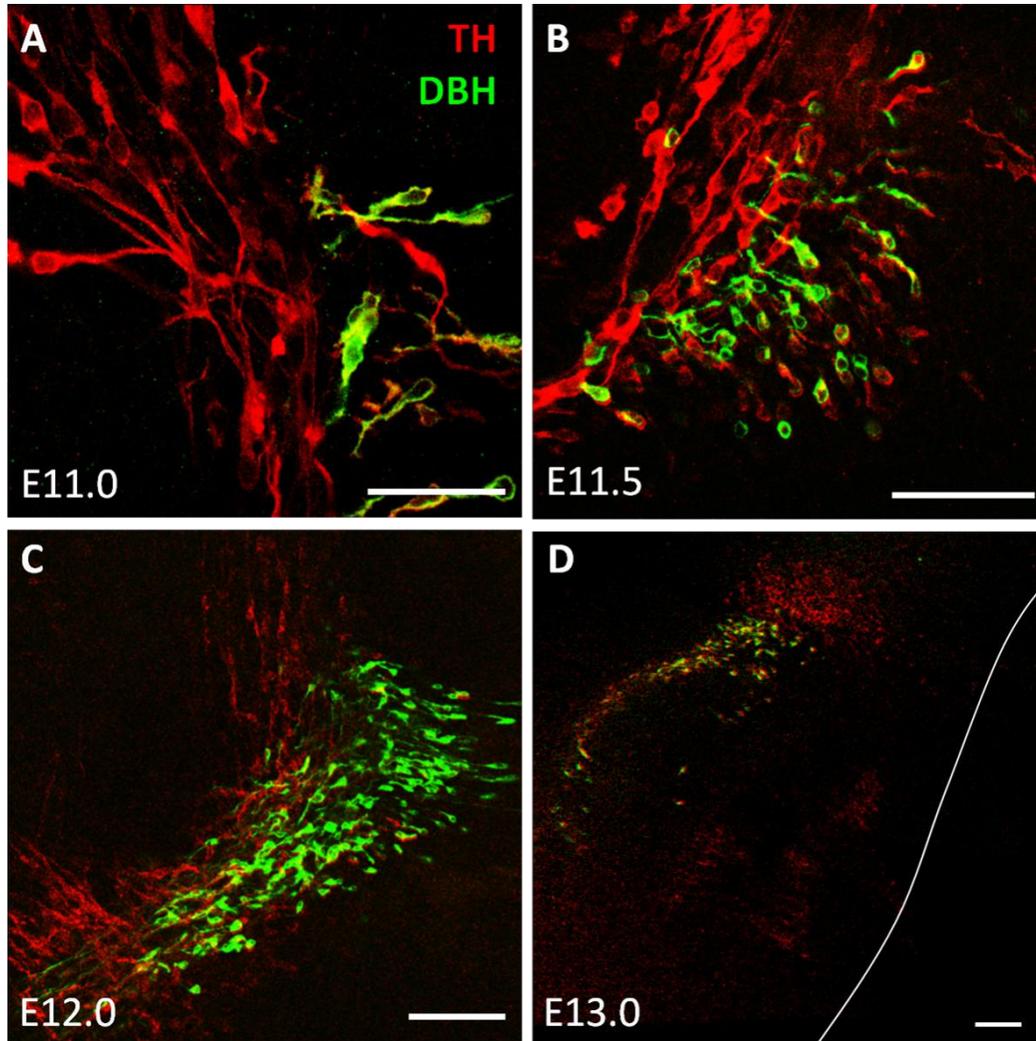


Figura 17. Células TH⁺/DBH⁻ provenientes del mesencéfalo dorsal atraviesan en la zona del istmo para incorporarse a la corriente migratoria de células DBH⁺ de la r1. A) A partir del estadio E11 se observa en la r1 el flujo de las TH⁺ provenientes del MD, en dónde también se puede apreciar las primeras células DBH⁺ que migran desde la placa alar hacia la placa basal dentro de la misma r1. **B)** y **C)** Misma zona de la r1 pero en estadios más posteriores, E11.5 y E12 respectivamente. Todavía pueden observarse las TH⁺ provenientes del MD, además de un aumento de células DBH⁺ migratorias. **D)** En E13 ya no se observa TH⁺ en el MD ni en la zona del istmo, sin embargo en la r1 se puede observar células DBH⁺/TH⁺ y células que son sólo TH⁺. Barra de calibración 50 μ.

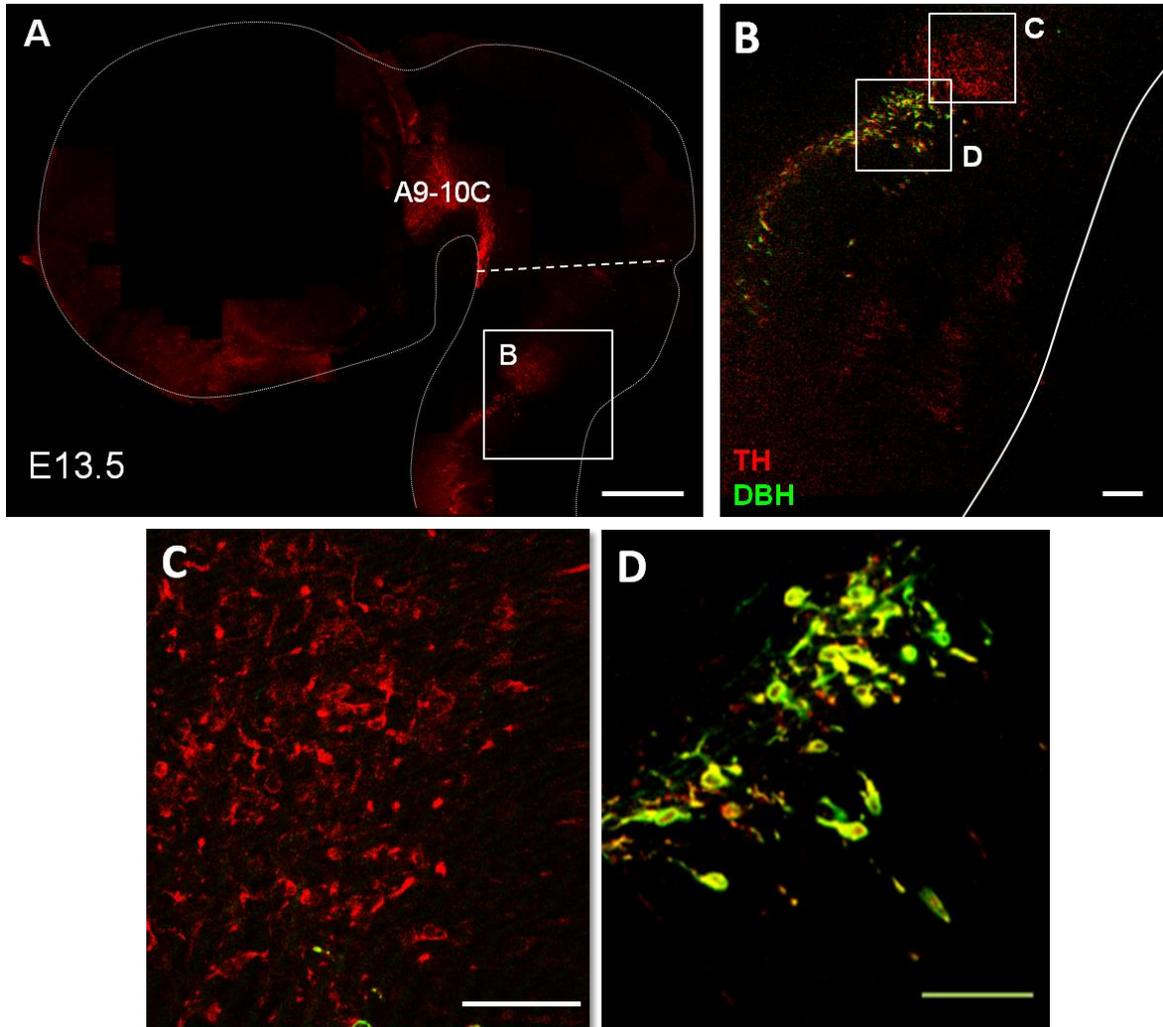


Figura 18. Población de células TH⁺/DBH⁻ en la r1 en E13. **A)** Panorámica de un embrión E13 en donde puede apreciarse células TH⁺ en la r1. Barra de calibración 500 μm. **B)** Magnificación de la r1 en donde se ubica el LC. Se puede apreciar la presencia de células TH⁺/DBH⁺ así como de células TH⁺/DBH⁻. Neuronas DBH⁺/TH⁺ posicionándose en su lugar de destino en dónde se formará el LC. **C)** Células TH⁺/DBH⁻ localizadas “por encima” de la población DBH⁺/TH⁺. **D)** Células DBH⁺/TH⁺ que conformarán el LC. Barra de calibración 50 μ.

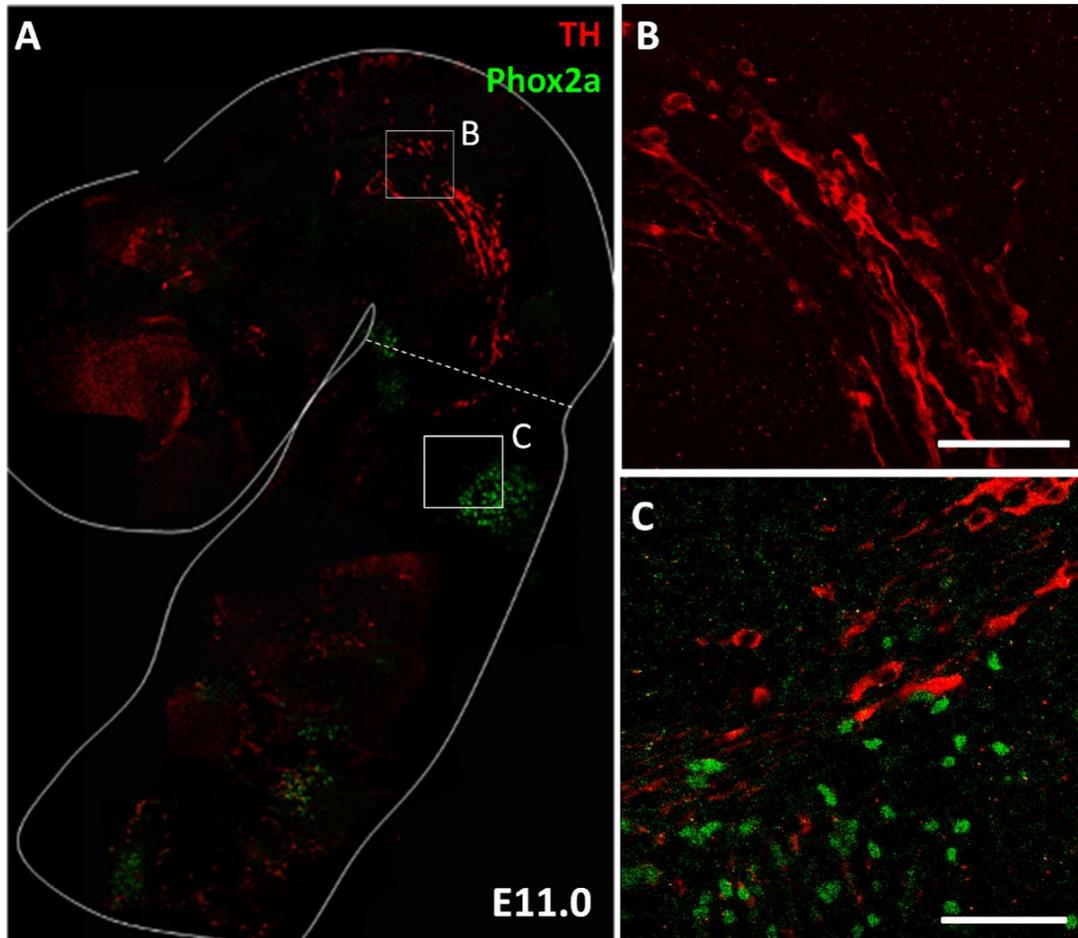


Figura 19. Las células migratorias TH⁺ del mesencéfalo dorsal no expresan Phox2a. **A)** Neuroepitelio de un embrión E11.5 con células TH⁺ y Phox2a⁺. **B)** Células TH⁺ migratorias provenientes del MD no colocalizan con Phox2a. **C)** La señal Phox2a⁺ puede observarse en la r1 y en zonas más caudales del rombencéfalo, posiblemente son células predecesoras de neuronas noradrenérgicas. Barra de calibración 50μ.

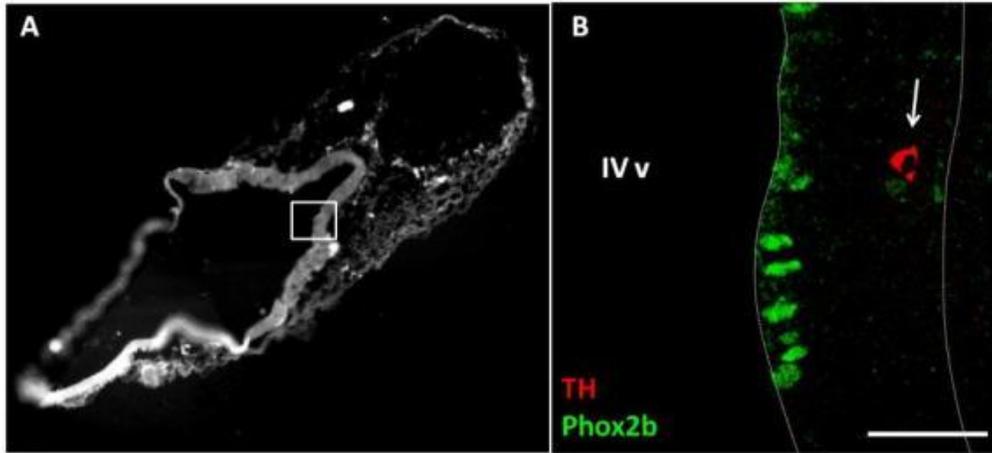


Figura 20. Expresión de Phox2b en la r1. A) Corte coronal que representa a la r1. **B)** Micrografía de A), en dónde se puede observar células Phox2b⁺ en la zona ventricular de la r1, así como células TH⁺ en la zona más pial. No se observó expresión de Phox2b en zonas no ventriculares, lo que nos indica que las células post-mitóticas dejan de expresar Phox2b. Barra de calibración 50μ.

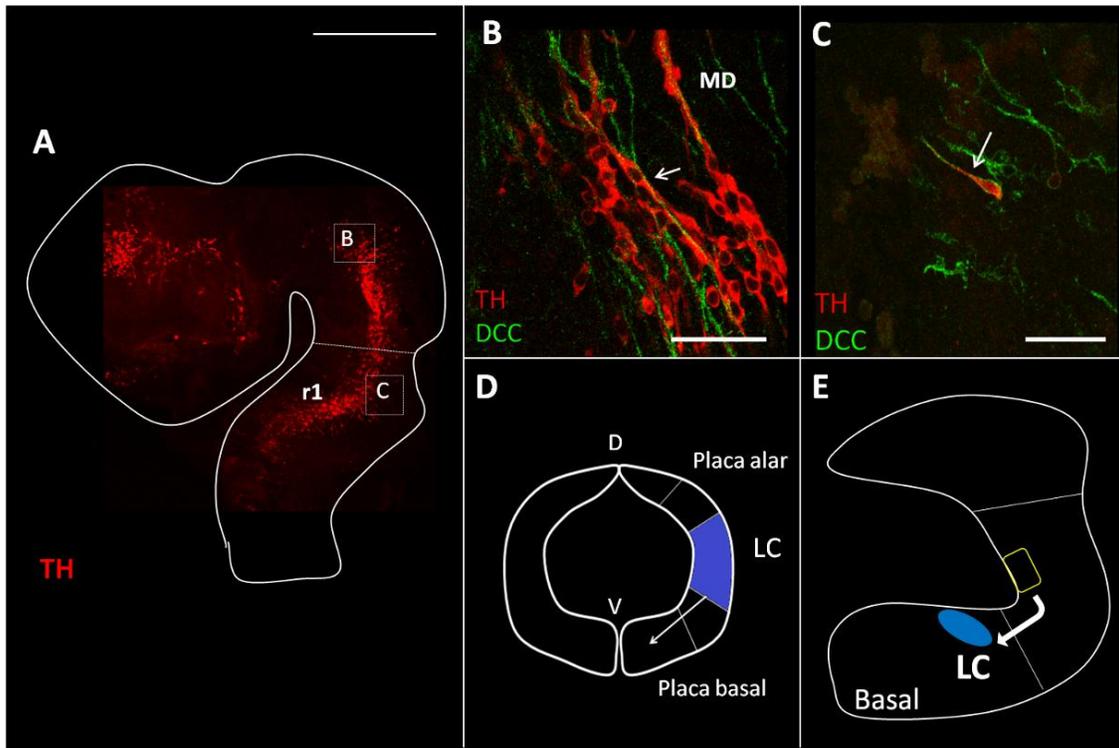


Figura 21. Las células TH⁺ migratorias del mesencéfalo dorsal son adyacentes a fibras DCC. A) Panorámica de un neuroepitelio de embrión E11.5 en donde se indica la

presencia de células TH⁺ en el mesencéfalo y rombencéfalo. Barra de calibración 500 μm. **B)** Las neuronas TH⁺ del MD no son positivas a DCC, pero son adyacentes a fibras DCC⁺. Presuntamente las fibras DCC⁺ corresponden a proyecciones del TMeV. **C)** Células TH⁺ en la r1 que formarán el LC colocalizan con DCC. **D)** Representación de un corte transversal a nivel de la r1 en donde se muestra en la placa alar el sitio de origen del LC en E11.0. **E)** Representación de un corte transversal de la r1 en donde se muestra el sitio final de las células que conforman el LC en E13.5. (Aroca et al., 2006). D, dorsal; V, ventral. Barra de calibración 50 μm.

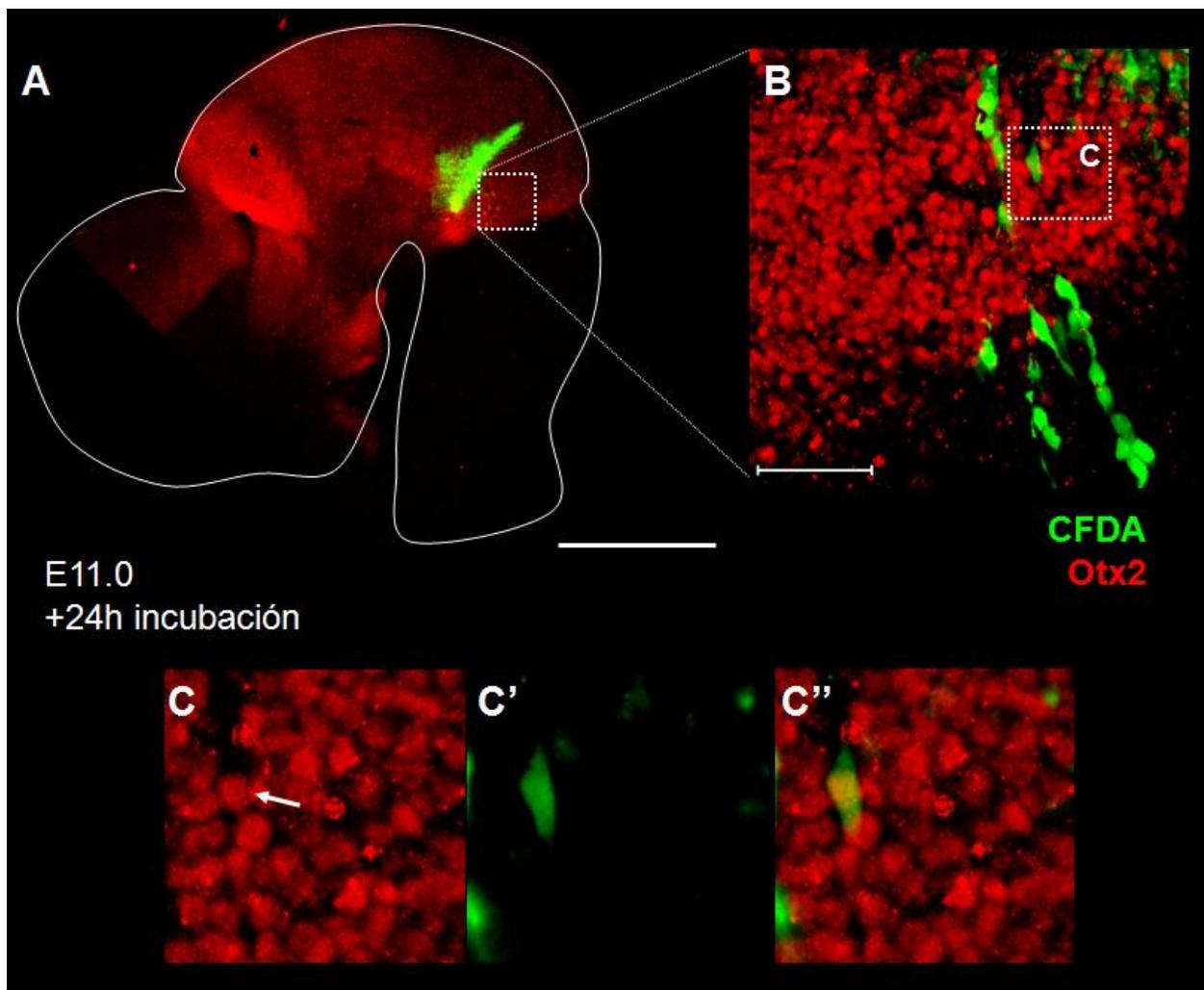


Figura 22. Células migratorias CFDA⁺ expresan Otx2 en el mesencéfalo. A) Panorámica de un hemineuripitelo, en donde se aprecia la zona de inyección de

CFDA. Barra de calibración 500 μm . B) Magnificación de A que muestra células CFDA+ desplazadas del sitio de inyección, tanto en el mesencéfalo como rombencéfalo. C) Magnificación de B, en donde se observa una célula CFDA+ colocalizando con Otx2 dentro del mesencéfalo. Barra de calibración 50 μm .

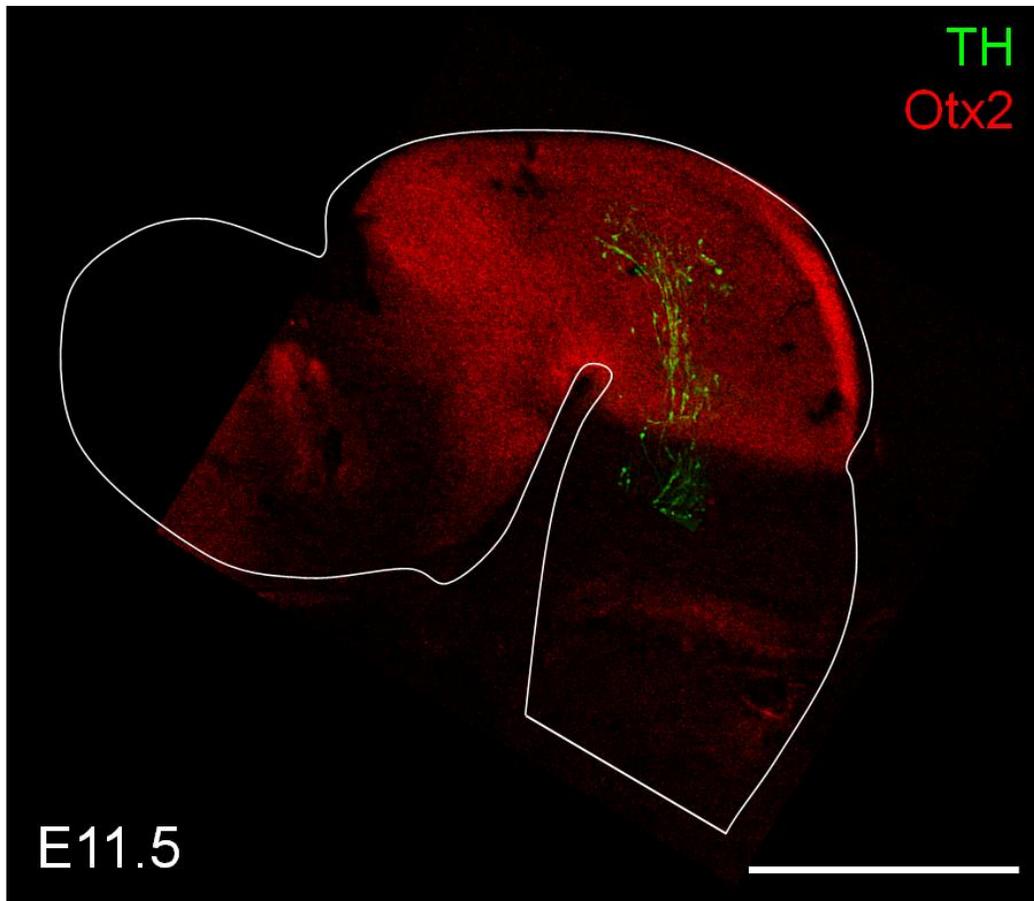


Figura 23. Distribución de Otx2 en neuroepitelio E11.5. Panorámica de un hemineuroepitelio en donde se muestra la distribución de las células Otx2⁺ en el estadio E11.5 así como la migración de las células TH⁺ del mesencéfalo dorsal. Barra de calibración 500 μm .

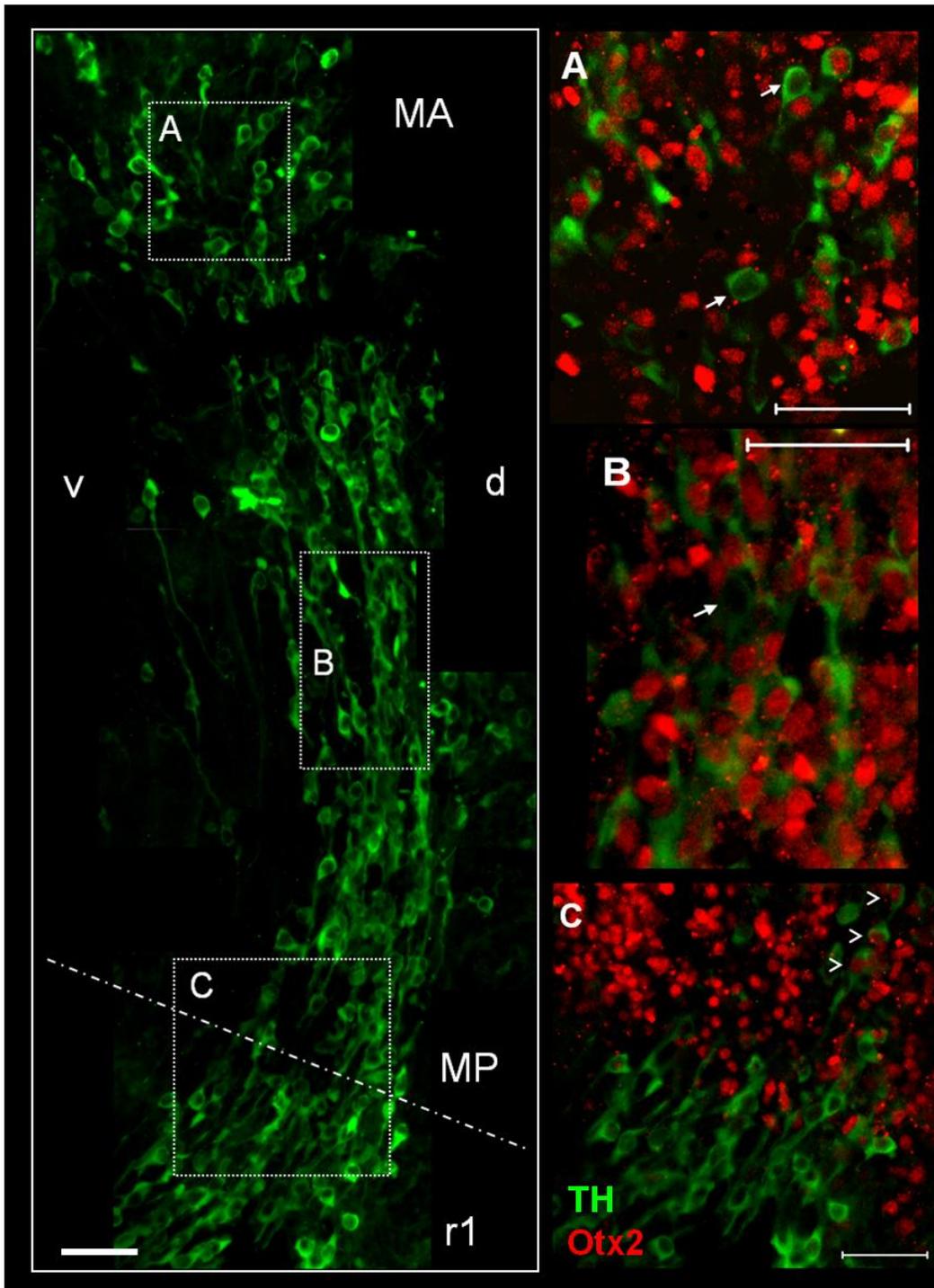


Figura 24. Neuronas migratorias TH⁺ expresan Otx2 en el mesencéfalo y dejan de expresarlo en el rombencéfalo. Magnificación de la Fig.23 de la, a corriente de células TH⁺ de la CM-MR. **A)** Magnificación de la corriente migratoria TH⁺ en el mesencéfalo anterior en donde se muestra además de las células TH, la expresión de Otx2. Las células TH⁺ localizadas en el MD son Otx2⁺ a excepción de unas pocas (indicadas con

flechas). MA, mesencéfalo anterior; MP, mesencéfalo posterior; v, ventral; d, dorsal. **B)** Magnificación de la corriente TH que continúa a lo largo del mesencéfalo AP, en esta región la mayoría de las células migratorias TH⁺ expresan Otx2. **C)** Magnificación de la corriente migratoria en la zona del istmo, en donde deja de expresarse Otx2. Se observa que en las zonas más posteriores del mesencéfalo o en el límite con el rombencéfalo, disminuye el número de células TH⁺/Otx2⁺ (indicadas con flechas). Barra de calibración 50 μm.

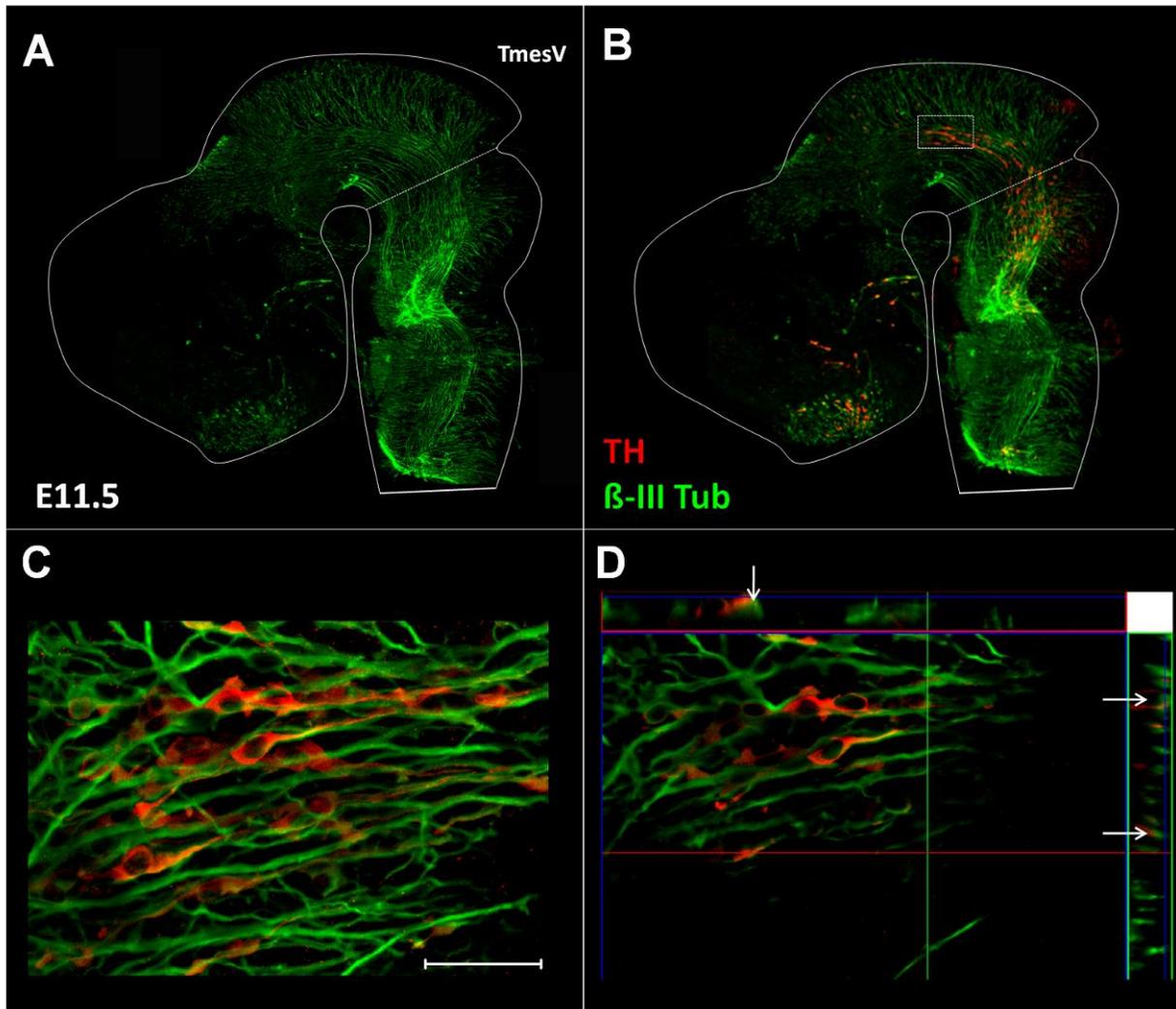


Figura 25. Células TH⁺ del mesencéfalo dorsal y su relación con fibras βIII-Tub⁺ **A)** Vista panorámica del hemisferio izquierdo de un neuroepitelio de embrión E11.5 en donde se observa el tracto formado del TmesV en proyección al rombencéfalo. **B)** El mismo embrión pero ahora se muestran las células TH⁺ migratorias en aparente

asociación con el TmesV. **C)** Magnificación de varias secciones en donde se observa los axones del TmexV y las células TH⁺ que se disponen sobre el tracto. **D)** Proyección ortogonal de una sola sección de la reconstrucción anterior las flechas indican neuronas TH⁺ adyacentes a fibras β -III-Tub⁺.

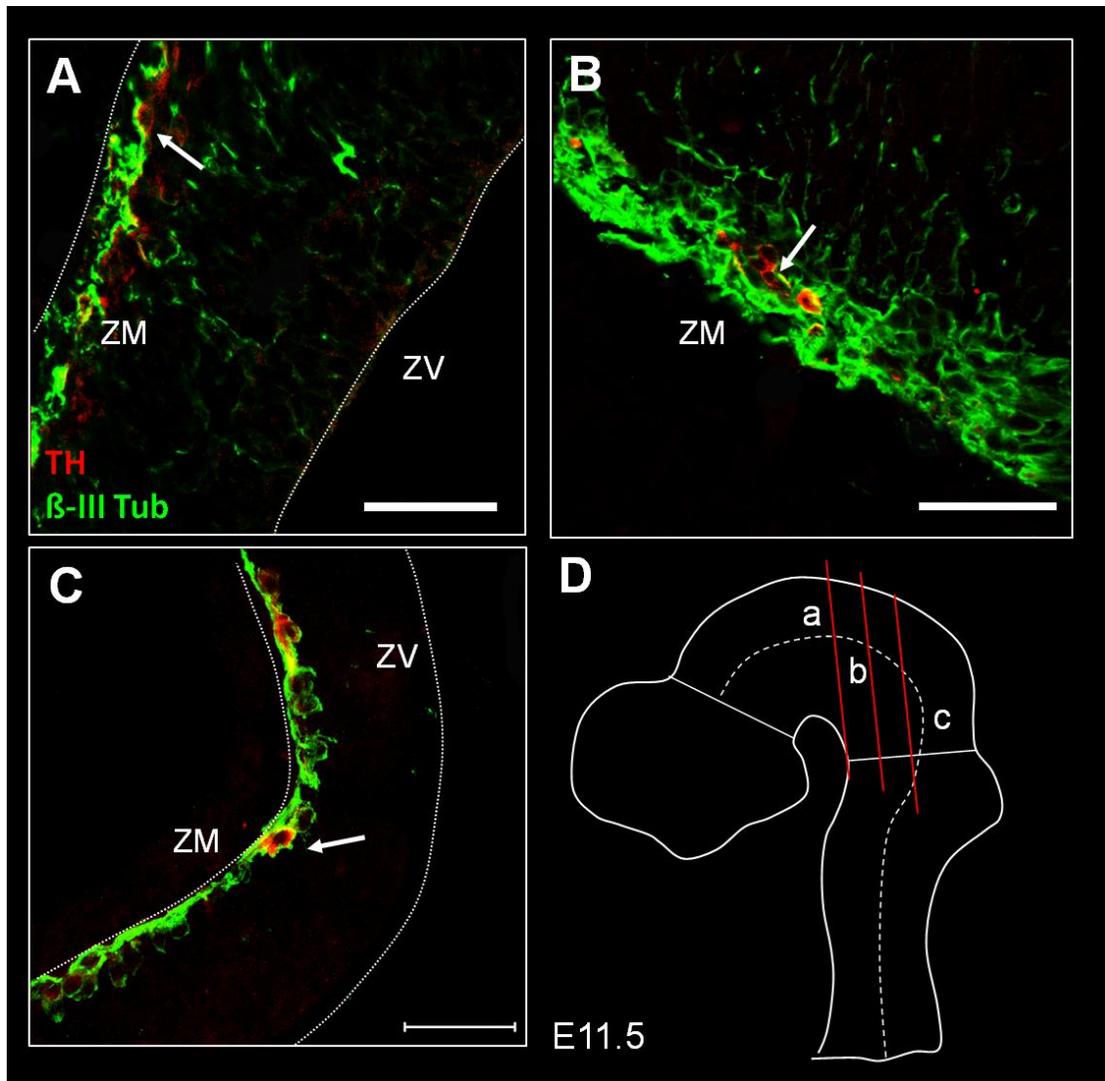


Figura 26. Células TH⁺ del mesencéfalo dorsal adyacentes a otras neuronas en un corte coronal. A-C) Células TH⁺/ β -III-Tub⁺ son adyacentes a células β -III-Tub⁺, ubicadas en las zonas más marginales, en diferentes niveles del mesencéfalo. **D)** Localización aproximada de las micrografías anteriores en el neuroepitelio completo. Barra de calibración 50 μ .

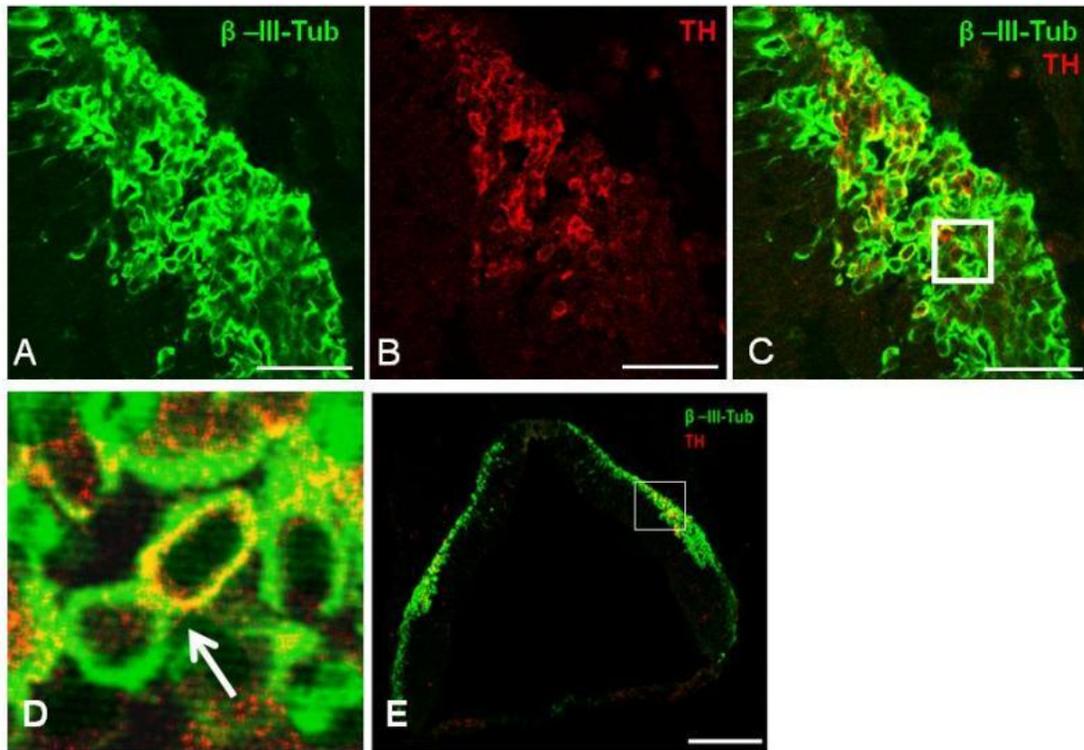


Figura 27. Células TH⁺ del mesencéfalo son adyacentes a otras neuronas en un corte transversal. **A)** células β-III-Tub⁺ en el mesencéfalo dorsal, posiblemente corresponden al TmesV; **B)** misma ubicación que la fotografía anterior pero mostrando células TH⁺ que corresponden a la CM-MR; **C)** las células TH⁺ son adyacentes a las células β-III-Tub⁺. En **D)** se muestra un acercamiento de una célula TH junto con una célula β-III-Tub⁺. Barra de calibración 50 μm. **E)** Vista panorámica de un corte transversal del mesencéfalo, en donde se puede ubicar el plano en el que se tomaron las micrografías anteriores. Barra de calibración 100 μm.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alberi L, Sgado P y Simon HH. 2004. Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development* 131(13): 3229-3236.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L y Rubenstein JL. 1997. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278(5337): 474-476.
- Ang SL. 2006. Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* 133(18): 3499-3506.
- Aroca P, Lorente-Canovas B, Mateos FR y Puelles L. 2006. Locus coeruleus neurons originate in alar rhombomere 1 and migrate into the basal plate: Studies in chick and mouse embryos. *J Comp Neurol* 496(6): 802-818.
- Berridge CW y Waterhouse BD. 2003. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42(1): 33-84.
- Bertrand N, Castro DS y Guillemot F. 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3(7): 517-530.
- Broccoli V, Boncinelli E y Wurst W. 1999. The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmus organizer. *Nature* 401(6749): 164-168.
- Chen L, Liao G, Waclaw RR, Burns KA, Linnquist D, Campbell K, Zheng Y y Kuan CY. 2007. Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. *J Neurosci* 27(14): 3884-3893.
- Coppola E, d'Autréaux F, Rijli F y Brunet J-F. 2010. Ongoing roles of Phox2 homeodomain transcription factors during neuronal differentiation. *Development* 137 (24): 4211-4220.
- Dahlstroem A y Fuxe K. 1964. Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl: SUPPL 232:231-255*.
- de Carlos JA, Lopez-Mascaraque L y Valverde F. 1996. Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16(19): 6146-6156.
- Denaxa M, Chan CH, Schachner M, Parnavelas JG y Karagogeos D. 2001. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128(22): 4635-4644.
- Echevarria D, Vieira C, Gimeno L y Martinez S. 2003. Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res Brain Res Rev* 43(2): 179-191.
- Farkas LM, Dunker N, Roussa E, Unsicker K y Kriegstein K. 2003. Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci* 23(12): 5178-5186.
- Fuller RW. 1982. Pharmacology of brain epinephrine neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22: 31-55.

- Garcia-Moreno F, Pedraza M, Di Giovannantonio LG, Di Salvio M, Lopez-Mascaraque L, Simeone A y De Carlos JA. 2010. A neuronal migratory pathway crossing from diencephalon to telencephalon populates amygdala nuclei. *Nat Neurosci* 13(6): 680-689.
- Garel S, Garcia-Dominguez M y Charnay P. 2000. Control of the migratory pathway of facial branchiomotor neurones. *Development* 127(24): 5297-5307.
- Ghashghaei HT, Lai C y Anton ES. 2007. Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat Rev Neurosci* 8(2): 141-151.
- Guo S, Brush J, Teraoka H, Goddard A, Wilson SW, Mullins MC y Rosenthal A. 1999. Development of noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain requires BMP, FGF8, and the homeodomain protein soulless/Phox2a. *Neuron* 24(3): 555-566.
- Hökfelt T (1984). Distributional of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the rat brain. Björklund A and Hökfelt T. En *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Classical Transmitters in the CNS, Part I*, 277–379. Amsterdam, Elsevier.
- Hornbruch A, Ma G, Ballermann MA, Tumova K, Liu D y Cairine Logan C. 2005. A BMP-mediated transcriptional cascade involving *Cash1* and *Tlx-3* specifies first-order relay sensory neurons in the developing hindbrain. *Mech Dev* 122(7-8): 900-913.
- Hunter E, Begbie J, Mason I y Graham A. 2001. Early development of the mesencephalic trigeminal nucleus. *Dev Dyn* 222(3): 484-493
- Joyner AL, Liu A y Millet S. 2000. *Otx2*, *Gbx2* and *Fgf8* interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr Opin Cell Biol* 12(6): 736-741.
- Kandel E, Schwartz J y Jessell T. 2000. *Principles of neural science*, Fourth Edition. McGraw-Hill, New York, USA.
- Kawano H, Ohyama K, Kawamura K y Nagatsu I. 1995. Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Brain Res Dev Brain Res* 86(1-2): 101-113.
- Klockgether T. 2004. Parkinson's disease: clinical aspects. *Cell Tissue Res* 318(1): 115-120.
- Kutejova E, Briscoe J y Kicheva A. 2009. Temporal dynamics of patterning by morphogen gradients. *Curr Opin Genet Dev* 19(4): 315-322.
- Letinic K y Rakic P. 2001. Telencephalic origin of human thalamic GABAergic neurons. *Nat Neurosci* 4(9): 931-936.
- Levine AJ y Brivanlou AH. 2007. Proposal of a model of mammalian neural induction. *Dev Biol* 308(2): 247-256.
- Liu ZR, Shi M, Hu ZL, Zheng MH, Du F, Zhao G y Ding YQ. 2010. A refined map of early gene expression in the dorsal rhombomere 1 of mouse embryos. *Brain Res Bull* 82(1-2): 74-82.
- Marin F, Herrero MT, Vyas S y Puelles L. 2005. Ontogeny of tyrosine hydroxylase mRNA expression in mid- and forebrain: neuromeric pattern and novel positive regions. *Dev Dyn* 234(3): 709-717.
- Marin O y Rubenstein JL. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26: 441-483.
- Marin O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M y Rubenstein JL. 2001. Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293(5531): 872-875.

- Mason I, Chambers D, Shamim H, Walshe J y Irving C. 2000. Regulation and function of FGF8 in patterning of midbrain and anterior hindbrain. *Biochem Cell Biol* 78(5): 577-584.
- Mastick GS y Easter SS, Jr. 1996. Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain. *Dev Biol* 173(1): 79-94.
- Maxwell SL, Ho HY, Kuehner E, Zhao S y Li M. 2005. Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Dev Biol* 282(2): 467-479.
- Metin C, Vallee RB, Rakic P y Bhide PG. 2008. Modes and mishaps of neuronal migration in the mammalian brain. *J Neurosci* 28(46): 11746-11752.
- Millet S, Campbell K, Epstein DJ, Losos K, Harris E y Joyner AL. 1999. A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* 401(6749): 161-164.
- Nadarajah B y Parnavelas JG. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3(6): 423-432.
- Nygren LG y Olson L. 1977. A new major projection from locus coeruleus: the main source of noradrenergic nerve terminals in the ventral and dorsal columns of the spinal cord. *Brain Res* 132(1): 85-93.
- Ohyama K, Kawano H, Asou H, Fukuda T, Oohira A, Uyemura K y Kawamura K. 1998. Coordinate expression of L1 and 6B4 proteoglycan/phosphacan is correlated with the migration of mesencephalic dopaminergic neurons in mice. *Brain Res Dev Brain Res* 107(2): 219-226.
- Pattyn A, Goridis C y Brunet JF. 2000. Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. *Mol Cell Neurosci* 15(3): 235-243.
- Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C y Brunet JF. 1997. Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis. *Development* 124(20): 4065-4075.
- Polleux F y Anton ES (2005). *Neural Migration in the Developing Brain*. Mahendra SR and Jacobson M. En *Developmental Neurobiology*, 223-233. New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T y Ghosh A. 2002. Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 129(13): 3147-3160.
- Prakash N, Brodski C, Naserke T, Puelles E, Gogoi R, Hall A, Panhuysen M, Echevarria D, Sussel L, Weisenhorn DM, Martinez S, Arenas E, Simeone A y Wurst W. 2006. A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development* 133(1): 89-98.
- Prakash N y Wurst W. 2006. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell Mol Life Sci* 63(2): 187-206.
- Puelles E. 2007. Genetic control of basal midbrain development. *J Neurosci Res* 85(16): 3530-3534.
- Puelles L y Rubenstein JL. 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26(9): 469-476.
- Raible F y Brand M. 2004. Divide et Impera--the midbrain-hindbrain boundary and its organizer. *Trends Neurosci* 27(12): 727-734.

- Rakic P. 1971. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res* 33(2): 471-476.
- Rakic P. 1990. Principles of neural cell migration. *Experientia* 46(9): 882-891.
- Rhinn M y Brand M. 2001. The midbrain--hindbrain boundary organizer. *Curr Opin Neurobiol* 11(1): 34-42.
- Saghatelian A. 2009. Role of blood vessels in the neuronal migration. *Semin Cell Dev Biol* 20(6): 744-750.
- Shi M, Guo C, Dai JX y Ding YQ. 2008. DCC is required for the tangential migration of noradrenergic neurons in locus coeruleus of mouse brain. *Mol Cell Neurosci* 39(4): 529-538.
- Shults CW, Hashimoto R, Brady RM y Gage FH. 1990. Dopaminergic cells align along radial glia in the developing mesencephalon of the rat. *Neuroscience* 38(2): 427-436.
- Siegel GJ 2006. *Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects*. Amsterdam ; Boston: Elsevier.
- Smidt MP, Smits SM, Bouwmeester H, Hamers FP, van der Linden AJ, Hellemons AJ, Graw J y Burbach JP. 2004. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development* 131(5): 1145-1155.
- Smits SM, Ponnio T, Conneely OM, Burbach JP y Smidt MP. 2003. Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 18(7): 1731-1738.
- Son JH, Min N y Joh TH. 1996. Early ontogeny of catecholaminergic cell lineage in brain and peripheral neurons monitored by tyrosine hydroxylase-lacZ transgene. *Brain Res Mol Brain Res* 36(2): 300-308.
- Sunmonu NA, Li K, Guo Q y Li JY. 2011. Gbx2 and Fgf8 are sequentially required for formation of the midbrain-hindbrain compartment boundary. *Development* 138(4): 725-734.
- Tamamaki N, Fujimori K, Nojyo Y, Kaneko T y Takauji R. 2003. Evidence that *Sema3A* and *Sema3F* regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex. *J Comp Neurol* 455(2): 238-248.
- Tamamaki N, Fujimori KE y Takauji R. 1997. Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17(21): 8313-8323.
- Tiveron MC, Hirsch MR y Brunet JF. 1996. The expression pattern of the transcription factor *Phox2* delineates synaptic pathways of the autonomic nervous system. *J Neurosci* 16(23): 7649-7660.
- Ugrumov MV. 2009. Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: distribution in the brain, development and functional significance. *J Chem Neuroanat* 38(4): 241-256.
- Ugrumov MV, Melnikova VI, Lavrentyeva AV, Kudrin VS y Rayevsky KS. 2004. Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons expressing individual complementary enzymes of the dopamine synthetic pathway in the arcuate nucleus of fetal rats. *Neuroscience* 124(3): 629-635.
- Ungerstedt U. 1971. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* 367: 1-48.

- Voorn P, Kalsbeek A, Jorritsma-Byham B y Groenewegen HJ. 1988. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* 25(3): 857-887.
- Weihe E, Depboylu C, Schutz B, Schafer MK y Eiden LE. 2006. Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cell Mol Neurobiol* 26(4-6): 659-678.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G y Alvarez-Buylla A. 2001. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128(19): 3759-3771.
- Wurst W y Bally-Cuif L. 2001. Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat Rev Neurosci* 2(2): 99-108.
- Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA y Rosenthal A. 1998. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93(5): 755-766.
- Zhao T, Szabo N, Ma J, Luo L, Zhou X y Alvarez-Bolado G. 2008. Genetic mapping of Foxb1-cell lineage shows migration from caudal diencephalon to telencephalon and lateral hypothalamus. *Eur J Neurosci* 28(10): 1941-1955.
- Zervas M, Millet S, Ahn S y Joyner AL. 2004. Cell behaviors and genetic lineages of the mesencephalon and rhombomere 1. *Neuron* 43(3): 345-357.
- Zhuang B y Sockanathan S. 2006. Dorsal-ventral patterning: a view from the top. *Curr Opin Neurobiol* 16(1): 20-24.