

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Genoarquitectura Comparada del
Mesencéfalo Alar en el Ratón y el Pollo

Dº. Abdelmalik Ayad

2014



Programa oficial de postgrado

Doctorado en Neurociencia

Tesis de Doctorado

GENOARQUITECTURA COMPARADA DEL MESENCÉFALO ALAR EN EL RATÓN Y EL POLLO

Abdelmalik Ayad

Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología

Directores de la Tesis de Doctorado:

Luis Puelles López

José Luis Eduardo Ferran

2014

INDICE

Agradecimientos _____ 5

Resumen _____ 6

Summary _____ 7

Palabras clave _____ 8

Abreviaturas _____ 8

1 INTRODUCCION _____ 10

 1.1 Regionalización del tubo neural _____ 10

 1.2 Mesencéfalo _____ 13

 1.3 Organización dorsoventral del mesómero 1 _____ 17

 1.4 Organización dorsoventral del mesómero 2 _____ 19

 1.5 Genoarquitectura mesencefálica _____ 20

2 OBJETIVOS _____ 22

3 MATERIALES Y MÉTODOS _____ 23

 3.1 Cerebros de ratón y pollo _____ 23

 3.2 Disección y fijación _____ 24

 3.3 Inclusión _____ 26

 3.4 Técnicas de Biología Molecular e Hibridación In Situ _____ 27

 3.4.1 Clonación _____ 27

 3.4.1.1 Extracción del ARN _____ 27

 3.4.1.2 Retrotranscripción (RT) _____ 29

 3.4.1.3 PCR y amplificación del fragmento del ADN de interés _____ 30

 3.4.1.4 Extracción del ADN amplificado _____ 32

 3.4.1.5 Ligación _____ 32

 3.4.1.6 Transformación _____ 32

 3.4.1.7 Análisis de la secuencia _____ 35

 3.4.2 Plásmidos y sondas de ARN _____ 35

3.4.2.1 Plásmidos _____	35
3.4.2.2 Linealización _____	38
3.4.2.3 Síntesis de sondas de ARN o Transcripción in vitro _____	41
3.4.3 Hibridación in situ _____	42
3.4.3.1 Hibridación in situ cromogénica simple en cortes de agarosa _____	44
3.4.3.2. Hibridación in situ cromogénica doble en cortes de agarosa _____	47
3.4.3.3 Hibridación in situ cromogénica simple en cortes de criostato _____	48
3.4.4 Técnicas inmunohistoquímicas _____	49
3.4.5 Técnicas de hibridación in situ combinada con inmunohistoquímica _____	51
3.5 Visualización y escaneado de imágenes _____	51
4 RESULTADOS _____	52
4.1 Límite rostral y caudal del mesencéfalo _____	52
4.1.1 Límite diencéfalo-mesencefálico (DMB) _____	52
4.1.2 Límite mesencéfalo-rombencefálico (MHB) _____	56
4.2 Dominios y subdominios alares de la región mesencefálica _____	58
4.3 Divisiones dorsoventrales de la placa alar mesencefálica _____	63
4.4 Genoarquitectonía de los estratos del TG _____	67
4.5 Genoarquitectura de los estratos del colículo superior _____	68
4.6 Genoarquitectura del colículo inferior del ratón _____	70
4.7 Genoarquitectura de los estratos del PI (subdominio DL) _____	71
4.8 Genoarquitectura comparada del SC del pollo _____	71
4.9 Genoarquitectura comparada del IC del pollo _____	73
Figuras 4.1 a 4.28 _____	78
5 DISCUSIÓN _____	135
5.1 Límites mesencefálicos _____	135
5.2 Regionalización anteroposterior de la placa alar de m1 _____	139
5.3 Divisiones dorsoventrales de la placa alar mesencefálica _____	144

5.4 Genoarquitectura de los estratos del colículo superior_____	147
5.5 Genoarquitectura comparada del tectum óptico del pollo_____	148
5.6 Genoarquitectura del colículo inferior del ratón_____	150
5.7 Genoarquitectura comparada del torus semicircularis del pollo_____	151
6 CONCLUSIONES_____	154
7 BIBLIOGRAFIA_____	156
8 ANEXOS_____	161

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis el Profesor Luis Puelles y el Dr. Jose Luis Ferran (Chelo). A Luis, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su paciente y continúa ayuda, por poner en mis manos todos sus conocimientos, por todos sus amables detalles y especial preocupación. Chelo, te quiero agradecer muy especialmente, el apoyo que me ofreciste para aprender a trabajar de una manera minuciosa y sistemática que me ha permitido desarrollar mis conocimientos y metodologías. Gracias por enseñarme a trabajar y mejorar día a día en el laboratorio, gracias por tu paciencia, gracias por tu increíble generosidad; todos los regalos que me has dado, y sobre todo por las comidas de los sábados y domingos cuando no viene nadie.

Gracias también a Margaret, por las clases de prácticas en Neuroanatomía, por enseñarme la morfología y anatomía del cerebro humano directamente desde el material de la sala de disección.

A mi familia en Marruecos, mi padre Mohamed y a mi madre Zineb; y a mis hermanos y hermanas por estar siempre ahí.

También me gustaría darle las gracias a mis compañeros de trabajo: Antonia, Ruben, Nica, Laura, Rafa, Pedro y José Manuel. Y a los antiguos compañeros: Juanu, Tania, Paloma, Luisa e Isabel. A nuestros técnicos de laboratorio Mari Carmen Morga y Mari Carmen Fernández. A Mari carmen Izquierdo, la secretaria, gracias por su ayuda. A todos los profesores del departamento de anatomía Humana y Psicobiología, en especial, a Pilar y Faustino, gracias por sus consejos y su ayuda. Faustino te agradezco muy especialmente por ayudarme con la administración de sección de postgrado para matricularme en el doctorado de neurociencias.

A aquellas personas que han estado en nuestro laboratorio por estancias científicas: Luciano (Argentina), Kike (Barcelona), Manu (Barcelona), Thabiso (Sudáfrica), Rosana (Chile), Myriam (Italia), Ana (Francia), Bea (Barcelona), Stijn (Bélgica), Leila (Brasil) y Luciano (Brasil).

Finalmente, Doy las gracias a todas personas que han estado en mi camino durante todos los años de mis estudios.

RESUMEN

Objetivo general: Caracterizar genoarquitectonicamente de modo comparado la placa alar mesencefálica del ratón y el pollo durante el desarrollo y la vida postnatal temprana

Materiales y métodos: Se utilizaron ratones de la cepa Swiss Albino. Se analizaron embriones de E10.5, E11.5, E12.5, E14.5, E16.5 y E18.5, así como algunos estadios postnatales y el adulto (P0, P10-14, P25 y P56). En el estudio de aves se utilizaron embriones de pollo (HH30-HH45) y algunos estadios postnatales (P1, P2, P6). Para llevar a cabo el análisis pretendido se realizaron hibridaciones in situ con múltiples sondas de RNAm en embriones in toto, o en secciones de vibratomo y de criostato. El material procesado fue escaneado utilizando el software Image Scope. Finalmente los datos fueron seleccionados para su interpretación y análisis.

Resultados: Como resultado del análisis genoarquitectónico se caracterizó molecularmente los límites rostral y caudal del mesencéfalo de ratón y pollo durante el desarrollo y algunos estadios postnatales. Además de los ya conocidos marcadores *Pax6*, *Tcf7l2* y *Fgf8*, otros factores de transcripción tales como *Lim1*, *Lhx2*, *Foxp1*, *Tcfap2B*, *Dbx1*, *Esrrb* y *FoxB1* resultaron útiles para identificar estos límites. Además estos datos genoarquitectónicos han contribuido a clarificar los límites entre los dominios alares anteroposteriores y los subdominios dorsoventrales de m1 y m2 (mesómeros 1 and 2). Se ha llevado a cabo un detallado estudio genoarquitectónico comparado de los colículos superior e inferior (torus semicircular) del pollo y el ratón, lo cual ha permitido confirmar y en su caso postular homologías de sus componentes estructurales (capas, núcleos, poblaciones neuronales) entre ambas especies. Otras regiones comprendidas en este estudio son el gris tectal y el área preístmica.

Conclusiones: Los datos obtenidos en este estudio permiten disponer de marcadores adicionales para localizar con precisión los límites del mesencéfalo, así como también identificar las regiones y subregiones alares que componen los mesómeros 1 y 2. Los abundantes datos moleculares contribuirán a futuros estudios de los dominios alares mesencefálicos, cuya finalidad sea comprender los fenómenos causales de su proceso de laminación o especificación celular diferencial. Finalmente, se aporta la definición de un nuevo territorio histogenético radial intercalado entre los colículos superior e inferior, el área intercollicular. Por otra parte el detallado análisis genoarquitectónico comparado del colículo inferior/torus semicircular entre pollo y ratón ha permitido postular posibles homologías entre ambas especies.

SUMMARY

General aim: Characterize comparatively the genoarchitectonic structure of the mesencephalic alar plate of the mouse and chick during development and early postnatal life.

Methods: The study used mice wild Albino Swiss strain. We analyzed embryos at E10.5, E11.5, E12.5, E14.5, E16.5 and E18.5; as well as selected postnatal stages and the adult (P0, P10-14, P25 y P56). To carry out the intended analysis multiple in situ hybridizations with mARN probes were performed on whole embryos, in vibratome sections and cryostat sections. In selected cases an immunohistochemical reaction served as counterstaining of the hybridization. The processed material was scanned using Image Scope software. Finally, specific data were selected for further interpretation and analysis.

Results: Using our genoarchitectonic approach we characterized molecularly the rostral and caudal midbrain limits during all stages of development and some postnatal stages. Besides the known relevant markers *Pax6*, *Tcf7l2* and *Fgf8*, other patterns of transcription factors such as *Lim1*, *Lhx2*, *Foxp1*, *Tcfap2b*, *Dbx1*, *FoxB1* and *Esrrb* were useful to identify these limits. Furthermore, these genoarchitectonic data helped to clarify the boundaries between the various anteroposterior alar domains and their respective dorsoventral subdomains across m1 and m2 (mesomeres 1 and 2). Finally, the analysis allowed obtaining data on the selective expression of genes in the different strata that make up the layers of the superior and inferior colliculi. Other studied regions were the tectal gray, the intercollicular area and the preisthmic area.

Conclusions: The data obtained in this study identified additional markers that accurately locate the boundaries of the midbrain, and served to identify genoarchitectonically distinct regions that make up the alar plate of mesomere 1. The novel intercollicular area was identified as a full radial histogenetic zone. Finally, abundant molecular data were generated that will contribute to future causal developmental studies of the superior and inferior colliculi, as regards the process of layering or cell specification. Moreover, detailed postulates of homology were proposed between the structural components of the mammalian inferior colliculus and the avian torus semicircularis.

PALABRAS CLAVE:

Colículo superior, colículo inferior, torus semicircular, mesencéfalo, sustancia gris periacueductal, griseum tectalis, preistmo, area intercolicular, genoarquitectura.

ABREVIATURAS:

2Cb	Lobule 2 of the cerebellar vermis
3Cb	Lobule 3 of the cerebellar vermis
AD	Alar dorsal region
ADL	Alar dorso-lateral region
ALPAG	Alar dorsal PAG
ap	Alar plate
Aq	Aqueduct
AVL	Alar ventro lateral region
BIC	Brachium of the IC
bp	Basal plate
Cb	Cerebellum
Cc	Central toral nucleus, core portion
Cic	Commissure of the IC
CIC	Central nucleus of IC
Cs	Central toral nucleus, shell portion
D	Diencephalon
DCIC	Dorsal cortex of the IC
DE	Dorsal externo
DEPAG	Dorsal externo PAG
DI	Dorsal interno
DIPAG	Dorsal interno PAG
DM	Dorsomedial nucleus
DMB	Diencephalic- mesencephalic boundary
DPall	Dorsal pallium
DpG	Deep gray layer of the SC
DpMe	Deep mesencephalic nucleus;
E	External nucleus;
ECIC	External cortex of The IC
EPTTh	Epithalamus
fp	Floor plate
H	Hiliar toral nucleus
Ha	Habenula
HyA	Hypothalamus alar
HyB	Hypothalamus basal
Ic	Intercollicular area, core portion
IC	Inferior colliculus
ICo	Intercollicular area
Im	Nucleus isthmi, pars magnocellularis
InG	Intermediate gray layer of the SC
InWh	Intermediate white layer of the SC
IO	Isthmo-optic nucleus
Ip	Nucleus isthmi, pars parvicellularis
Is	Intercollicular area, shell portion

Isth	Isthmic nuclei
Isth Org	Isthmic organizer
LL	Lateral lemniscus
LLD	Dorsal nucleus of the lateral lemniscus
LLv	Ventral nucleus of the lateral lemniscus
LPAG	Lateral PAG
lraq	Lateral recess of the aqueduct
m1	Mesomere 1
m2	Mesomere 2
Mes	Mesencephalon
mPAG	Mesencephalic periaqueductal gray
mz	Mantle zone
OT	Optic tectum
OV	Optic vesicle
p1	Prosomere 1
p2	Prosomere 2
p3	Prosomere 3
PAG	Periaqueductal gray
PAGm2	Periaqueductal gray m2
PBG	Parabigeminal nucleus
pc	Posterior commissure
PC	Paracentral toral nucleus
PG	Pineal gland
PI	Preisthmic region
Pt	Pretectum
Pth	Prethalamus
PV	Toral periventricular lamina
PVc	Toral periventricular lamina, core portion
PVs	Toral periventricular lamina, shell portion
Rh	Rhombencephalon
rp	Roof plate
rt	Retroflex tract
S	Superficial area
Sag	Sagulum nucleus
SC	Superior Colliculus
Shp ZLI	Shell posterior of the zona limitans intrathalamic
SP	Secondary prosencephalon
Sp	Subpallium
SubB	Subbrachial nucleus
SuG	Superficial gray layer of the SC
Tel	Telencephalon
TG	Tectal gray
Th	Thalamus
VLPAG	Ventrolateral PAG

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Regionalización del tubo neural

Durante las etapas tempranas del desarrollo de los vertebrados se forma una placa neural que posteriormente dará origen al tubo neural. Como parte de una serie compleja de procesos de regionalización y especificación celular se van generando divisiones a lo largo del eje anteroposterior (AP) y dorsoventral (DV) del tubo neural. En algunos casos éstas son preestablecidas ya desde estadios de placa neural, pero en su mayor parte aparecen claramente en el tubo neural cerrado. Las **divisiones dorsoventrales** establecen dominios longitudinales primarios a lo largo de todo el tubo neural, que son conocidos como **placas del techo, alar, basal y del suelo**. Tales subdivisiones generales obedecen a mecanismos antagónicos de ventralización y dorsalización, procedentes de fuentes de señales en el suelo y el techo, respectivamente, que eventualmente alcanzan un equilibrio, creando el límite alar-basal. Otros mecanismos de regionalización actúan a lo largo del **eje AP** y generan divisiones transversales al eje (con límites perpendiculares al mismo), de naturaleza segmentaria. La primera manifestación de este proceso forma segmentos de tubo que son conocidos como **proneurómeros**. Las subdivisiones proneuroméricas iniciales del tubo neural son, en orden de rostral a caudal, el **prosencefalo secundario (PS)**, el **diencéfalo (Di)**, el **mesencefalo (Mes)**, el **rombencefalo (Rh)** y la **médula espinal (SC)** (Figs. 1.1 y 1.2). Los proneurómeros se subdividen secundariamente en segmentos de menor tamaño conocidos como **neurómeros**, cuyo número es constante en todos los vertebrados (2 prosómeros hipotalámicos en el PS, 3 prosómeros diencefálicos, 2 mesómeros, 12 rombómeros y un número variable de mielómeros medulares). Cada uno de los neurómeros está constituido dorsoventralmente por las cuatro zonas longitudinales mencionadas previamente (Fig. 1.2B) (Inoue y col., 2000; Fernández-Garre y col., 2002; Staudt y Houart, 2007; Sánchez-Arrones y col., 2009; Puelles y col., 2012; Puelles, 2013).

En los trabajos clásicos de finales del siglo XIX el tubo neural ya era dividido en tres grandes regiones conocidas como cerebro anterior, medio y posterior; aunque con claras diferencias interpretativas en comparación con cómo se conciben actualmente estas regiones en términos de divisiones internas y neurómeros que las componen. Según el modelo neuromérico, el prosencefalo secundario y el diencéfalo formarían parte del

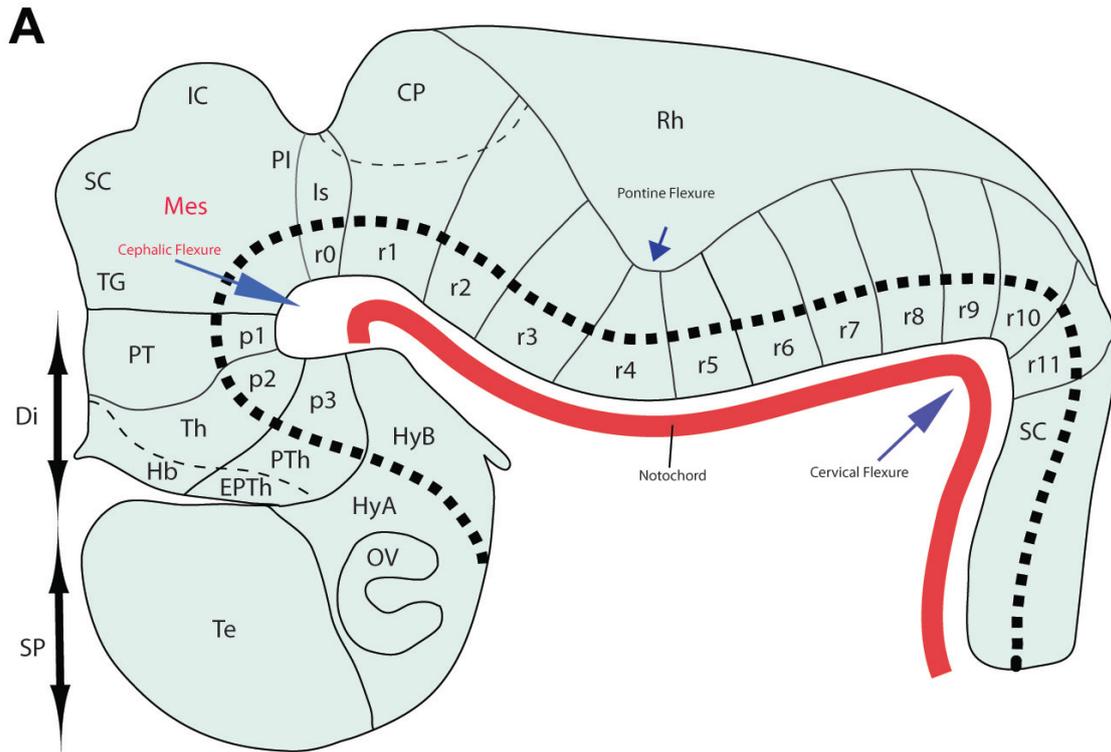


Figura 1.1: Esquema de la partición dorsoventral y anteroposterior del tubo neural. En esta visión lateral se observan de izquierda a derecha: 1) el prosencéfalo primario, formado por el diencéfalo (Di; que consta de 3 prosómeros: p1-p3) y el prosencefalo secundario (SP; hipotálamo-Hy- + telencéfalo-Te-); 2) el mesencéfalo (Mes); 3) el rombencéfalo (Rh; istmo-Is [r0] + r1-r11) y 4) la médula espinal (SC). Se destacan además las tres flexuras (de caudal a rostral: cervical, pontina y cefálica) que pueden observarse en el tubo neural durante el desarrollo temprano. La línea de puntos indica el límite alar/basal, siendo además una marca morfológica de las curvaturas del eje longitudinal. El mesencéfalo se localiza entre la región pretectal (rostral) y el istmo (caudal). Modificada de Puelles y col., 2008 (Morales Delgado, 2012).

cerebro anterior; el mesencéfalo correspondería al **cerebro medio;** y finalmente encontraríamos al rombencéfalo y la médula espinal como parte del **cerebro posterior.** La porción más rostral del tubo neural que se conoce como prosencéfalo secundario contiene como derivados representativos importantes al **hipotálamo** (que ocupa la placa del suelo, la placa basal entera y una pequeña parte de la placa alar), los **campos oculares** (a partir de los cuales se formará la vesícula óptica, también alar), y el

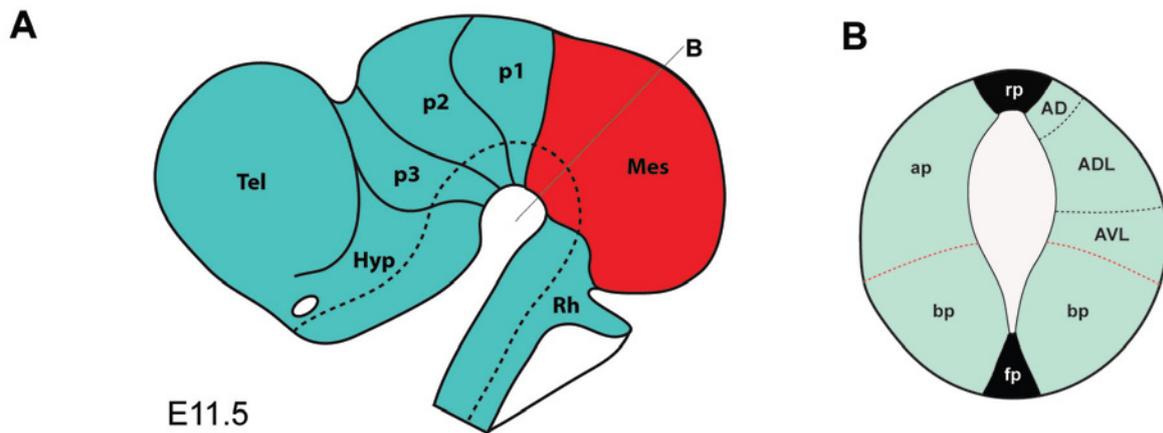


Figura 1.2: Esquema representando las divisiones anteroposteriores y dorsoventrales del tubo neural de un ratón a E11.5. **(A)** Visión lateral del sistema nervioso central del ratón en la que se representan de izquierda a derecha: el prosencéfalo secundario (telencéfalo-Tel- + hipotálamo-Hyp-) y el diencefalo con sus prosómeros (p1-p3), seguido del mesencéfalo y el rombencéfalo. **(B)** Representación esquemática de una sección transversal a nivel mesencefálico (marcado en A) en la que se pueden observar sobre el lado izquierdo desde dorsal a ventral la placa del techo (rp), la placa alar (ap), la placa basal (bp) y la placa del suelo (fp). Sobre el lado derecho se indican los principales subdominios de la región alar (**Dorsal**, **Dorso-Lateral** y **Ventro-Lateral**).

telencefalo en la parte más dorsal de la placa alar. La región diencefálica definida en términos modernos excluye al hipotálamo e incluiría como derivados propios a los prosómeros 1, 2 y 3 que contienen en su respectiva placa alar a las regiones **pretectal**, **talámica** y **pretalámica**, respectivamente (Figs. 1.1 y 1.2). Conjuntamente, el prosencéfalo secundario y el diencefalo constituyen lo que clásicamente se denominaba cerebro anterior o **prosencefalo primario** (His 1895, 1904; von Kupffer, 1906; Kuhlenbeck, 1973; Puelles y Rubenstein 1993, 2003; Puelles y col., 2004; Puelles y col., 2012; Puelles, 2013).

1.2 Mesencéfalo

El **cerebro medio** o **mesencéfalo** es la región del tubo neural localizada entre el prosencéfalo primario y el rombencéfalo. Los límites rostrales y caudales del mesencéfalo se encuentran entre los límites que más temprano se establecen y fijan durante el proceso de regionalización del tubo neural. A medida que avanza el desarrollo, la porción mesencefálica del tubo neural se incurva progresivamente sobre sí misma, dando origen a la **flexura cefálica**; se produce paralelamente una compresión anteroposterior del mesencéfalo ventral y una expansión del mesencéfalo dorsal (Figs.1.1, 1.2). Esta deformación morfogenética del mesencéfalo se puede observar en todos los vertebrados, dando lugar a una forma de cuña en el plano sagital, con una porción ventral muy estrecha y una parte dorsal expandida, que contiene a los colículos superior e inferior, entre otros componentes alares (Fig. 1.1). Muchos estudios clásicos no tienen en cuenta esta deformación flexural, lo que lleva a incluir erróneamente bajo el concepto de ‘mesencéfalo’ ciertas partes cercanas del diencefalo caudal o del rombencéfalo rostral (como si la forma del mesencéfalo fuese cilíndrica). Los patrones de expresión de ciertos genes, así como las diferentes líneas transgénicas que se han utilizado para obtener mapas de destino en el ratón, han contribuido a clarificar definitivamente qué regiones pertenecen verdaderamente al mesencéfalo y cuáles deben ser excluidas (Puelles y col., 2012).

La especificación regional anteroposterior del mesencéfalo ocurre bajo la influencia del **organizador ístmico (IsO)**, un organizador secundario localizado en la unión mesencéfalo-rombencefálica. Este organizador produce señales difusibles de FGF8, cuya concentración gradionalmente decreciente según la distancia al organizador permite a los tejidos que lo rodean seleccionar determinados patrones diferenciales de diferenciación. Experimentos de trasplante de esta región en porciones más rostrales del tubo neural (diencefalo) inducen la diferenciación de estructuras mesencefálicas o rombencefálicas (Martinez y col., 1991). Se ha demostrado que el producto del gen *factor fibroblástico 8* (Fgf8; Crossley y col., 1996) es el principal responsable del efecto de este organizador. Su emergencia y mantenimiento es el resultado de una mutua inhibición de los dominios de expresión de *Otx2* (en mesencéfalo) y *Gbx2* (en rombencéfalo). La adquisición de distintas identidades mesencefálicas en el eje AP se debe a la capacidad de responder al gradiente de FGF8 por parte de las células neuroepiteliales *Otx2* positivas. Este gradiente es por tanto el responsable de la

generación de cuatro áreas mesencefálicas distintas en la placa alar, que se corresponden de rostral a caudal con los siguientes derivados: *Griseum tectalis* (TG), *Colículo superior* (SC) (o *Tectum óptico* en aves), *Colículo inferior* (IC) (o *Torus semicircularis* en aves) y *Preistmo* (PI) (Figs. 1.1 y 1.3) (Hidalgo-Sánchez y col., 2005; Basson y col., 2008; Puelles y col., 2011; Puelles 2013). Cada una de estas cuatro áreas mesencefálicas presenta las tres principales subdivisiones dorsoventrales alares mencionadas previamente (D, DL y VL), siendo importante destacar que sus principales derivados reconocidos con nombre propio (TG, SC, IC y PI) **pertenecen al subdominio DL** (Fig. 1.3A-B) (Puelles y col., 2012).

El límite rostral molecular del mesencéfalo se establece tempranamente durante el desarrollo, aunque un poco más tarde que el IsO. El factor de transcripción *Pax6* expresado del lado diencefálico presenta inhibición mutua con *Pax2* del lado mesencefálico, estableciéndose así el **límite diencefalo-mesencefálico** (DMB). Una de las consecuencias de este evento es que la expresión de *engrailed 1 y 2* únicamente ocurre en el territorio mesencefálico. Este límite marcado molecularmente por la frontera caudal de *Pax6* se corresponde en el adulto con el borde caudal de la comisura posterior. Estudios en aves, mamíferos, pez cebra y anfibios han confirmado la presencia en estas especies de idénticos marcadores moleculares reconociendo el límite diencefalo-mesencefálico (Matsunaga y col., 2000; Ferran y col., 2007, 2008, 2009; Morona y col., 2010; Merchan y col., 2011; Lauter y col., 2013).

Las referencias anatómicas que identifican el límite rostral y caudal del mesencéfalo fueron sugeridas inicialmente por Palmgren (1921), simplemente tras un análisis morfológico atento del desarrollo embrionario en varias especies. El límite caudal, que coincide molecularmente con el borde caudal de expresión de *Otx2* en el mesencéfalo y el límite rostral de expresión de *Fgf8* en el istmo, es reconocible generalmente por una constricción ístmica. El límite rostral del mesencéfalo se reconoce anatómicamente por localizarse por detrás de la comisura posterior de la región pretectal. Este límite en estadios tempranos puede reconocerse por ser el límite caudal de *Pax6* y *Tcf4*, así como también el límite rostral de *Meis2* (Ferran y col., 2007, 2008, 2009; Morona y col., 2010; Merchan y col., 2011; Puelles y col., 2011; Lauter y col., 2013).

El mesencéfalo puede ser dividido a lo largo del eje AP en dos neurómeros, que en esta región del cerebro se denominan **mesómeros 1 y 2**. Estas particiones fueron concebidas hace casi un siglo (también por Palmgren, 1921), pero fueron luego abandonadas por

diversas razones, a las que se ha retornado en los últimos años en trabajos de Puelles y colaboradores. Estos trabajos, considerando tanto evidencias experimentales como de expresión génica, han concluido en la necesidad de concebir un *mesómero 1* (m1), rostral y más grande, que incluye en la placa alar a las áreas mesencefálicas que forman **el griseum tectalis, y los colículos superior e inferior**. Por otra parte el *mesómero 2* (m2) es un pequeño segmento intercalado entre el colículo inferior y el istmo del rombencéfalo, que contiene la denominada **región preistmica** (Fig. 1.3). La placa basal de m1 contiene a la sustancia negra, el complejo oculomotor, el núcleo rojo y otras poblaciones celulares. (Palmgren, 1921; Vaage 1969, 1973; Hidalgo-Sánchez y col., 2005; Puelles y col., 2012; Puelles 2013).

El componente alar más rostral del mesencéfalo contiene como estructura principal al **griseum tectalis (tectal gray; TG)**, también conocido clásicamente (y erróneamente) como núcleo pretectal posterior en la literatura de mamíferos; se trata de una estructura laminar retinorecpiente distinta al colículo superior/tectum, que está localizado caudalmente a ella (Fig. 1.3). Existen estudios comparativos que han caracterizado la región homóloga en aves y se han sugerido comparaciones con otros vertebrados (García-Calero y col., 2002; Puelles y col., 2007). El gris tectal presenta aspectos de sus capas externa, intermedia y profunda que lo diferencian del colículo superior, y, además, su mapa retinotópico es especular respecto al del colículo superior en el eje nasotemporal.

El **colículo superior** en roedores es una estructura retinorecpiente de mayor tamaño que el TG, y ha sido estudiada en más detalle. Convencionalmente se han identificado los **estratos superficial, intermedio y profundo**, cuya función es integrar una entrada de información visual superficial con sendas entradas más profundas de información posicional acústica y somatosensitiva (tacto). Esta integración le permite al colículo superior organizar una respuesta final de orientación sacádica de la mirada, la cabeza y eventualmente el tronco hacia cualquier estímulo visual, acústico o táctil novedoso o de algún modo inesperado (Chalupa, 1984; Huerta y Harding, 1984; Stein, 1984). Se puede observar durante el desarrollo la expresión de diferentes genes a modo de gradiente, cuyo significado probablemente esté relacionado con la generación de identidad posicional de las proyecciones visuales a lo largo de los ejes AP y DV.

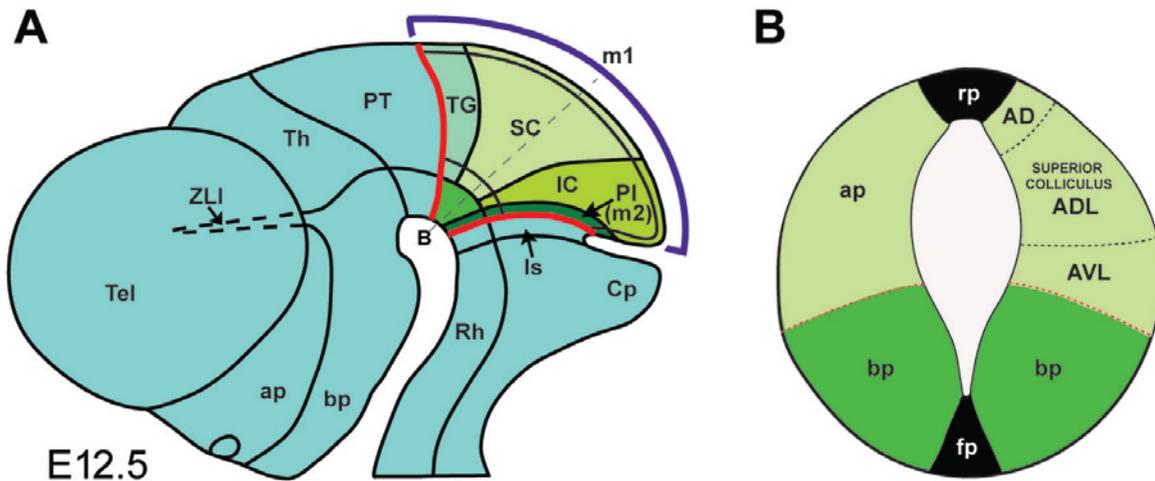


Figura 1.3: Esquemas que representan una vista lateral del sistema nervioso central y una sección transversal a nivel mesencefálico. (A) Esquema que muestra la organización anteroposterior del mesencéfalo, identificándose los dos neurómeros mesencefálicos conocidos como mesómeros 1 y 2 (m1, m2). Se destacan en sentido anteroposterior el griseum tectalis (TG), seguido del colículo superior (SC) y el inferior (IC), de localización más caudal, como principales derivados alares del mesómero 1. El mesómero 2 tiene como componente alar más destacado al preistmo. (B) Representación esquemática de una sección transversal a nivel del territorio mesencefálico ocupado por el colículo superior, en el que se destaca que el colículo superior es un derivado del subdominio alar dorsolateral (ADL). Esquema modificado de Puelles y col., 2012.

El **colículo inferior** en roedores se describe como una formación globular de gran tamaño, compuesta por un núcleo principal central y una cápsula con partes dorsal y externa; el conjunto forma parte de un importante relevo del sistema auditivo ascendente (diana del lemnisco lateral). Se ha postulado que el candidato a homólogo del CI en aves podría ser, en parte o en su totalidad, el **complejo toral (torus semicircularis)**. A diferencia de la protrusión superficial marcada del colículo inferior en los mamíferos, el torus de los no mamíferos, tal como alude su nombre, hace relieve en el interior de la cavidad ventricular del mesencéfalo. Dicho complejo de aves incluye a varios grupos neuronales claramente diferenciados entre los que destacan los del núcleo toral (núcleo central) y una cápsula circundante, entre otros (Puelles y col., 1994; Puelles y col., 2007; Puelles y col., 2012).

La **región preístmica** corresponde a un dominio alar muy estrecho que forma parte del mesómero 2. Entre sus componentes alares más destacados en aves encontramos al núcleo preístmico magnocelular (anteriormente conocido como núcleo ístmico magnocelular), siendo todavía materia de debate cuál es el núcleo homólogo en los mamíferos (Hidalgo-Sánchez y col., 2005; Puelles y col., 2007; Puelles y col., 2012).

1.3 Organización dorsoventral del mesómero 1

Las estructuras mesencefálicas presentan una organización dorsoventral derivada del efecto regionalizante ejercido durante el desarrollo por ciertos organizadores secundarios, como la placa del techo (fuente de moléculas como WNT y BMP), o la placa del suelo (fuente de SHH) (Puelles y col., 2012). Los estudios de expresión de genes más recientes han permitido concluir que tanto los territorios alares como los basales del mesencéfalo pueden ser subdivididos en pequeños subdominios microzonales dorsoventrales (Nakatani y col., 2009; Kala y col., 2009; Puelles y col., 2012; *Allen Developing Mouse Brain Atlas*), tal como fue observado en otras regiones del cerebro como la médula espinal, el rombencéfalo o la región pretectal (Ebert y col., 2003; Wilson y Maden 2005; Zhuang y Sockanathan, 2006; Ferran y col., 2007; Sieber y col., 2007; Morona y col., 2010; Merchán y col., 2011).

El mesómero 1 del cual forman parte el griseum tectalis, el colículo superior y el colículo inferior, presenta divisiones dorsoventrales alares y basales. La división más dorsal corresponde a la **placa del techo (m1-rp)**. Este subdominio tiene un manto pobre en células y es el sitio de cruce de axones comisurales del griseum tectalis y de ambos colículos (comisuras del gris tectal, tectal e intercolicular). A nivel de la placa alar se observan tres subdominios dorsoventrales denominados **alar dorsal (AD)**, **alar dorsolateral (ADL)** y **alar ventrolateral (AVL)** (Figs. 1.2B y 1.3B) (Puelles y col., 2012). A nivel de la placa basal se describen los subdominios lateral, intermedio y medial. Finalmente el subdominio más ventral corresponde a la placa del suelo.

El **subdominio AD** debe concebirse como una columna longitudinal separada del griseum tectalis, colículo superior y colículo inferior, que se extiende al menos en toda la extensión del dominio de m1 (posiblemente también a nivel de m2). Aunque se describe habitualmente como una columna homogénea que atraviesa los tres territorios anteroposteriores de m1 (Fig. 1.3), podrían esperarse diferencias de constitución celular

o de códigos moleculares entre los mencionados territorios, así como alguna estructura microzonal interna. Tal como se verifica en todos los territorios del mesencéfalo, el estrato periventricular de AD aparece formado por un sector parcial de la sustancia gris periacueductal (AD-PAG). En los estratos central e intermedio se localizan las columnas ventral y dorsal de los núcleos paracomisurales tectales (TPCV, TPCD), respectivamente. Estos núcleos también se conocen como columnas longitudinales tectales dorsal y ventral (Saldaña y col. 2007; Puelles y col., 2012; Aparicio y Saldaña, 2013). La columna dorsal está constituida únicamente por neuronas gabaérgicas, dedicadas a proporcionar inhibición masiva a núcleos talámicos de orden superior de una modalidad sensorial específica (Aparicio y Saldaña, 2013). El TPCV recibe proyecciones de varios circuitos del sistema auditivo, incluido el núcleo paraolivar superior, el colículo inferior y la corteza auditiva primaria (Saldaña y col. 2007; Viñuela y col., 2011; Aparicio y col., 2010; Aparicio y Saldaña, 2013).

El **subdominio ADL** contiene de rostral a caudal el griseum tectalis y los colículos superior (tectum en aves) e inferior (torus semicircularis en aves). A nivel periventricular se localiza de nuevo el sector correspondiente de la PAG (AL-PAG). A nivel del **griseum tectalis** del ratón se distinguen unos **estratos central e intermedio**, profundos al estrato **superficial** de naturaleza retinorecipiente. En **aves** se destaca solamente un **estrato central** y uno **superficial**, si bien éste último posee varias láminas celulares o plexiformes (Puelles y col., 2007; Puelles y col., 2012). El **colículo superior** del ratón está formado por **seis capas** (entre grises y blancas), además de la capa profunda correspondiente al PAG. Externamente al PAG se localiza el estrato profundo o central, formado por una capa de sustancia blanca profunda (**DpWh**) y una capa gris profunda, que es superficial a la anterior (**DpG**). El siguiente estrato, denominado intermedio, está formado por una capa blanca intermedia (**InWh**) y una capa gris intermedia (**InG**). Finalmente aparece el estrato superficial, que recibe proyecciones masivas desde la retina ipsi- y contralateral. Este estrato se subdivide de abajo a arriba en la capa de fibras ópticas (Op), la capa gris superficial (SuG), y la capa zonal (Zo; Drager y Hubel, 1975a,b). Es importante destacar que en el SC de los mamíferos aparecen dos capas superficiales al estrato óptico, algo que no se observa en otros vertebrados (Puelles, 2001). El homólogo al CS en aves corresponde al tectum óptico, el cual presenta tres estratos fundamentales conocidos como periventricular, central y superficial (Puelles y col., 2007); habitualmente sólo se subdivide en capas el estrato

superficial. El estrato periventricular es en cierta medida un primordio del PAG, pero también contiene células que en otras especies ocupan estratos más externos. De hecho, la clasificación de diferencias a nivel de estratos y capas no es muy significativa en sentido comparado, ya que se ha comprobado que hay una fuerte conservación evolutiva de determinados tipos neuronales, que varían evolutivamente en su ubicación estratigráfica. Por lo tanto, aunque una capa reciba un nombre equivalente, su contenido celular en términos de tipos característicos es variable. No obstante falta aun un estudio sistemático de tales tipos neuronales con marcadores moleculares, campo de investigación al que se aportará algo en este trabajo.

El **colículo inferior** del ratón está formado por un núcleo periventricular central, flanqueado dorsomedialmente por la corteza dorsal y dorsolateralmente por la corteza externa (Franklin y Paxinos, 2008). El colículo inferior de aves se describe como un complejo formado por tres grupos neuronales denominados originalmente como área intercolicular, núcleo toral y área preístmica superficial; sin embargo existen muy pocos datos que sugieran cuáles son las estructuras homólogas en aves y mamíferos; contamos sólo con algunas apreciaciones generales (por ej., el núcleo central del ratón, como posible homólogo del núcleo central del pollo; Puelles y col., 1994; Puelles y col., 2007).

El **subdominio AVL** de m1 contiene estructuras conocidas como **liminares alares** (de *limen alaris*: borde de la placa alar). Como en el caso del dominio dorsal se extiende a lo largo de los tres territorios anteroposteriores de m1 y se espera que presente diferencias puntuales en cada uno de ellos, que aún no han sido objeto de estudio. Como en los dominios tratados anteriormente, el estrato periventricular está formado por el sector correspondiente del PAG (AVL-PAG), y el estrato intermedio presenta la porción subtectal o liminar de la formación reticular del mesencéfalo. En roedores, el estrato superficial del AVL a nivel del TG está atravesado longitudinalmente por el brazo de conjunción superior (del colículo superior) y el brazo de conjunción inferior (del colículo inferior) (Puelles y col., 2012).

1.4 Organización dorsoventral del mesómero 2

El mesómero 2 corresponde a un dominio de reducidas dimensiones, localizado caudalmente en el mesencéfalo, que forma un delgado anillo transversal dispuesto

rostralmente a la región ístmica. Este último carácter es la razón de recibir el mesómero 2 alar la denominación de región preístmica (Hidalgo-Sánchez y col., 2005). A efectos de localización, el preistmo basal queda encajado entre el núcleo del nervio oculomotor (III par), un componente de la placa basal mesencefálica a nivel de m1, y el núcleo del nervio troclear (IV par), componente basal de la región ístmica, estando el mesómero 2 basal intercalado en el intersticio entre ambos núcleos motores.

La división más dorsal del mesómero 1 corresponde a su placa del techo (**m2-rp**) y se localiza rostral a la decusación del nervio troclear en el techo ístmico. A nivel de la placa alar de m2 se observan de nuevo los tres dominios denominados *alar dorsal* (AD), *alar dorsolateral* (ADL) y *alar ventrolateral* (AVL) (Figs. 1.2B y 1.3B) (Puelles y col., 2012). A nivel de la placa basal existen asimismo los dominios lateral, intermedio y medial. La placa del suelo de m2 tiene como derivado específico al núcleo interfascicular (Hidalgo-Sánchez y col., 2005; Puelles y col., 2012).

El **subdominio AD** presenta como principal derivado el núcleo sagulum, que podría ser una continuidad de la columna paracomisural descrita para el mesómero 1 en su subdominio AD (Saldaña y col. 2007; Puelles y col., 2011; Aparicio y Saldaña, 2013). El **subdominio ADL** que se localiza inmediatamente caudal al colículo inferior contiene como derivado fundamental al complejo nuclear cuneiforme (Puelles y col., 2012). Esta estructura presenta estratos periventricular, intermedio y superficial. En el **subdominio AVL** encontramos al núcleo subcuneiforme.

1.5 Genoarquitectura mesencefálica

El enorme progreso en la última década en la secuenciación de genomas de distintas especies, así como en el desarrollo de herramientas moleculares estandarizadas y programas bioinformáticos accesibles, han derivado en detallados estudios a nivel molecular de las distintas regiones anatómicas del cerebro. Los patrones de expresión génica revelados mediante hibridación in situ pueden ser utilizados como tinciones topográficas que revelan límites arquitectónicos que confirman, cuestionan o complican las divisiones anatómicas del cerebro previamente conocidas; además, esta información es en parte relevante para nuestra comprensión sobre cómo se originan estas estructuras durante la ontogenia y la evolución (sobre todo datos sobre los factores de transcripción).

La genoarquitectura neural se refiere a la descripción estructural de una formación multicelular en términos de sus patrones de expresión génica. Este tipo de análisis aplicado al tejido nervioso permite obtener códigos moleculares que caracterizan a una determinada región, núcleo, estrato o capa del cerebro; tales datos han revolucionado la neuroanatomía moderna (p.ej., Ferran y col., 2009; Puelles y Ferran, 2012).

La finalidad del presente trabajo es verificar mediante un amplio estudio genoarquitectural si la caracterización anatómica del mesencéfalo formulada previamente a este nuevo enfoque técnico es adecuada, o necesita ser reformulada a la luz de los nuevos detalles moleculares que pudieran surgir.

La resultante información molecular detallada permitirá eventualmente postular mecanismos moleculares candidatos a participar en los distintos procesos de especificación de cada dominio mesencefálico. Por otra parte, estos datos serán de gran utilidad para poder hacer comparaciones de tipo homológico entre distintos vertebrados, lo cual permitiría concebir con mayor conocimiento de causa cuáles son los núcleos, estratos y capas fundamentales de esta región del cerebro.

2- OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar genoarquitectónicamente la placa alar mesencefálica de roedores y aves durante el desarrollo y la vida postnatal temprana.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar genoarquitectónicamente los límites rostral y caudal del mesencéfalo durante el desarrollo y estadios postnatales tempranos del ratón.
2. Caracterizar genoarquitectónicamente los subdominios dorsoventrales alares de los mesómeros 1 y 2 del ratón, testando el modelo actual de tres partes.
3. Caracterizar genoarquitectónicamente durante el desarrollo y estadios postnatales tempranos del ratón los derivados del dominio mayoritario DL de la placa alar mesencefálica: el griseum tectalis, el colículo superior, el colículo inferior y la región preístmica.
4. Determinar si las diferencias anteposteriores observadas en el subdominio DL del mesómero 1 tienen correlato también en los subdominios D y AVL del mesómero 1.
5. Caracterizar genoarquitectónicamente los estratos y capas del griseum tectalis, del colículo superior e inferior y de la región preístmica durante el desarrollo y estadios postnatales tempranos del ratón.
6. Comparar los datos obtenidos en ratón y en pollo con la finalidad de destacar las diferencias y parecidos de tipo genoarquitectónico, a efectos de elaborar un modelo topológico de homologías detalladas entre las poblaciones neuronales de esta región cerebral, y específicamente de la subregión peor conocida, el colículo inferior.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cerebros de Ratón y de Pollo

Los animales utilizados para la realización de esta tesis fueron tratados de acuerdo con la normativa Española (Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, B.O.E. no 252, 21 de octubre de 2005, paginas 34367-34391) y la directiva de la Unión Europea (Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de julio de 2003, por la que se modifica la Directiva 86/609/CEE) respecto a la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros procedimientos científicos.

Los cerebros de ratón fueron obtenidos a partir de ratonas gestantes proporcionadas por la Sección de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia, ubicado en el Campus de Espinardo. Las hembras gestantes (*mus musculus*, cepa *Swiss Albino*) fueron mantenidas en una habitación termo regulado y aireado (25 °C) con fotoperiodo controlado (12h Luz y 12h oscuridad) hasta su sacrificio. Para la datación, se consideró como día post-coitum (dpc) o estadio 0.5 (E0.5) el momento en que se observó el tapón vaginal de la hembra, tras el cruce con el macho de la misma cepa. A partir de este momento se contaron los días de gestación. El sacrificio de la hembra se hizo por dislocación cervical. Los embriones de ratón fueron obtenidos entre los estadios E10,5 hasta E18,5, incluyéndose además en el estudio algunos estadios postnatales.

También hemos utilizado imágenes de secciones de cortes de cerebros procesados para hibridación in situ de embriones de ratones diversos estadios de desarrollo, así como postnatales de procedentes del *Allen Institute for Brain Science* (<http://www.alleninstitute.org>).

Los embriones y especímenes postnatales de pollo (*Gallus gallus domesticus*) procedían de huevos suministrados por la Granja Santa Isabel; Córdoba (www.granjasantaisabel.com). Los huevos fertilizados se almacenaron a 14°C, temperatura que maximiza la supervivencia del Zigoto y ralentiza/bloquea el desarrollo. Para su uso fueron incubados en posición inclinada (el eje mayor en paralelo a la base de sujeción) a 38°C, con humedad controlada al 65% y con un lento movimiento basculante (lo que minimiza los abortos y las malformaciones) hasta el estadio embrionario deseado. Su datación se llevo a cabo según la tabla de desarrollo de pollo de Hamburger y Hamilton (1951), la cual estadifica el embrión en función de sus características morfológicas (fig. 3.1)

Para el estudio en embriones de pollo se utilizaron cerebros entre los estadios HH30-HH45 y algunos postnatales seleccionados.



Figura 3.1: Imágenes de estadios del desarrollo en embriones del pollo entre HH1 y HH35 (0-9 días de incubación) propuestas por Hamburger y Hamilton (1951).

3.2 Disección y Fijación

El proceso de la fijación es una etapa clave en su realización, ya que una mala fijación nos va a proporcionar unos resultados erróneos a lo largo de nuestros experimentos de hibridación in situ o de inmunohistoquímica. El objetivo de esta etapa es conservar las células en un estado más parecido al estado vivo, es decir, protegerla del ataque bacteriano u hongos, de la autólisis de sus propias enzimas celulares, distorsiones, conservación de las proteínas, y endurecer el tejido. La elección de un fijador u otro depende del estudio ulterior que vaya a realizar. En nuestro estudio el fijador paraformaldehído al 4% (Prolabo, Cat. No. 28794) fue convenientemente utilizado. El factor tiempo es también importante a la hora de la fijación, ya que algunas técnicas como la inmunohistoquímica requieren un tiempo breve de fijación. Generalmente

fijamos durante una noche los embriones destinados a inmunohistoquímica y durante 24 horas los embriones que vayan a usar en hibridación in situ.

La metodología de disección y fijación varió con la edad de los embriones. Así para embriones de pollo de hasta HH35 y de ratón hasta E14.5, la disección se hizo en dos fases y la fijación fue por inmersión. Para los embriones con estadios superiores a HH35/E14.5 la disección se hace justamente después de la perfusión intracardíaca (ver más adelante).

La primera fase de la disección de los cerebros embrionarios de hasta HH35/E14.5 consistió en extraer al embrión del saco embrionario bajo lupa y en PBS 0,1M (diluyendo 8g de NaCl [Panreac.Cat No141659], 0.2g de KCl [Sigma, Cat. No. P9541], 1.44g de Na₂HPO₄ [Sigma, Cat. No. S3264] y 0.24g de KH₂PO₄ [Sigma, Cat. No. P9791] en 1L de agua filtrada y ajustando el pH a 7.4) con pinzas de microdisección inoxidable desinfectadas y libres de RNasas (RNaseZap, Ambion Cat. No. 9780), limpiarlo de restos de sangre, quitar el máximo de tejido no nervioso y abrir el cráneo para que entrase el fijador. Así se hizo una fijación previa por inmersión en paraformaldehído 4% (PFA 4%) disuelto en PBS al 0.1M.pH7.4 y se dejó unas dos horas para endurecer los tejidos. En la segunda fase, bajo lupa, en frío y en PFA 4%, se extrajo completamente el sistema nervioso central. A continuación se dejó fijando 24 horas a 4°C y en movimiento. El volumen de PFA 4% fue diez veces el volumen de la muestra.

Para los estadios superiores a HH35/E14.5 y para postnatales se realizó una fijación por perfusión intracardíaca que precedía a la fijación por inmersión. Tras la anestesia por frío para los embriones (entre HH36-HH45) o mediante inhalación por éter dietílico (Prolabo, Cat. No. 23809.294) para postnatales y adultos, se abrió la caja torácica, con mucho cuidado para evitar hemorragias y que los órganos y vísceras sufrieran daños y se dejó al descubierto el corazón. Tras la eliminación del pericardio, se insertó una aguja en el ventrículo izquierdo y se hizo un orificio en la aurícula derecha. Por medio de una bomba de perfusión (Peristaltic Pump 66, Harvard apparatus) se inyectó el fijador (PFA4%) que penetró por el ventrículo izquierdo, entró el circuito arterial general hasta el cerebro vía las ramas de la aorta, pasó al circuito venoso y salió por la aurícula derecha. Cuando los tejidos adquirieron un aspecto blanquecino y el animal presentó cierta rigidez, se cortó la cabeza, bajo la lupa se extrajo el cerebro y se dejó fijando 24

horas en el mismo fijador a 4°C y en movimiento. Luego de la fijación los cerebros fueron lavados 3 veces durante 30 minutos en PBS 0.1M para quitar los restos de PFA4%. Los embriones destinados a almacenaje se pasaron a una solución salina (SS, NaCl 8,3g/L) durante 30-90 minutos (según el tamaño del embrión) a 4°C. Posteriormente se hizo un lavado con una mezcla de solución salina y EtOH 70% en proporción 1:1 durante 30-90 minutos y a continuación se lavaron en EtOH 70% durante 30-90 minutos y se almacenaron indefinidamente a 4°C. Los embriones para hibridación in situ o para inmunohistoquímica se dejaron en PBS 0.1M y se procedió a su inclusión.

3.3 Inclusión.

Se hicieron dos tipos de inclusión, una para cortar en vibratomo (Leica VT 1000S), en cuyo caso se incluyó en agarosa; y otra para criostato (Leica CM 3050S), para la cual se incluyó en gelatina.

La inclusión en agarosa (D-1, low EEO, Pronadisa, Cat. No. 8008) se preparó al 4% en PBS 0.1M. Se calentó la solución en microondas hasta su disolución y se pasó a un baño María a 60°C para eliminar burbujas y estabilizar. Para hacer los bloques se utilizaron moldes de plástico prediseñados acordes, se orientaron los cerebros en función del plano de corte deseado y se dejaron solidificar en agua fría con hielo. Una vez obtenido el bloque sólido se talló conforme al plano de sección deseado. Mediante el vibratomo se obtuvieron cortes entre 90- 120µm a una velocidad entre 1 y 3 y una frecuencia de 4. Los cortes fueron recogidos individualmente, mediante un pincel y colocados en placas de petri de 6 (Iwaki, Cat. No. 3810-006) en PBS 0.1M y organizados en varias series paralelas para que la ordenación de cortes sea más fácil.

Para la inclusión en gelatina los cerebros se sumergieron durante 24h en una solución crioprotectora de sacarosa (Panreac, Cat. No. 141621) al 15%-30% en PBS 0.1M. Los cerebros se colocaron en gelatina (Panreac, Cat. No. 142060) al 20% con sacarosa al 15%-30% en tampón fosfato (PBGS). Se creó una pequeña capa de PBGS en molde de plástico y se dejó solidificar durante 30 minutos. Esta base tenía como finalidad que el embrión no tocara el plástico y quedara en el centro del bloque. A continuación se colocó el cerebro y se añadió PBGS hasta cubrirlo. Se dejó solidificar el bloque,

primero a temperatura ambiente y luego a 4°C, durante 1 o 2 horas. El siguiente paso fue tallar el bloque según el plano deseado, para luego pegarlo a una base plana de corcho. La congelación se realizó por inmersión de los bloques en isopentano (2-metilbutano, Sigma, Cat. No. 59070) durante 2 minutos, a una temperatura que se mantuvo, mediante la adición de hielo seco, entre -50 y -55°C para ratón y entre -60°C y -65°C para pollo. Los bloques se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. Los cortes de criostato obtenidos oscilaron entre 15- 40µm, se recogieron en portaobjetos SuperFrost (Thermo Scientific, Cat. No. W505XF) y se conservaron a -80°C hasta su uso.

3.4 Técnicas de Biología molecular e hibridación in situ

Con la finalidad de obtener ribosondas para ser utilizadas en el procedimiento de hibridación in situ en pollo y ratón, se llevó a cabo el procedimiento de clonación en vectores tipo TA. Los procedimientos de clonación e hibridación in situ realizados en esta tesis requirieron de diversas técnicas de biología molecular (**Fig. 3.2**), las serán descritas a continuación.

3.4.1 Clonación

Algunos de los genes utilizados como ribosondas en esta tesis no estaban disponibles en laboratorio, por lo que tuvieron que ser clonados en el laboratorio. El protocolo de clonación consistió en una serie de pasos para los cuales existían varias opciones. En laboratorio se seguían los protocolos derivados de una serie de sugerencias diseñadas por el Dr. Jose Luis Ferran y colaboradores. Estos protocolos son revisiones y modificaciones de los originales ofrecidos por las casas comerciales y de los libros y artículos consultados

3.4.1.1 Extracción del ARN

Se obtuvo 100µg del tejido de interés (todo el embrión en estadios más tempranos), tanto de pollo como de ratón (de forma independiente) y se congeló rápidamente en

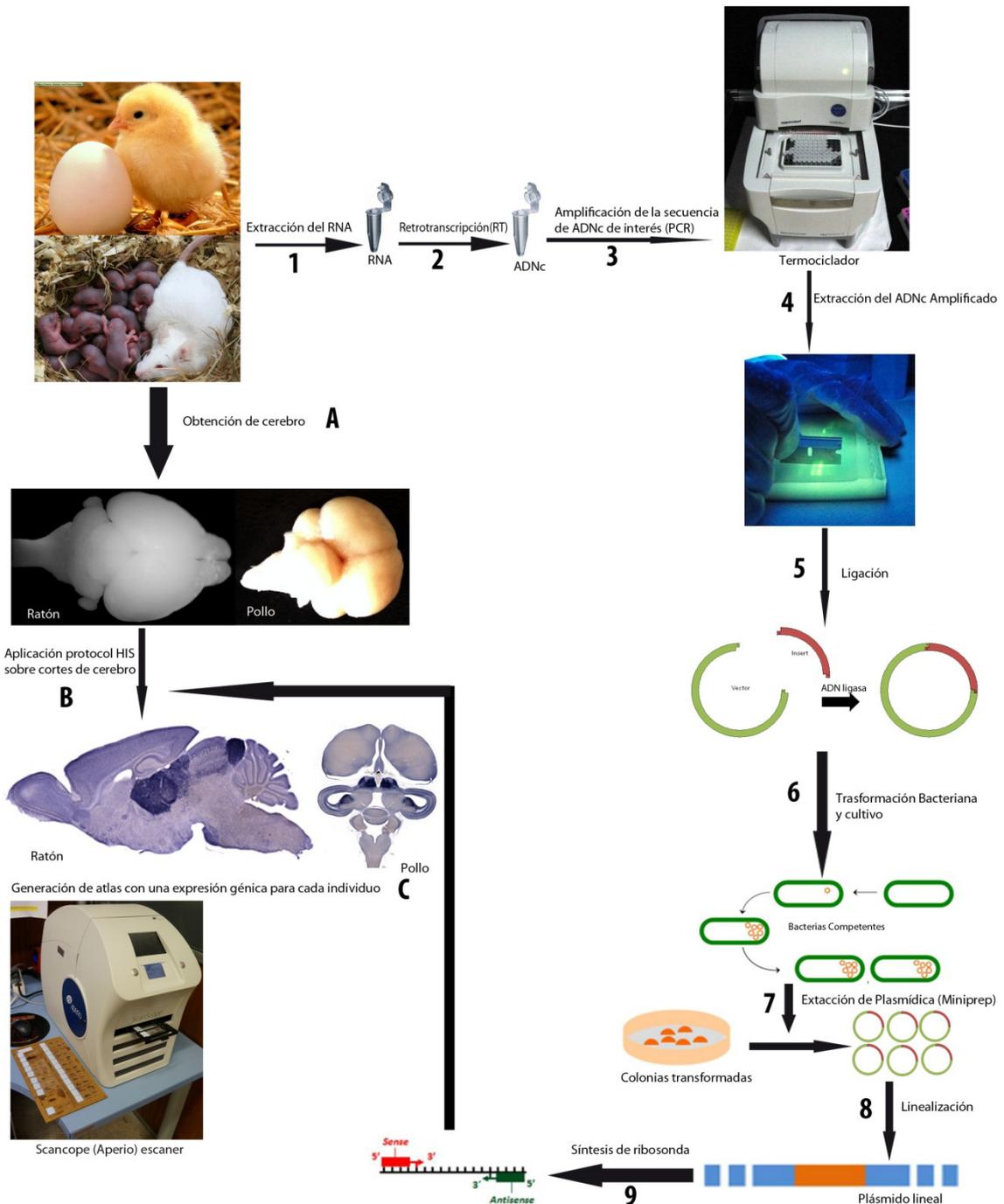


Figura 3.2: Diagrama de flujo que muestra de forma sintética como se interrelacionan los procedimientos de clonación y síntesis de sondas con la hibridación in situ. Por un lado se indican las distintas etapas seguidas con las muestras de tejido durante el procedimiento de clonación y síntesis de sondas a partir del plásmido obtenido (1-9); y por otra parte como a partir del cerebro obtenido se obtienen mediante hibridación in situ secciones seriadas que expresan el gen de interés (A-C).

hielo seco. Para la extracción se utilizó el kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 74104). El procedimiento consistía en añadir 600 μ L de tampón RLT (β -Mercaptoetanol) a los tejidos, homogenizar bien y centrifugar el lisado durante 3 minutos a velocidad máxima. Esto generó una separación de fases en la que el volumen superior contenía el ARN. La fase superior se pasó a otro eppendorf, se agregó mismo volumen de alcohol 70% al sobrenadante, se puso brevemente el tubo en un vortex, y finalmente el contenido se pasó a la columna de separación; la que se centrifugó durante 30 segundos. A continuación se colocaron 350 μ L de tampón RW1 para lavar la columna que se centrifugó durante 30 segundos. El siguiente paso consistió en agregar 80 μ L de DNasa I diluida en tampón RDD (10 μ L de DNasa I + 70 μ L de tampón RDD) a la columna, que luego se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para que se digirieran los restos de ADN mediante la enzima DNasa. Se agregó 350 μ L de tampón RW1 y se centrifugó 30 segundos a 8000g. A continuación, se lavó la columna dos veces mediante 500 μ L de tampón RPE, se centrifugó durante 30 segundos en el primer lavado y 2 minutos en el segundo en las mismas condiciones. Se pasó la columna a otro tubo nuevo de 2 mL y se centrifugó durante 1 minuto para eliminar toda la posibilidad de restos de tampón RPE en la columna. Finalmente, se pasó la columna a un eppendorf de 1.5 mL, se agregó 50 μ L de agua pura sin RNasa (Sigma) y se centrifugó durante 1 minuto para que se diluya el ARN. Se corrió un gel para comprobar la calidad de la extracción (se deben ver dos bandas intensas que se corresponden con los ARN ribosómicos 28S y 18S) y se guardó a -80°C hasta su uso (**Fig. 3.2, paso 1**).

3.4.1.2 Retrotranscripción (RT)

Este paso consiste en una retro-transcripción del ARN total (que incluye el ARNm de nuestro interés) a ADNc. Luego de comprobar la concentración de ARN total (debería estar entre 10 pg y 5 μ g de ARN total), mediante el kit SuperScript III Reverse Transcriptase ((Invitrogen. Cat. No. 18080-093) se procedió a la obtención del ADNc. Se siguió estrictamente el protocolo descrito por la casa comercial que consistió en hacer una desnaturalización en el termociclador a 65°C durante 5 minutos de la mezcla de ARN (11 μ L, se varió según la concentración de RNA total, si estaba más concentrado se ajustó este volumen con agua sigma), cebadores oligo μ DTI) (1 y

desoxinucleótidos dNTPs (1 μ L). A continuación se pasó la reacción a hielo durante 1 minuto y luego se agregaron a la mezcla 4 μ L de first-Strand buffer (5X), 1 μ L de DTT (0.1M), 1 μ L de inhibidor de RNasa (RNaseOUT), 1 μ L de la polimerasa (SuperScript I/III RT, todos provistos por el kit): El siguiente paso fue incubar la mezcla de reacción en el termociclador durante 1 hora a 50°C, seguido inmediatamente de 15 minutos a 70°C. Finalmente se le agregó la enzima RNasa H (18021-014) para eliminar el ARN que había servido de molde. El ADNc resultante fue utilizado como molde para la PCR o se guardó a -20°C (**Fig. 3.2, paso 2**).

3.4.1.3 PCR y amplificación del fragmento del ADN de interés.

La PCR constituye un procedimiento complejo que depende del éxito obtenido en los procedimientos anteriores (**Fig. 3.2, paso 3**). La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica básica de biología molecular para obtener copias de un fragmento particular de ADN. Consiste en etapas sucesivas de desnaturalización del ADN (molde), unión de los cebadores al ADN y síntesis de la hebra complementaria por la ADN polimerasa. Las tres etapas, se repiten unas 30-40 veces (ciclos) dependiendo del objetivo. Además se añaden, una desnaturalización inicial para deshacer posibles estructuras cuaternarias de las moléculas del ADN molde, una elongación final y un paso de conservación en el que las muestras se mantienen a 4°C hasta su análisis.

Utilizando distintos programas bioinformáticos se seleccionaron las secuencias de los genes de interés y se llevó a cabo el diseño de los cebadores (www.ncbi.nlm.nih.gov; <http://www.ensembl.org/index.html>; <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Los cebadores fueron solicitados a MWG-Biotech AG (Fisher Scientific Bonsai, España). La mezcla de reacción utilizada fue ajustada a un volumen final de 25 μ L (*ver tabla 3.1*) y se procedió a la reacción según la programación indicada en la *tabla 3.2*.

Componentes	Volumen (μ l)
5x PCR Buffer	5
25 mM MgCl ₂	2
dNTP Mix 10 mM	0.5
Taq (Promega M3175)	0.5
Primer Izq (10pmol/ μ l)	2
Primer dch (10pmol/ μ l)	2
cDNA	0.5
Agua Sigma	12.5
Total	25

Tabla 3.1: Mezcla de reacción de PCR para un volumen final de 25 μ l.

	Etapas de cada ciclo	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95°C	2'
33x	Desnaturalización	95°C	30''
	Alineamiento	58°C	30''
	Elongación de la polimerasa	72°C	3'
	Extensión final	72°C	20'
	Mantemiento	4°C	∞

Tabla 3.2: Programación de la termocicladora.

Finalizada la PCR se hizo una corrida electroforética del volumen total en un gel al 1% (**Fig. 3.3**).

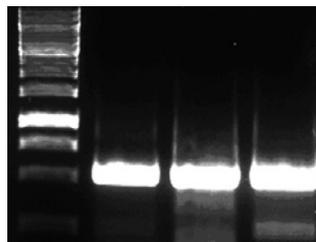


Figura 3.3: Imagen de una corrida electroforética. A la izquierda se observa una escala de referencia (ladder), el cual nos indica que la banda ampificada tiene un tamaño aproximado de 750 pares de bases. Las tres bandas de la derecha corresponden a la amplificación por PCR de un fragmento del gen calbindina 2 (*Calb2*), utilizando cebadores específicos.

3.4.1.4 Extracción del ADN amplificado.

Finalizada la corrida electroforética en un gel de agarosa, utilizando la escala de referencia GeneRuler 1kb (Fermentas, Cat. No. SM0311) para determinar aproximadamente el tamaño de las distintas bandas amplificadas, se seleccionó la banda del tamaño esperado para su extracción (**Fig. 3.2, paso 4; Fig. 3.3**). La extracción se llevó a cabo utilizando un kit comercial (Qiagen, Cat. No. 28704). Finalmente se midió la concentración mediante espectrofotometría y se procedió a la ligación.

3.4.1.5 Ligación

El vector pGEM-T Easy (**Fig. 3.5**) fue el utilizado para la clonación de fragmentos de interés (**Fig. 3.2, paso 5**). El mencionado plásmido se comercializa linealizado presentado en ambos extremos 3' timidinas terminales libres, que será parte del denominado sistema TA. Para poder hacer efectiva la ligación en el sistema TA (Marchuk y col., 1990), durante la etapa de polimerización final de la PCR, la ADN polimerasa unirá adeninas a los extremos 5' de los fragmentos de ADN, generando extremos asimétricos (denominados cohesivos) que son complementarios a las timidinas libres en los extremos 3' del vector de clonación. Para el procedimiento de ligación, se usó el kit pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Cat. No. A1360), con la siguiente mezcla de reacción:

2x Rapid ligation buffer	2.5 μ L
pGEM-T Easy Vector	0.5 μ L
Producto de PCR	1.5 μ L
T4 DNA ligase	05 μ L
Volumen final	5 μ L

La mezcla se dejó, toda la noche a 4°C ó 1 hora a temperatura ambiente, dependiendo de las circunstancias.

3.4.1.6 Transformación

La transformación artificial de bacterias es un proceso de transferencia genética estable que consiste en la introducción de ADN exógeno (plásmido) en una bacteria que es capaz o competente de incorporarlo (**Fig. 3.2, paso 6**). Una vez dentro de la bacteria, el plásmido tiene una replicación génica autónoma, totalmente independiente al ADN

cromosómico bacteriano. Para la transformación se usaron 20 μL de bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α (Invitrogen, Cat. No. 18263-012) y 5 μL de la mezcla de ligación. Se incubaron 30 minutos en hielo, se realizó un choque térmico durante 45 segundos a 42°C (este tratamiento aumenta la permeabilidad de la membrana bacteriana) y se dejaron inmediatamente 5 minutos en hielo. Luego, se agregaron 200 μL de medio de crecimiento S.O.C (Invitrogen, Cat. No. 15544-034) y se dejaron crecer a 250 rpm a 37°C en posición horizontal durante 2h. Transcurrido este tiempo, se añadieron 20 μL de X-Gal a las bacterias transformadas y se sembraron en placas Petri (90mm; Sterilin, Cat. No. 101R20) con LB (se preparó diluyendo en H₂O destilada triptona al 1%; extracto de levadura al 0.5%; NaCl al 1% y Agar 1.5% (Oxoid, Cat. No. LP0011), ajustando el pH 7.2- 7.5 y autoclavando durante 30 minutos a 121°C) + Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C y se colocaron de forma invertida, con la tapa hacia abajo, con el fin de favorecer una mayor oxigenación y propiciar la condensación de la humedad en la tapa y no en el medio.

La selección de las bacterias que habían incorporado el vector con el inserto se estableció en relación a la resistencia a un antibiótico y la síntesis de la enzima β -Galactosidasa. Además del gen de resistencia a ampicilina, el vector de clonación pGEM-T Easy lleva el gen *LacZ* interrumpido por el MCS que contiene el sitio de inserción del ADN exógeno (ver **Fig. 3.5**). Así, en caso que el vector se cierre sin inserto la proteína β -Galactosidasa (codificada por gen *LacZ*) podría ser sintetizada catalizando la hidrólisis de galactósidos (como la galactosa). X-Gal es hidrolizado por la β -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. De este modo, si X-Gal es disuelto en el medio de agar de una placa de cultivo, las colonias crecidas en la placa que posean un gen *lacZ* funcional podrán ser claramente distinguidas por su coloración azul (**Fig. 3.4**). Basado en esta estrategia molecular, de las bacterias transformadas solo podían crecer las que hubiesen incorporado el plásmido (resistencia a ampicilina), y aquellas colonias con inserto aparecerían de color blanquecino (no sintetizaban β -Galactosidasa); mientras que las colonias con vectores vacíos serían azules.

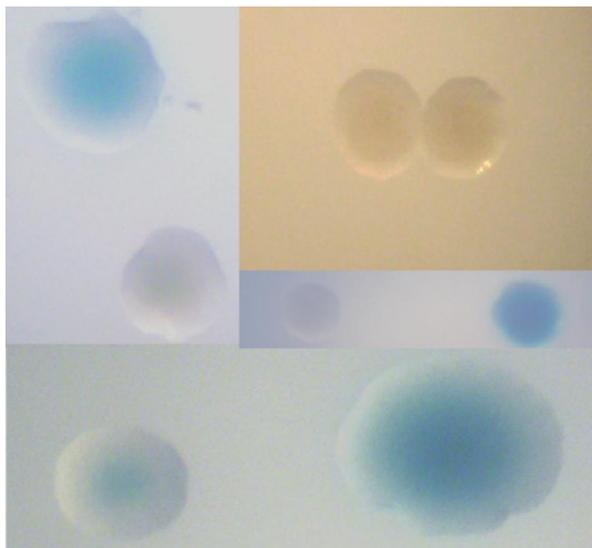


Figura 3.4: Ejemplos de colonias azules y blancas. Las colonias blancas tienen alta probabilidad de contener un inserto; mientras que las azules debido a la expresión de β -Galactosidasa confirman la ausencia de inserto en el sitio de multiclonado del plásmido (MCS).

A la mañana siguiente las placas se pasaron a una nevera de 4°C con objeto de evitar que crezcan colonias satélites y para acentuar la diferencia entre colonias blancas y azules. Se escogieron bajo lupa colonias completamente blancas con bordes uniformes y que estuviesen aisladas de otras colonias (**Fig. 3.4**).

Para comprobar qué colonias tenían el inserto de interés se siguió una estrategia de amplificar por PCR utilizando los cebadores M13 Forward y M13 Reverse para las distintas colonias (blancas). Esta técnica denominada PCR de colonia; consistió en picar una colonia, moverla un poco en un volumen mínimo de mezcla de reacción de PCR (12.5 μ L), para luego sembrar el resto de la colonia bacteriana en una nueva placa con LB + ampicilina. Durante la PCR se alargó la fase inicial de desnaturalización en el termociclador a 5 minutos para romper las membranas de las células y se fijó el tiempo de polimerización según el tamaño del inserto esperado, añadiendo 180pb generado por la distancia de los cebadores M13 hasta el inserto. Una vez terminada la PCR, aquellas colonias que presentaban el tamaño esperado según el inserto, se volvieron a cultivar para hacer al día siguiente una miniprep (Qiagen, cat.No. 27106), un stock de bacterias transformadas (a -80°C) y luego ser enviadas a secuenciar.

3.4.1.7 Análisis de la secuencia

Con la secuencia recibida y mediante BLAST se determinó si el fragmento clonado era el de interés (alineaba con el gen publicado), su longitud exacta (y ubicación en la secuencia publicada) y la orientación de inserto respecto al vector (dirección en la que se sintetiza el ARNm). También se hizo un mapa de restricción por si había sitios de reconocimiento de enzimas que no estaban en la secuencia publicada (variación genética individual). Toda la información obtenida se resumió en las hojas de datos de genes clonados (anexos).

3.4.2 Plásmidos y sondas de ARN

La técnica de hibridación *in situ* utiliza sondas de ARNm antisentido como secuencia complementaria a los ARN a detectar en las células y tejidos. Estas sondas se sintetizan en el laboratorio por una reacción de transcripción *in vitro* a partir de una secuencia molde de ADN clonado en un vector bacteriano.

3.4.2.1 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico circular de doble cadena que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Contienen un origen de replicación u ORI (un punto inicial para la replicación del ADN) que les permite replicarse dentro de la bacteria, al menos un gen que codifica para la resistencia a un antibiótico para la selección de colonias con el plásmido en un medio selectivo con dicho antibiótico, un sitio de multiclonaje (MCS, acrónimo de multicloning site, que contiene numerosas secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción) donde se inserta el ADN exógeno y sitios de reconocimiento de enzimas ARN polimerasas (las más comunes T3, T7 y SP6) para sintetizar moléculas de ARNm (sondas) a partir de fragmentos insertados en estos plásmidos (**Fig. 3.5**).

Los plásmidos con los insertos de interés utilizados en este trabajo en su mayor parte han sido construidos en el laboratorio, pero en algunos casos fueron cedidos por laboratorios colaboradores o comprados a compañías que los comercializan (**Tabla 1**).

Gen	Especie	Vector	Tamaño inserto	Tamaño Vector	Enzima antisentido	polimerasa antisentido	Fuente
Bhlhb4	<i>M. musculus</i>	pBluescript II KS+	1082 pb	3015 pb	NcoI, SacII, SphI	T3	J. L. Ferran
Calb2	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	931 pb	SphI	Sp6	A. Ayad- J.L. Ferran
Dbx1	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	575 pb	XbaI	T7	R. Rubenstein
Enc1	<i>G. gallus</i>	pBluescript II KS+	1200 pb	3000 pb	SalI	T3	M. Hernandez
Enk	<i>G. gallus</i>	pBluescript II KS+	876 pb	3000 pb	NotI	T3	ARK-genomics
Esrrb	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	802 pb	NcoI, SphI, SacII	Sp6	A. Ayad- J.L. Ferran
FoxB1	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	330 pb	SphI/NcoI/SacII	Sp6	J. L. Ferran
FoxP1	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	890 pb	SpeI (BcuI)	T7	J. E. Sandoval
FoxP2	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	462 pb	SacII	Sp6	J. E. Sandoval
Gad67	<i>G. gallus</i>	pBluescript II KS+	1180 pb	3000 pb	NotI	T3	ARK-genomics
Gata3	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	710 pb	NcoI,SphI	Sp6	J. L. Ferran
Gbx2	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb		HindIII	T7	Gail Martin
Gsh1	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	822 pb	NcoI, SphI	Sp6	J. L. Ferran
Lhx2	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb		Eco R1	T7	RZPD
Lim1	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	439 bp	Nde I (PstI, Sal I)	T7	L. Sánchez-Arrones
Meis1	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	950 pb	NcoI	Sp6	J. L. Ferran
Meis1	<i>G. gallus</i>	p-GEM-T Easy	1230 pb	3015 pb	NdeI	T7	J. L. Ferran
Meis2	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	-	SphI	Sp6	J. L. Ferran
Meis2	<i>G. gallus</i>	p-GEM-T Easy	1210 pb	3015 pb	NdeI	T7	J. L. Ferran
nNOS	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	-	SacII	Sp6	J. L. Ferran
Npy	<i>G. gallus</i>	pBluescript II KS+	623 pb	3000 pb	NotI	T3	ARK-genomics
ParvB	<i>G. gallus</i>	p-GEM-T Easy	449 pb	3015 pb	NcoI	Sp6	A. Ayad- J.L. Ferran
ParvB	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	516 pb	NcoI	Sp6	J. L. Ferran
Pax3	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb		SacI, SpeI	T7	J. L. Ferran
Pax6	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb		SphI, SacII	Sp6	J. L. Ferran
Pax7	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	1000 pb	NdeI/SpeI	T7	J. L. Ferran
Penk1	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb		SacII	Sp6	J. L. Ferran
RorA	<i>G. gallus</i>	p-GEM-T Easy	982 pb	3015 pb	SacII	Sp6	J. L. Ferran
Shh	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	640 pb	HindIII	T3	Manuel Irimia
Six3	<i>G. gallus</i>	pBluescript	750	4000 pb	HindIII	T3	Shimamura
Six3	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	408 pb	SacII	Sp6	J. L. Ferran

Tac1	<i>G. gallus</i>	pBluescript II KS+	688 pb	3000 pb	NotI	T3	ARK-genomics
Tac1	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	833 pb	SacII	Sp6	J. E. Sandoval
Tal1	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	818 pb	NdeI,SpeI	T7	J. L. Ferran
Tal2	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb		SphI	Sp6	J. L. Ferran
Tcf7l2	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb		NcoI/SphI	Sp6	J. L. Ferran
Tcf7l2	<i>G. gallus</i>	pBluescript II KS+	2345	3000 pb	HhoI	T7	Nakamura H
Tfap2B	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	671 pb	NcoI,SphI	Sp6	J. L. Ferran
Vglut2	<i>G. gallus</i>	pBluescript II KS+	3000 pb	620 pb	NotI	T3	ARK-genomics
Zic1	<i>M. musculus</i>	p-GEM-T Easy	3015 pb	627 pb	NdeI	T7	J. L. Ferran

Tabla 1. Lista de plásmidos utilizados para los procedimientos con material de ratón (*Mus musculus*) y de pollo (*G.gallus*).

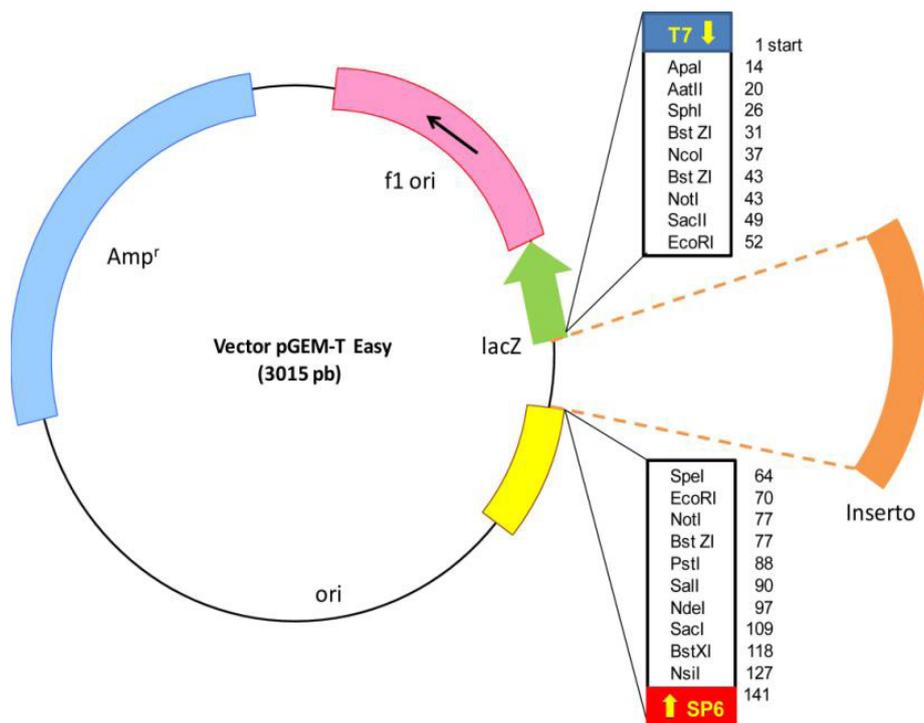


Figura 3.5. Mapa de los principales componentes (promotores, MCS, etc) del plásmido comercial pGEM-T Easy (uno de los más utilizados en biología molecular) y el sitio de inserción del fragmento de ADN exógeno (Morales-Delgado 2012).

3.4.2.2 Linealización

Se usaron dos estrategias para la linealización del plásmido, una basada en endonucleasas de restricción y otra por PCR.

A) *Linealización por endonucleasas*

Dado que el fragmento ADN con la secuencia de interés fue insertado en el MCS del plásmido circular, a ambos lados quedan varios lugares de reconocimiento de enzimas. Como sitio de corte se eligió el flanco que permitía sintetizar una sonda antisentido (opuesto al sitio de unión de la polimerasa de síntesis antisentido) y se selecciono una enzima de restricción que no cortase dentro del inserto y si en el flanco elegido. Una vez seleccionada la enzima de restricción del inserto se hizo esta mezcla de reacción:

ADNp	variable (5µg)
H ₂ O	Variable
Tampón del enzima	5µL
Enzima de Restricción	2µL
Volumen final	50µL

La mezcla de reacción se incubó durante una hora y media a 37°C. Se corrió un gel de agarosa (MS-8, Pronadisa, Cat. No. 8064) al 1% de la mezcla de reacción y de ADN circular para controlar que la enzima cortó y que la reacción había tenido lugar (**Fig.3.6**).

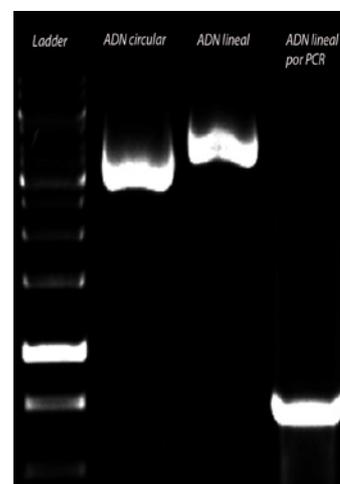


Figura 3.6: Gel de agarosa al 1.5% para visualizar las bandas de ADN circular y lineal. El plásmido circular corre mucho más que el lineal debido a su enrollamiento. El tamaño esperado de nuestro plásmido con la secuencia de interés debe ser observado por lo tanto en la banda del ADN lineal con respecto al marcador de referencia (ladder).

Para la purificación de los plásmidos lineales obtenidos por este método se añadió (en proporción 1:1) 50µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1; Sigma, Cat. No. P2069). Se agitó vigorosamente y se centrifugó a velocidad máxima (14.000g) durante 15 minutos a 4°C. Se pasó el sobrenadante a otro eppendorf estéril y se le añadieron 5µL de acetato sódico (3M pH 5,2; Sigma, Cat. No. S-7899) y 137,5µL de EtOH 100%. Se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó en las mismas condiciones y se retiró el sobrenadante. El pellet resultante se lavó con 150µL de EtOH 70% agitándolo y se centrifugó nuevamente. Tras eliminar el sobrenadante el pellet se dejó secando a 37°C, luego se resuspendió en 25µL de agua pura (Sigma).

Otra opción más rápida de purificar los plásmidos es utilizando el kit miniprep (Qiagen, cat.N. 27106): Luego de incubarlos una hora y media a 37°C con las enzimas, se añadieron 400µL de tampón PB al volumen de reacción (50µL) de plásmidos linealizados; se pasó todo el volumen a la columna de miniprep y se centrifugó durante 1 minuto a velocidad máxima. Luego se agregaron 800µL de tampón PE, se dejó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó un minuto a velocidad máxima. Se centrifugó nuevamente la columna durante 2 minutos para eliminar el exceso de tampón PE, y Finalmente, se pasó la columna a un eppendorf de 1.5 mL, finalmente se agregaron 50 µL de agua pura sin RNasa (Sigma) y se centrifugó durante 1 minutos para que se diluya el plásmido lineal. Se corrió un gel, se midió la concentración mediante el espectrofotómetro y se guardó a -20°C hasta su uso.

B) Linealización por PCR

Los vectores que contienen la secuencia de interés para obtener una ribosonda suelen tener a ambos lados del MCS la región de reconocimiento para las polimerasas T7, SP6 o T3. En los vectores más utilizados suele estar T7 de un lado y SP6 o T3 del otro.

Para amplificar por PCR el inserto, se usaron cebadores diseñados contra las secuencias de origen de la transcripción del bacteriófago M13 (forward y reverse) generalmente insertadas en los vectores flanqueando a los promotores de polimerasas para la secuenciación. Así se amplifica el inserto y el lugar de unión a polimerasas completamente.

Las secuencias de los cebadores utilizados han sido:

M13 Forward 5'- GCCAGGGTTTTCCCAGTCAC -3'

M13 Reverse 5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3'

Se siguió generalmente el protocolo de la casa comercial Promega (GoTaq® Flexi DNA Polymerase) para amplificación ajustando el volumen final a 50 µL:

Promega	Reacción (µl)
5x PCR Buffer	10
25 mM MgCl ₂	4
dNTP Mix 10 mM	1
Taq	0.25
Cebador Izq (10pmol/µl)	4
Cebador dch (10pmol/µl)	4
cDNA	a
Agua Sigma	25.75
Total	50

	Etapas	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización Inicial	95°C	2'
37x	Desnaturalización	95°C	30''
	Alineamiento	58°C	30''
	Extensión	72°C	1'
	Extensión final	72°C	20'
	Mantenimiento	4°C	∞

Tras la amplificación de cDNA mediante termociclador, se hizo una corrida electroforética en un gel de agarosa (**Fig. 3.6**) y se utilizó el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Cat. No. 28704) para la purificación del fragmento amplificado.

3.4.2.3 Síntesis de sondas de ARN o Transcripción in vitro

La reacción de transcripción in Vitro consistió en la síntesis de ARN mensajero monocatenario por una ARN polimerasa en presencia de desoxinucleótidos (dNTPs) a partir de una secuencia de ADN lineal (plásmido linealizado).

El 35% de desoxinucleótido uracilo (UTP) estaba marcado con una proteína detectable por anticuerpos específicos (digoxigenina o fluoresceína).

La mezcla de reacción utilizada está basada en el protocolo de la casa Roche (Nonradioactive In situ Hybridization Application Manual):

ADN plásmido linealizado	Variable(1µg)
H ₂ O libre de RNasa	Variable, dependiendo del volumen de ADN lineal
10x Tampón del Transcripción	2µL (Roche, incluido con cada polimerasa)
10x dNTPs	2µL (Roche, DIG RNA Labeling Mix [Cat. No. 11 277 073 910]. Fluorescein RNA Labelling Mix [Cat. No. 11 685 619 910])
RNasa Inhibidora	2µL (Roche, Cat. No. 03 335 399 001)
ARN polimerasa	0.5µL (Roche, Cat No. T7 10 881 767 001, T3 11 031 163 001 y SP6 10 810 274 001)
Volumen final	20µL

Se puso a incubar 2 horas y media a 37°C. Luego se le añadieron 3µL de DNasaI (Roche, Cat. No. 04 716 728 001), 0.5µL de inhibidor de RNasa y se incubó 15 minutos a 37°C, para eliminar el ADN. Se paró la reacción añadiendo 4µL del quelante EDTA 0.5M pH 8 (Sigma, Cat. No. E7889) mezclada con 40µL de agua sigma.

Se corrió un gel de agarosa para comprobar si la sonda había sintetizado (**Fig. 3.7**). Si está la sonda se añaden 5 μ L de cloruro de litio 8M (Sigma, Cat. No. L7026) y 125 μ L de EtOH 100%, luego se procede a agitar y dejar precipitar toda la noche a -20°C.

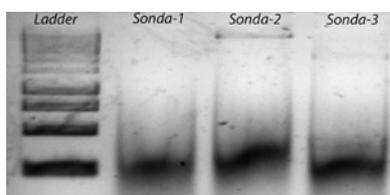


Figura 3.7: Gel de agarosa al 2% para visualizar la ribosonda obtenida durante la transcripción *in Vitro*.

Al día siguiente se centrifugó a velocidad máxima, 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300 μ L de EtOH 70%. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se lavó el pellet con 50 μ L de EtOH 100% centrifugando 10 minutos a 4°C. Se dejó secar el pellet a 37°C y se resuspendió con 25 μ L de agua pura (Sigma). Se dejó 15 minutos a 37°C para que se disuelva el pellet. Se desnaturalizó la sonda durante 3 minutos a 80- 95°C e inmediatamente se llevó a hielo durante 5 minutos. Por último se añadieron 25 μ L de formamida desionizada (Ambion, Cat. No. AM9342) y se almacenó a -20°C).

3.4.3 Hibridación in situ

Una vez cumplidas las etapas descritas en los capítulos anteriores de esta tesis, se procedió a la histoquímica de hibridación in situ propiamente dicha. En general, dicha técnica permiten localizar dónde y cuándo se expresa el ARNm de un determinado gen. Está basada en la característica que tienen los ácidos nucleicos de formar híbridos. La hibridación in situ es una herramienta muy potente en cuanto a la diversidad de información que genera sobre las diferentes poblaciones celulares de un tejido, convirtiéndose en una técnica indispensable en cualquier laboratorio de investigación dedicado a la morfología molecular. El análisis combinado de la distribución espacio-temporal de la expresión génica proporciona una información clave para intentar elucidar el papel causal de los genes durante el desarrollo embrionario, partiendo de una

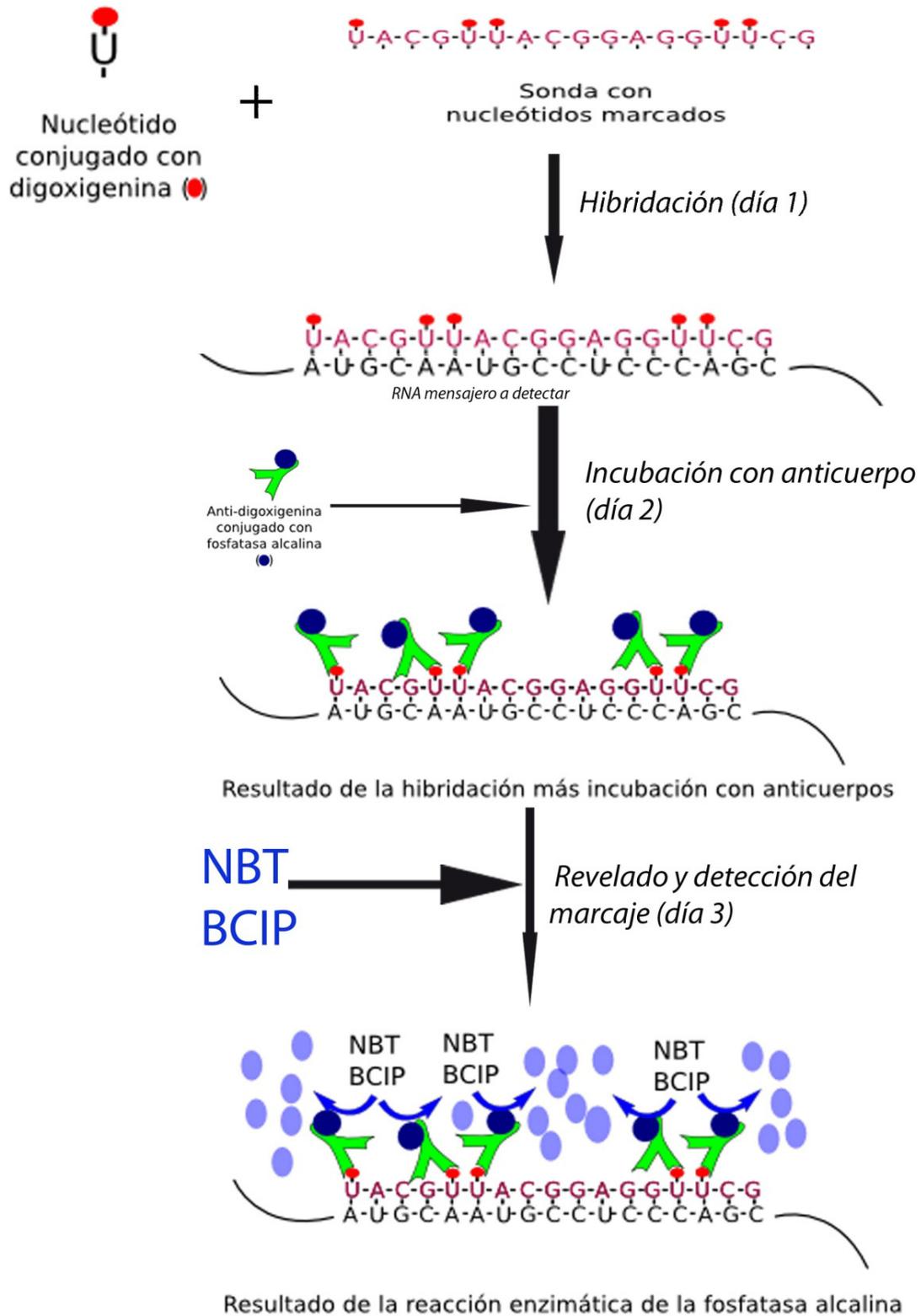


Figura 3.8: Principio de la técnica de hibridación *in situ* de ARNm y sus etapas experimentales. Esta técnica permite localizar secuencias de ARNm en estructuras tejidos o grupos celulares que componen estructuras anatómicas concretas.

caracterización precisa de los diferentes componentes del sistema nervioso a lo largo de la ontogenia.

La primera etapa del consiste en hibridar la ribosonda antisentido (marcada con digoxigenina o fluoresceína) con los ARNm del tejido, formándose así doble híbridos ARN-ARN, en condiciones de astringencia estricta para aumentar la especificidad de la ribosonda de interés y eliminar las uniones inespecíficas. La segunda etapa permite que los fragmentos Fab de los anticuerpos acoplados a la enzima fosfatasa alcalina, que están dirigidos contra la digoxigenina o fluoresceína, se unan a nuestra ribosonda. Numerosos fragmentos Fab de anticuerpos se pegan a una sola ribosonda, potenciando el resultado de la reacción. En la última etapa se añaden los sustratos de la fosfatasa alcalina (ej., NBT/BCIP), los cuales producen una reacción cromógena azul oscura en el citoplasma de las células que contienen el ARNm hibridado con la ribosonda de interés (**Fig. 3.8**).

Para hibridación in situ cromogénica simple y doble en cortes de agarosa se siguió generalmente el protocolo descrito por Shimamura y col. (1994) con modificaciones y adaptaciones posteriores (Ferran y col., 2014). Para el procedimiento de hibridación en secciones de criostato se utilizó un protocolo distinto (Ferran y col., 2014).

3.4.3.1 Hibridación in situ cromogénica simple en cortes de agarosa (Ferran y col., 2014)

El primer día (Día 1) del procedimiento, luego de tres lavados de 10 minutos en PBT (PBS-Tween 0.1% .Sigma, Cat. No. P7949) las secciones se trataron con Proteínasa K (10µg/µL; Roche, Cat. No. 03 115 836 001) durante 5-10 minutos a temperatura ambiente (R/T) sin movimiento para evitar la degradación excesiva de los cortes. En el siguiente paso los cortes se lavaron con PBT (dos lavados rápidos) y se post-fijaron con PFA 4% más glutaraldehído (Sigma, Cat. No. 6257) al 0.25% durante 20 minutos a R/T en movimiento; y se lavaron nuevamente tres veces con PBT durante 10 minutos en cada lavado para eliminar el exceso de paraformaldehído y facilitar la entrada del tampón de hibridación. A continuación se pre-hibridó con tampón de hibridación precalentado (50% de formamida desionizada, 10% de PE 1X (10mM PIPES [Sigma, Cat. No. P1851] y 0.1mM EDTA), 0.5% CHAPS (Sigma, Cat. No. C3023), 0.1%

Tween 20, NaCl 0.75M, 100µg/mL ARNt (Sigma, Cat. No. R5636) y 0.5mg/mL heparina (Sigma, Cat. No. H3393)) durante 1-2 horas a 58°C, para minimizar uniones de la sonda no específicas. Luego se recicló el tampón de hibridación para el próximo uso y se añadió el tampón de hibridación con la sonda a una concentración entre 0.2-2µg/µl y se dejó hibridar toda la noche a 58°C.

Al día siguiente (Día 2) se lavaron los cortes en sucesivos tampones de diferentes concentraciones salinas:

Se lavó 2 veces con el tampón 1 (NaCl 300mM, PE 1X y Tween 20 0.1%) durante media hora cada uno a 58°C y 2 veces con el tampón 1.5 (NaCl150mM, PE 1X, Tween20 0.1) durante media hora cada uno a 50°C. Después se trató con ARNasa (100µ/ml en PIPES 10 mM pH 7.2, NaCl 500 mM y Tween 20 0.1%) durante una hora a 37°C para eliminar la ribosonda no hibridada. A continuación se hizo 1 lavado con tampón 2 (Formamida 50% NaCl 300mM, PE 1X y Tween20 0.1%) y 1 lavado con tampón 3 (Formamida 50%, NaCl150mM, PE 1X y Tween20 0.1%) durante media hora cada uno a 50°C y por último 2 lavado en tampón 4 (NaCl 500mM, PE 1X y Tween20 0.1%) durante 20 minutos cada uno a 65°C. Se siguió con un lavado en MABT (Acido Maleico [Sigma, Cat. No. M0375], NaCl, Tween20 0.1%) durante 10 minutos y se bloqueó en MABT con suero de oveja 10% (Sigma, Cat. No. S2263) y con agente bloqueante de Boehringer (BBR; Roche, Cat.No. 11 096 176 001) 2% durante 2 hora. Posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche, Cat. No. 11 333 062 910) ó anti-fluoresceína conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, en la misma solución bloqueante a una concentración 1/3500 durante toda la noche a 4°C en movimiento.

Al día siguiente (Día 3) las secciones se lavaron seis veces (durante 30 minutos a R/T) con MABT durante 30 minutos cada vez. Posteriormente se lavaron con NTMT (Tris100mM ph 9,5 [Roche, Cat. No. 30 1 11842 001], 100mM NaCl, 50mM MgCl₂ [Sigma, Cat. No. M9272], Tween20 0.1%) añadiendo 0.5mg/ml de levamisol (Sigma, Cat. No. L9756) durante 20 minutos. Y se incubaron en NTMT con NBT ((Roche, Cat. No. 11 383 213 001) 0.45 µl/ml y BCIP (Roche, Cat. No. 11 383 221 001) 3.5 µl/ml, y se dejó a revelar en oscuridad a R/T. La reacción, dio un producto coloreado azulado donde se expresaba el ARNm a estudio (**Fig. 3.9**), y se paró con varios lavados en PBT con 1mM de EDTA.

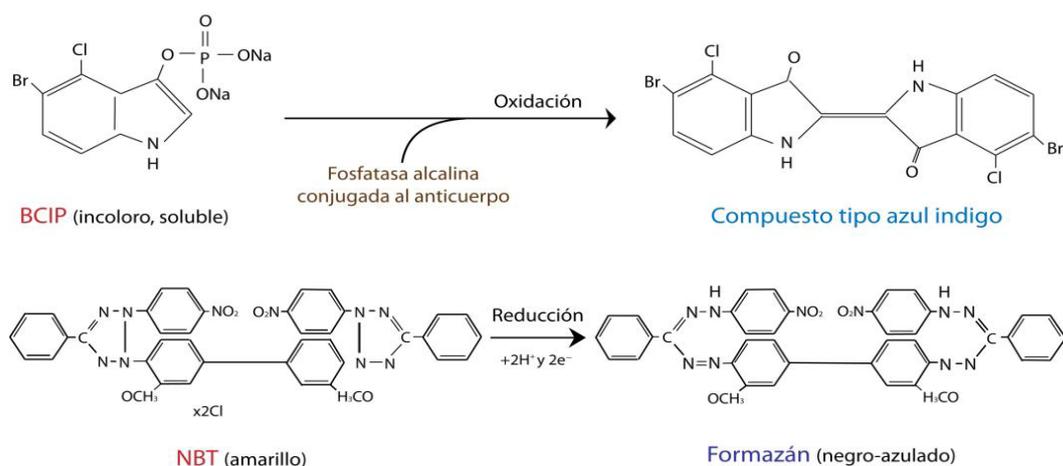


Figura 3.9: Reacción de oxidación-reducción producida en el revelado de la fosfatasa alcalina. Primero se hidroliza el sustrato enzimático BCIP, formándose un intermediario que se dimeriza y se oxida produciendo un compuesto de tipo azul índigo. Al mismo tiempo, el NBT se reduce por los dos equivalentes reductores generados por la dimerización y forma un precipitado insoluble negro-azulado llamado formazán.

Tras el revelado los cortes se post-fijaron con PFA 4% se lavaron varias veces con PBS 0.1M, se ordenaron, se montaron sobre un portaobjetos Superfrost con una mezcla de PBS 1M con 0.5% de gelatina (Merck, Cat. No. 104072), se dejaron secar un par de horas, se deshidrataron en una concentración creciente de etanol hasta EtOH 100% y xileno (Panreac, Cat. No. 141769) y se les colocó un cubreobjetos con el medio de montaje Eukitt (EMS, Cat. No.12673-22).

3.4.3.2 Hibridación in situ cromogénica doble en cortes de agarosa (Ferran y col., 2014)

En este tipo de hibridación se debe tener en cuenta la calidad de las sondas y la sensibilidad de los reveladores de detección para la selección de la mejor combinatoria. El anticuerpo contra digoxigenina (1/3500) y el revelador NBT/BCIP son más sensibles que el anticuerpo contra fluoresceína (1/750) y que el revelador INT/BCIP que precipita con menos eficiencia y es menos visible. En este trabajo, la sonda de peor calidad fue marcada con fluoresceína pero se releva en primer lugar con NBT/BCIP (más sensible), mientras que la sonda de mejor calidad fue marcada con digoxigenina pero se releva en segundo lugar con INT/BCIP (menos sensible) (**Fig. 3.10**).

Para la hibridación doble las dos sondas deben ser marcadas con proteínas inmunodetectables distintas. En esta tesis las sondas fueron marcadas con digoxigenina y fluoresceína.

El protocolo a seguir es exactamente igual que para la hibridación in situ simple, salvo que las dos sondas en el primer día se hibridan al mismo tiempo, se añaden mezcladas las dos ribosondas en el mismo tampón de hibridación. Los lavados posteriores son los mismos, y en primer lugar se incuba con anti-Digoxigenina, se detecta la señal como en la hibridación in situ simple, y posteriormente se procede a lavar 2 ó 3 veces durante 30 minutos con MABT. A continuación se bloquea durante a hora a temperatura ambiente en movimiento. Finalmente se incuba con el segundo anticuerpo (Anti-fluoresceína-AP, Roche, Cat. No.11426338910) a una concentración 1/750 en la solución bloqueante a 4°C durante toda la noche. Para finalizar se recicla el anticuerpo al día siguiente, y se lavo 6 veces con MABT durante 30 minutos en movimiento. Se lava 20 minutos con NTMT y se revela la reacción con NTMT + 33mg/ml de INT/BCIP (Roche, Cat. No. 1681460): 7,5µl/ml. El revelador INT/BCIP se prepara en NTMT precalentado a 37°C para que se disuelva, luego se filtra y se estabiliza a 37°C. La reacción se para con PBT más EDTA 1mM.

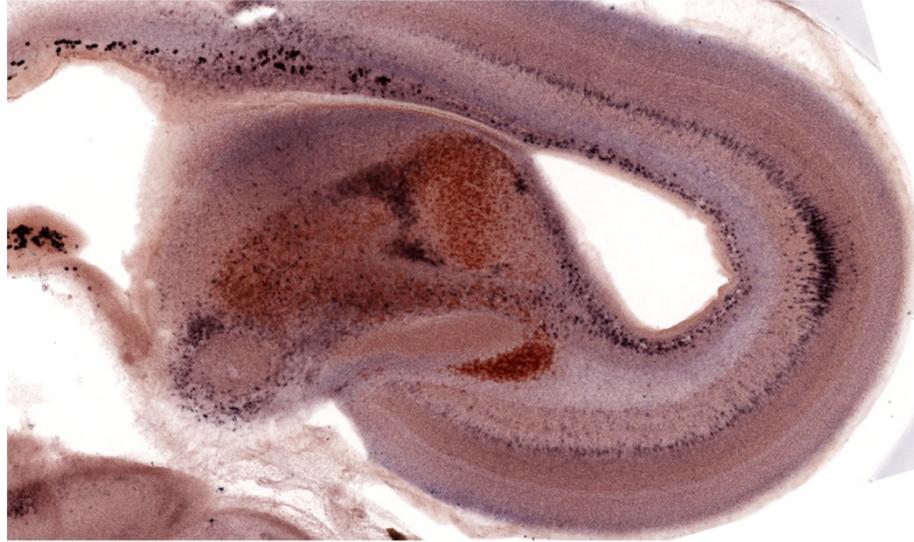


Figura: 3.10: Ejemplo de hibridación in situ cromogénica doble en la que se observa la expresión del gen *Tac1* marcada con Fluoresceína -UTP (color azul) y del gen *Six3* marcada con Dig- UTP (color rojo).

3.4.3.3 Hibridación in situ cromogénica simple en cortes de criostato (Ferran et al, 2014)

El primer día de hibridación los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente durante al menos dos horas. A continuación los portaobjetos se post-fijaron con PFA 4% en una cubeta durante 10 minutos. A continuación se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS. Tras los lavados se sumergieron los cortes durante 10 minutos en agitación en solución de acetilación (3,2 mL Trietanolamina [Sigma, Cat. No. T8521], 420 μ L HCl [Panreac, Cat. No. 141020], Anhidrido acético [Sigma, Cat. No. A6404] en 234 mL H₂O) y tras esto se permeabilizaron durante 30 minutos en PBS-Tritón 1% (Sigma, Cat. No. X100). Se lavaron de nuevo con PBS tres veces durante 10 minutos cada uno y se pre-hibridaron añadiendo 400 μ L de tampón de hibridación sobre los cortes, en posición horizontal en una cámara húmeda durante 2-4 horas.

Transcurrido este tiempo, se prepararon las sondas añadiendo 1 μ L de sonda por cada ml de tampón de hibridación en un tubo que se calentó durante 5 minutos a 80°C y posteriormente se incubó durante 5 minutos en hielo. Se reemplazó el tampón de pre-

hibridación con 200µL de tampón de hibridación que contenía la sonda correspondiente en cada portaobjeto, y se colocó un cubre para evitar la evaporación del tampón. Los portaobjetos fueron incubados durante toda la noche a 72°C.

Al día siguiente, se quitaron los cubres y se colocaron los portaobjetos en una cubeta con SSC 0,2% a 72°C durante 45 minutos. Posteriormente realizó un lavado de 5 minutos con SSC 0,2% a temperatura ambiente seguido de tres lavados de 5 minutos con solución B1 (0,1M Tris pH 7,5; 0,15M NaCl; Tritón X-100 al 0,1%). Se colocaron las portas en una cámara húmeda con solución de bloqueo durante 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente se incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina-AP a concentración de 1/3500 en solución de incubación (B1 más anticuerpo) durante una noche a 4°C.

Al día siguiente, Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con solución B1 y 2 lavados de 10 minutos con solución B2 (0,1M Tris pH 9,5; 0,1M NaCl; 50mM MgCl₂; Tween 0,1%). Posteriormente se revelaron los portaobjetos con la solución de B2 añadido de NBT (4.5 µL/mL) y BCIB (3.5 µL/mL) a 37°C.

La reacción se detuvo colocando los portaobjetos en solución B1. Después se secaron y se deshidrataron los cortes en soluciones sucesivas de alcohol 70%, 96%, 100% y xileno, y finalmente se procedió a su montaje con un cubreobjetos en Eukitt.

3.4.4 Técnicas inmunohistoquímicas

Estas técnicas permiten detectar y localizar proteínas en tejidos y células mediante un anticuerpo diseñado contra antígenos de la proteína objeto. Así se determina dónde y cuándo se expresan las proteínas del gen a estudiar. Debido a los distintos niveles de regulación desde el ARNm a la proteína, la presencia del ARNm no significa que esté siendo traducido a proteína (por modificaciones post-transcripcionales). Cuando la proteína es expresada selectivamente, al igual que los ARNm, nos permite identificar estructuras, tipos o grupos celulares dentro de un tejido. Tras el reconocimiento del antígeno por un anticuerpo primario, se expone el tejido a un anticuerpo secundario hecho contra la especie y conjugado a la biotina. De este modo, la biotina puede ser detectada a través del complejo avidina-biotina acoplado a la peroxidasa (Avidin-Biotin-Complex o ABC). La peroxidasa tiene como sustrato el peróxido de hidrogeno,

el cual oxida la diaminobenzidina (DAB) que da lugar a un precipitado marrón insoluble (**Fig. 3.11**).

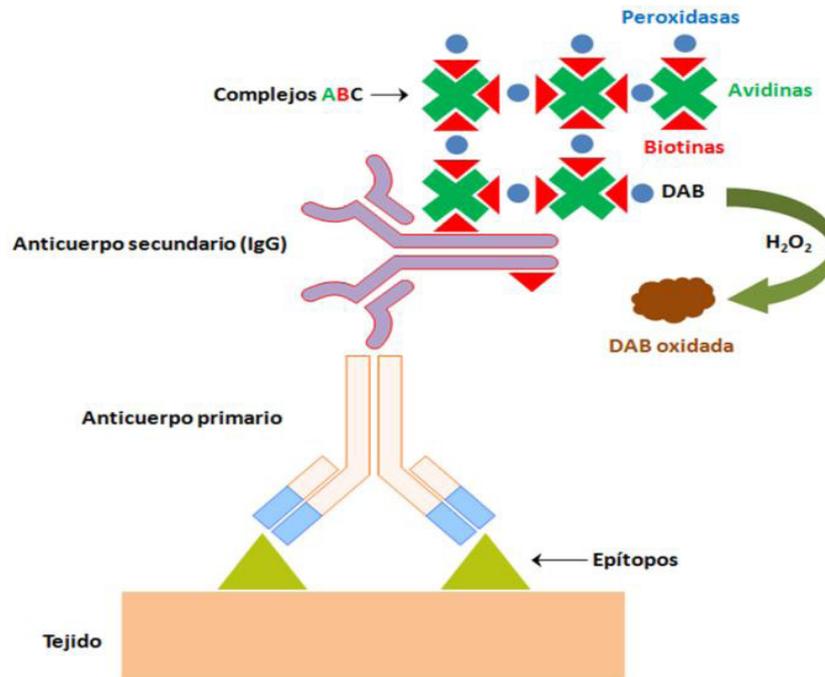


Figura 3.11: Etapas de una inmunohistoquímica que muestran la amplificación de la sensibilidad de la detección de un antígeno mediante el método ABC.

Los pasos de inmunohistoquímica se hicieron a temperatura ambiente en una placa agitadora. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBST (PBS 0.1M con Tritón X100 al 0.1%) en agitación y se trataron con 0.3% de H₂O₂ en PBST durante 15 minutos en agitación y oscuridad. Después de tres lavados de 10 minutos con PBST en agitación vigorosa, se bloquearon los cortes en la solución PBST-GA (PBST; Gelatina al 0.2%; Azida 0.1%) añadido de 0.1M de lisina (Sigma, Cat. No. L5626) durante 90 minutos en agitación y a continuación se incubaron con el anticuerpo primario a una dilución que varió según el anticuerpo en la solución PBST-GA durante una noche a 4°C en agitación lenta.

Al día siguiente, se hicieron tres lavados de 10 minutos con PBST y dos lavados de 10 minutos con PBST-G (PBST; Gelatina al 0.2%). Posteriormente los cortes se incubaron durante 90 minutos en agitación con un anticuerpo secundario a la concentración que varió según el anticuerpo primario usado. Tras tres lavados de 10 minutos cada uno en

PBST, se incubaron en el complejo avidina-biotina (ABC; Vector Laboratories Cat.No. PK-4000) preparado 30 minutos antes, a una concentración 1/350 durante una hora a R/T y movimiento. Después de tres lavados de 10 minutos en PBST y dos lavados de 10 minutos en Tris-HCl 0.05M pH7.4 y PBS se procedió a revelar la reacción con 3,3'-diaminobenzidín tetrahydrochlorid (DAB; AppliChem, A0596) al 1% y 0.03% de H₂O₂ en Tris-HCl en movimiento y oscuridad.

La reacción se detuvo con un par de lavados en Tris-HCl. Tras la inmunohistoquímica se montaron los cortes sobre portaobjetos con una mezcla de Tris-gelatina (0.5% gelatina), se dejaron secar durante un día a temperatura ambiente y se deshidrataron en una serie de alcoholes de porcentaje creciente hasta etanol 100% y xilol; y se cubrieron con cubreobjetos y medio de montaje Eukitt.

3.4.5 Técnicas de hibridación in situ combinada con inmunohistoquímica

Estas técnicas se permiten de obtener doble marcaje sobre los mismos cortes. Los cortes deben procesarse primeramente mediante la hibridación in situ. Tras detener la reacción de hibridación in situ y sin post-fijar los cortes con PFA al 4%, los cortes en PBT se lavaron varias veces con PBST y se continuó con la inmunohistoquímica, tal como se describía antes (parágrafo 3-4-4).

3.5 Visualización y escaneado de las imágenes.

Se escanearon los portaobjetos completos usando un escáner digital (Scanscope SC, Aperio Technologies, EEUU). Este aparato permite obtener imágenes digitales de gran calidad, con aumentos graduables hasta 20x, de un portaobjetos entero.

Posteriormente, mediante el software ImageScope (programa de Aperio) se seleccionaron cada una de las secciones de interés, y se creó un atlas de expresión génica de los cortes procesados. Por último, la elaboración de las figuras fue llevada a cabo mediante el uso de los programas informáticos Adobe PhotoShop CS4 y Adobe Illustrator CS4 (Adobe Systems, San José, CA).

4. RESULTADOS

En primer lugar se describirán los datos genoarquitectónicos que permiten establecer con claridad los límites rostral y caudal del mesencéfalo durante el desarrollo embrionario. A continuación se utilizarán distintos marcadores para definir los distintos dominios anteroposteriores que encontramos en la placa alar mesencefálica (correspondiente a los mesómeros 1 y 2), centrándonos fundamentalmente en los respectivos derivados a nivel del subdominio dorsolateral, que representan el grupo más importante en términos de volumen relativo y tratamiento en la literatura (griseum tectal, colículo superior, colículo inferior y región preístmica). Posteriormente se estudiará genoarquitectónicamente a nivel de los mesómeros 1 y 2 la organización de sus divisiones dorsoventrales. Hemos de destacar que en cada dominio y cada subdominio progenitor encontramos una capa ventricular, el futuro epéndimo, y una zona del manto (mz), donde se desarrollarán las poblaciones neuronales locales. El manto (mz) será sistematizado en términos de estratos periventricular, intermedio y superficial. Eventualmente se describirán las capas correspondientes a cada estrato, cuando existan. Como último apartado, se hará un estudio comparado del mesencéfalo alar entre el pollo y el ratón, centrado particularmente en la genoarquitectura comparada del torus semicircularis/colículo inferior. El presente estudio tiene como finalidad examinar la posible conservación de una topología espacial fundamental (evolutivamente invariante) de los códigos moleculares característicos de estas estructuras, posibilitando así el postular homologías detalladas a nivel de poblaciones neuronales entre los derivados correspondientes del Bauplan común de ambas especies.

4.1 Límites rostral y caudal del mesencéfalo.

4.1.1 Límite diencéfalo-mesencefálico (DMB).

El **límite molecular entre el diencéfalo y el mesencéfalo (DMB)** es reconocido desde estados tempranos del desarrollo por coincidir con el borde caudal de la expresión precoz de *Pax6* en la placa alar diencefálica (Ferran y col., 2007, 2008, 2009, Morona y

col., 2010; Merchán y col., 2011). En el ratón de estadio E10.5 la señal de *Pax6* se localiza en las capas ventricular y del manto de la mayor parte del tálamo y de la totalidad de la región pretectal (dominios diencefálicos de la placa alar de los prosómeros 2 y 1, respectivamente) y detiene su expresión en el borde caudal del pretecho, que corresponde al DMB. En los estadios E11.5 y E12.5 se pierde parte de la señal diencefálica de *Pax6*, pero se sigue observando la expresión en el ventrículo de gran parte del pretecho, mientras que a nivel del manto la señal en la región pretectal se localiza exclusivamente en el dominio comisural o caudal, junto al DMB, con un final caudal neto (Figs. 4.1 H,I). En E14.5 el borde caudal de la expresión comisural pretectal de *Pax6* sigue siendo un marcador molecular de referencia para identificar el límite DMB a nivel de la placa alar, si bien en esta fase su expresión prácticamente se restringe en el manto al estrato periventricular comisural (Fig. 4.5 C-E). En las secciones sagitales que interesan niveles periventriculares se observan los paquetes de axones que componen a la comisura posterior, circulando dorsoventralmente en su totalidad dentro del territorio pretectal comisural (Figs. 4.5 D,E). Ello establece que en lo sucesivo debemos tomar un plano tangente caudalmente a la comisura posterior como DMB, corroborando nuestras nociones previas (Puelles y col., 2012).

Meis2 es otro gen cuya expresión complementaria a *Pax6* identifica el DMB desde estadios tempranos (Ferran y col., 2007; Merchán y col., 2011; Sánchez-Guardado y col., 2011). En E11.5 la señal de *Meis2* se observa en la totalidad de la placa alar del mesencéfalo, tanto en la capa ventricular como en el manto, deteniéndose su expresión a nivel rostral precisamente en el DMB. También se observa señal de *Meis2* en algunos dominios de la placa basal mesencefálica, pero a este nivel no resulta útil como referencia para localizar el DMB (Fig. 4.1 C,D). En E13.5 *Meis2* sigue expresándose en la totalidad de la placa alar mesencefálica, acabando en el DMB (Fig. 4.1 J,K). Sin embargo, a partir de este estadio ya se observa una disminución de la expresión de su mRNA en el dominio más rostral del mesencéfalo, que corresponde al prospectivo TG (Fig. 4.1 J,K). A E16.5 se hace evidente la prácticamente total ausencia de expresión de *Meis2* en los subdominios alares mesencefálicos dorsal y dorsolateral, pero persiste cierta presencia en el subdominio ventrolateral (Fig. 4.6 A,G,M). También se destaca en este estadio la expresión de este gen en componentes superficiales de la región pretectal comisural (población potencialmente migrada tangencialmente desde el mesencéfalo rostral). La observación minuciosa de las secciones permite reconocer que el borde

caudal de *Meis2* en la población superficial del dominio comisural pretectal está indicando el DMB (*cabeza de flecha*, Fig. 4.6 A,G,M). Una observación similar aparece en estadios postnatales, donde claramente la población pretectal dorsal que es *Meis2* positiva marca con su borde caudal el DMB (Fig. 4.12 C).

Se observó, además, que la expresión de *FoxB1* presenta un marcado gradiente en el mesencéfalo, ocurriendo su expresión más intensa rostralmente junto al DMB, a la par que tal reacción falta sobre el lado correspondiente a la región pretectal, convirtiéndose este patrón también en un marcador útil para identificar el DMB en estadio E12.5 (Fig. 4.4 S-U). Hay asimismo expresión marcada de *Esrrb* en la capa del manto del TG (mesencéfalo rostral; Fig. 4.5 A,B,I,J), la cual está ausente en el dominio pretectal caudal, convirtiéndose así este gen en otro marcador clave para identificar el DMB a nivel de la capa del manto entre E11.5-E14.5. La expresión de *Npy* en el manto pretectal yuxtacomisural y comisural es otro patrón presente entre E11.5 y E16.5 (estadios analizados), cuyo borde caudal coincide con el DMB. No hay expresión de este gen en los dominios mesencefálicos rostrales, como el TG y el SC (Fig. 4.6 B).

Otros patrones de expresión analizados se detienen en el límite DMB en fases de desarrollo tempranas hasta E11.5, pero típicamente a partir de E12.5 empiezan a extenderse al territorio mesencefálico. Esto probablemente implique algún fenómeno debido a señales inductivas mediadas por el IsO, que podrían producir este cambio radical en estos estadios tempranos claves. Uno de estos patrones corresponde a la expresión del gen *Tcf7l2* (también conocido como *Tcf4*) que se expresa tanto a nivel de la capa ventricular como del manto de los territorios talámico y pretectal, deteniéndose inicialmente en el DMB hasta los estadios E10.5-11.5. Es a partir de E11.5 tardío cuando se empieza a observar la expresión de este gen en algunas células superficiales de la capa del manto mesencefálico, lo que va incrementándose notablemente a partir de E12.5 (Figs. 4.1 A,B; 4.3 AC). En el estadio E16.5 ya se observa una fuerte expresión de *Tcf7l2* en el colículo inferior y en algunas capas del colículo superior (Fig. 4.6 H-L). Finalmente, en estadios postnatales se observa una intensa expresión en el territorio del griseum tectalis (TG) y del colículo inferior (IC), pero la expresión disminuye en el colículo superior (CS) (Fig. 4.10 A-C). Por lo tanto este marcador solo es útil como referencia para el DMB hasta E10.5, y luego distingue dominios anteroposteriores de m1.

El factor de transcripción *Lim1* es otro gen que hasta E11.5 se expresa de forma significativa en el manto del dominio yuxtacomisural y comisural del territorio pretectal, deteniendo su expresión en el DMB a nivel alar; en esta fase está totalmente ausente a nivel de la placa alar mesencefálica (Fig. 4.1 E-G). A partir de E12.5, no obstante, *Lim1* comienza a expresarse en el manto del TG, del SC y del PI, dejando de ser útil como marcador del DMB (Fig. 4.3 A-G). *Gata3* es otro factor de transcripción que se expresa de una forma similar a la de *Lim1*, estando presente primeramente en la placa alar pretectal (manto del pretecho yuxtacomisural y comisural) y deteniéndose en el DMB; pero con ausencia de expresión en la placa alar mesencefálica hasta E11.5. Sin embargo luego presenta expresión en el manto del TG y SC del mesencéfalo, que comienza a destacarse desde el estadio E12.5 (Figs. 4.1 T,U; 4.3 AB). La señal de *Tal1* y *Tal2* también está primero completamente ausente en el territorio mesencefálico, pero está presente en los dominios yuxtacomisural y comisural de la región pretectal hasta el DMB en embriones de E11.5. Sin embargo a partir del estadio E12.5 estos dos marcadores se pueden detectar también en el TG, SC y PI (Figs. 4.1 L-M; 4.3 U-AA). La expresión de *Sox14* es similar a las anteriores hasta E11.5, debido a que se observa su mRNA en el manto del dominio juxtacomisural del pretecho, y en la capa superficial del dominio comisural, indicando su borde caudal el DMB. Sin embargo, aunque a partir de E12.5 su expresión se observa en el manto del TG y SC, a nivel periventricular sigue marcando el DMB, debido a que este gen no se expresa en dicha capa en el dominio comisural pretectal (Figs. 4.1 N; 4.5 H).

Finalmente, algunos otros genes no destacan por una clara ausencia de expresión a uno de los lados del DMB, pero presentan expresión diferencial a cada lado de este límite, resultando por tanto también útiles para identificarlo.

Bhlhb4 es un factor de transcripción que presenta una expresión diferencial en el manto en los territorios pretectal y mesencefálico (Fig. 4.3 R-T). Al examinar cortes sagitales o horizontales destaca su expresión en el estrato periventricular pretectal yuxtacomisural, pero ausente en el dominio comisural, mientras que se expresa en los estratos periventricular e intermedio del mesencéfalo, inmediatamente detrás del DMB; este detalle es útil para el reconocimiento del DMB en estadios E12/E12.5 (Fig. 4.3 R-T). Similares diferencias de expresión de *Bhlhb4* a ambos lados del DMB se observan en los estadios E14.5 y E16.5 (Figs. 4.5 U-V; 4.8 A-C).

Los factores de transcripción *Pax3* y *Pax7* examinados entre los estadios E11.5-E14.5 se expresan en el manto del dominio comisural pretectal, así como en el mesencéfalo; no obstante, la señal de *Pax3* falta conspicuamente en el manto del TG (mesencéfalo rostral), mientras que la de *Pax7* presenta una clara disminución de su expresión en el manto del TG. Por esta razón ambos marcadores revelan claramente en cortes horizontales el DMB (Figs. 4.4 A,B,K,L; 4.5 K-M).

Dbx1 es un gen que presenta una expresión dinámica durante el desarrollo, pero que durante el estadio E12.5 claramente identifica el DMB. Tanto en secciones sagitales como en horizontales puede observarse la intensa señal de este gen en las capas ventricular y periventricular sobre el lado mesencefálico, deteniéndose rostralmente en el DMB. Por otra parte se observa una expresión muy débil del mensajero del lado pretectal a nivel ventricular (Fig. 4.4 V-W).

El factor de transcripción *Lhx2* presenta su expresión en todos los estratos del manto sobre el lado mesencefálico, pero únicamente a nivel periventricular sobre el lado pretectal, siendo esta expresión diferencial entre ambos territorios útil para localizar el DMB (Fig. 4.4 G,H,Q). Un aspecto similar en cuanto a diferencias a ambos lados del límite DMB puede destacarse en la expresión del gen *Foxp1* en secciones horizontales y secciones sagitales entre los estadios E11.5-E16.5. Sobre el lado pretectal se observa una población superficial en el manto, mientras que sobre el lado mesencefálico la población positiva es fundamentalmente intermedia y periventricular (Figs. 4.4 AD; 4.7 A-B).

4.1.2 Límite mesencéfalo-rombencefálico (MHB).

El límite caudal del mesencéfalo o límite mesencéfalo-rombencefálico (MHB) resulta establecido por la interacción indirecta de antagonismo mutuo de los factores de transcripción *Otx2* y *Gbx2*, partiendo de la situación de que *Otx2* se expresa sobre el lado mesencefálico y *Gbx2* sobre la región rombencefálica (Puelles y col., 2012, Puelles 2013). *Otx2* se expresa desde estadios tempranos en las zonas ventricular y del manto de del diencefalo y la totalidad del dominio mesencefálico; su señal se detiene caudalmente en el MHB prospectivo, ya en fases de placa neural tardía. La expresión de *Otx2* es un marcador clave para identificar el límite caudal del mesencéfalo a nivel de las placas del

techo, alar, basal y del suelo en el estadio E11.5 (Fig. 4.2 A-F,M-P). La observación minuciosa en estadios tempranos muestra que *Otx2* se expresa prácticamente en todo el grosor de la pared neural mesencefálica en estadio E11.5, pero a partir de E13.5 algunos dominios mesencefálicos, notablemente partes del cuadrigémino inferior, apagan la expresión de este gen (Fig. 4.2 A-F,M-X). Nosotros también estudiamos la expresión complementaria de *Gbx2* entre E10.5 y E14.5, y se comprobó que está restringida al lado rombencefálico, siendo igualmente útil para reconocer el MHB (Figs. 4.1 O,P,R; 4.5 O). Un análisis comparado de la expresión de *Gbx2* y *Shh* (un marcador de placa basal en el mesencéfalo) en secciones consecutivas en el estadio E10.5 mostró que *Gbx2* se detecta solamente en la placa alar de la región ístmica (Fig. 4.1 P-S).

El solapamiento temprano parcial de los patrones de expresión de *Otx2-Gbx2* está relacionado con la red génica que da inicio a la expresión en anillo de *Fgf8* sobre el lado rombencefálico, junto al MHB, dando lugar al IsO. Esta expresión de *Fgf8* que instaaura el organizador ístmico se observa en las placas alar y basal, estando prácticamente ausente en los dominios de las placas del techo y del suelo en los estadios E11.5 y E13.5 analizados por nosotros (Fig. 4.2 G-L,Y-AD). El mRNA de *Fgf8* aparece en las zonas ventricular y del manto a E11.5, pero principalmente en el estrato ventricular en el estadio E13.5 (Fig. 4.2 G-L,Y-AD). Según los patrones de *Otx2* y *Fgf8* analizados, se confirma en secciones sagitales que la fóvea ístmica (FI) presente en la placa del suelo del istmo forma parte del rombencéfalo, estando situada caudalmente al MHB (Figs. 4.1 U; 4.2 D,E,J), tal como se aprecia morfológicamente en estadios tempranos (Palmgren 1921). La expresión mesencefálica de *Meis2* limita caudalmente con el MHB, estando ausente a nivel del organizador ístmico; no obstante, este gen se expresa asimismo en el estrato superficial del dominio alar de la región ístmica, siendo por lo tanto un marcador útil para reconocer este límite entre los estadios E11.5-E16.5 (Figs. 4.1 C,D,J,K; 4.6 A,G,M). No se detectó expresión de *Six3* en la placa alar mesencefálica caudal en el estadio E11.5 (o antes); sin embargo tal expresión aparece en el dominio preístmico (PI) del mesencéfalo a partir del estadio E13.5. Debido a que el dominio PI es el dominio más caudal del mesencéfalo, que limita con el MHB, esta expresión es eminentemente útil para reconocerlo a partir de este estadio (Figs. 4.1 V,W; 4.4 AC; 4.5 F,G; y Dutra de Oliveira 2011).

4.2 Dominios y subdominios alares de la región mesencefálica

Como hemos mencionado previamente, el mesencéfalo consta de dos mesómeros (m1, m2), por lo cual distinguimos las correspondientes dos partes de la placa alar, si bien la de m2 es muy reducida anteroposteriormente (Fig.1.3). El mesómero 1 es significativamente de mayor tamaño que el m2, y presenta al menos 4 subdominios anteroposteriores (nosotros definiremos más abajo un quinto subdominio de m1). Ambos mesómeros a su vez presentan una regionalización dorsoventral parecida. Según el modelo propuesto más recientemente, éstas comprenderían como subdominio más dorsal a la **placa del techo (rp)**, seguido en la placa alar por los **subdominios dorsal (D)**, **dorsolateral (DL)** y **ventrolateral (VL)** (Figs. 1.2 y 1.3). El *mesómero 1*, que está localizado rostralmente, presenta en su placa alar las especializaciones alares mesencefálicas más estudiadas y mejor caracterizadas, que pertenecen estrictamente al subdominio DL de la placa alar (Fig. 1.3). En posición más rostral en el subdominio DL se encuentra el **griseum tectalis (TG)** que limita con la región pretectal (diencéfalo), seguido por el **colículo superior (SC)** y el **colículo inferior (IC)** que se sitúa en la posición más caudal de m1. En el *mesómero 2* el dominio DL está representado por la **región preístmica (PI)** (Puelles y col. 2012; Puelles 2013). Nuestro objetivo en este apartado fue obtener a distintos estadios del desarrollo marcadores moleculares que nos permitiesen reconocer y delimitar los componentes anteroposteriores del dominio dorsolateral tanto de m1 como de m2, que se pueden subdividir en diversos estratos, en los que incluimos partes discretas de la sustancia gris periacueductal; en la siguiente sección ello dará lugar a un análisis de la validez del modelo de divisiones dorsoventrales alares propuesto hasta la fecha (Puelles y col., 2012).

En primer lugar centramos nuestra exploración genoarquitectónica en hallar el primer estadio de desarrollo que presenta evidencia molecular de que los diversos dominios alares comienzan a individualizarse. Hemos determinado que solo a partir de E12.5 es posible encontrar marcadores candidatos a individualizar los dominios anteroposteriores de la placa alar mesencefálica. Muchos de los patrones de expresión analizados muestran inicialmente una expresión en gradiente anteroposterior, siendo generalmente la expresión más intensa junto al DMB y disminuyendo progresivamente hacia el límite con el rombencéfalo (MHB).

Otros patrones de expresión muestran localizaciones discretas. Por ejemplo, la

expresión de *Lim1* en estadio E12.5 aparece únicamente en la capa del manto del TG y del SC, estando completamente ausente en el IC, aunque también aparece en el PI (Fig. 4.3 A-J). En el mismo estadio, el gen *Bhlhb4* presenta una distribución similar, aunque se expresa principalmente en la capa periventricular del TG y SC, estando ausente en el IC y PI (Fig. 4.3 R-T). La expresión periventricular de *Bhlhb4* sigue presente en estadios avanzados del desarrollo y postnatales en la región del TG y del SC, aunque se detecta también una población superficial adicional (tardía) en el SC; la señal de este gen continúa prácticamente ausente en el IC y PI (Figs. 4.5 U-V y 4.8 A-J). La expresión ventricular de *Gsh1* observada en estadio E12.5 presenta un claro gradiente con mayor intensidad en el TG, presencia menor en el SC y prácticamente ausencia de señal en el IC y PI (Fig. 4.4 AB). En el estadio E11.5 la expresión del gen *Tfap2B* muestra un claro gradiente rostrocaudal con una expresión muy débil en el manto poco desarrollado del IC y del PI (Fig. 4.3 K-M). En E12.5, este gen se expresa intensamente en el TG y el SC, y está prácticamente restringido a la capa periventricular y su proximidad en el IC y el PI. Este marcador es útil en estadios avanzados y postnatales para reconocer el límite entre el SC y el IC a nivel del manto (Figs. 4.3 N-Q; 4.5 P-T; 4.6 N-R; 4.8 R-V).

En E12.5, el mRNA del gen *Tall* estaba presente en el manto del TG y del SC, mientras que no se observó señal alguna en el IC; pero si una elevada expresión en el PI (Fig. 4.3 U-AA). En comparación, *Foxp1* a E12.5 presenta una expresión diferencial en el manto entre la región del TG y del SC; con señal exclusivamente periventricular en el TG, aparece en el manto periventricular e intermedio en el SC (Fig. 4.4 AD). El gen *FoxB1* se expresa intensamente en el manto del TG y del SC, pero está ausente en el IC y PI a E12.5 (Fig. 4.4 S-U).

Entre los estadios E12.5 y E14.5 se desarrolla la expresión de *Essrb* en el manto del TG, siendo éste un marcador clave para reconocer rostralmente el DMB y caudalmente el límite del TG con el SC (Fig. 4.5 A,B,I,J). La expresión de *Pax7* analizada entre los estadios E12.5 y E14.5 muestra una cierta disminución en los niveles de su mRNA en el TG, mientras que muestra una expresión intensa en ventrículo y manto del SC, pero falta totalmente la expresión de este gen en la mayor parte del IC y el PI. Este marcador es útil para reconocer el límite entre SC e IC (Figs. 4.4 K-P; 4.5 K-M). En estadios de desarrollo más avanzados (E16.5) y en postnatales tempranos (P1) se destaca una expresión selectiva en algunas capas del TG, y una señal más intensa en la mayor parte

del manto del SC, pero continúa siendo no detectable su señal en el IC y PI (Figs. 4.8 N-P; 4.9 C-G).

El gen *Meis2* muestra una clara disminución de su expresión en el TG a partir de E14.5, siendo muy manifiesta tal disminución en estadio E16.5 (Fig. 4.6 A,G,M). Esta ausencia de *Meis2* en la mayor parte de las capas del manto del TG permite reconocer el límite entre el TG y el SC a nivel del manto incluso en estadios postnatales. Este gen también se caracteriza por presentar una elevada expresión en el manto del IC en estadios postnatales, permitiendo diferenciarlo claramente del SC y del PI (Fig. 4.12 C).

El análisis del patrón de expresión de *Npy* muestra que es un marcador útil para identificar el territorio del IC y del PI, ya que está completamente ausente en el SC y en el TG a partir de E11.5, así como en estadios postnatales (Figs. 4.6 B-F y 4.14 A-D). La expresión diferencial que presentan los factores de transcripción *Foxp1* y *Foxp2* a nivel del manto del subdominio DL permite identificar con certeza los subdominios del TG, SC, IC y PI, así como también los respectivos límites entre los dominios (Figs. 4.4 AD; 4.7 A,B,G,H,M-R; 4.9 A,B,H,I). En E11.5 *Foxp1* se expresa en el TG principalmente a nivel periventricular, mientras que su expresión es superficial tanto de la región pretectal como en el SC, lo cual permite en conjunto localizar el DMB y el límite caudal del TG con el SC; en E16.5 aparece también expresión a nivel del estrato central (Figs. 4.4 AD; 4.7 A,B,M). El mRNA de *Foxp1* en el SC y en el PI se observa distribuido en el manto, mientras que está ausente en el IC (Figs. 4.7 A,B,N,O; 4.9 A,B). En el caso de la expresión de *Foxp2* a nivel del TG, ésta destaca por su localización principalmente periventricular y en el estrato central suprayacente (Figs. 4.7 G,H,P; 4.9 H,I). A nivel del SC la señal se localiza también en los estratos periventricular y central principalmente, siendo mucho menor su señal en el estrato superficial, mientras que su expresión en el manto del IC se incrementa de forma notable, permitiendo diferenciar con precisión el SC del IC; y el IC del PI (Figs. 4.7 G,H,Q,R; 4.9 H,I).

El patrón de expresión de *Tcf7l2* comienza a extenderse a partir de E12.5 en los distintos dominios que componen la placa alar mesencefálica, sobrepasando su inicial patrón talámico y pretectal. A diferencia de la expresión pretectal en este estadio de desarrollo, cuya señal se detecta en la zona del manto y en la zona ventricular, a nivel mesencefálico este gen solo se observa intensamente expresado en el manto del TG, SC e IC, estando ausente en el PI. Sin embargo, en este estadio no se observa expresión

diferencial entre TG, SC e IC que permita reconocer con certeza los límites entre estos dominios (Fig. 4.3 AC). Es a partir de E14.5 cuando la expresión en el manto del TG y del IC se mantiene elevada, a diferencia de del SC que se restringe selectivamente a la sustancia gris periacueductal (PAG) y algunas capas del manto, permitiendo de esta forma reconocer con precisión los límites entre los tres territorios. Estas diferencias se mantienen en E16.5 y los estadios postnatales analizados (Figs. 4.6 H-L; 4.10 A-C).

En el caso de los patrones de expresión de *Lhx2* y *Gata3*, aun cuando su expresión se observa en los tres dominios alares de m1 y en m2 alar, éstos se pueden delimitar unos de otros debido a la expresión diferencial de ambos genes. A nivel del TG *Lhx2* se expresa principalmente en los estratos superficial y periventricular, mientras que en el SC se observa tanto en la zona del manto como en la ventricular, siendo su expresión más intensa en el PAG (Fig. 4.7 I-L). El IC se caracteriza por presentar zonas de ausencia completa de expresión (como el núcleo central), mientras que el PI expresa *Lhx2* en todas sus capas (Fig. 4.7 H-L). En el caso de *Gata3* observamos que en E16.5 su expresión a nivel del TG se observa también en los estratos superficial y periventricular, principalmente, mientras que en el SC se expresa en la mayor parte de las capas del manto (a excepción del PAG), si bien está ausente en la capa ventricular (Fig. 4.7 C-F). En el IC, *Gata3* no se expresa en el núcleo central, mientras que parece estar presente en la mayor parte de los derivados del PI (Fig. 4.7 C-F). Como se adelantó más arriba, TG, SC, IC y PI corresponden al subdominio dorsoventral alar de mayor tamaño, denominado DL (Fig. 1.3). En las secciones transversales analizadas para *Gata3* y *Lhx2* se puede observar como a nivel de PAG hay claras diferencias entre los dominios D y DL (Fig. 4.7 E,F,K,L).

Otros marcadores analizados durante el desarrollo fueron *Six3* y *Tal2*. El mRNA de *Six3* se expresa únicamente en el PI hasta E13.5, mientras que a partir de E14.5 aparece su expresión también en el manto del PI y del IC (Figs. 4.4 AC; 4.5 F,G; 4.8 Q,W,X). En el caso de la expresión de *Tal2* hemos observado que en el estadio E16.5 se concentra principalmente en el ventrículo del PI y del IC (Fig. 4.8 K,L).

En estadios postnatales se analizaron algunos marcadores adicionales a los ya mencionados *Tcf7l2* y *Npy*, tales como la expresión de *Calb2* (calretinina), *Penk1* (precursor de encefalina), *Parvb* (parvoalbúmina) y *Tac1* (sustancia P), los cuales también se caracterizan por presentar expresión diferencial entre los tres dominios DL

de m1 (TG, SC, IC) y el de m2 (PI). En las secciones analizadas en estadios postnatales P10 y P25 *Calb2* se expresa intensamente en el manto del TG con suficiente intensidad como para visualizar en secciones sagitales tanto el DMB como el límite del TG con el SC (Fig. 4.10 D). Si bien la *Calb2* también se expresa en el SC, característicamente el núcleo central del IC presenta muy pocas células que expresan este gen, mientras que a nivel del manto del PI se destaca una intensa señal similar a la observada en el TG. Por tanto, este marcador es útil para diferenciar los principales dominios alares mesencefálicos (Fig. 4.10 D-F). *Penk1* muestra una intensa expresión en el manto de algunas poblaciones celulares del TG, mientras que esta prácticamente ausente en el SC. Sin embargo, este gen se expresa selectivamente en el núcleo externo del IC, siendo mínima su presencia en el núcleo central, mientras que algunas poblaciones celulares PI principalmente superficiales también expresan su señal en P25 y P56 (Fig. 4.11 A-E). En el caso de *ParvB*, este marcador fue detectado en ciertas capas del manto del TG y SC, pero con claras diferencias que permiten distinguir ambos territorios. Lo más llamativo resultó ser la intensa expresión de este gen en el núcleo central del IC, y su prácticamente total ausencia en el PI (Fig. 12 A-B). Finalmente, *Tac1* resultó ser un marcador que de forma muy característica permite reconocer en secciones sagitales todos los principales dominios alares mesencefálicos. Su señal está prácticamente ausente en los estratos central y superficial del manto del TG, pero aparece intensamente en el PAG subyacente (Fig. 4.13 A,B). A nivel del SC la expresión se destaca en el sector del PAG correspondiente y en la capa superficial del manto, siendo también abundante su expresión en el núcleo externo y el PAG del IC y en el PI (Fig. 4.13 A-D).

Un análisis pormenorizado genoarquitectónico de la placa alar de m1 durante el desarrollo y en estadios postnatales, centrado en los cuatro subdominios dorsolaterales (DL), permite reconocer marcadores que individualizan cada dominio de la placa alar mesencefálica por su presencia, ausencia o expresión diferencial laminar en relación a regiones adyacentes. Sin embargo es de destacar que solo es posible destacar estas diferencias con claridad a partir de E12.5. El dominio del **griseum tectalis (TG)** se puede reconocer, como mencionamos, por la presencia selectiva de los genes *Esrrb* y *Foxb1*, por la disminución y progresiva ausencia de *Pax7* y *Meis2*, y la expresión diferencial de *Foxp1*, *Fop2*, *Gata3* y *Lhx2*. Además, otros genes resultan marcadores útiles para localizar el TG, como *Tcf7l2*, *Calb2*, *Penk1*, *ParvB* y *Tac1*, ya sea por su

ausencia, expresión diferencial, o intensidad en relación a dominios adyacentes del pretecho o del SC. El **colículo superior (SC)** combina los marcadores mencionados para TG y los correspondientes al dominio IC, relativamente más caudal dentro de m1. Pueden destacarse como marcadores representativos aunque no exclusivos del SC *FoxP1*, *FoxP2*, *Gata3*, *Lhx2*, *Pax7* y *Meis2*, que presentan claras diferencias con el patrón observado en el TG (rostral) y el IC (caudal). El dominio del **colículo inferior (IC)** puede reconocerse ya en E12.5 por la ausencia de expresión de genes tales como *Lim1*, *Bhlhb4*, *Tal1*, *Pax7*, *Gsh1*, *FoxB1* a lo que se suma posteriormente la ausencia de señal de *Tfap2B* en el manto central y superficial a medida que avanza el desarrollo. Por *Npy* identifica selectivamente al IC y otros como *Tcf7l2*, *Meis2*, *Lhx2*, *Foxp2* o *ParvB* lo hacen asimismo por su expresión más intensa en IC en comparación al SC. Finalmente, el **preístmo (PI)** se caracteriza por la expresión selectiva de *Lim1*, *Calb2*, *Six3* (aunque a partir de E14.5 este último marcador se observa también en el IC, probablemente debido a una migración tangencial de neuronas del PI al IC). Aunque el PI comparte la expresión de *Npy*, *Gata3*, *Foxp1*, *Foxp2* y *Lhx2* con el IC, las diferencias son tan significativas como para poder reconocer el dominio sin dificultad. El patrón de *Tcf7l2* resulta asimismo útil, ya que está ausente en el PI, pero no en el IC.

4.3 Divisiones dorsoventrales de la placa alar mesencefálica.

Como hemos mencionado más arriba, los mesómeros 1 y 2 presentan divisiones dorsoventrales primarias que comprenden a las placas del techo, alar, basal y del suelo (Figs. 1.2 y 1.3). Según el modelo más reciente de Puelles et al., (2012), la placa alar se subdivide dorsoventralmente en los subdominios dorsal (D), dorsolateral (DL) y ventrolateral (VL). Nuestro objetivo es comprobar si esta partición DV en la placa alar mesencefálica es detectable mediante los marcadores analizados (y es posible identificar mejor estas divisiones), o si los resultados obtenidos sugieren alguna modificación al modelo actual.

Un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de interpretar nuestro material es que debido a la forma de cuña que presenta la región mesencefálica, donde la reducida placa basal forma el vértice y la voluminosa placa alar forma la base opuesta, es imposible en un mismo seriado obtener secciones estrictamente transversales para todos los dominios alares mesencefálicos; de hecho, es raro ver más de un corte estrictamente transversal

(Fig. 1.3). La mayoría de las secciones que se interpretan como si fuesen transversales incluyen en la misma sección varios territorios alares vecinos, los cuales en realidad se siguen en sentido rostrocaudal (por ejemplo es posible encontrar colículo superior e inferior en la misma sección), o bien ciertas partes del mesencéfalo alar aparecen cortadas oblicuamente, superpuestas a partes más ventrales que pertenecen ya sea al pretecho o al rombencéfalo. Esto es debido a la gran expansión y deformación que experimenta la placa alar en su subdominio dorsolateral, lo cual produce entre otros efectos la deformación en cuña del mesencéfalo y la pronunciada compresión del mesencéfalo ventral a nivel de la flexura cefálica. Los planos teóricamente transversales que delimitan el mesencéfalo se hacen aparentemente oblicuos. Por lo tanto una serie de cortes que es transversal a nivel del centro del mesencéfalo se hace cada vez más horizontal (pasando por grados de oblicuidad) según nos acercamos a los extremos anterior y posterior de la placa alar. Este razonamiento es clave a la hora de interpretar la posición relativa del dominio que estamos caracterizando según los ejes dorsoventral o anteroposterior topológicos (Fig.1).

La **placa del techo** se puede identificar mediante marcadores que selectivamente se expresan en ella, o mediante genes presentes en la placa alar que dejan libre la placa del techo. El gen *Lmx1b* se expresa selectivamente en la placa del techo en todo el territorio mesencefálico (Fig. 4.4 J). El mRNA de *Dbx1*, *Gata3*, *Lhx2*, *Lim1*, *Pax3*, *Tall* aparece expresado selectivamente en la placa alar a partir del límite alar-basal, sin observarse expresión alguna de estos marcadores en el techo a E12.5, reconociendo así el límite placa alar-techo (Figs. 4.3 E-J,W,Z,AA,AB; 4.4 B-F,I,J,L-R,W-AA; 4.7 E,F). En el caso del gen *Tfap2B* se observa que está ausente en la placa del techo hasta E11.5, pero también se distingue su presencia en dicho dominio a partir de E12.5 (Fig. 4.3 L,Q; 4.8 T-V). En relación a *Gata3* y *Lhx2*, en estadios avanzados de desarrollo continuamos observando que en ambos casos el mRNA se extiende entre el límite alar-basal y el alar-techo, estando ausente su señal en la placa del techo (Fig. 4.7 E,F,K,L). La expresión de *Tcf7l2* aparece en la placa alar de los territorios alares de m1, alcanzando el límite alar-basal; está ausente en la placa del techo tanto durante el desarrollo embrionario como en estadios postnatales (Figs. 4.6 H-L; 4.10 B,C). Sin embargo, el gen *Otx2* se expresa tanto en toda la placa alar mesencefálica, como en la placa del techo, no siendo un marcador útil para discriminar este dominio (Figs. 4.2 M-R; 4.5 N).

Habiendo delimitado con precisión la placa del techo en los estadios analizados, el

siguiente paso fue definir los subdominios dorsoventrales de la placa alar mediante marcadores genéticos. En primer lugar analizamos el subdominio dorsal (D) postulado en el modelo de partida. En el material analizado pudimos observar en el periodo embrionario y estadios postnatales que *Zic1* se expresa en la placa del techo y en un territorio adyacente a la misma, estando ausente en el subdominio dorsolateral (DL) a partir del cual se desarrollarán el TG, SC, IC y PI (Figs. 4.8 M; 4.9 C-G,J-N,Q-R). Cuando comparamos en los mismos estadios la expresión de *Zic1* con la de *Pax7* resultó evidente que hay un solapamiento entre un pequeño territorio *Pax7* positivo y la región más lateral que expresa *Zic1* (Figs. 4.8 M-P; 4.9 C-G,J-N). Por otra parte, sabemos por la expresión de *Lmx1b* que el territorio de la placa del techo es muy delgado. Queda por tanto definido el territorio de la placa del techo (*Lmx1b* y *Zic1* positivo), un subdominio adyacente a ésta, que solo expresa *Zic1*, y que denominamos subdominio **Dorsal interno (DI)**, y finalmente un territorio al que denominamos subdominio **Dorsal externo (DE)** que expresa *Zic1* y *Pax7* (Figs. 4.8 M-P; 4.9 C-G,J-N,Q-R). Según nuestros datos el subdominio que se había definido anteriormente como dorsal en realidad está formado por dos subdominios (Dm y DI) que probablemente producirán cada uno derivados específicos. Otros patrones analizados confirman esta interpretación. El gen *Tcf7l2* no se expresa en la placa del techo, pero lo hace intensamente en el PAG del Dm y en el PAG y zona del manto del DI en E16.5 (Fig. 4.6 I-L). El factor de transcripción *Gata3* no se expresa en la placa del techo, en el Dm está ausente en el PAG y aparece intensamente en el resto del manto de Dm, mientras que en el DI lo vemos intensamente expresado en el PAG y el resto de las capas del manto correspondiente (Fig. 4.7 E,F). El patrón de *Lhx2* tampoco se expresa en la placa del techo, y presenta diferencias en sus niveles de expresión en los estratos superficiales y el PAG del Dm y DI (Fig. 4.7 K,L). En el caso de la expresión de *Foxp2*, destaca la ausencia de su señal en la placa del techo (rp) y en el Dm, pero está presente en el manto del DI, con claras diferencias con respecto al subdominio DL adyacente (Fig. 4.7 P-R). Finalmente, al analizar la expresión de *Foxp1* detectamos que estaba ausente tanto en la placa del techo como en los dominios dorsales Dm y DI, observándose únicamente su expresión en el subdominio DL adyacente (Fig. 4.7 M-O). Por lo tanto, se confirma la existencia de un subdominio dorsal vecino a la placa del techo, pero los patrones observados sugieren su partición en partes medial y lateral sutilmente diferentes en varios aspectos moleculares.

El **subdominio dorsolateral (DL)** se corresponde con el TG, SC, IC y PI caracterizados en el apartado anterior. Los patrones de expresión de *Tcf7l2*, *Tfap2b*, *Gata3*, *Lhx2*, *Foxp1*, *Foxp2*, *Npy*, *Six3* y *Pax7* resultan útiles para su estudio, tal como se mencionó en el apartado anterior (Figs. 4.6; 4.7; 4.8; 4.9). Es interesante destacar que la señal de *Gata3* está característicamente ausente en el PAG del DL, pero está presente en el PAG del DI y Dm (Fig. 4.7 E,F). Además, observamos que *Lhx2* y *Foxp1* tienen una expresión intensa y selectiva en el PAG del DL (Fig. 4.7 K,L,M-O), mientras que *Foxp2* lo hace en el PAG del DL y DI (Fig. 4.7 P-R).

Como hemos explicado al inicio de este apartado, si bien rostralmente podemos obtener secciones que son aproximadamente transversales al griseum tectalis (TG) o al colículo superior (SC) (Fig. 4.7 E,K,N,Q), debido a la deformación morfogenética expansiva alar, los cortes más caudales del mismo seriado sistemáticamente incluyen colículo superior, colículo inferior y preistmo en la misma sección, al interesarse oblicuamente u horizontalmente el mesencéfalo caudal (Fig. 4.7 F,L,O,R).

En las secciones transversales a nivel del SC podemos identificar claramente debajo del subdominio DL un **subdominio ventrolateral (VL)**, tal como se postula en el modelo que usamos (Fig.1). El subdominio VL ventral al TG presenta expresión de *Foxp1* en el PAG, a diferencia del subdominio DL suprayacente (TG), que carece de tal señal (Fig. 4.7 M). En cambio, en el subdominio VL situado ventralmente al SC el PAG-VL y las capas periventriculares del manto suprayacentes no expresan *Foxp1*, mientras que el PAG-DL correspondiente al SC sí expresa *Foxp1* (Fig. 4.7 N). Destaca asimismo la ausencia de *Lhx2* en el sector PAG-VL correspondiente al SC, en contraste con su fuerte presencia en el PAG del subdominio DL suprayacente (PAG, DL; Fig. 4.7 K). Finalmente, *Foxp2* se expresa uniformemente en el estrato intermedio de los subdominios VL situados bajo el TG y el SC, y carece de expresión en los estratos periventricular (PAG) y superficial correspondientes; este estrato intermedio de VL positivo contrasta con el de los subdominios DL suprayacentes, donde la señal de *Foxp2* se restringe a una capa intermedia profunda, más gruesa en el TG que en el SC, y se acompaña de expresión en el PAG-DL y alguna señal superficial (Figs. 4.7 P,Q).

Cuando analizamos las secciones más caudales de estos seriados aparecen en la misma sección el SC y el IC (Fig. 4.6 J-L,P-R; 4-7 F,L,O,R; 4.8 N-Q,T-V; 4.9 C-G). Según el modelo de partida, el colículo superior debería contactar directamente con el colículo

inferior; sin embargo, hemos observado sistemáticamente que entre el SC y el IC se dispone un dominio adicional que no había sido bien caracterizado hasta el presente, si bien constaba la presencia de un núcleo intercolicular en esta zona de transición; por ello hemos denominado el dominio histogenético radial completo que aparece intercalado entre SC e IC el **dominio intercolicular (In)**; nótese que en esta zona también existe la comisura intercolicular (Puelles y col., 2012). En principio cabe postular que este nuevo dominio alar también debe estar constituido por subdominios D, DL y VL, tal como ocurre en los restantes casos.

El gen *Foxp1* se expresa selectivamente a nivel del estrato superficial en este territorio intercolicular intercalado entre el SC y el IC, con un patrón bien delimitado en relación a la distribución que presenta este gen en territorios adyacentes (In; Fig. 4.7 O). En cambio, *Foxp2* está ausente en el estrato superficial intercolicular, pero aparece con cierta expresión en los niveles periventricular (PAG) e intermedio de este territorio (In; Fig. 4.7 R). *Gata3* se destaca a nivel del dominio intercolicular por estar prácticamente ausente, salvo por unas pocas células dispersas en el estrato superficial, contrastando tanto con el SC como con el IC (In; Fig. 4.7 F). El gen *Lhx2* se caracteriza por un bajo nivel de expresión en el PAG y estratos intermedio y superficial del dominio intercolicular (In; Fig. 4.7 L). Otros genes analizados, tales como *Pax7*, *Tcf7l2* y *Tfap2B*, también presentaban un patrón característico en este dominio, diferente al observado en el SC e IC (In; Figs. 4.6 I-L,OR; 4.9 C-G).

Como resultado de nuestro análisis de los dominios dorsoventrales hemos concluido que en lugar de existir un dominio Dorsal, debemos considerar los dominios **Dorsal interno** y **Dorsal externo**. Además, nuestro estudio genoarquitectónico destaca la existencia de un nuevo dominio anteroposterior intercalado entre el SC y el IC, el cual no había sido caracterizado hasta el momento. Le hemos denominado **Dominio intercolicular**. (Fig. 4.15).

4.4 Genoarquitectura de los estratos del TG.

El TG es una estructura pluriestratificada. Además de su estrato periventricular o PAG, cubierto por una capa de sustancia blanca central, encontramos un estrato gris central (**CeG**), un estrato intermedio (**InG**) y un estrato superficial retinorecpiente (**SuG**; éste

último es conocido clásicamente como el *núcleo del tracto óptico*, mientras que el resto del TG era conocido erróneamente como *núcleo pretectal posterior*).

Entre los genes analizados a nivel del TG, hemos observado que *Foxp1* se expresa intensamente en el estrato intermedio (InG), así como en el PAG, pero en niveles muy bajos (Figs. 4.7 M; 4.9A,B). Por otra parte *Foxp2* se expresa intensamente en el estrato central (CeG) y de una forma más reducida en el PAG (Figs. 4.7 P; 4.9 H,I). La señal de *Esrrb* aparece intensamente en su capa superficial (TG; Fig.4.5 A,B,I,J), mientras que *Pax7* se expresa preferentemente en el estrato intermedio, a diferencia del SC donde se intensifica superficialmente (TG; Fig. 4.5 K,L; 4.9 C-G). Finalmente hemos observado que *Zic1* en estadios postnatales se expresa en el TG en los estratos superficial e intermedio (Fig. 4.9 O).

4.5 Genoarquitectura de los estratos del colículo superior.

Obtuvimos asimismo códigos moleculares que caracterizan los distintos estratos del manto del colículo superior. El colículo superior (SC) está formado por tres estratos divididos en seis capas, a lo que se añade la sustancia gris periacueductal (PAG) dorsolateral subyacente, que se corresponde con su estrato periventricular. Cubriendo al PAG encontramos el *estrato central*, formado por dos capas, la **capa blanca profunda (DpW)**, y la **capa gris profunda (DpG)**. Sobre éstas se sitúa el *estrato intermedio* con la **capa blanca intermedia (InW)**, y la **capa gris intermedia (InG)**. Finalmente encontramos el estrato superficial, que se divide en la **capa de las fibras ópticas (Op)**, la **capa gris superficial (SuG)** y la **capa zonal** (Drager y Hubel, 1975a,b).

En relación al estrato periventricular, que dará como derivado fundamental en estadios postnatales el PAG, hemos observado que *Bhlhb4* se expresa durante el desarrollo en este estrato (Figs. 4.3 S,T; 4.5 U,V; 4.8 B-J), representando una población que contribuirá probablemente al PAG del SC. *Tcf7l2*, *Tfap2B*, *Lhx2*, *Foxp1* y *Foxp2* son algunos de los genes que hemos observado intensamente expresados en el PAG del SC durante el desarrollo (Figs. 4.6 I-L,O-R; 4.7 K,L,N,O,Q,R). Es interesante destacar que durante el desarrollo y estadios postnatales tempranos, algunos genes como *Pax7* y *Gata3* no se expresan en el estrato periventricular (futuro PAG), pero si lo hacen en los estrato central, intermedio y superficial (Fig. 4.7 E,F; 4.8 N-P; 4.9 C-G). En estadios

postnatales hemos observado que los genes *Tcf7l2* y *Calb2* presentan una mínima expresión en el PAG (Fig. 4.10 B,C,E,F). Secciones que muestran la expresión de *Penk1* en P25 y P56 permiten observar una intensa expresión de este gen en alguna de sus poblaciones celulares (Fig. 4.11 A,B,D,E). Detectamos señal *Meis2* en el PAG en P25, mientras que en P56 (adulto) se presenta únicamente en una población superficial dispersa del PAG (Fig. 4.12 C,D). Finalmente, hemos observado en el PAG una intensa expresión de *ParvB* en P25 y P56 (Fig. 4.13 A,D).

En relación al resto de los estratos, hemos observado que durante el desarrollo *Tcf7l2* presenta una expresión más intensa en el estrato superficial (Fig. 4.6 I-L); mientras que en estadios postnatales está ausente en el estrato superficial, pero presente en las capas grises de los estratos intermedio y central (InG, DpG), pero con un nivel de expresión muy débil comparado con el del colículo inferior (IC) (Fig. 4.10 A-C). Durante el desarrollo, la señal de *Gata3* aparece en los tres estratos, aunque con mayor intensidad en el intermedio (Fig. 4.7 D,E,F); *Lhx2* también aparece en todos los estratos, pero se expresa más intensamente en el superficial (Fig. 4.7 K). La expresión de *Foxp1* es más intensa en los estratos central e intermedio y la de *Foxp2* en el central (Figs. 4.7 N,O,Q,R; 4.9 A,B,H,I). El factor de transcripción *Pax7* se expresa en los tres estratos, pero con mayor intensidad en el superficial (Figs. 4.8 M-P; 4.9 C-G). Igualmente, durante los estadios de desarrollo analizados el factor de transcripción *Tfap2B* aparece en todos los estratos del SC, pero con mayor intensidad en el superficial (Figs. 4.6 N-R; 4.8 R-V).

La señal de *Calb2* (Calretinina) caracteriza los tres estratos, aunque no de forma muy intensa, y está menos presente en el estrato superficial en los estadios postnatales (Fig. 4.10 D-F). El patrón de expresión del gen *Penk1* (precursor de encefalina) en el estrato central, intermedio y superficial presenta una discreta lámina de células en la capa gris del estrato intermedio (InG), y algunas células dispersas en la capa gris del estrato central (DpG) (Fig. 4.11 A,B,D,E). La distribución de la expresión de *ParvB* en estadios postnatales se caracteriza por estar ausente en el PAG y concentrarse fundamentalmente en el estrato superficial (SuG) y en la capa gris del estrato central (DpG) (Fig. 4.12 A-B). En estadios postnatales tempranos (P25) el gen *Meis2* muestra una intensa expresión en todos los estratos del SC, en donde particularmente destacan la capa gris del estrato intermedio (InG) y el PAG (Fig. 4.12 C,D). En estadios postnatales más avanzados se observa una disminución de los niveles de este mensajero, siendo del mismo modo

destacable la expresión en la capa gris del estrato intermedio y en el PAG (Fig. 4.12 C,D). Otro de los patrones de expresión analizados durante estadios postnatales fue la distribución del gen *Tac1* (sustancia P). Su señal se distribuye más intensamente en los estratos superficial y periventricular (PAG). La señal prácticamente estaba ausente en el estrato intermedio (InG), pero se detectó su presencia en algunas células de la capa gris del estrato central (DpG) (Fig. 4.13 A-D).

4.6 Genoarquitectura del colículo inferior del ratón.

El colículo inferior del ratón está formado por el **núcleo central (CIC)**, de naturaleza periventricular, que está rodeado dorsomedialmente por la **corteza dorsal (DCIC)** y dorsolateralmente por la **corteza externa (ECIC)** (Franklin y Paxinos 2008, Puelles y col., 2012). En la corteza externa se describen cuatro capas.

Para el análisis genoarquitectónico del colículo inferior se utilizaron secciones de cerebros postnatales debido a que presentaban un grado de diferenciación más avanzado, necesario para una adecuada caracterización.

Hemos observado que el **núcleo central (CIC)** expresa intensamente *Meis2*, *RorA*, *ParvB*, *Tcf7l2* y *Enc1* en P10, P14 y P25 (Figs. 4.23 A-E,K-O; 4.24 A-E,KO; 4.25 F-J; 4.26 K-O; 4.27 A-E; 4.28 A-E). Se observaron además en este núcleo algunas células aisladas expresando *Tac1* en P10 y *Calb2* en P9, P10 y P25 (Figs. 4.23 F-J; 4.25 A-E; 4.26 F-J; 4.27 F-J). En P0 hay una intensa expresión de *Npy* en la región que podría corresponder al núcleo central (Figs. 4.25 F-J; 4.27 K-O); sin embargo hacia P14 se observa una clara disminución de la expresión en la zona correspondiente al CIC, quedando las células positivas restringidas a las regiones corticales circundantes (Fig. 4.25).

La **corteza externa (ECIC)** expresa intensamente *Calb2*, *Enc1*, *Meis2*, *Npy*, *Tac1* y *Tcf7l2* en P9, P10, P14 y P25 (Figs. 4.23 A-J; 4.24 K-O; 4.25; 4.26 F-O; 4.27; 4.28 A-E). También se observó en esta corteza la expresión de los genes *Penk1* y *ParvB* en algunas poblaciones celulares (Figs. 4.24 A-J; 4.26 A-E).

La **corteza dorsal (DCIC)** expresa intensamente *Calb2*, *Enc1*, *Meis2*, *Npy*, *Tac1* y *Tcf7l2* en P9, P10, P14 y P25 (Figs. 4.23 A-J; 4.24 K-O; 4.25; 4.26 F-O; 4.27; 4.28 A-E). Algunas poblaciones celulares del DCIC expresan el gen *Penk1* (Figs. 4.24 F-J; 4.26 A-E).

4.7 Genoarquitectura de los estratos del PI (subdominio DL).

El subdominio dorsolateral de m2 es una estructura organizada radialmente en estratos que está localizada entre el colículo inferior (IC) y el istmo rombencefálico. Contiene periféricamente a su sector propio del PAG la región conocida como **gris cuneiforme (CnG)**. Esta formación consta de un estrato intermedio, también denominado **núcleo cuneiforme** (profundo; **Cnf**), y un estrato superficial, a veces denominado núcleo cuneiforme superficial, que preferiblemente conviene llamar **núcleo subbrachial (SubB)**, siguiendo a Puelles y col. (2012), para evitar confusión en esta zona limitante entre el mesencéfalo y el istmo rombencefálico. Otras formaciones cercanas que también han sido clasificadas en el complejo cuneiforme parecen ser ístmicas.

Los genes *Lhx2* y *Gata3* no se expresan en el PAG del gris cuneiforme, y están prácticamente ausentes en el estrato superficial, pero sí se expresan en el estrato intermedio durante el desarrollo (Fig. 4.7 F,L). La expresión de *Foxp1* y *Foxp2* también falta en el PAG, pero *Foxp1* aparece en los estratos intermedio y superficial, mientras que *Foxp2* únicamente se expresa en el intermedio durante el desarrollo (Fig. 4.7 O,R). Hay señal de *Npy* principalmente en el estrato intermedio, así como expresión menos intensa en el superficial durante el desarrollo (Fig. 4.6 D,F). El factor de transcripción *Tfap2B* se observó únicamente en el estrato periventricular (PAG) durante el desarrollo (Figs. 4.6 P-R; 4.8 V). *Six3* es un gen que se expresa intensa- y selectivamente en los estratos intermedio y superficial del PI (Fig. 4.8 Q,W). Observamos señal marcada de *Calb2* (calretinina) en el PAG, el estrato intermedio y en menor medida en el estrato superficial en estadios posnatales (Fig. 4.10 F). En estos estadios la señal de *Tac1* aparece en el PAG, en algunas poblaciones del estrato intermedio y en el estrato superficial (Fig. 4.13 A,B,D).

4.8 Genoarquitectura comparada del SC del pollo.

El tectum óptico en aves es en su conjunto la estructura homóloga al colículo superior de los mamíferos. Su estructura es sistematizada habitualmente en estratos periventricular, central y superficial. Los estratos periventricular y central se subdividen en subcapas de sustancia blanca y gris, respectivamente, mientras que el estrato superficial, más complejo, presenta 10 láminas celulares y plexiformes alternadas que en orden desde la superficie a la profundidad (bajo la capa marginal del estrato de fibras ópticas) se identifican ya sea numéricamente (capas 1-10) o alfabéticamente (a-j)

(Puelles y col., 2007). El estrato superficial puede ser dividido asimismo en una parte externa retinorecipiente y de aspecto plexiforme (láminas a-g) y otra interna con mayor densidad neuronal (láminas i,j), separadas por la capa principal plexiforme h, ya visible a los 8 días de incubación (estadio HH34; Fig.4.17). Esta estructura retinorecipiente recibe las fibras aferentes del tracto óptico en su estrato marginal, a diferencia del caso en mamíferos, en los que dicho estrato queda más profundo, bajo el estrato superficial; los terminales ópticos a continuación se ramifican en la mitad externa del estrato superficial (láminas a-f), si bien las sinapsis llegan también a las dendritas apicales de todas las neuronas superficiales situadas más profundamente, incluyendo algunas neuronas del estrato central. Estudios previos de tipo comparado sobre la formación tectal en mamíferos y saurópsidos (Vanegas, 1984; Nieuwenhuys y col., 1998; Butler y Hodos, 2005) ya han puesto de manifiesto que los estratos en sí mismos no son comparables, mientras que sí se pueden identificar poblaciones o tipos neuronales equivalentes en cuanto a su secuencia de diferenciación, tipo histológico, quemoaarquitectura y conectividad (Puelles y Bendala, 1978; Báez y col., 2003; Puelles y col., 2007). Las neuronas equivalentes ocupan con sus cuerpos celulares distintas posiciones en relación a los estratos según la especie. Esto es, la evolución ha sido conservativa respecto a los linajes celulares y sus propiedades morfológicas/funcionales, pero ha permitido variaciones significativas en el grado de migración radial o tangencial de los diferentes tipos celulares, de tal manera que en cada grupo de especies se manifiestan combinaciones particulares de tipos neuronales en las capas o estratos visibles. Un tipo neuronal cuyo soma es periventricular en un reptil puede ser comparable a neuronas del estrato central en un ave y a otras superficiales en un mamífero, con mínimas adaptaciones en el árbol dendrítico. Si bien estas conclusiones están claras a nivel histológico y conectivo, sustentando la invariable unidad funcional del tectum a lo largo de la evolución (movimientos sacádicos de la mirada), hay muy escasa información sobre la vertiente genoarquitectónica, en cuyo terreno tienen cabida los datos aquí presentados.

Genoarquitectura del tectum óptico del pollo en estadios avanzados del desarrollo.

Nuestros datos obtenidos a partir de 15 días de incubación (HH41, HH43, HH45; Figs 17-22), en cuyo momento las migraciones neuronales pueden considerarse terminadas,

indican que tanto *Tcf4* (*Tcf7l2*) como *Meis2* representan marcadores generales de todos los estratos tectales (no podemos resolver si son todos los tipos neuronales en todos los estratos los que expresan estos genes). En el estrato periventricular, que supuestamente es un primordio de lo que será el PAG de mamíferos, aunque puede contener tipos neuronales que pasan a otros estratos, vemos aparecer, aparte de los marcadores generales citados, señal de *Tfap2B*, *Tac1* y *Enk*. El estrato gris central se marca diferencialmente con *RorA*, *Meis1*, *Parv* y *Enk*. Las partes externa e interna del estrato superficial se marcan conjuntamente con *Pax7*, *Enc1*, *Tfap2B*, *Parv* y *Enk*, mientras que la parte interna se marca selectivamente con *Tac1* (en una subcapa profunda), y la parte superficial presenta selectivamente neuronas *Npy* positivas.

4.9 Genoarquitectura comparada del IC del pollo.

El colículo inferior (mamíferos) y el torus semicircularis (aves) corresponden en ambos casos a las estructuras laminares o nucleares mesencefálicas integradas en la vía acústica y derivadas del subdominio dorsolateral más caudal del mesómero1, intercalado entre el dominio intercolicular (In) por delante y el preistmo (PI) por detrás (Figs. 4.15 y 4.16) (Puelles et al., 2007; Puelles et al., 2012). En ambos casos se trata de complejos compuestos por varios estratos desde la profundidad hasta la superficie pial. El colículo inferior de los mamíferos está en gran medida evaginado, generando un relieve redondeado (al que se debe su nombre de ‘colículo’) así como un receso ventricular, lo que indica que todas sus capas se incurvan hacia el exterior. En cambio, la estructura homóloga dentro de la vía acústica, el torus semicircularis presente en aves, reptiles y anfibios, hace relieve en el ventrículo del mesencéfalo (al cual se alude con su nombre ‘torus’), siendo escasamente visible en la superficie (Fig.3.10). Se han descrito particiones específicas de este dominio tanto en mamíferos como en aves; pero sigue siendo materia de debate cuáles serían las subestructuras homologas entre ambos tipos de vertebrados, tomadas de una en una. El objetivo de esta sección es analizar genoarquitectónicamente el complejo toral de las aves, tomando el pollo como modelo. Los códigos moleculares obtenidos podrán ser comparados posteriormente con los del ratón, teniendo en cuenta su topología relativa, sus diferentes desarrollos morfogenéticos y sus códigos moleculares, intentando así postular un modelo de subestructuras homólogas entre ambas especies.

Genoarquitectura del torus semicircularis del pollo.

Recibe la denominación de torus semicircularis una formación nuclear en aves que hace relieve bilateral- y caudalmente en la cavidad ventricular del mesencéfalo (ésta incluye recesos laterales en el lóbulo óptico que amplían el habitual acueducto) por debajo del tectum óptico. En la nomenclatura clásica se le aplicaba el nombre de núcleo mesencefálico lateral. Debido a su desarrollo predominantemente periventricular y a su escasa representación sobre la superficie pial, en aves no se detecta ningún relieve externo del lóbulo óptico mesencefálico que indique su presencia. Estudios anatómicos, así como evidencias quimioarquitectónicas y hodológicas, han llevado a postular varias subdivisiones en el torus de las aves. Se concibe al complejo toral compuesto por un elemento periventricular diversamente subdividido, denominado núcleo toral, sobre el cual se añade una formación superficial menos voluminosa (Puelles et al., 1994; 2007).

El núcleo toral es la masa periventricular responsable del relieve ventricular característico del torus y corresponde a la porción más voluminosa del complejo toral. Se distinguen en este núcleo: 1) la lámina periventricular, que posee una delgada porción axial y una porción capsular más extensa alrededor, 2) el núcleo externo, en el extremo ventrolateral del complejo, 3) el complejo central que posee una porción axial (subnúcleo axial central), y una capsular (subnúcleo capsular del núcleo central), así como los subnúcleos dorsomedial y paracentral (ventromedial) del núcleo central y el área toral hiliar (zona detrás del subnúcleo axial central donde penetra en el complejo la vía acústica aferente, o lemnisco lateral). El subnúcleo dorsomedial representa el extremo dorsal del torus central, que topográficamente se sitúa caudal- y medialmente, protruyendo hacia el estrato superficial (Fig.3.10). La prolongación directa de las fibras del lemnisco lateral penetra radialmente en los componentes denominados hiliar y axiales (por definir el eje de representación tonotópica principal) hasta alcanzar el ventrículo (parte axial de la lámina periventricular y del núcleo central), mientras que los componentes capsulares rodean o abrazan periventricularmente la porción axial del complejo. El área superficial es el componente no periventricular que está vinculado superficialmente al núcleo toral, y que cubre las partes axial y capsular del mismo, en particular su parte dorsomedial. El área superficial también presenta una región celular más densa axial, rodeada por una parte capsular más laxa. Rostralmente al núcleo toral aparece en aves un área diferenciada conocida como **área intercolicular**, implicada en mecanismos de fonación. Como hipótesis de trabajo, asumiremos que este área se

corresponde con el dominio intercolicular descrito más arriba en el mesencéfalo de ratón.

En primer lugar hemos analizado algunos marcadores que nos permiten reconocer la localización del complejo toral y su relación con los dominios adyacentes. La expresión del gen *Tfap2B* aparece en el área intercolicular (In) entre los estadios HH34-HH41 (Fig. 4.17). Por otra parte, este gen está prácticamente ausente en el complejo toral, con presencia reducida principalmente a la lámina periventricular. Ambos detalles genoarquitectónicos permiten reconocer el componente periventricular y el superficial del complejo toral de forma conjunta (no expresan *Tcfap2B*) en relación a los dominios adyacentes intercolicular y preístmico (Fig. 4.17 G,H,I,M,N,O). Por otra parte, se observa que el núcleo externo (E) sí expresa *Tcfap2B*. El externo es un núcleo que limita con el tectum óptico, por lo cual su posición topológica permitiría postularlo como candidato a ser un componente del dominio intercolicular y no del complejo toral (Fig. 4.17). Finalmente, destacamos que la expresión observada a nivel toral periventricular parece concentrarse fundamentalmente en la porción capsular de la lámina periventricular (Fig. 4.17).

Hemos hallado otros patrones de expresión que delimitan el complejo toral al expresarse en la mayor parte de sus derivados, y en algunos casos estar ausentes en los dominios adyacentes. El gen *Enc1* se expresa en la mayor parte de los componentes periventriculares y superficiales del complejo toral; mientras que en la región preístmica y en la mayor parte del área intercolicular adyacente los niveles de mensajero son muy bajos (ver más adelante; Fig. 4.18 G-L). Este gen prácticamente no se expresa en el núcleo externo (E), que es candidato a ser parte del área intercolicular y no del complejo toral, tal como postulamos anteriormente (Fig. 4.18 G-L). La señal de *Six3* se observa en células que componen partes del núcleo toral, así como en poblaciones del área superficial, estando ausente en la lámina periventricular toral. Se destaca la ausencia del mensajero de *Six3* en el dominio intercolicular y en el núcleo externo (Fig. 4.18 M-R). Este marcador permite reconocer un límite entre el complejo toral y el dominio intercolicular en toda la dimensión radial. Finalmente, observamos la expresión intensa del factor de transcripción *Tcf712* (*Tcf4*) en todos los derivados del complejo toral, estando ausente en el dominio preístmico (núcleo preístmico magnocelular, Im), y disminuido significativamente en el área intercolicular (Fig. 4.18 A-F). Mediante hibridación in situ cromogénica doble de *Tcf712* y *Six3* es posible, por un lado,

reconocer la intensa expresión de *Tcf7l2* (azul) en el dominio del complejo toral, bien diferenciada, por otra parte, del dominio preístmico contiguo que expresa *Six3* (rojo) (Fig. 4.21 N-P). La expresión de *Meis1* también ha resultado clarificadora a la hora de reconocer la totalidad de los derivados periventriculares y parte de los superficiales del complejo toral, aunque está ausente en la lámina periventricular. Debido a que este gen no se expresa en los dominios intercolicular y preístmico, permite una delimitación precisa del complejo toral en relación a los territorios adyacentes (Fig. 4.19 G-L). Utilizando como punto de partida estos patrones que delimitan el complejo toral de los dominios adyacentes, se facilita el análisis del resto de los genes aquí interpretados, ya que éstos marcan en algunos casos derivados puntuales.

Hemos observado que los genes *Tfap2B*, *Enc1*, *Tcf7l2*, *Meis2*, *Vglut2*, *Penk1* y *Tac1* se expresan en la lámina periventricular (PV) del torus (Figs. 4.17; 4.18 G-L; 4.18 A-F; 4.19 A-F; 4.20 G-L; 4.21 G-R; 4.22). *Tfap2B* y *Penk1* están presentes solamente en la cápsula de la lámina periventricular (Figs. 4.17; 4.21 G-L). En contraste, los genes *Enc1* y *Meis2* presentan expresión selectiva en el componente axial de la lámina periventricular (Figs. 4.18 G-L; 4.19 A-F). Los genes *Tcf7l2*, *Tac1* y *Vglut2* están presentes en ambos componentes de la lámina periventricular (Fig. 4.18 A-F; 4.20 G-L; 4.22).

En la caracterización de los componentes centrales (también periventriculares) hemos observado que el componente axial del núcleo central expresa los genes *Enc1*, *Gad67*, *Meis1*, *ParvB*, *RorA*, *Six3*, *Tcf7l2* y *Vglut2* (Figs. 4.18; 4.19 G-R; 4.20 G-R; 4.21). El componente capsular del núcleo central contiene expresión de los siguientes marcadores *Enc1*, *Gad67*, *Meis1*, *Meis2*, *Penk1*, *Six3*, *Npy*, *Tcf7l2* y *Vglut2*, (Figs. 4.18; 4.19 A-L; 4.20; 4.21 G-R). El subnúcleo paracentral (ventromedial) expresa *Enc1*, *Six3*, *Meis1*, *Tac1*, *Tcf7l2*, *RorA* y *Vglut2* (Figs. 4.18; 4.19 G-R; 4.20 G-L; 4.21 M-R; 4.22). El subnúcleo hiliar se caracteriza por la expresión de *Enc1*, *Meis1*, *ParvB*, *RorA*, *Tac1*, *Tcf7l2* y *Vglut2* (Figs. 4.18 A-L; 4.19 G-R; 4.20 G-L; 4.21 A-F; 4.22). Finalmente el subnúcleo dorsomedial se caracteriza por la expresión de *Enc1*, *Gad67*, *Meis1*, *Meis2*, *Npy*, *Penk1*, *Six3*, *Tcf7l2* y *Vglut2* (Figs. 4.18; 4.19 A-L; 4.20; 4.21 G-R).

En la caracterización genoarquitectónica del componente superficial hemos observado en el componente axial del área superficial la expresión de *Enc1*, *Penk1*, *RorA*, *Tac1*, *Tcf7l2* y *Vglut2* (Figs. 4.18 A-L; 4.19 M-R; 4.20 G-L; 4.21 G-R; 4.22), mientras que el

componente capsular del área superficial expresa *Gad67*, *Npy*, *Penk1*, *Six3*, *Tcf7l2* y *Vglut2* (Figs. 4.18 A-F,M-R; 4.20; 4.21 G-R).

Figuras 4.1 a 4.28

Figura 4.1: Serie de secciones de cerebro de ratón orientadas en sentido sagital (A-E, H-O, T-W), horizontal (F, P-S) y transversal (G), obtenidas de embriones entre E10.5 y E11.5. (A-B) Secciones que muestran la expresión del gen *Tcf7l2* en el embrión de ratón a E10.5. En este estadio, el gen *Tcf7l2* se expresa intensamente en el tálamo y en la zona pretecal indicando su borde caudal el límite mesencéfalo-diencefálico (línea azul, DMB). (C-D, J-K) Secciones que permiten observar la expresión del gen *Meis2* en los embriones de ratón a E11.5 y E13.5 respectivamente, pudiendo reconocerse el DMB debido a que es el sitio en el cual se detiene la expresión de este gen (línea azul). (E-G, L-N, T-W) Secciones que muestran la expresión de los genes *Lim1*, *Tal1*, *Tal2*, *Sox14*, *Gata3* y *Six3* en el embrión de ratón a E11.5, respectivamente. (O) Sección en la que se observa la expresión del gen *Gbx2* a E12.5. (P-S) En estas secciones consecutivas destaca de forma comparada la expresión de los genes *Gbx2* (P,R) y *Shh* (Q,S) en el embrión de ratón a E10.5, respectivamente. Las secciones (C-D, J-N, T-U) han sido obtenidas del *Allen Developing Mouse Brain Atlas*. El análisis genoarquitectural en estos estadios de desarrollo permite reconocer con precisión los límites anterior y posterior del mesencéfalo, pero no se destacan diferencias anteroposteriores que permitan identificar sus dominios alares característicos (TG, SC, In, IC, PI). Los planos de cortes horizontal (F) y transversal (G) se señalan en E; mientras que el plano aplicado en P-S se indica en O. Los límites anterior (DMB) y posterior del mesencéfalo (MHB) están señalados con líneas azules y rojas respectivamente. Barra de escala: 300 μm .

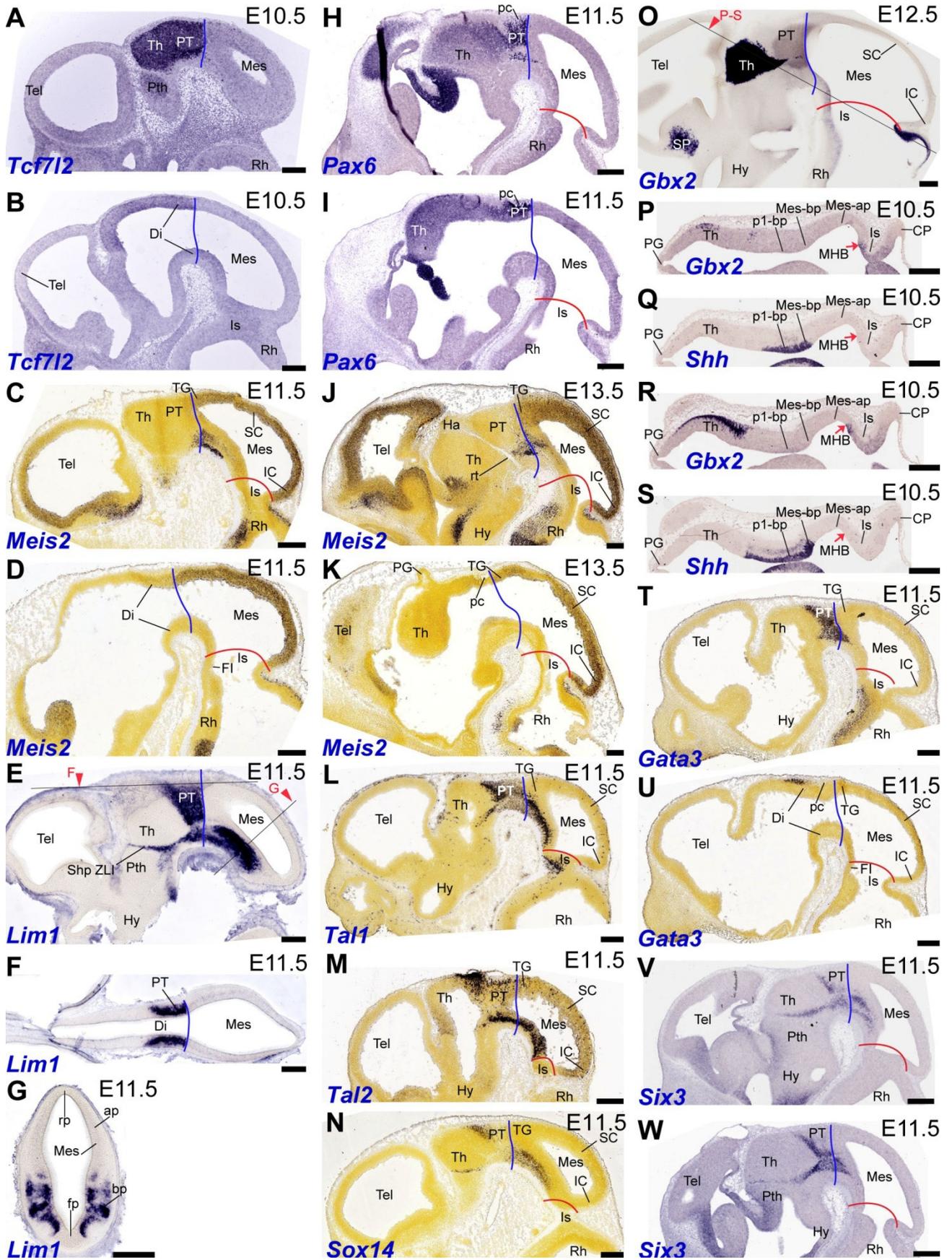


Figura 4.2: Serie de cortes de cerebro de ratón orientados de forma sagital (A-L, S-AD) y transversal (M-R) obtenidos de embriones a E11.5 y E13.5. (A-F, M-X) Secciones que muestran el patrón de expresión de *Otx2* a E11.5. (S-X) Secciones que muestran el patrón de expresión de *Otx2* a E13.5. La expresión del gen *Otx2* en estos estadios se apaga en el límite caudal del mesencéfalo tanto en la placa del techo como en la del suelo, indicando el límite posterior del mesencéfalo (línea roja). (G-L, Y-AD) Secciones en las que se observa el patrón de expresión del gen *Fgf8* a E11.5 y E13.5 respectivamente. La expresión del gen *Fgf8* se restringe al dominio rostral del rombencéfalo justamente en la región del organizador ístmico, indicando el límite caudal del mesencéfalo con el rombencéfalo (línea roja). Los planos de cortes correspondientes a las secciones M-P y Q-R, se señalan en B y W respectivamente. Todas las secciones han sido descargadas del *Allen Developing Mouse Brain Atlas*. La línea roja indica el límite posterior del mesencéfalo. Barra de escala: 300 μ m.

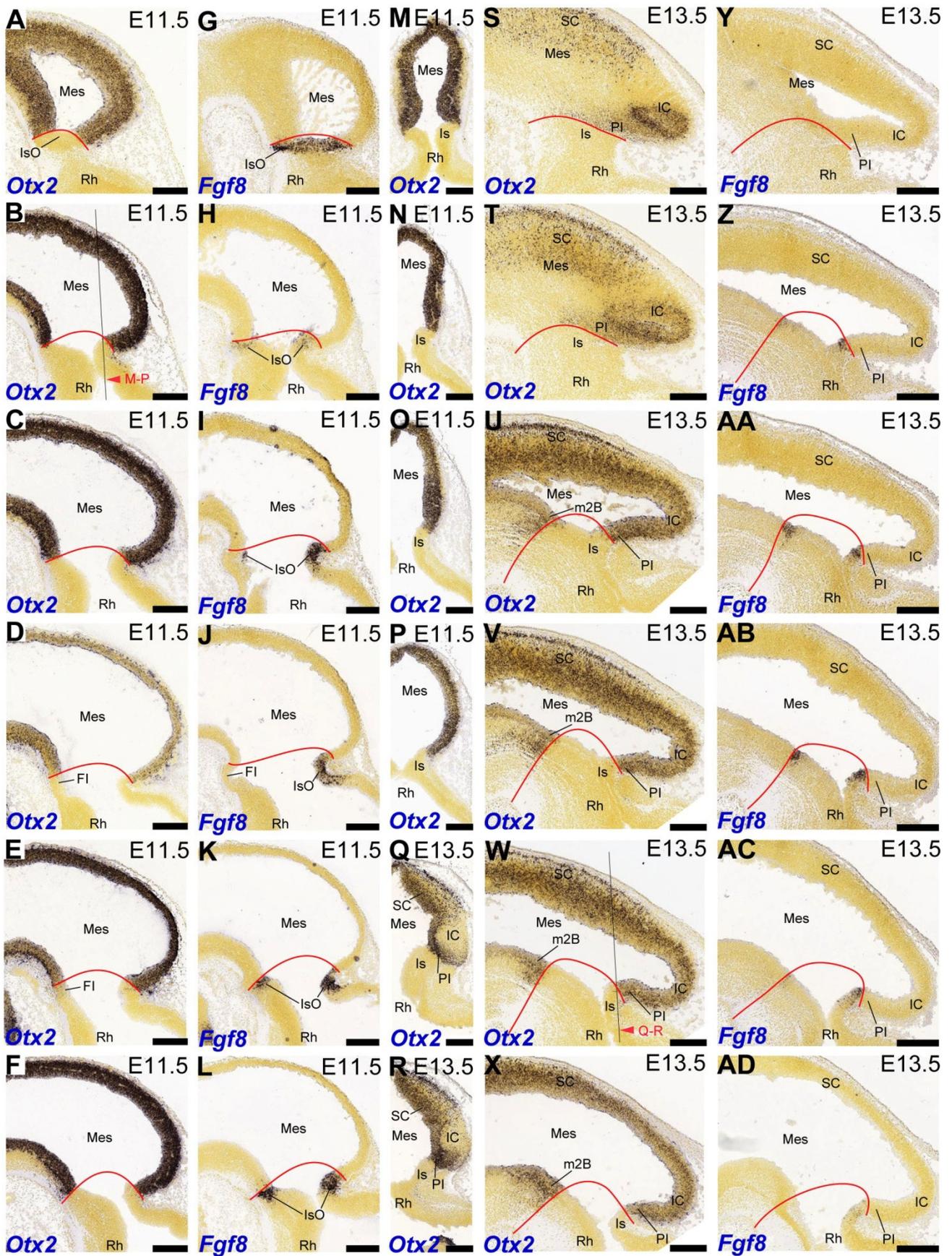


Figura 4.3: Secciones obtenidas de cerebros de ratón orientadas de forma sagital (A-D, K, R, U-V, AC), horizontal (E-F, L-Q, S-T, W-Y, AB) y transversal (G-J, Z-AA) de embriones de ratón a E11.5 (K-M), E12.0 (R-S) y E12.5 (A-J, N-Q, T-AC). (A-J) Secciones en las que se observa el patrón de expresión de *Lim1*. Este gen se expresa en el griseum tectal, colículo superior y preistmo, pero está ausente en el colículo inferior a partir de E12.5. (K-Q) Secciones en las que se muestra la expresión del gen *Tfap2B* en todos los dominios alares mesencefálicos entre E11.5 y E13.5. (R-T) Secciones en las que se destaca la expresión del gen *Bhlhb4*. La expresión de este gen permite localizar el límite rostral del mesencéfalo debido a la expresión diferencial de este gen a ambos lados del DMB; siendo además un gen prácticamente ausente en el IC y PI en este estadio analizado. (U-AA) Secciones en las que se observa la señal del gen *Tall1*, detectándose en el griseum tectal, colículo superior y región preístmica, estando ausente en el colículo inferior a E12.5. (AB) El patrón de expresión del factor de transcripción *Gata3* es similar al del gen *lim1*. (AC) El factor de transcripción *Tcf7l2* se observa en el manto de la placa alar mesencefálica a partir de E12.5. Según se destaca de estas observaciones, es a partir de E12.5 cuando se detectan diferencias moleculares entre los dominios anteroposteriores de la placa alar mesencefálica. Los planos de corte en las secciones E-F, G-J, L-Q, S-T, W-Y y Z-AA, se señalan en B, C, K, R, U y V respectivamente. Los límites anterior y posterior del mesencéfalo están indicados con líneas azules y rojas respectivamente. Barra de escala: 300 μm .

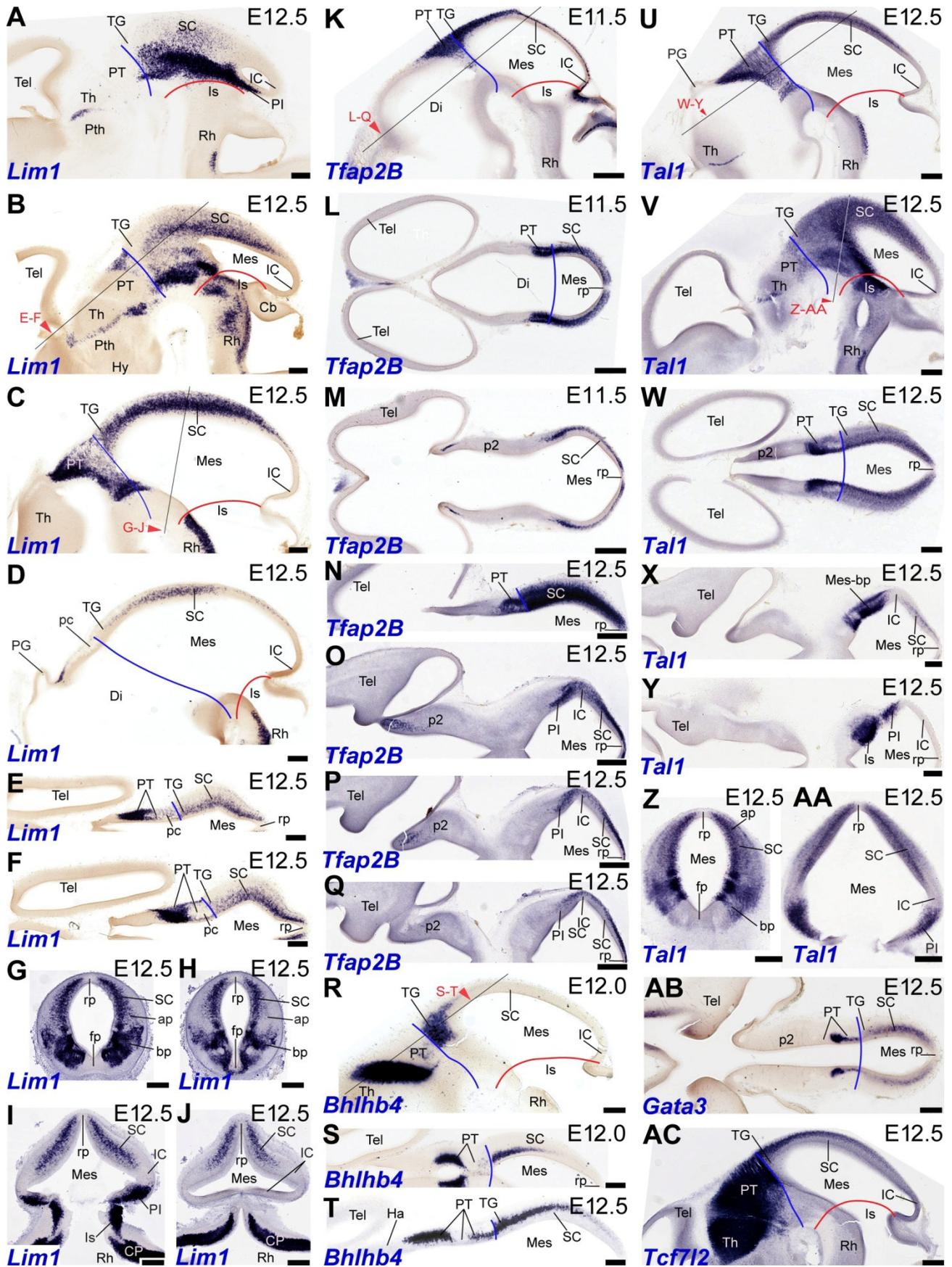


Figura 4.4: Secciones obtenidas de cerebros de ratón orientadas de forma sagital (A, G, H, K, S, V, AB-AC), horizontal (B, C, D, L-N, Q, R, W-Y, AD) y transversal (E, F, I, J, O, P, T, U, Z, AA) de embriones de ratón a E12.5 y E13.5. (A-F) Secciones en las que se observa el patrón de expresión de *Pax3*, cuya expresión diferencial permite localizar el límite rostral mesencefálico. (G-I, Q-R) La expresión del factor de transcripción *Lhx2* permite destacar a nivel del manto el límite mesencéfalo-diencefálico. (J) El gen *Lmx1b* se destaca por su expresión selectiva en los subdominios del techo y suelo de la región mesencefálica. (K-P) Secciones que muestran la expresión del factor de transcripción *Pax7* que está presente en el TG y SC, pero ausente en el IC y PI. (S-U) Expresión del gen *Foxb1* localizada selectivamente en el TG y SC, pero ausente en el IC. (V-AA) Secciones que muestran la expresión del factor de transcripción *Dbx1*, que a este estadio se lo puede observar en todos los dominios alares, aunque ausente en el subdominio del techo. (AB) Expresión del factor de transcripción *Gsh1*, que en este estadio se destaca por su ausencia en el IC y PI. (AC) Patrón de expresión del gen *Six3* a E12.5, que practivamente esta remitido al dominio PI de la región alar mesencefálica. (AD) Patrón de expresión de *Foxp1* con diferencias regionales a nivel de la capa del manto mesencefálica. Las líneas roja y azul indican el límite anterior y posterior del mesencéfalo, respectivamente. Barra de escala: 300 μm .

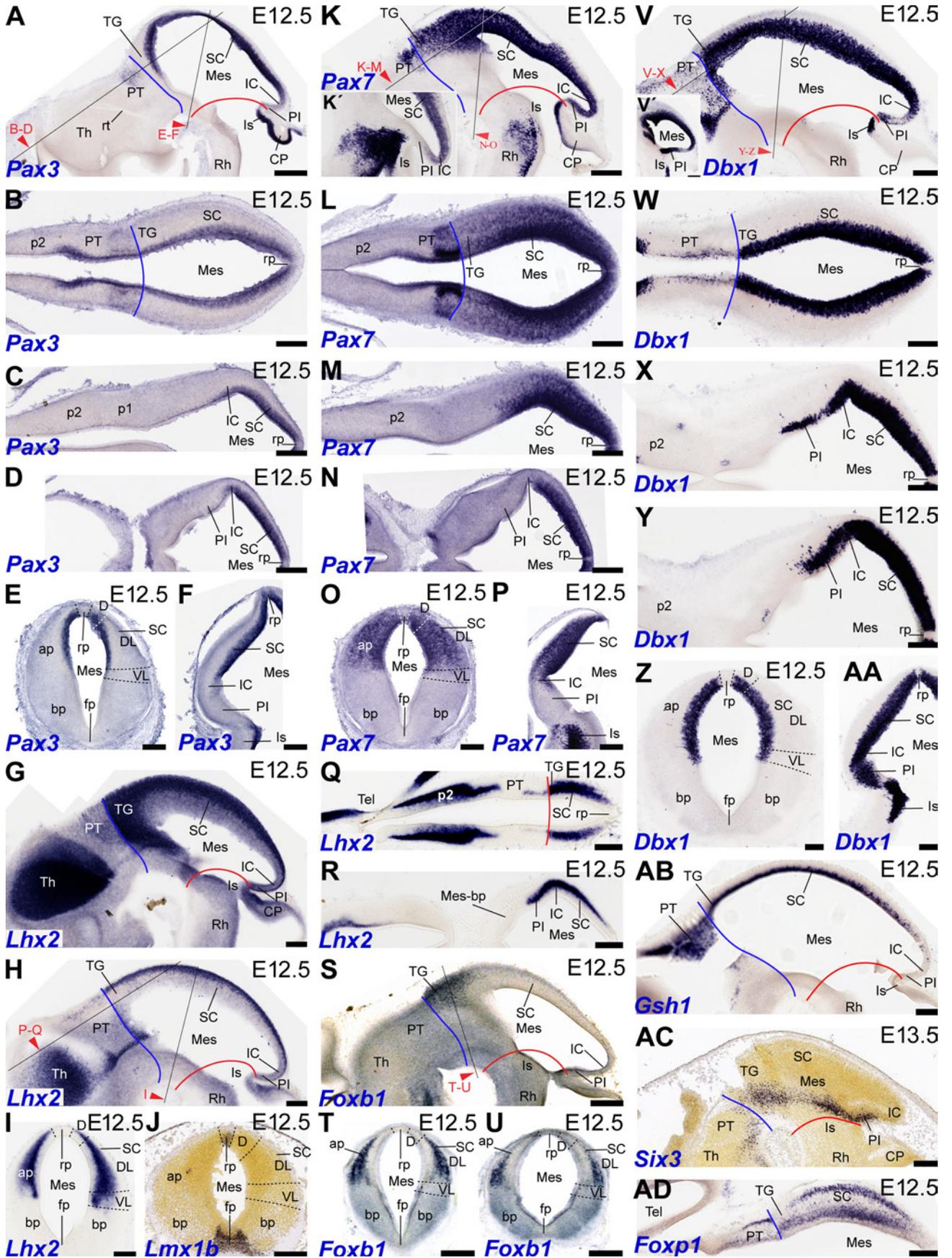


Figura 4.5: Serie de cortes de cerebro de raton orientados de forma sagital (A-E, H, K-M, y P-R), horizontal (I-J y S-V) y transversal (F-G y N-O) de cerebro de ratón a E13.5 (H, N) y E14.5. (A-B, I-J) Secciones que muestran el patrón de expresión del gen *Esrrb* el cual permite identificar el manto del GT. (C-E) Patrón de expresión del gen *Pax6* que esta presente en el manto alar de la región pretectal, mientras que está ausente en el manto alar del mesencéfalo; siendo un buen marcador que permite localizar el límite rostral del mesencéfalo. (F-G) Secciones transversales en las que se puede observar la expresión del gen *Six3*; que además de observarse en la región preístmica, comienza a destacarse en el IC. (H) El factor de transcripción *Sox14* en el manto del TG y SC, pero está ausente en el manto del IC y PI. (K-M) Se destaca la expresión diferencial del gen *Pax7* entre el mesencefalo y el prosomero 1, siendo además notoria la diferencia en el manto entre el TG y el SC. (N) Expresión del gen *Otx2* a E13.5 en la cual se destaca la ausencia de este gen en el manto del IC. (O) Sección que muestra la expresión de *Gbx2* a E14.5 y en la que se puede observar como se expresa en el ventrículo rombencefálico, deteniendo su expresión en el límite mesencéfalo-rombencefálico. (P-T) Patrón de expresión del gen *Tfap2B*; cuya señal se observa intensamente en el TG y en SC. (U-V) Secciones que muestran la expresión del gen *Bhlhb4* que se expresa principalmente en la capa periventricular del TG y SC. Es el estadio E13.5, el gen *Sox14* se expresa en el manto del TG y SC indicando el límite rostral del mesencéfalo, pero con claras diferencias en la capa superficial entre TG y SC. Los planos de cortes en las secciones I-J, U-V y S se señalan en A, M y R respectivamente. Las secciones H y N han sido descargadas del *Allen Developing Mouse Brain Atlas*. Los límites anterior y posterior del mesencéfalo están indicados con líneas azules y rojas respectivamente. Barra de escala: 300 μ m.

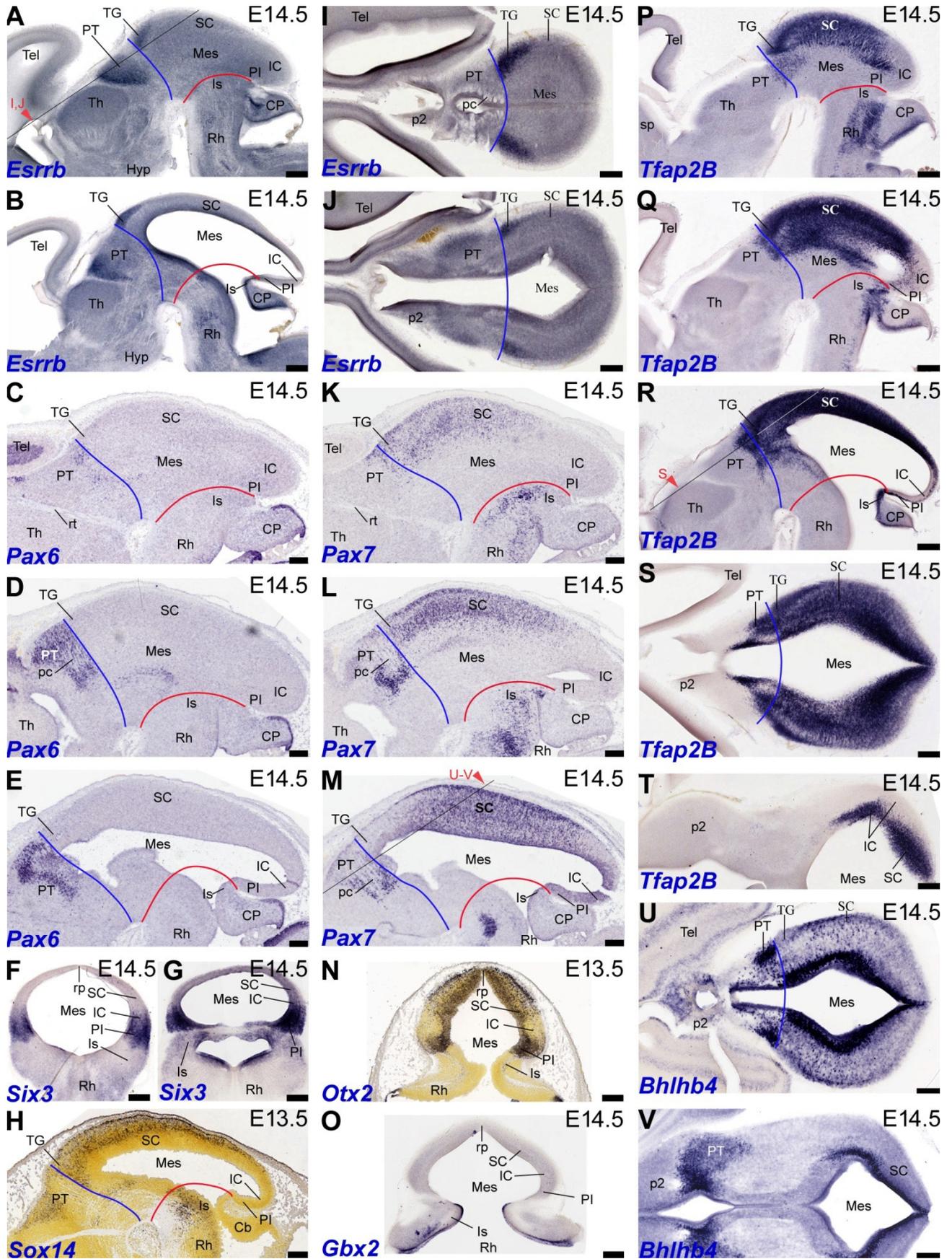


Figura 4.6: Secciones de cerebro de ratón orientadas de forma sagital (A-B, G-H y M-N) y transversal (C-F, I-L y O-R) de embriones de ratón a E16.5. (A, G, M) Patrón de expresión del gen *Meis2*. En este estadio, se destaca la expresión del gen *Meis2* en prácticamente todas las capas del manto de las regiones mesencefálicas, a excepción del TG en donde se observa una clara disminución de su expresión, aspecto que permite reconocer el TG del SC. Además la expresión en la capa superficial a nivel pretectal (cabeza de flecha) permite reconocer el límite mesencéfalo-diencefálico. (B-F) Secciones que muestran la expresión de *Npy* en el manto; cuyo patrón resulta útil para identificar derivados del IC y PI. En (B'), una sección más próxima al plano sagital, se destaca la expresión de *Npy* a nivel del PI. (H-L) Secciones que muestran la expresión del gen *Tcf7l2* en el manto del TG, SC e IC, estando ausente en el PI. La expresión diferencial de *Tcf7l2* en el SC, permite reconocer su dominio en relación al TG e IC. En (H'), una sección más próxima al plano sagital, se destaca la expresión de *Tcf7l2* a nivel del PI. (N-R) Secciones que muestran la expresión del gen *Tfap2B*, cuya intensa expresión se observa en todas las capas del manto del TG y del SC, pero solo en el estrato periventricular del IC del PI. Los planos de cortes en las secciones C-F, I-L y O-R se señalan en B, H y N respectivamente. Las líneas punteadas negras y blancas indican los límites entre los principales dominios o subdominios mesencefálicos y las líneas punteadas violetas indican el límite entre el estrato periventricular ocupado por el PAG y el resto del manto. Los límites anterior y posterior del mesencéfalo están indicados con líneas azules y rojas respectivamente. Barra de escala: 300 μ m.

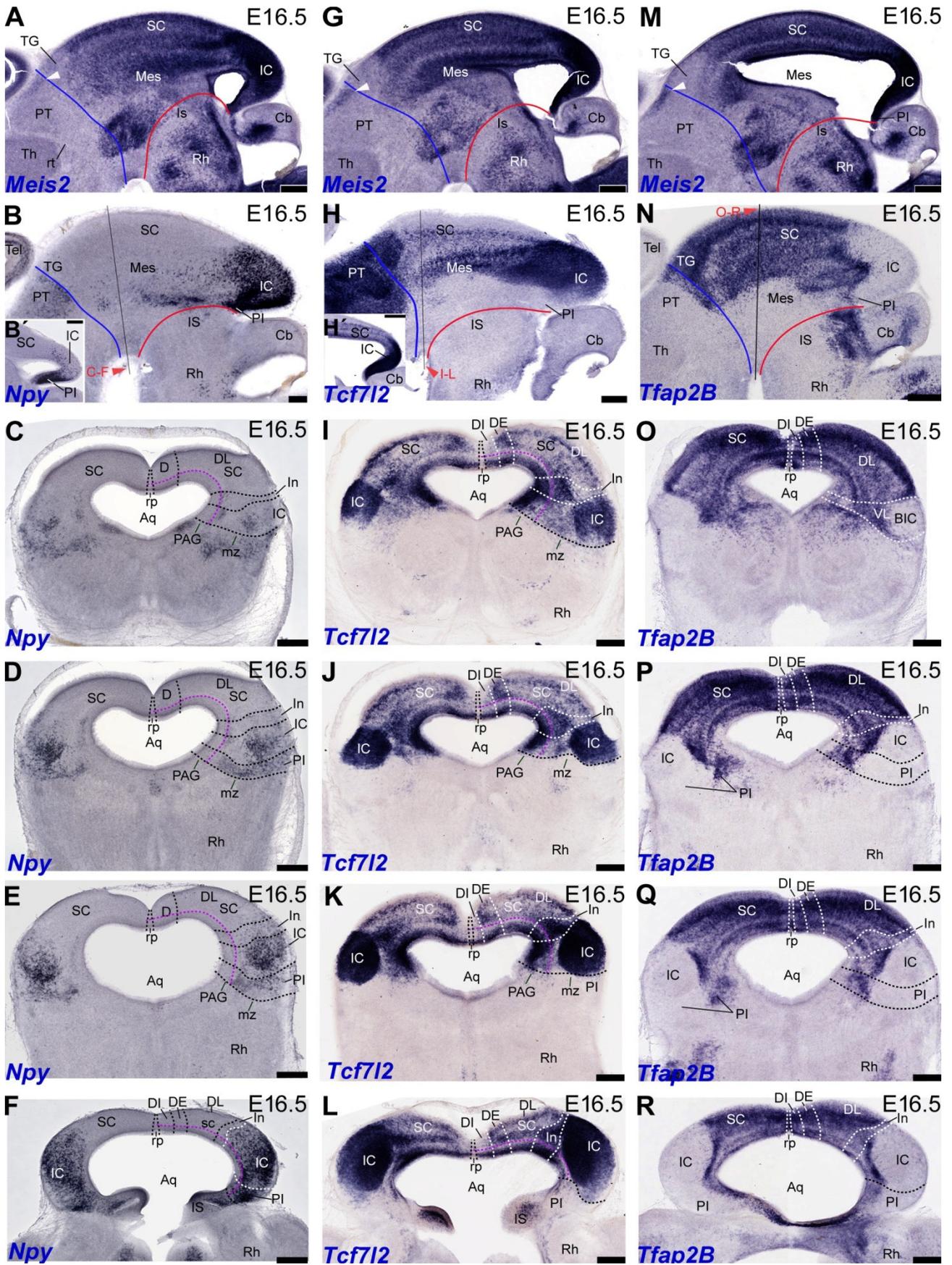


Figura 4.7: Serie de secciones de cerebro de ratón orientadas de forma sagital (A-D, G-J) y transversal (E-F, K-R) que muestran la expresión de los genes *Foxp1* (A-B, M-O), *Gata3* (C-F), *Foxp2* (G-H, P-R) y *Lhx2* (I-L) en embriones de ratón a E16.5. (C-F, I-L) La expresión deferencial de *Gata3* y *Lhx2* permite delimitar los dominios alares de m1 y m2; destacándose además que ambos genes no se expresan en el núcleo central del IC, mientras que su expresión está presente en la mayor parte de los derivados del TG, SC y PI. (A-B, G-H, M-R) La expresión del gen *Foxp1* se observa en el manto del TG, SC y PI, mientras que está ausente en IC; mientras que el gen *Foxp2* se expresa intensamente en una capa del manto del IC. El plano de corte relacionado con las secciones E-F se indica en D; el correspondiente a K-L se observan en I; mientras que el relacionado con M-P se indica en A; finalmente el plano correspondiente a las secciones P-R se indica en G. Las líneas punteadas negras y blancas indican los límites entre los principales dominios o subdominios mesencefálicos y las líneas punteadas violetas indican el límite entre el estrato periventricular ocupado por el PAG y el resto del manto. Los límites anterior y posterior del mesencéfalo están indicados con líneas azules y rojas respectivamente. Barra de escala: 300 μ m.

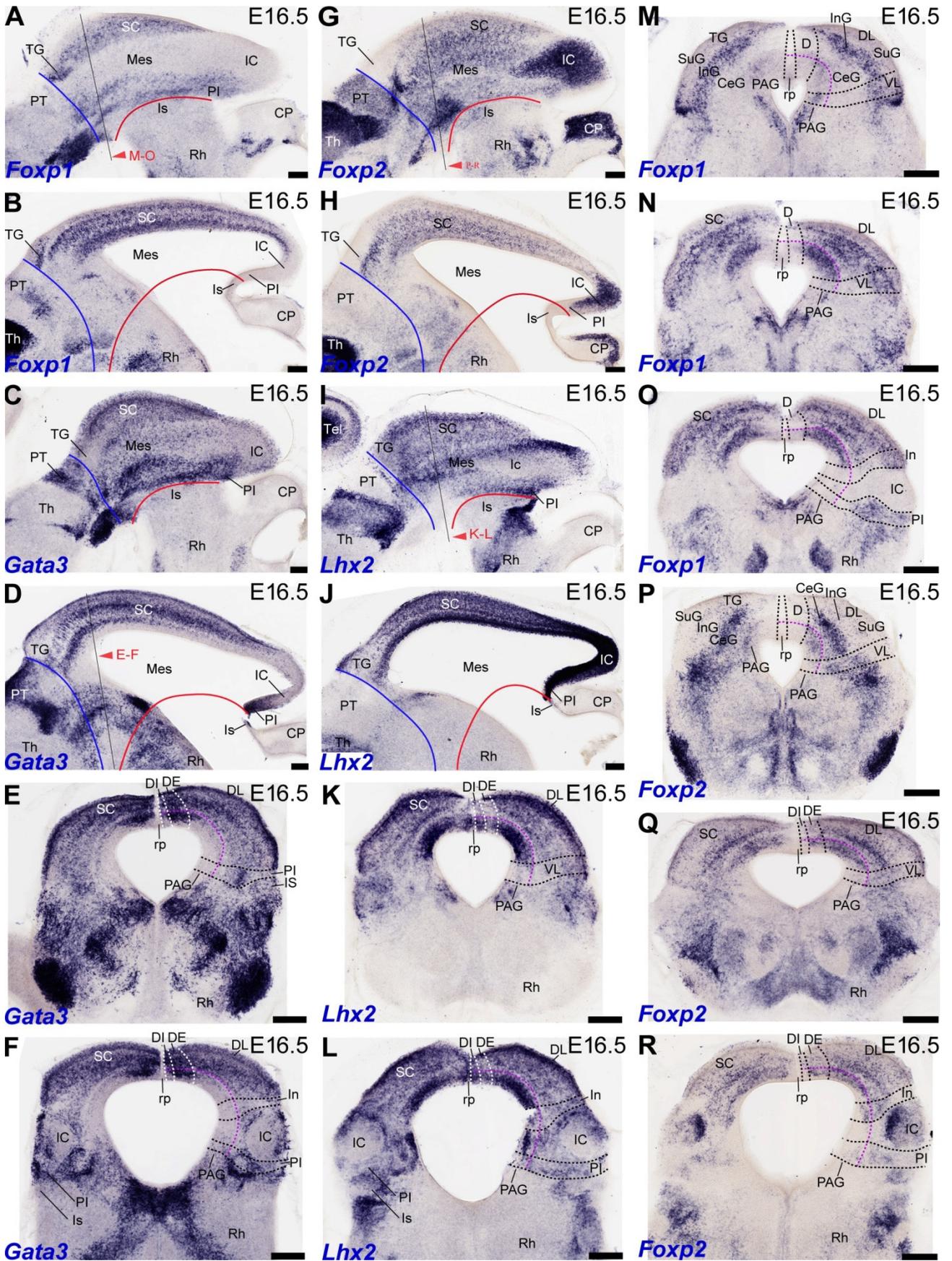


Figura 4.8: Serie de secciones de cerebro de ratón orientadas de forma sagital (A, K-L, R-S), horizontal (B-D) y transversal (E-J, M-Q, T-X) de embriones de ratón que muestran la expresión de los genes *Bhlhb4* (A-J), *Tal2* (K-L), *Zic1* (M), *Pax7* (N-P), *Six3* (Q, W-X) y *Tfap2B* (R-V) en embriones de ratón a E16.5 y E18.5. Los cortes B-J muestran la hibridación in situ para el mensajero del gen *Bhlhb4* combinada con inmunohistoquímica para la proteína nNOS. El plano de cortes en las secciones U-W se señala en R. **Figura 4.8:** Serie de secciones sagitales (A, K-L, R-S), horizontales (B-D) y transversal (E-J, M-Q, T-X) de embriones de ratón que muestran la expresión de los genes *Bhalhb4* (A-J), *tal2* (K-L), *Zic1* (M), *Pax7* (N-P), *Six3* (Q, W-X) y *Tfap2B* (R-V) en embriones de ratón a E16.5 y E18.5. Los cortes B-J muestran la hibridación in situ del gen *Bhlhb4* combinada con la inmunohistoquímica de la proteína nNOS (color amarillo). El plano de cortes en las secciones U-W se señala en R. Las líneas punteadas negras y blancas indican los límites entre los principales dominios o subdominios mesencefálicos y las líneas punteadas violetas indican el límite entre el estrato periventricular ocupado por el PAG y el resto del manto. Los límites anterior y posterior del mesencéfalo están indicados con líneas azules y rojas respectivamente. Barra de escala: 300 μ m.

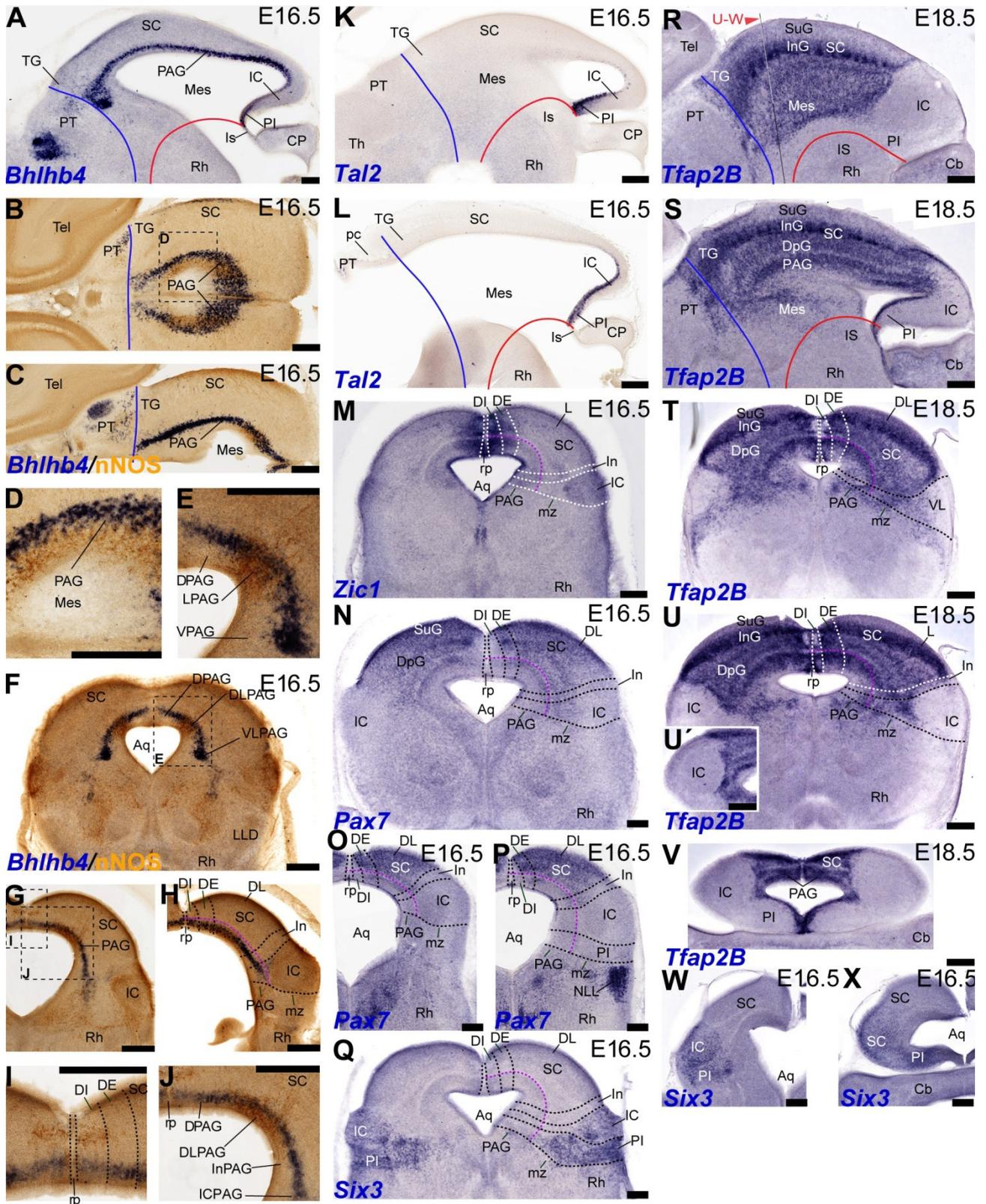


Figura 4.9: Serie de secciones de cerebro de ratón orientadas de forma sagital (A-B, H-I, O-P) y transversal (C-G, J-N, P-T) en estadios postnatales P1 y P6. (A-B) Secciones que muestran la expresión del gen *Foxp1*, en la que se destaca su ausencia en el IC. (C-G) Patrón de expresión del gen *Pax7* en el manto del SC, estando ausente en el IC y PI. (H-I) Se destaca la expresión del gen *Foxp2* muy intensa en el manto del IC. (J-T) Patrón de expresión del gen *Zic1*, en el cual se observa una intensa expresión en los subdominios DI y DE. Las líneas punteadas negras y blancas indican los límites entre los principales dominios o subdominios mesencefálicos y las líneas punteadas violetas indican el límite entre el estrato periventricular ocupado por el PAG y el resto del manto. Los límites anterior y posterior del mesencéfalo están indicados con líneas azules y rojas respectivamente. Barra de escala: 300 μm .

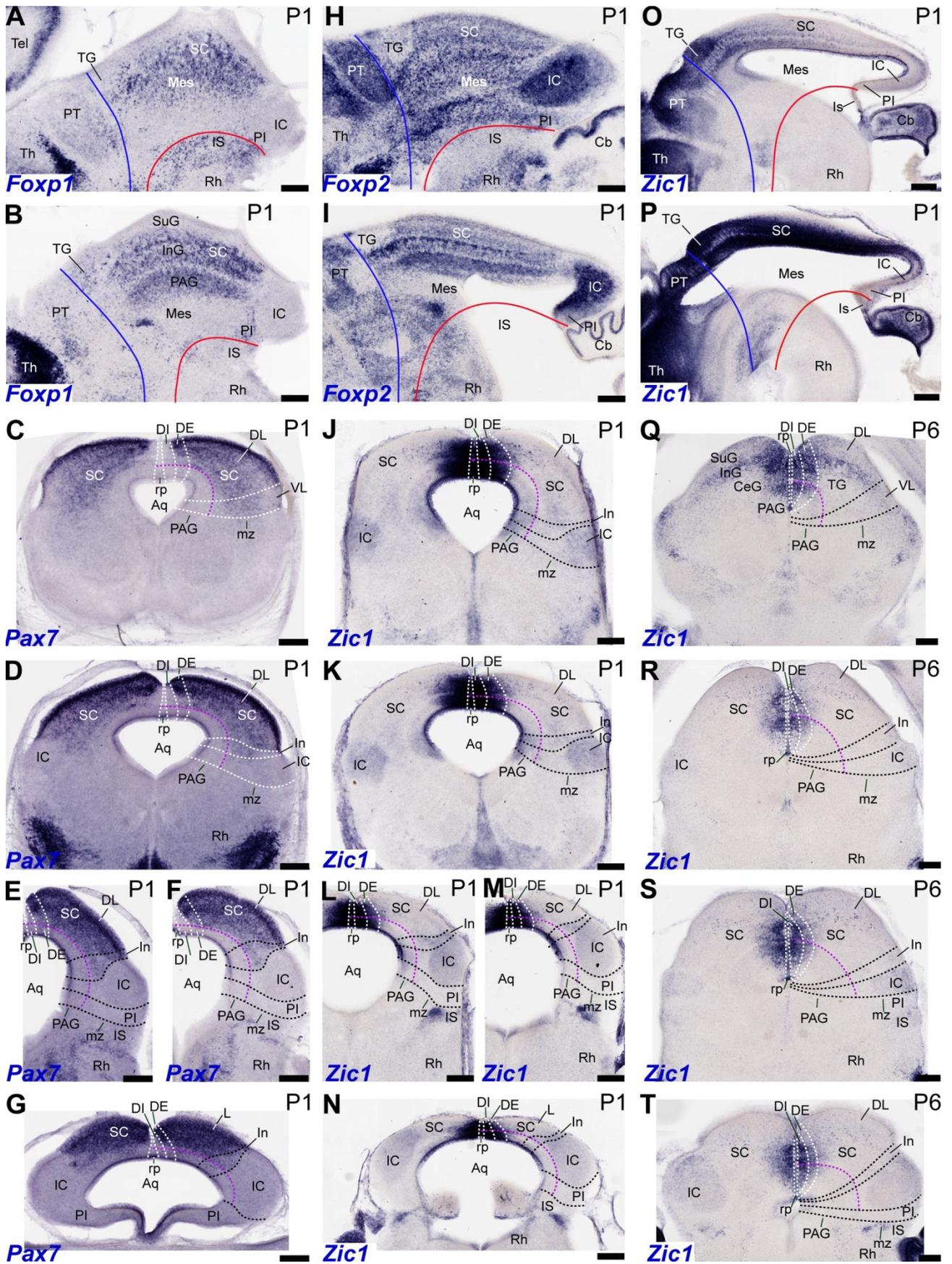


Figura 4.10: Secciones sagitales (A, D) y transversales (B-F) en cerebros de ratones a estadios postnatales P14 y P25 que muestran la expresión del gen *Tcf7l2* (A-C) y del gen *Calb2* (D-F). El plano de cortes en las secciones B-C y E-F se señalan en A y D respectivamente. Las líneas punteadas blancas indican el límite entre el estrato periventricular ocupado por el PAG y el resto del manto. Los límites anterior y posterior del mesencéfalo están indicados con líneas azules y rojas respectivamente. Barra de escala: 300 μm .

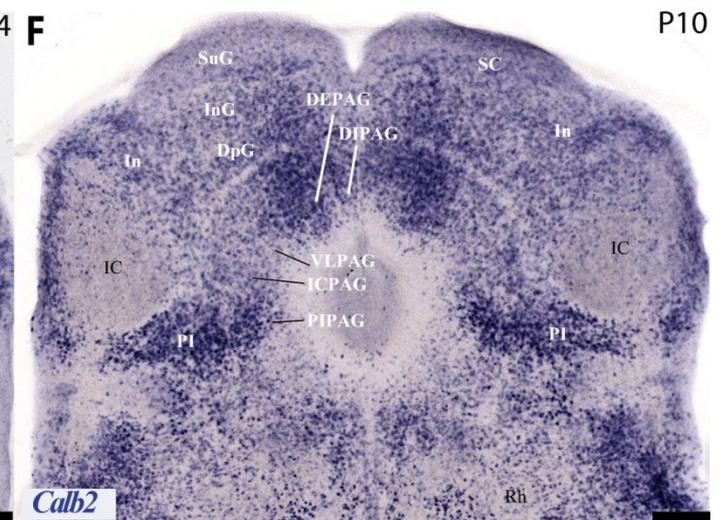
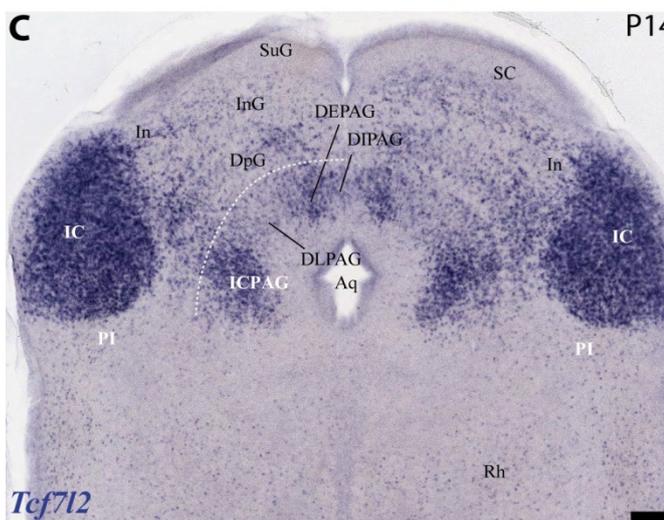
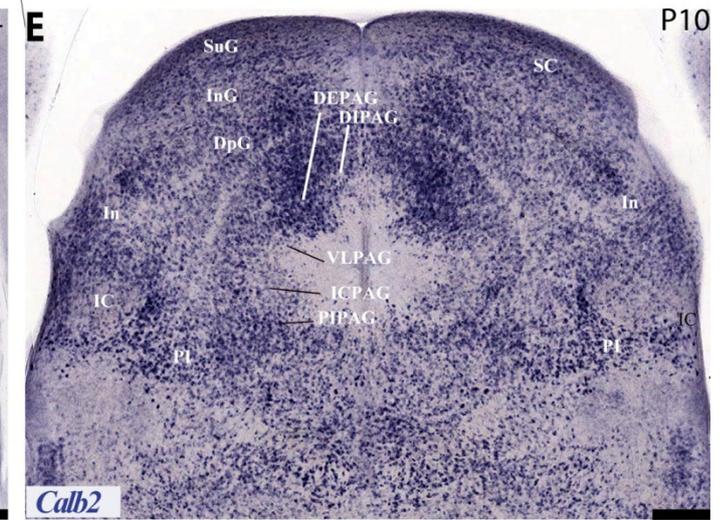
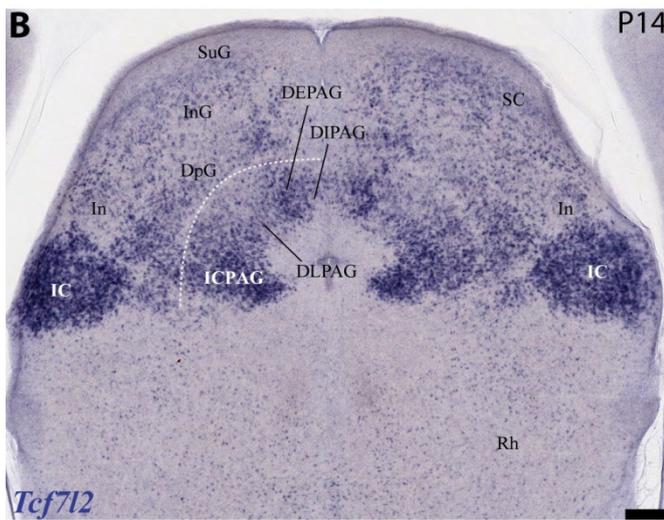
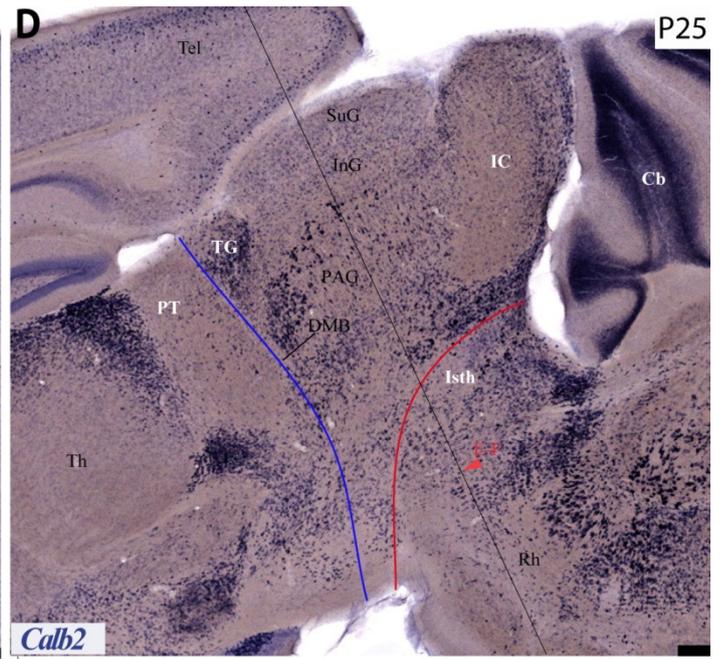
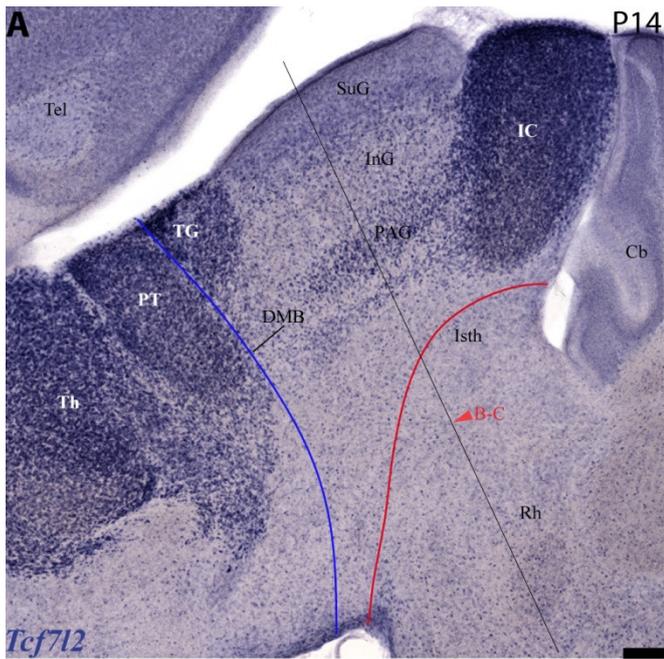


Figura 4.11: Serie de secciones sagitales (A-B), horizontal (C) y transversales (D-E) en cerebros de ratones a estadios postnatales P25 y P56 que muestran la expresión del gen *Penk1*. Los planos de cortes en las secciones D-E y en la sección C se señalan en A y B respectivamente. Los límites anterior y posterior del mesencéfalo están indicados con líneas azules y rojas respectivamente. Barra de escala: 300 μm .

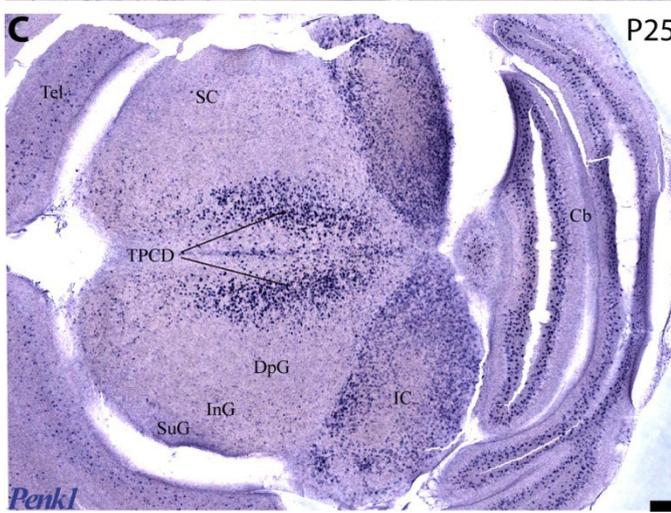
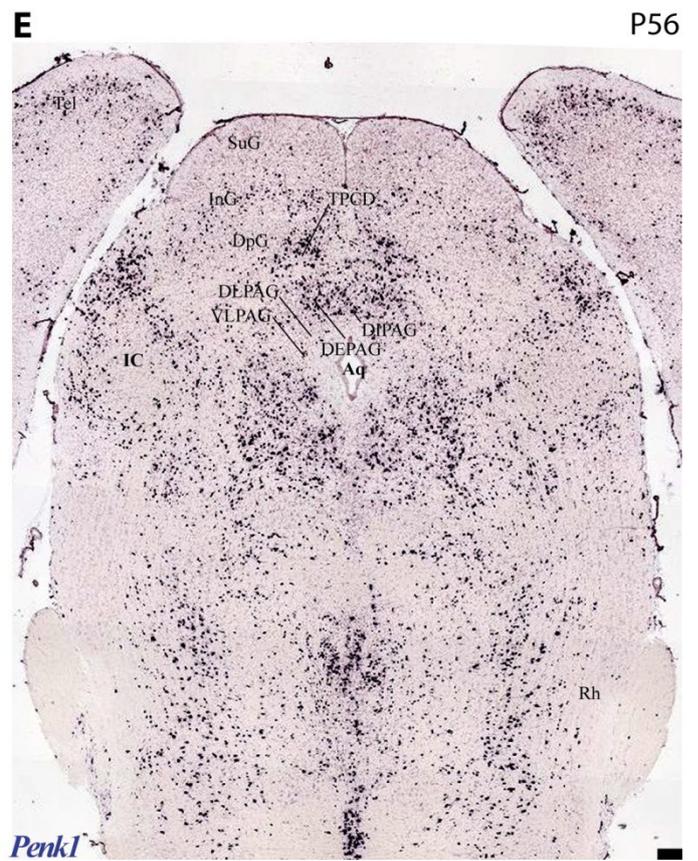
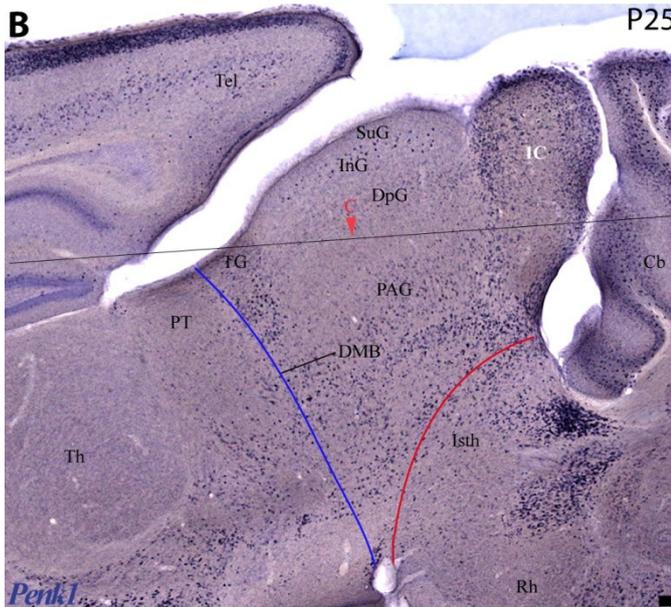
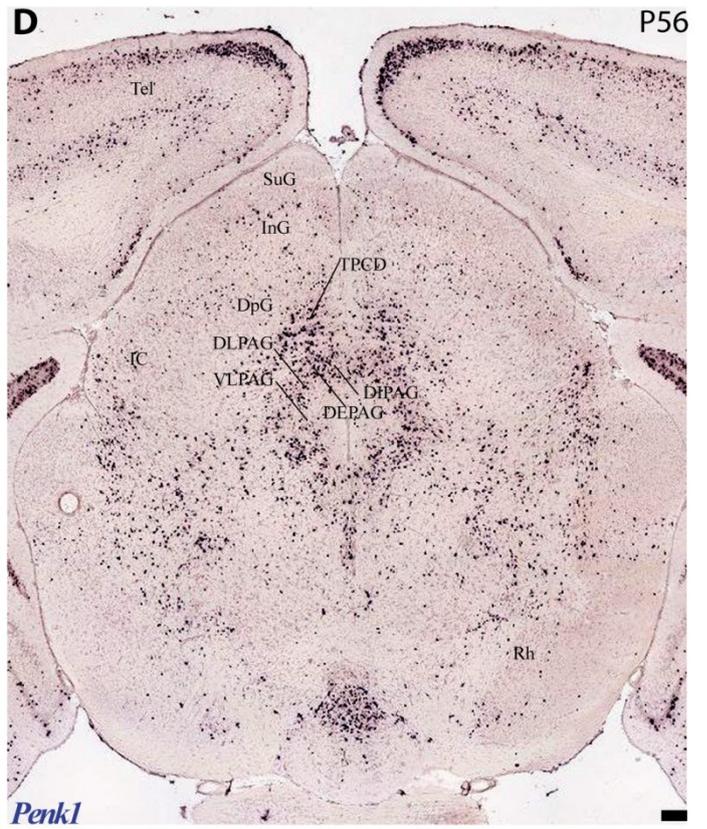
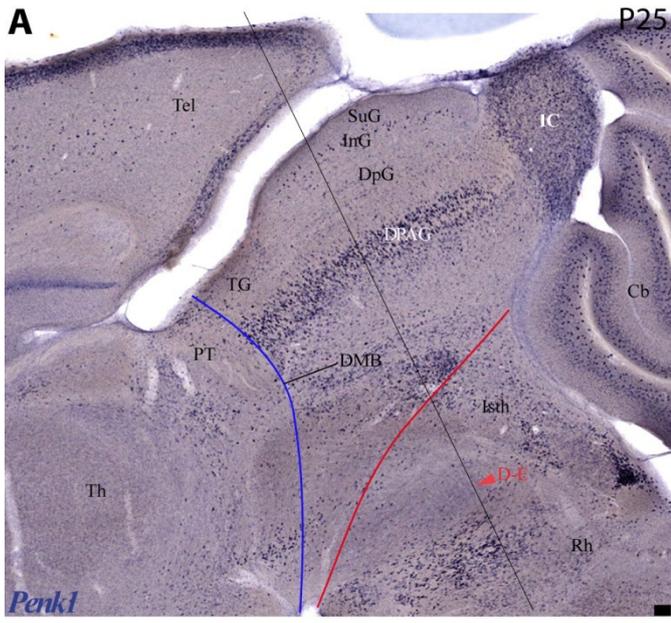


Figura 4.12: Serie de secciones sagitales (A-C), y transversal (D) en cerebros de ratones a estadios postnatales P25 y P56 que muestran la expresión de los genes *ParvB* y *Meis2*. El plano de corte en la sección D se señala en C. Los límites anterior y posterior del mesencéfalo están indicados con líneas azules y rojas respectivamente. Barra de escala: 300 μ m.

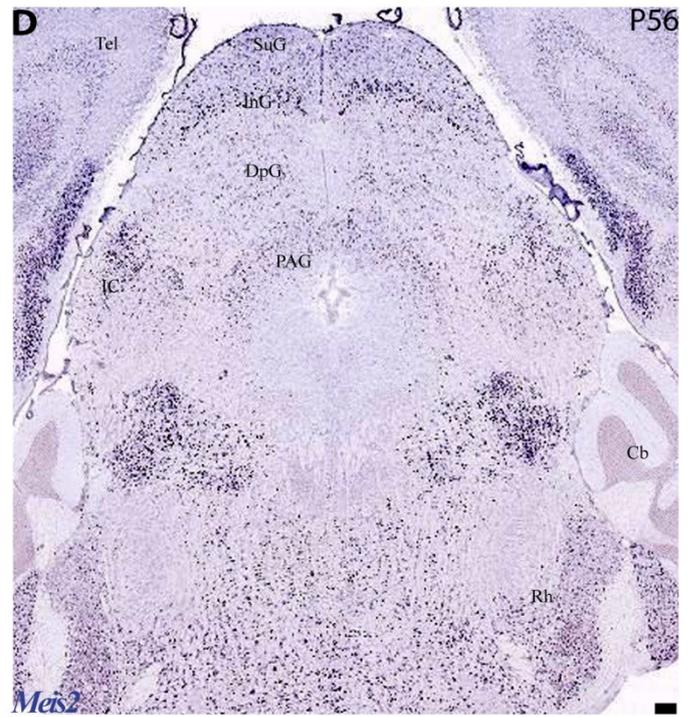
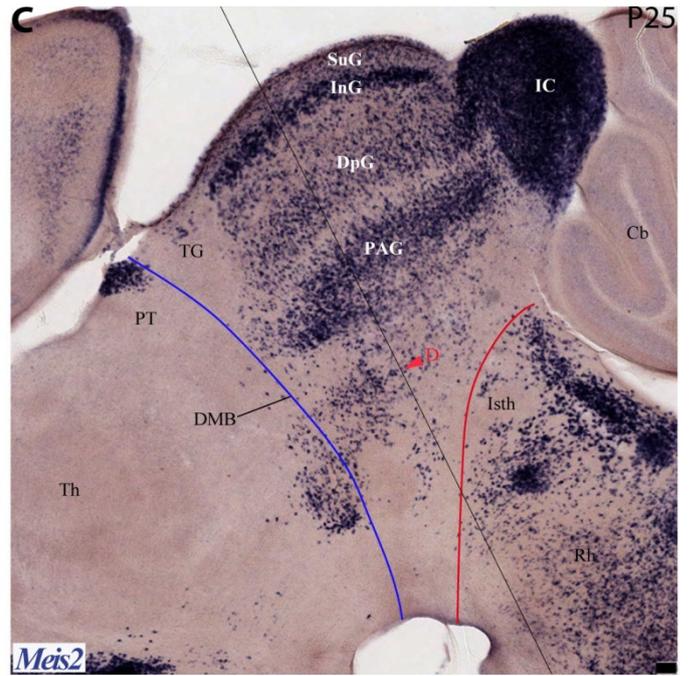


Figura 4.13: Serie de secciones sagitales (A-B) y transversales (C-D) de cerebro de ratón postnatal a P25 (A-B) y P25 (C-D) que muestran la expresión del gen *Tac1*. Los planos de corte en las secciones C-D se señalan en A. Los límites anterior y posterior del mesencéfalo están indicados con líneas azules y rojas respectivamente. Barra de escala: 300 μm .

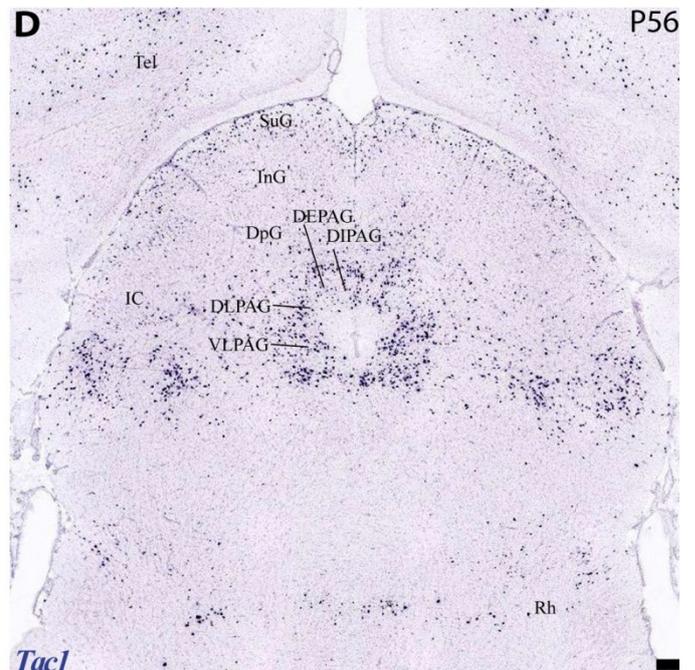
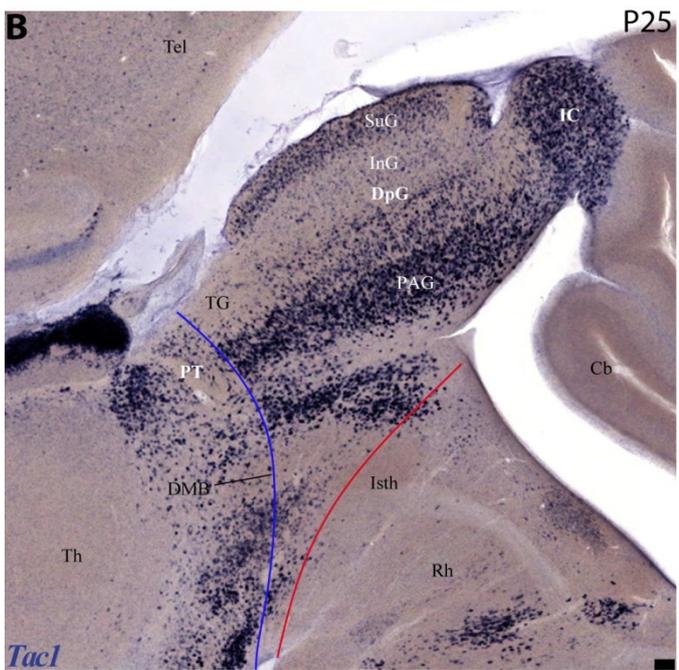
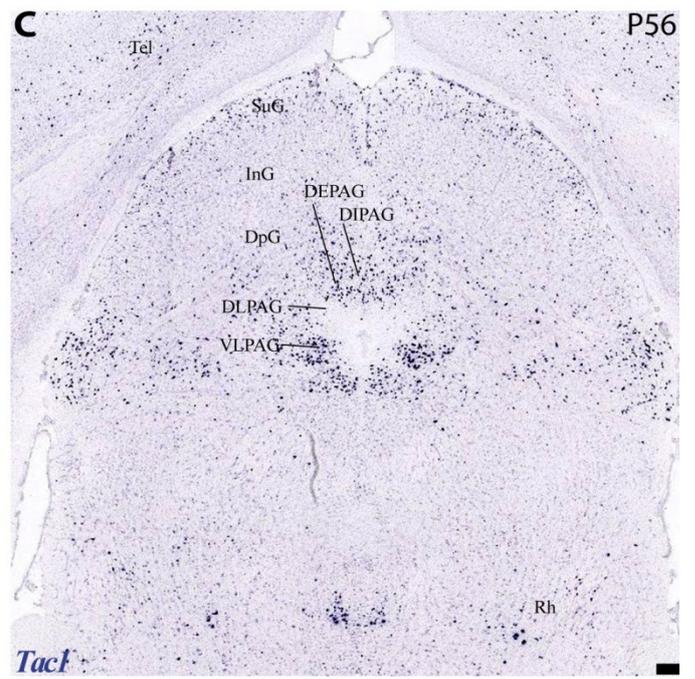
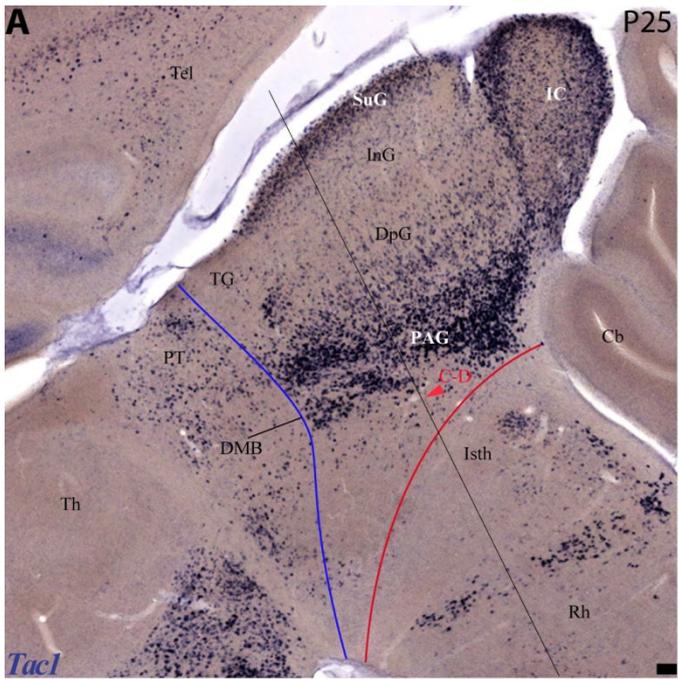


Figura 4.14: Serie de secciones sagitales (A-B) y horizontales (C-D) de cerebro de ratón postnatal a P0 (A-B) y P14 (C-D) que muestran la expresión del gen *Npy*. Los planos de corte en las secciones C-D se señalan en A. Barra de escala: 300 μm .

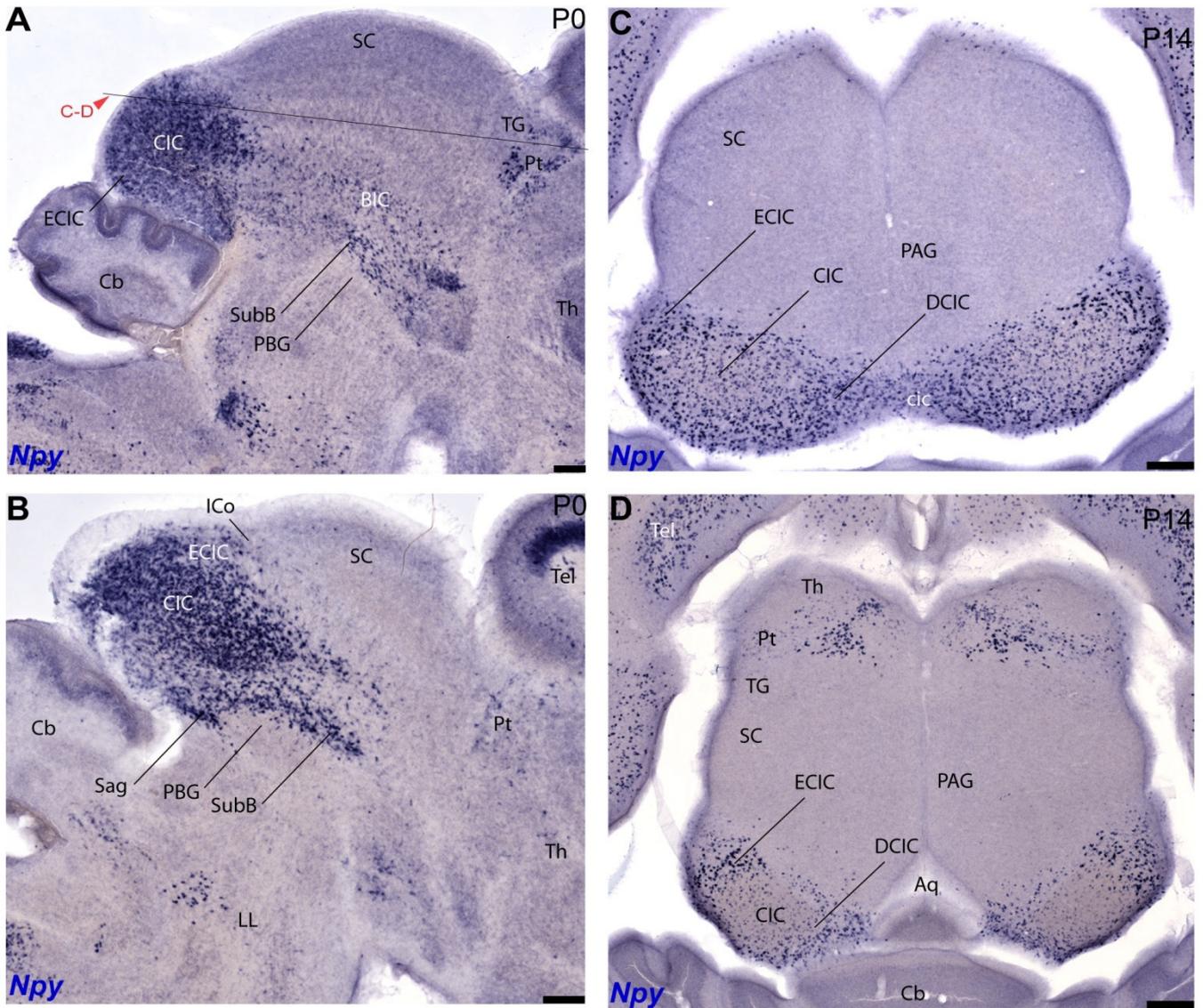


Figura 4.15:

Esquemas que representan una vista lateral del sistema nervioso central y una sección transversal a nivel mesencefálico cuya finalidad es comparar el estado del modelo de particiones alares mesencefálicas al inicio de este estudio (A,B) y los cambios introducidos una vez concluido (C,D). (A) Esquema que muestra la organización anteroposterior del mesencéfalo según el modelo propuesto por Puelles et al. (2011), en que se identifican los dos neurómeros mesencefálicos conocidos como mesómeros 1 y 2 (m1, m2). Como parte del mesómero 1 se destacan en sentido anteroposterior el griseum tectalis (TG), seguido del colículo superior (SC) y el inferior (IC) de localización más caudal, como principales derivados alares (se reconocen **3 elementos anteroposteriores**). El mesómero 2 tiene como componente alar más destacado al preistmo. (B) Representación esquemática de una sección transversal a nivel del territorio mesencefálico ocupado por el colículo superior, en el que se destacan desde dorsal a ventral los dominios alares Dorsal (D), Dorsolateral (DL) y Ventrolateral (VL) según Puelles y col. (2011). La sección atraviesa el dominio del colículo superior, un derivado del subdominio alar dorsolateral (ADL). (C) Esquema que muestra la organización anteroposterior del mesencéfalo acorde a los resultados obtenidos del estudio genoarquitectural, según el cual intercalado entre el dominio del colículo superior (SC) y el del colículo inferior (IC) se localiza un nuevo dominio no descrito hasta el momento en mamíferos que definimos como dominio Intercolicular (In). Por lo tanto la placa alar mesencefálica pasaría a tener 5 dominios alares anteroposteriores, 4 localizados en m1 y el restante en m2. (D) Sección transversal que pasa a través del dominio del colículo superior para indicar las divisiones dorsoventrales que se encontrarían asociadas a cada dominio alar. Según se deduce de nuestro estudio genoarquitectural el subdominio Dorsal (D) en realidad corresponde a dos subdominios que por esta razón hemos denominado subdominios Dorsal interno (DI) y Dorsal externo (DE). Como conclusión se desprende de nuestro análisis que en lugar de tres subdominios alares al menos se encuentran cuatro (DI,DE,DL,VL).

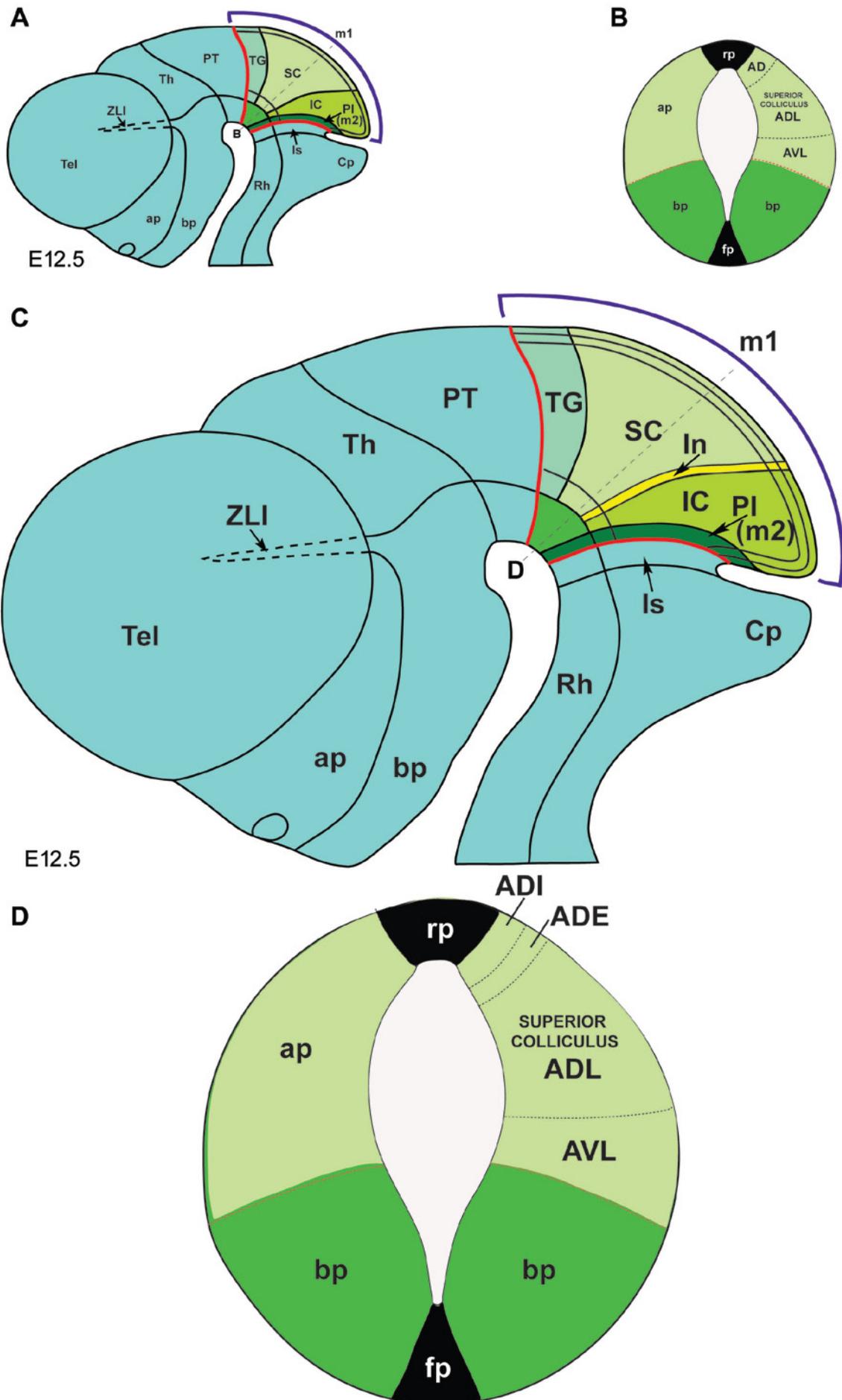


Figura 4.16: Esquemas del sistema nervioso central del pollo en un estado avanzado del desarrollo cuya finalidad es mediante una vista dorsal representar en el mesencéfalo los cinco dominios anteroposteriores presentes en la placa alar. (A) Vista dorsal del sistema nervioso central en la cual se destacan el telencéfalo (Tel), el diencéfalo (Di) con la pineal en la línea media dorsal, mesencéfalo (Mes) con su tectum óptico evaginado lateralmente y el cerebelo. (B) Magnificación de la región indicada en A que corresponde a la vista dorsal de la región mesencefálica y en la que se representa el subdominio correspondiente a la placa del techo (rojo), junto a esta los dominios alares Dorsal interno (DI, verde), seguido del Dorsal externo (DE, azul oscuro) y del Dorsolateral (DL, azul claro). (C) Esquema de la vista dorsal de la región mesencefálica en el cual se indican los cinco dominios anteroposteriores que encontramos en la placa alar desde rostral a caudal: Griseum tectalis (TG), Tectum óptico, Intercolicular (In), Torus semicircularis y Preistmo (PI). El PI es el único que pertenece a m2. (D) Representación de un corte transversal que pasa por el dominio del tectum óptico. Se pueden observar representados los subdominios correspondientes a la placa del techo (rp), seguida del DI, DE, DL, ventrolateral (VL), placa basal (no se han representado sus particiones) y finalmente la placa del suelo (negro).

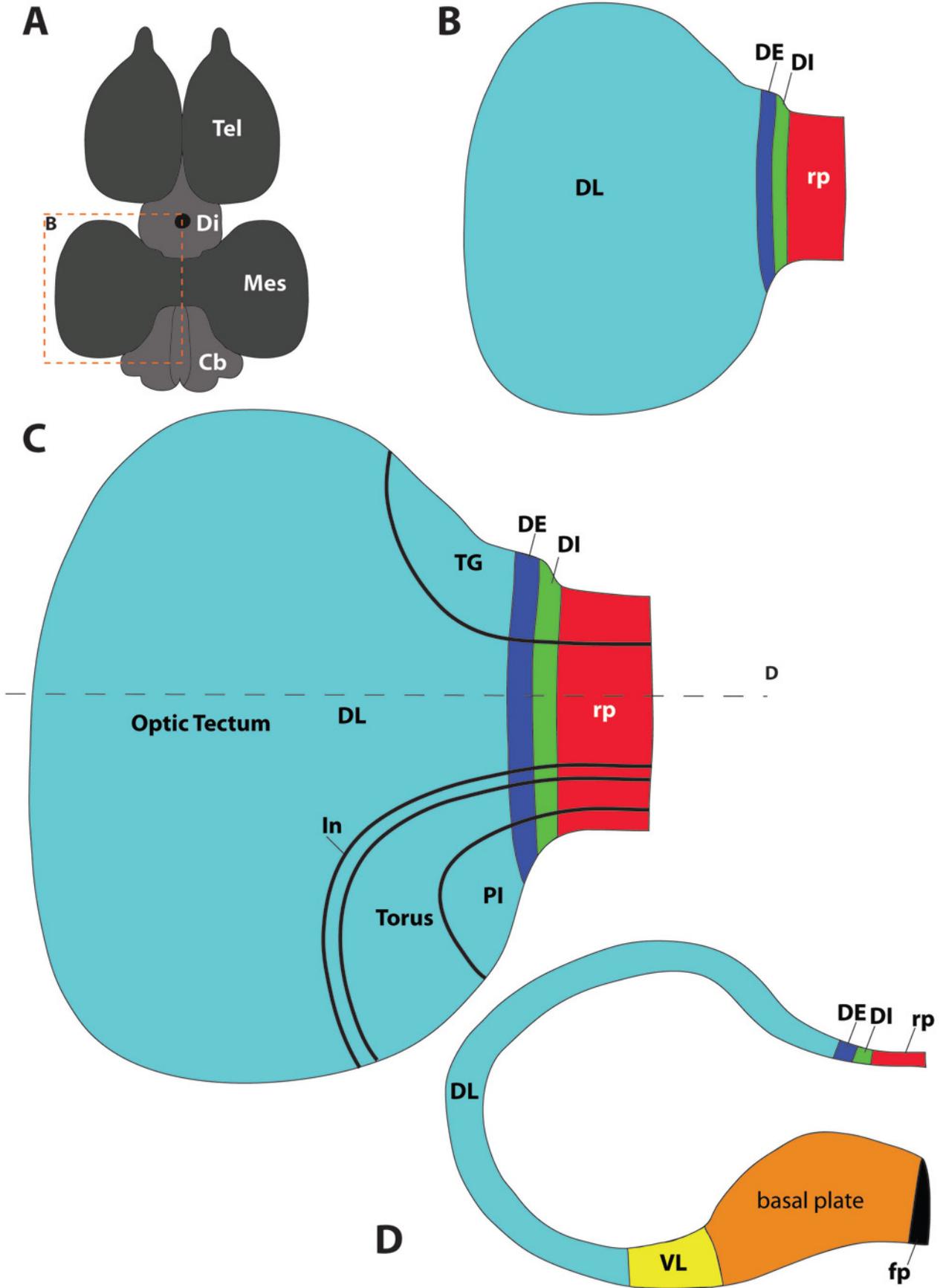


Figura 4.17: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes horizontales (dorsal a ventral) de cerebro de embriones de pollo a HH34 (A-F), HH41 (G-L) y HH43 (M-R) mostrando la expresión del gen *Tfap2B* mediante hibridación in situ. Barra de escala 300µm.

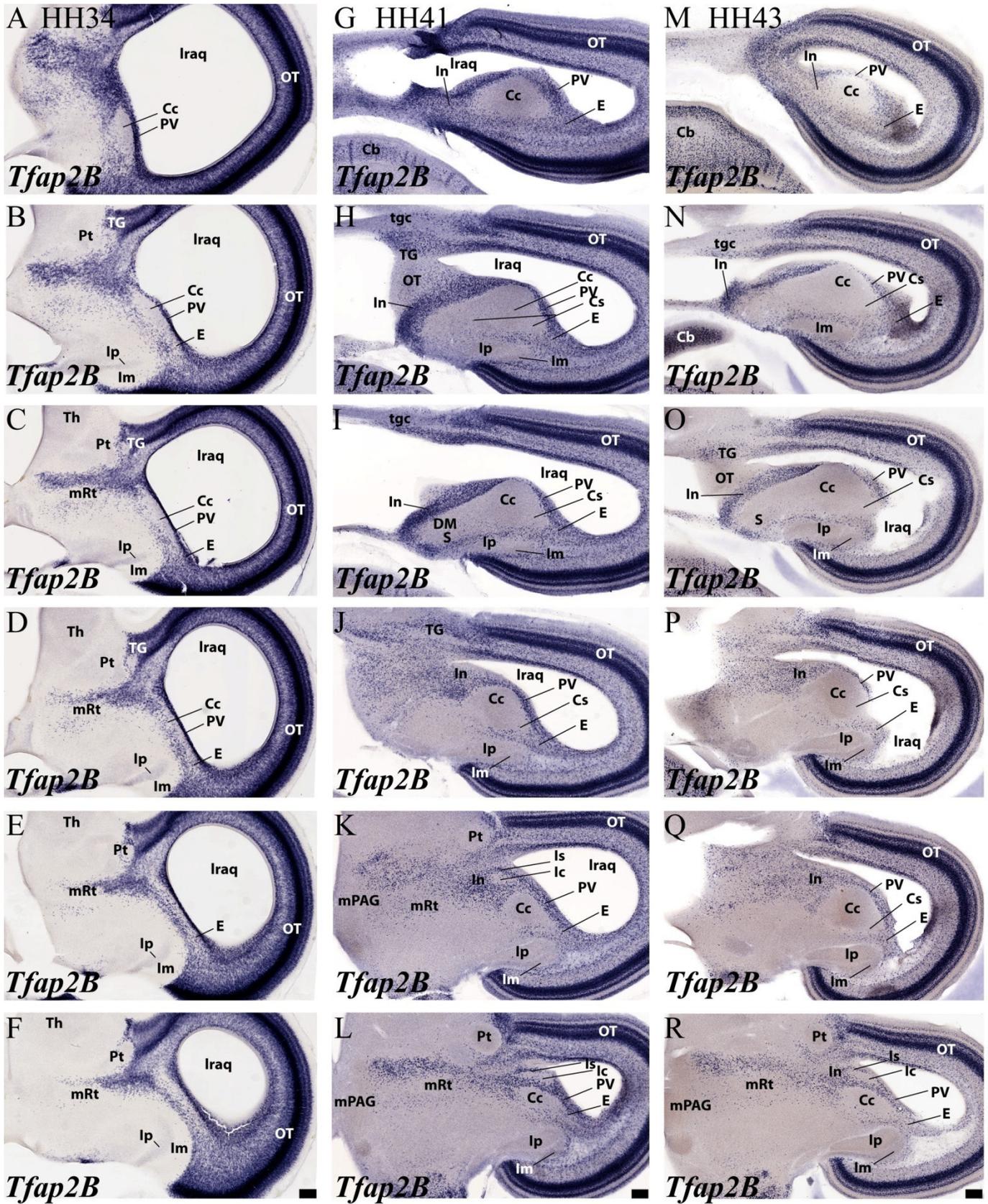


Figura 4.18: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes horizontales (dorsal a ventral) comparando la expresión de *Tcf7l2* (A-F), *Enc1* (G-L) y *Six3* (M-R) mediante hibridación in situ en estadios finales de desarrollo de embriones de pollo. Barra de escala 500µm.

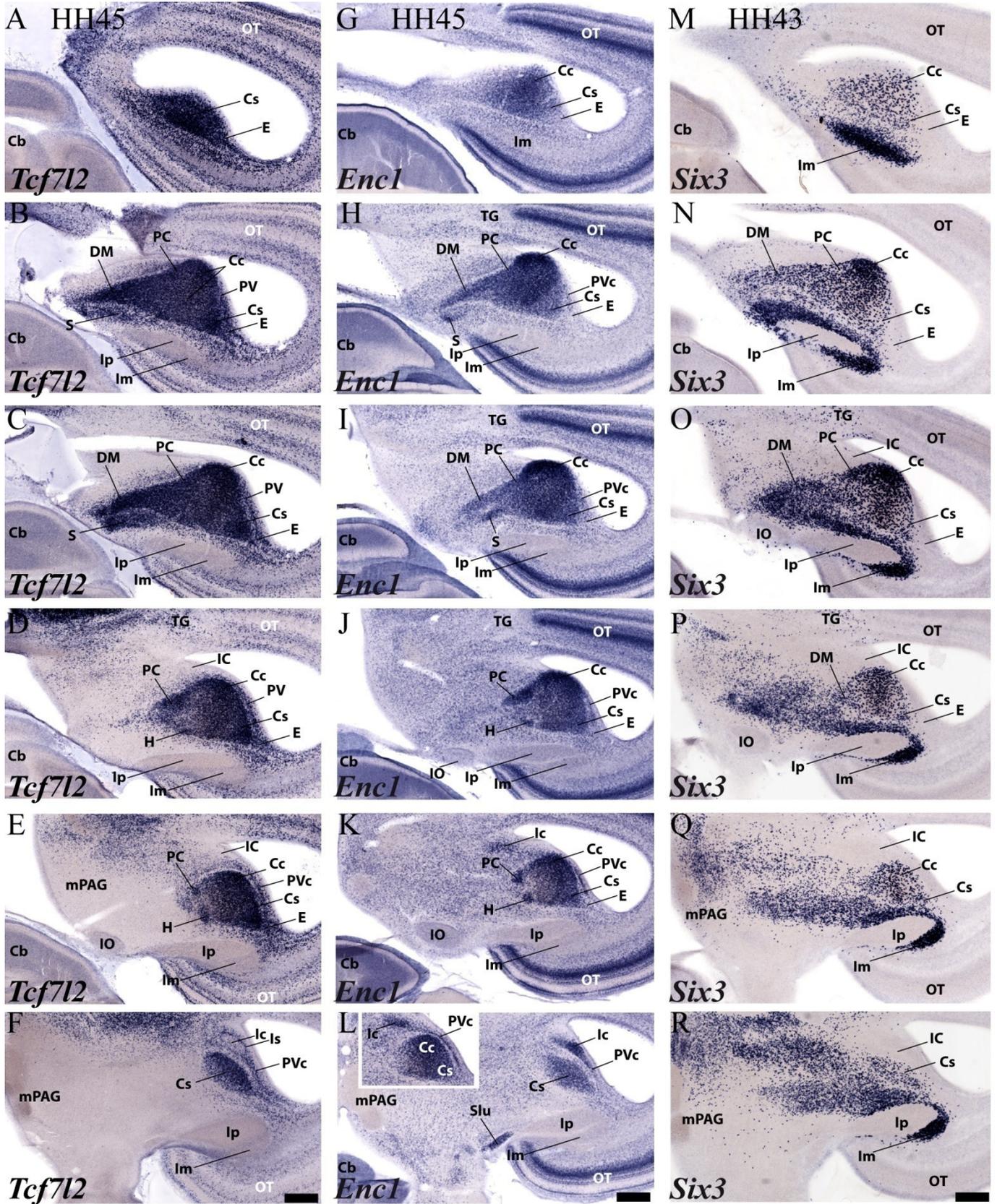


Figura 4.19: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes horizontales (dorsal a ventral) comparando la expresión de *Meis1*(A-F), *Meis2* (G-L) y *RorA* (M-R) mediante hibridación in situ, en estadios avanzados del desarrollo de embriones de pollo. Barra de escala 500µm.

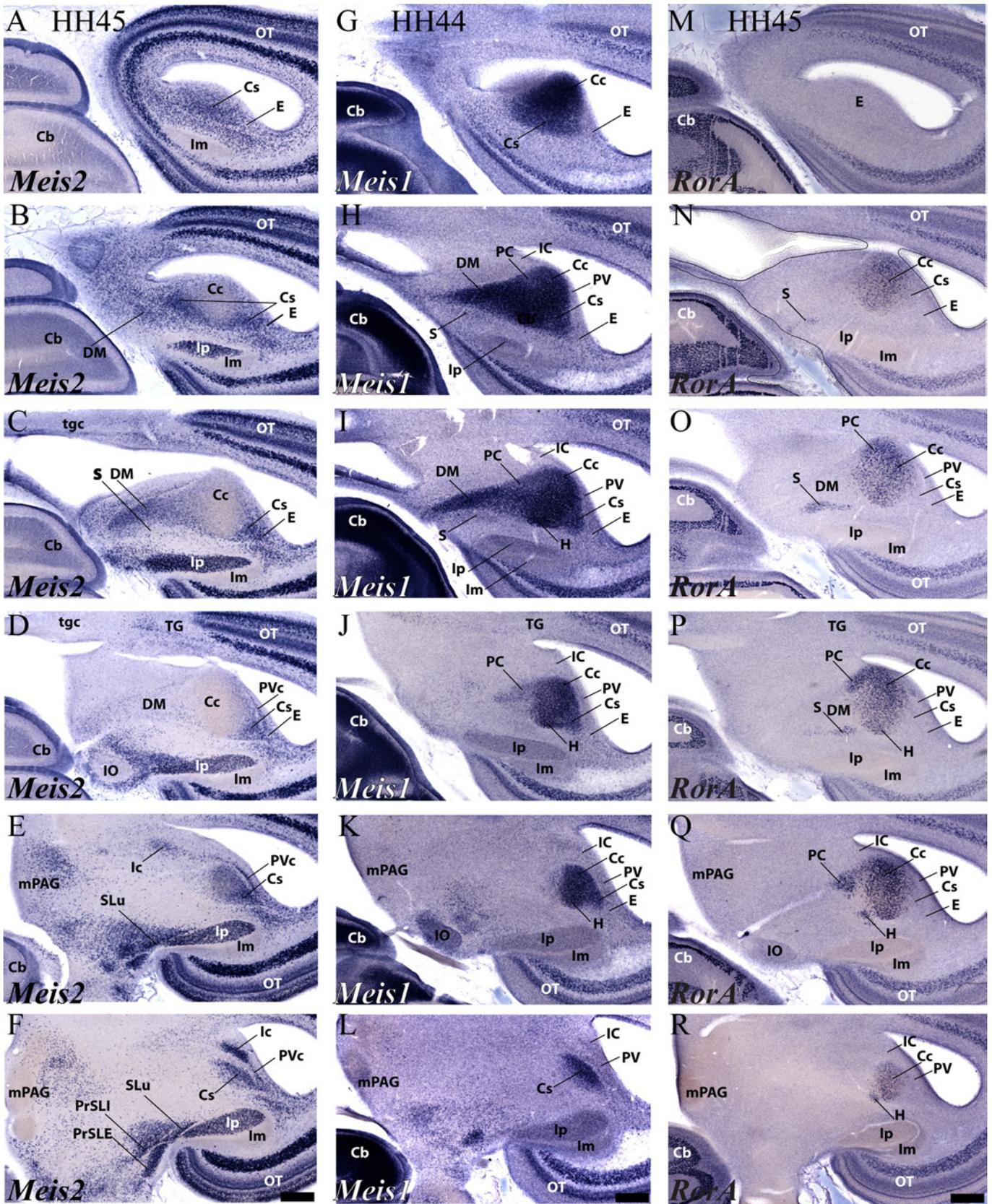


Figura 4.20: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes horizontales (dorsal a ventral) comparando la expresión de *Npy* (A-F), *Vglut2* (G-L) y *Gad67* (M-R) mediante hibridación in situ, en estadios avanzados del desarrollo de embriones de pollo. Barra de escala 500 μ m.

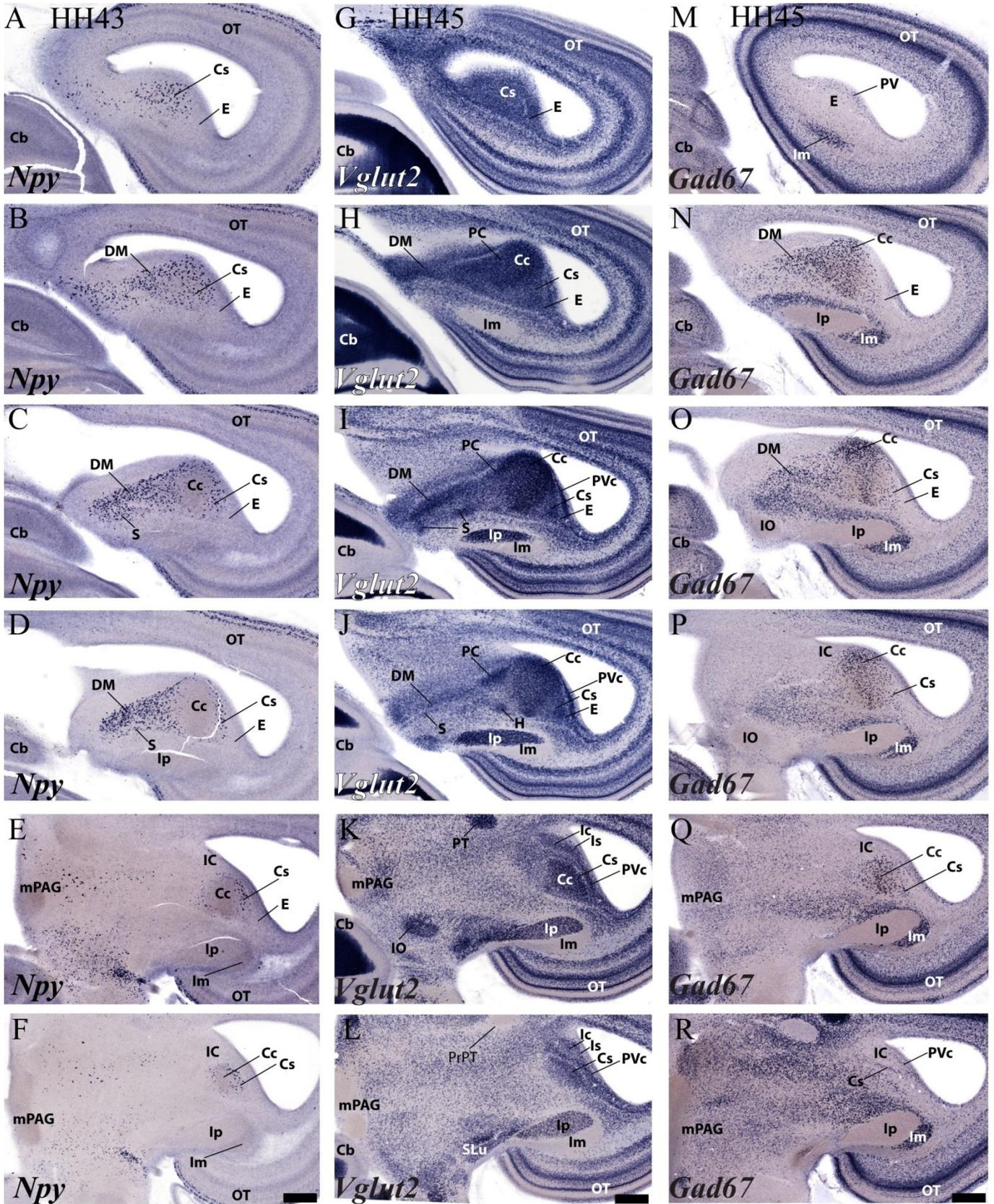


Figura 4.21: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes horizontales (dorsal a ventral) comparando la expresión de *ParvB* (A-F), *Penk1* (G-L) y *Tcf7l2/Six3* (M-R) mediante hibridación in situ, en estadios avanzados del desarrollo de embriones de pollo. Las secciones M-R muestran la expresión de *Tcf7l2* (Azul) y de *Six3* (rojo) mediante la hibridación in situ doble. Barra de escala 500µm.

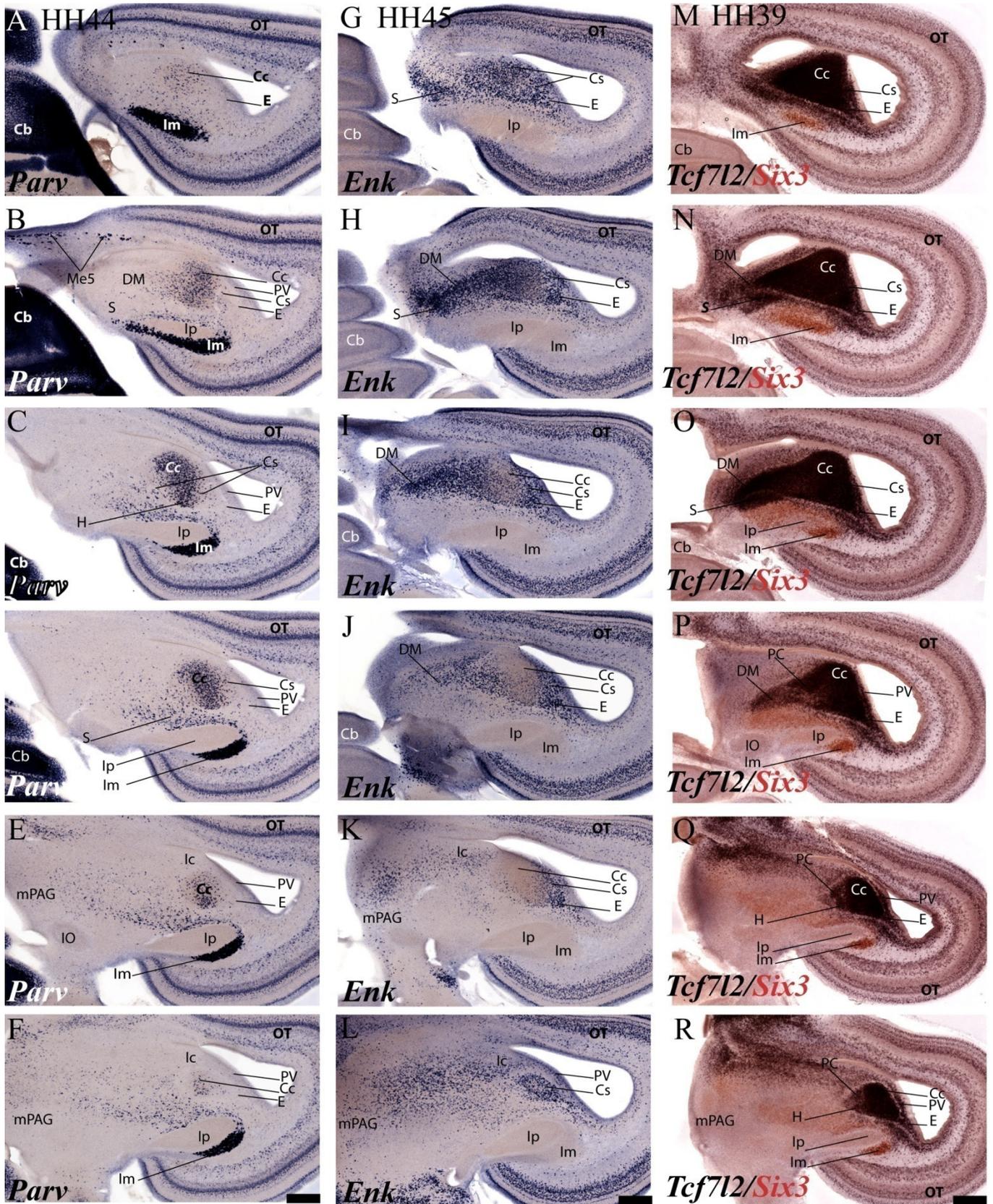


Figura 4.22: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes horizontales (dorsal a ventral) comparando la expresión de *Tac1* y *Tac1/Six3* mediante hibridación in situ, entre los estadios HH37 y HH45 del desarrollo de embriones de pollo. Las secciones G-L muestran la expresión de *Tac1* (Azul) y de *Six3* (rojo) mediante la hibridación in situ doble. Barra de escala 500µm.

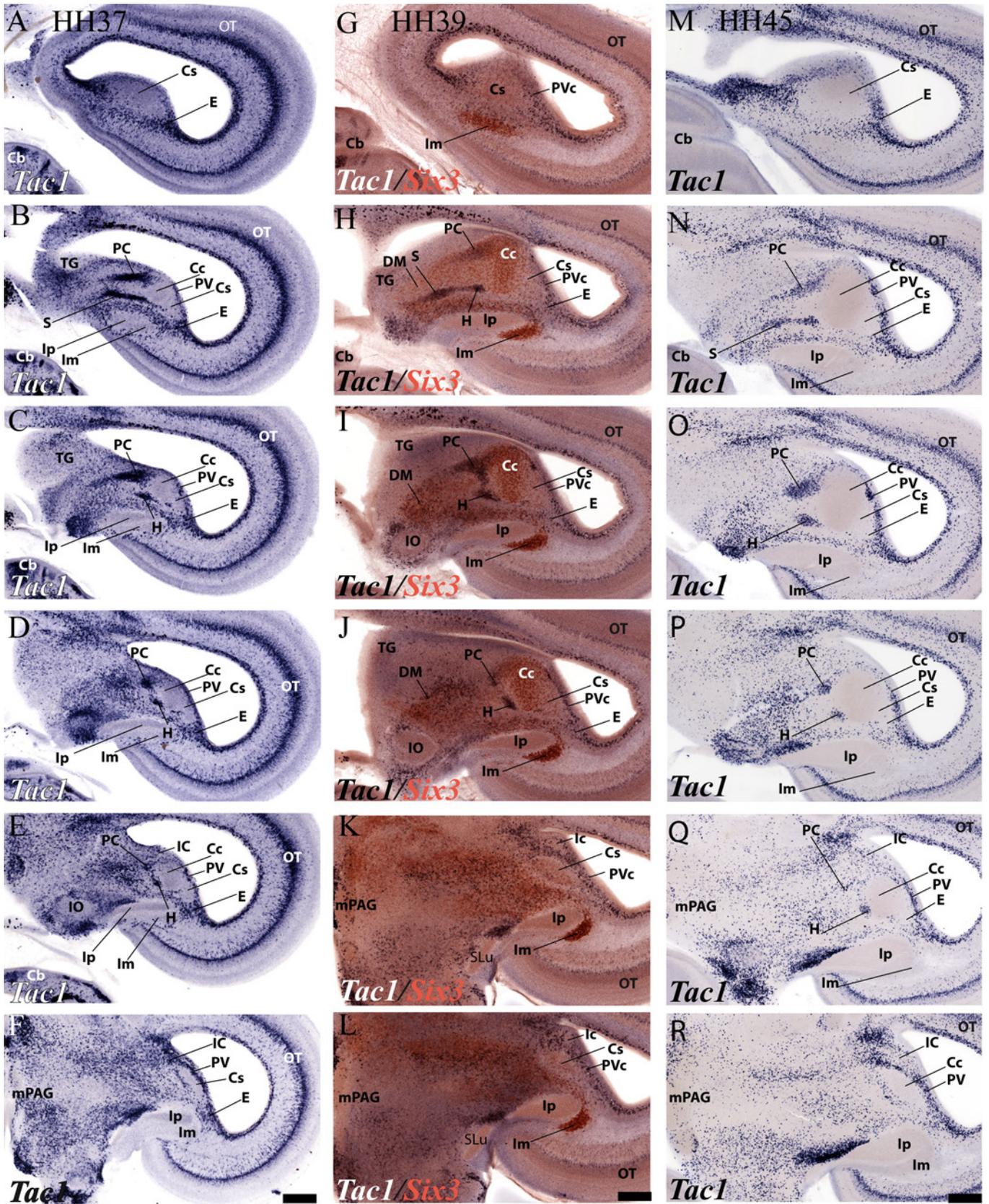


Figura 4.23: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes sagitales (lateral a medial) comparando la expresión de *Meis2* (A-E), *Tac1* (F-J) y *RorA* (K-O) mediante hibridación in situ en el cerebro de ratón a estadios postnatales P10 (A-J) y P25 (K-O). Barra de escala 300µm

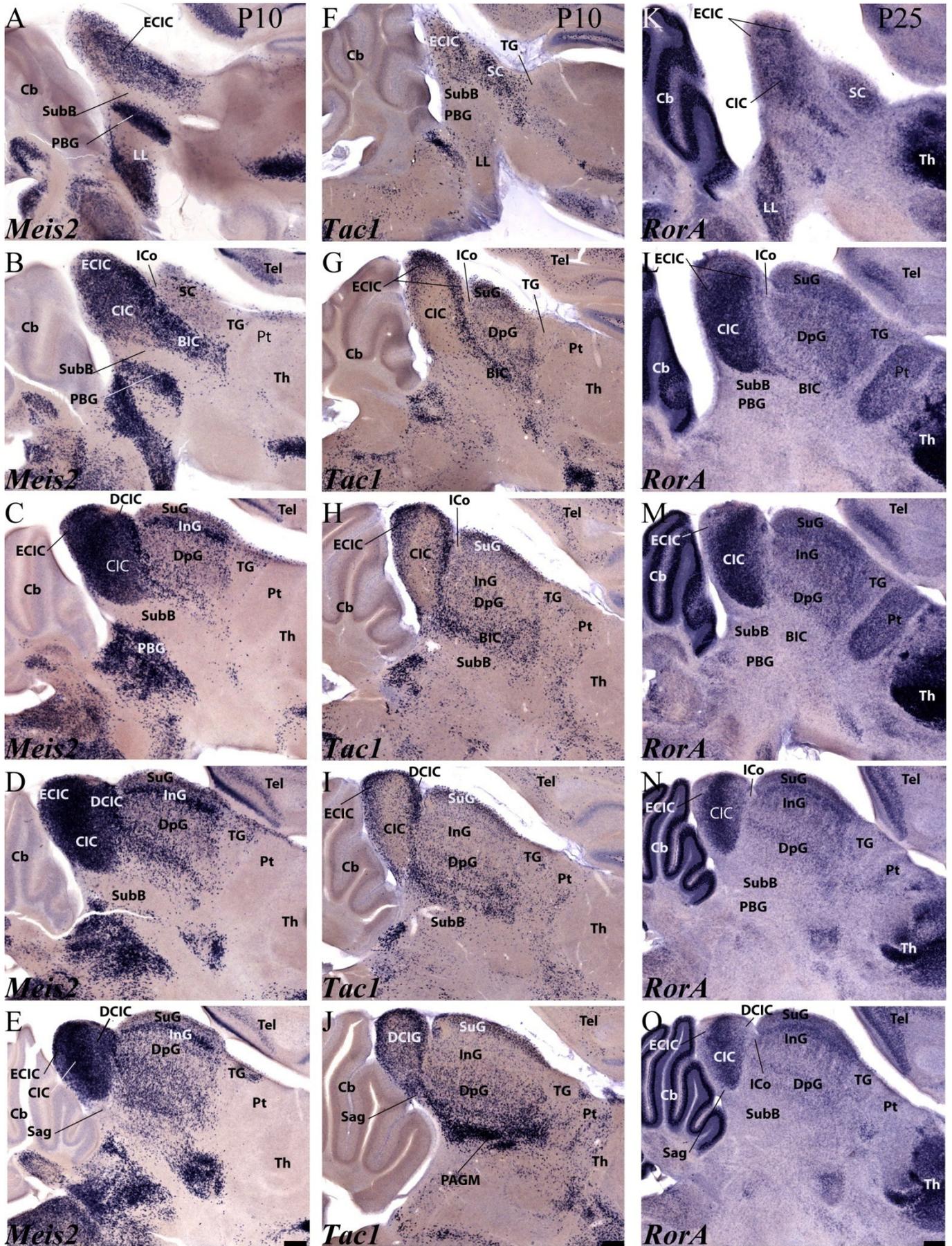


Figura 4.24: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes sagitales (lateral a medial) comparando la expresión de *ParvB* (A-E), *Penk1* (F-J) y *Tcf7l2* (K-O) mediante hibridación in situ en el cerebros de ratón a estadios postnatales P25 (A-J) y P14 (K-O). Barra de escala 300µm

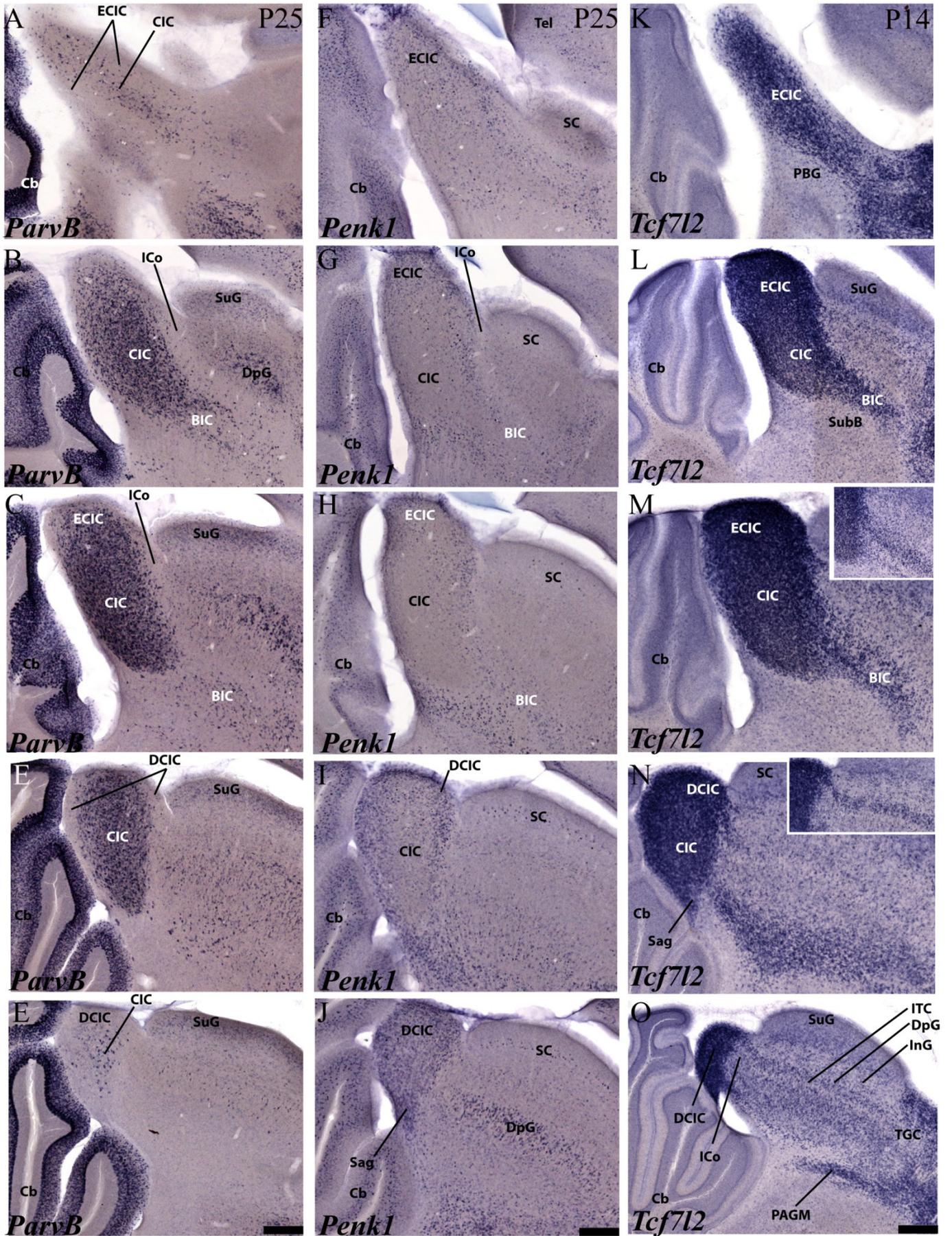


Figura 4.25: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes sagitales (A-J) y horizontales (K-O) comparando la expresión de *Calb2* (A-E) y *Npy* (F-O) mediante hibridación in situ en el cerebro de ratón a estadios postnatales P25 (A-J), P0 (F-J) y P14 (K-O). Barra de escala 300µm

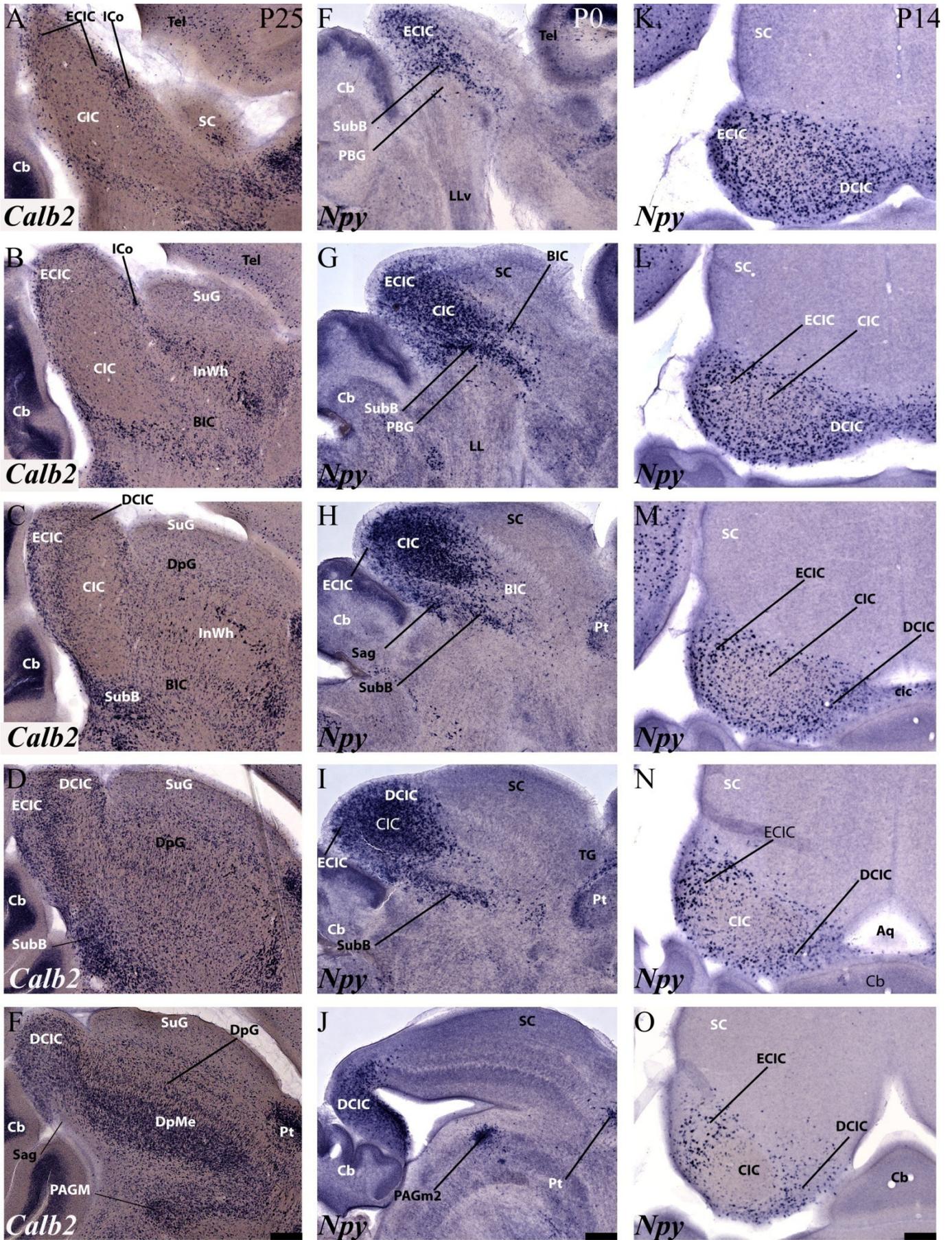


Figura 4.26: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes horizontales (dorsal a ventral) comparando la expresión de *Penk1* (A-E), *Calb2* (F-J) y *Tcf7l2* (K-O) mediante hibridación in situ en el cerebro de ratón a estadios postnatales P9 (A-J) y P14 (K-O). Barra de escala 300µm

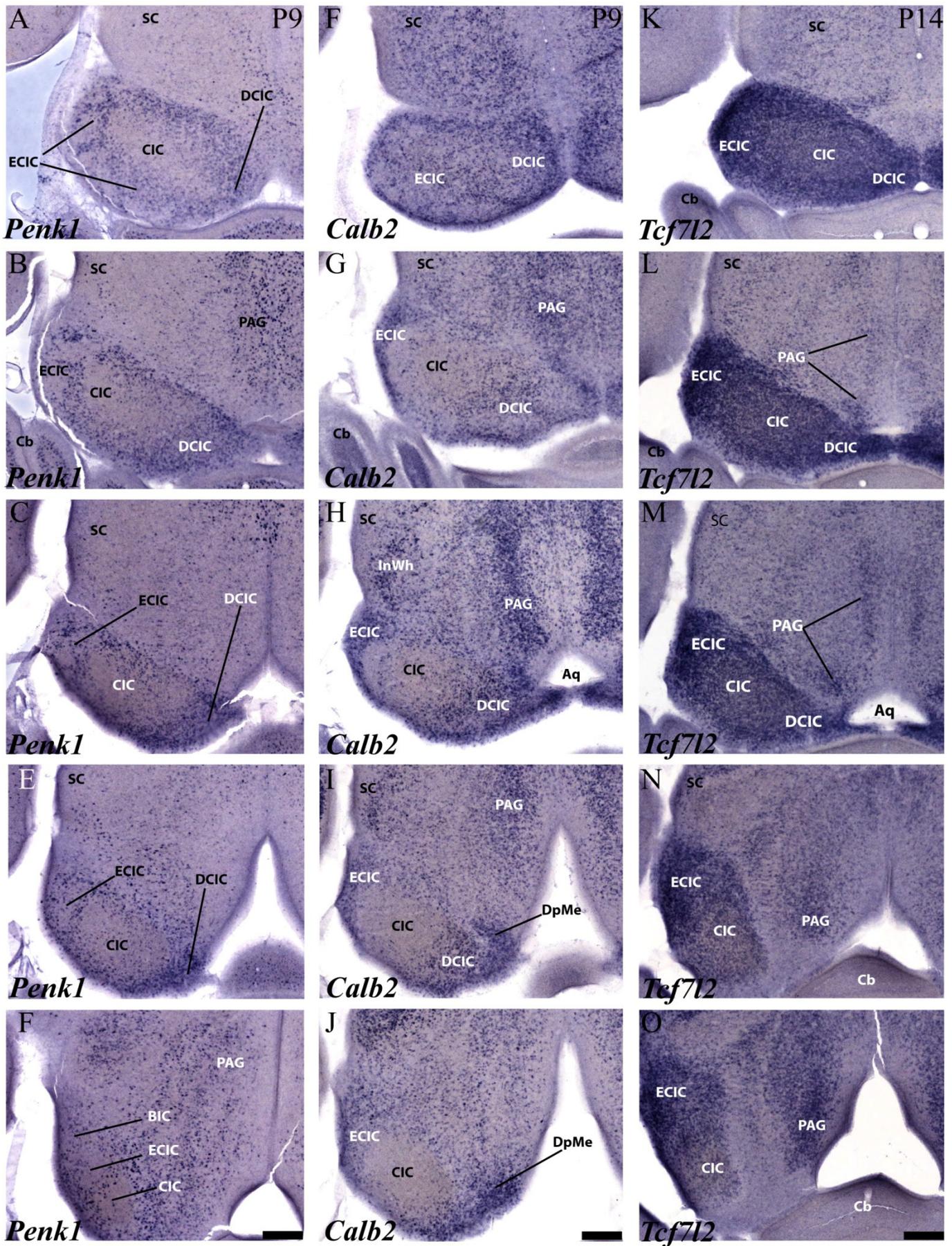


Figura 4.27: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes transversales (rostral a caudal) comparando la expresión de *Tcf7l2* (A-E), *Calb2* (F-J) y *Npy* (K-O) mediante hibridación in situ en el cerebro de ratón a estadios postnatales P10 (A-J) y P0 (K-O). Barra de escala 300µm

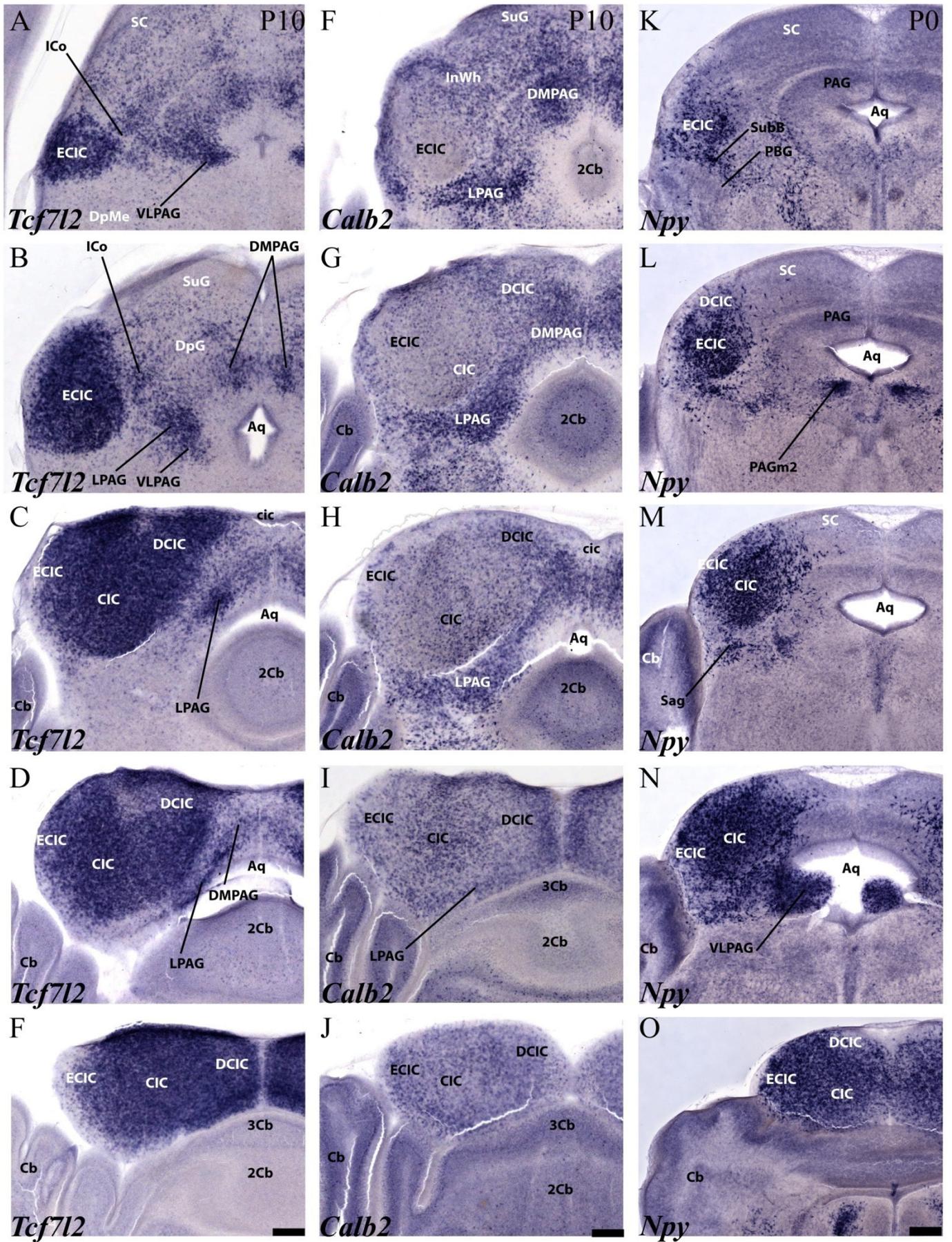
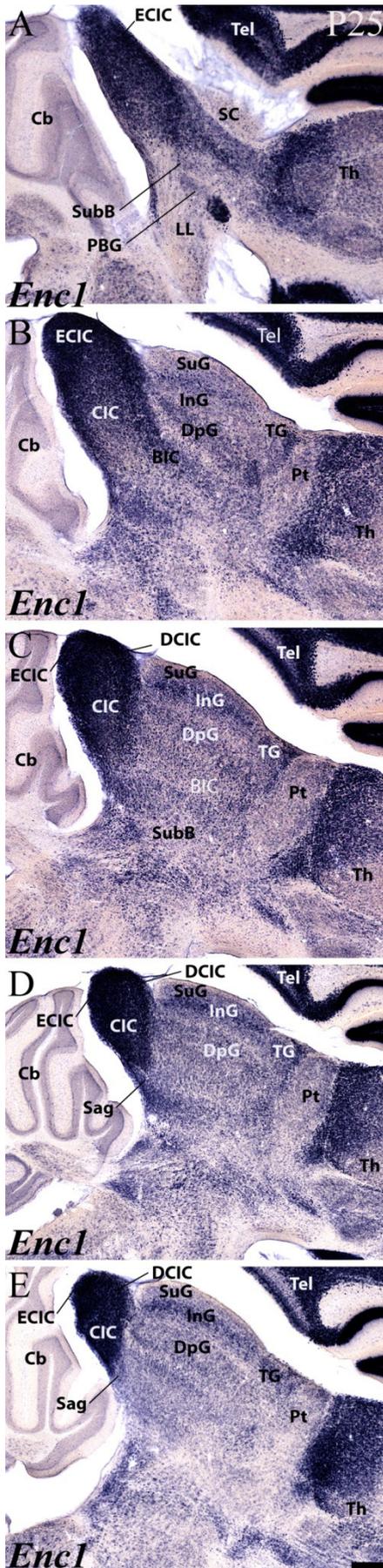


Figura 4.28: Secciones seleccionadas de una serie consecutiva de cortes horizontales (lateral a medial) mostrando la expresión del gen *Enc1* mediante hibridación in situ en el cerebro de ratón a estadios postnatales P25. Barra de escala 300µm



5. DISCUSIÓN

La caracterización genoarquitectónica del mesencéfalo de mamíferos (o específicamente de roedores) y aves ha sido objeto de escaso estudio hasta la fecha. Quizá el estudio más comprehensivo en el ratón sea el análisis reciente en un capítulo del libro “The Mouse Nervous System” de la organización de la placa alar y basal de los mesómeros 1 y 2 del territorio mesencefálico (Puelles y col., 2012). Otros estudios recientes se han centrado en estadios iniciales del desarrollo del mesencéfalo en el ratón (sin distinguir mesómeros), proponiendo modelos de su *división dorsoventral*, y/o analizando mediante líneas transgénicas el origen de poblaciones mesencefálicas específicas (Nakatani y col., 2007; Kala y col., 2009; Perez-Balaguer y col., 2009). No existe nada equivalente en las aves.

Los estudios genoarquitectónicos se han convertido entretanto en una herramienta clave para la identificación de regiones, dominios, capas o núcleos homólogos entre diversas especies, tal como ilustra el caso del pretectum (Ferran y col., 2007, 2008, 2009; Morona y col., 2010; Merchan y col., 2011; Lauter y col., 2013), y en esta línea se orienta el trabajo presente. Partiendo de un análisis molecular comparado del tectum óptico y el torus semicircular del pollo, así como de los colículos superior e inferior del ratón (y otros derivados alares acompañantes), nos hemos propuesto establecer las posibles homologías entre los derivados del mesencéfalo alar en aves y roedores desde el punto de vista genoarquitectural. En su aplicación al pollo, centrada fundamentalmente en la región menos conocida, el torus semicircular, nuestro estudio se beneficia parcialmente de la existencia de un trabajo previo del grupo, en el que ya se propuso un modelo estructural del torus semicircular sobre la base de mapeos quimioarquitectónicos de tipo inmunocitoquímico (Puelles y col., 1994). Este modelo se ha visto confirmado en lo fundamental por nuestras observaciones de mapeo génico.

5.1 Límites mesencefálicos

Insistimos sobre el tema de los límites del mesencéfalo porque este es un tema mal resuelto en la literatura, donde a menudo se añaden partes anatómicas que son propiamente diencefálicas o rombencefálicas al mesencéfalo (p.ej., Dong, 2008; Swanson, 2012). Esto se debe a la posición del mesencéfalo a nivel de la flexura

cefálica del neuroeje, que lleva a las caras ventrales del rombencéfalo y el diencefalo a aproximarse mutuamente debajo del mesencéfalo. Esto causa su deformación en cuña, con una base o superficie ventral muy reducida (comprimida a nivel del origen aparente del III par craneal) y una región dorsal muy desarrollada en sentido anteroposterior (expansión de la lámina cuadrigémina). Esta forma lleva fácilmente al error de considerar partes vecinas como propias del mesencéfalo. La definición de marcadores moleculares de los límites reales resulta así de primera importancia para resolver tales errores.

Corroboramos en primer lugar que el límite transversal entre diencefalo y mesencéfalo (**DMB**) pasa tangente al extremo caudal de la comisura posterior, separándolo así netamente del pretectum, tal como ya propuso Palmgren (1921), y luego confirmó Rendahl (1924), con metodología mucho menos sofisticada (tinción de hematoxilina), pero sí con un enfoque embriológico. No obstante, el desarrollo ulterior de la neuroanatomía en manos de otros autores atentos exclusivamente al cerebro adulto desdibujó o dejó de lado esta definición, causando la frecuente inclusión del pretectum y de la región prepontina del rombencéfalo (istmo y rombómeros 1 y 2) en el mesencéfalo. Ello ha dado lugar a mucha confusión en la literatura. Los estudios quimioarquitectónicos ulteriores y los datos genoarquitectónicos modernos han confirmado plenamente el concepto postulado inicialmente por Palmgren (1921) y Rendahl (1924). Es importante que los modernos datos moleculares permiten establecer límites entre las grandes partes del cerebro mucho antes que se hagan evidentes las referencias anatómicas clásicas, tales como el desarrollo de masas nucleares, de ciertos paquetes de axones, o de comisuras a través de la línea media. Comparando la expresión alar diencefálica de *Pax6* con mapas de destino en el pollo se ha concluido que desde estadios muy tempranos su límite posterior en la placa alar permite identificar el límite DMB en todos los vertebrados, tal como lo hemos confirmado una vez más en nuestro estudio en diversos estados de desarrollo (datos en ratones, humanos, pollos, codornices, rana *Xenopus laevis* y pez cebra; Mastick y col., 1997; Matsunaga y col., 2000; García-López y col., 2004; Kerwin y col., 2004; Ferran y col., 2008, 2009, 2010; Morona y col., 2010; Merchan y col., 2011; Puelles y col., 2012; Lauter y col., 2013). Hemos observado asimismo que la expresión de *Tcf7l2* a nivel del manto y ventrículo diencefálico se detiene caudalmente en el DMB, aunque solamente hasta E10.5 en el ratón, expresándose adicionalmente a partir de E11.5 en el manto de los distintos

dominios alares de m1. Estudios previos en pollo y codorniz igualmente mostraron que *Tcf7l2* se expresa del lado diencefálico en el ventrículo y el manto diencefálicos, deteniéndose en el DMB hasta el estadio HH24/Q24, y extendiéndose a partir del estadio siguiente en el manto mesencefálico (Merchán y col., 2011). Observaciones similares se obtuvieron comparando estados tempranos y tardíos de la rana *Xenopus laevis* (Morona y col., 2010).

Nuestros resultados en ratón confirman por otro lado que la expresión mesencefálica de *Meis2* se detiene rostralmente en el DMB en estadios tempranos. Además, a partir de E14.5 se produce una clara disminución de su expresión rostral, y comienza a observarse expresión de este marcador en capas superficiales del dominio comisural pretectal, un detalle no apreciado en estudios previos (Cecconi y col., 1997; Oulad-Abdelghani y col., 1997; Shim y col., 1997; Puelles y col., 2012). Estudios en pollo y codorniz han mostrado asimismo que la señal de *Meis2* en el mesencéfalo se detiene en el DMB desde estadios HH9/10 hasta HH24-25; sin embargo en estadio HH28/Q27 ya se observa una población superficial de células positivas sobre el dominio comisural pretectal (Ferran y col., 2007; Merchán y col., 2011; Sánchez Guardado y col., 2011). Estos datos confirman que tanto en aves como en mamíferos ocurre el mismo cambio espaciotemporal en la expresión de *Meis2*. Serán necesarios mapas de destino del dominio pretectal comisural o del gris tectal mesencefálico para determinar si el origen de esa población pretectal tardía *Meis2* positiva es mesencefálico o pretectal (implicando en el primer caso la existencia de una migración tangencial).

De nuestro estudio se desprende que otros patrones tales como los de *Lim1* y *Gata3* también se detienen en el DMB hasta E11.5, ampliándose luego su expresión al territorio mesencefálico a partir del estadio E12.5. Los datos en pollo y codorniz han mostrado que hasta HH24/Q24 la expresión alar de ambos marcadores se detiene en el DMB, observándose luego una masiva expresión en el manto mesencefálico a partir de HH27/Q27 (Ferran y col., 2007; Merchán y col., 2011). Entre los días E11.5 y E12.5 de gestación se produce por tanto en el ratón (estadios HH27/28 en el pollo) un cambio significativo en los patrones de expresión mesencefálicos (punto bisagra), que nos permite entre otros aspectos poder reconocer molecularmente a partir de este momento distintas particiones alares de m1. El patrón mesencefálico anteroposterior aparentemente es establecido por señales emanadas del organizador ístmico, siendo FGF8 la principal molécula señalizadora (Martinez y col., 1991; Crosley y col., 1996).

Diversas aproximaciones experimentales han concluido que ciertos niveles de señalización gradienta de FGF8 serían los responsables de generar las particiones alares anteroposteriores del mesencéfalo (Sato y col, 2001; Liu y col., 2003; Basson y col., 2008). Nosotros concluimos en este trabajo que tales particiones son en total 5. Futuros diseños experimentales deberían confirmar que el contexto molecular que permite la expresión gradienta de *Lim1*, *Gata3* y *Tcf4* en el mesencéfalo a partir de determinados estadios intermedios se relaciona con una disminución progresiva del efecto de FGF8 a niveles rostrales (probablemente debido al crecimiento de la vesícula).

Nuestros resultados analizando patrones diversos tales como *Foxp1*, *Bhlhb4*, *Lhx2* durante el desarrollo y ciertos estadios postnatales contribuyen a demostrar que también es posible reconocer el límite rostral mesencefálico con estos marcadores atendiendo a su expresión diferencial entre ambas regiones limítrofes. Aun cuando un mismo gen pueda expresarse en los dos territorios colindantes, se observa en muchos ejemplos que el marcador difiere en su distribución específica en las capas del manto (dimensión radial) de ambos territorios. Finalmente, del estudio de este límite se desprende que un patrón de expresión puede cambiar su localización, o ampliar su dominio de expresión, respondiendo a diversos factores contextuales. Por lo tanto, es preciso conocer cómo se expresa cada gen en cada estadio de desarrollo y postnatal, ya que las conclusiones derivadas del análisis de sólo algunos estadios pueden resultar engañosas.

El borde caudal de *Otx2*, un gen expresado en el diencéfalo y el territorio mesencefálico, así como el borde rostral de *Gbx2* y *Fgf8* expresados en el dominio rombencefálico, constituyen reconocidos marcadores del límite caudal del mesencéfalo que permanecen invariantes hasta el adulto (Puelles y col., 2012; Puelles 2013). Además de confirmar estos patrones en los estadios seleccionados, algunos otros marcadores estudiados aquí, tales como *Meis2*, *Six3* y *Dbx1*, interrumpen su expresión mesencefálica a nivel del IsO siendo también referentes para identificar el límite caudal del mesencéfalo (Figs. 7C, 8A). Tal límite fue asimismo definido en primer lugar y con métodos clásicos en diversos vertebrados por Palmgren (1921), aunque de nuevo autores ulteriores de la escuela americana desdeñaron su criterio embriológico, de tal manera que en gran parte de la literatura hasta fechas recientes se atribuye al mesencéfalo toda la región prepontina del rombencéfalo, que incluye el istmo y los rombómeros 1 y 2 (ver atlas de ratón de Dong, 2008). Los avances recientes en embriología experimental (mapas de destino y estudios sobre el organizador ístmico, así

como varios fenotipos transgénicos) y genoarquitectonía han mostrado suficientemente el error que implica tal distorsión de las particiones realmente existentes (revisión en Puelles y col., 2012).

5.2 Regionalización anteroposterior de la placa alar de m1

Los datos genoarquitectónicos obtenidos muestran que a partir de E12.5 es posible individualizar los territorios alares de m1 y m2 en el ratón (datos equivalentes en el pollo, estadios HH27/28). Estos territorios anteroposteriores incorporan según nuestro estudio un quinto componente, adicional a los ya postulados previamente. El dominio más rostral en m1 se conoce como **griseum tectalis (TG)**; ver García-Calero y col., 2002; Puelles y col., 2012), el cual se sigue del **colículo superior (SC)**; ambos son centros retinorecipientes); caudalmente a éste aparece primero el **dominio intercolicular (In)**, una formación somatosensitiva, y tras él el **colículo inferior (IC)**, una estación de relevo acústica. Los territorios alares del mesencéfalo incluyen asimismo en su extremo caudal el **preístmo (PI)**, que se localiza en la placa alar de m2 (Hidalgo-Sánchez y col., 2005; Puelles y col., 2007; 2012).

En la literatura neuroanatómica se suele ver una versión simplificada de este territorio, en la que se menciona exclusivamente a los dos colículos. El TG solía describirse en la literatura clásica como ‘núcleo pretectal posterior’, atribuyéndolo erróneamente al pretecho, aunque esta formación se localiza justamente caudal a la comisura posterior (un efecto de la confusión existente respecto al límite mesencéfalo-diencefálico; revisión en García-Calero y col., 2002; Puelles y col., 2012). Según nuestro nuevo modelo se generarían anteroposteriormente no menos de cinco dominios alares, como producto de los procesos de regionalización del mesencéfalo controlados por el organizador ístmico. En realidad, estas cinco formaciones identificadas con nombre propio representan solamente el componente dorsolateral –siempre el de mayor tamaño relativo- del patrón de subdivisión dorsoventral que se discutirá más adelante (Fig. 4.15). Por lo tanto, la placa alar mesencefálica presenta diversos otros derivados, situados ya sea dorsalmente o ventralmente a cada uno de los derivados mayoritarios. En su mayoría estos componentes son muy poco conocidos.

El gen *Esrrb* aparece expresado exclusivamente en el manto del griseum tectalis (TG), donde *Meis2* comienza a disminuir su expresión a partir de E12.5, y donde predomina asimismo la expresión de *calretinina* o *Calb2*. Otros genes tales como *Tcf7l2*, que inicialmente no se expresan en este territorio, muestran una masiva expresión en el manto del TG en estadios postnatales, con detalles diferenciales en relación a los territorios pretectales o del colículo superior adyacentes (rostral y caudal, respectivamente). Finalmente, también la expresión de *Foxp1*, *Foxp2*, *Gata3* y *Lhx2* presenta una distribución en el manto de TG que es característica y típica para este dominio. El gen *Ntng2* es otro marcador que se expresa intensamente en el TG (Figura 10.2 en Puelles et al., 2012). La abundancia de marcadores más o menos selectivos para el TG contrasta con la escasa atención que ha recibido esta región mesencefálica en el pasado, y continúa recibiendo en la actualidad. El griseum tectalis es una formación retinorecipiente poco estudiada que es identificada en la literatura de mamíferos como “núcleo pretectal posterior” (su parte más profunda) y “núcleo del tracto óptico” (parte superficial); existe una estructura estratificada homóloga en el lóbulo óptico de las aves (Puelles y col., 1991; Caballero-Bleda y col., 1992; Díaz y col., 2000; Martínez-de-la-Torre, 1995; García-Calero y col., 2002; Puelles y col., 2007; Puelles y col., 2012), así como en reptiles y anfibios. Hasta este momento no se había realizado ningún estudio sistemático que definiera molecularmente los límites de este territorio durante el desarrollo y estadios postnatales en roedores, siendo esta información clave para definir en diseños experimentales las singularidades propias de esta región retinorecipiente.

Nuestros datos genoarquitectónicos sobre el colículo superior muestran que a partir de E12.5 se observa expresión de *Lim1*, *Gata3*, *Bhlhb4*, *Gsh1*, *Tal1* y *Foxb1* en esta formación. Estos genes se expresan tanto en el manto del colículo superior como en el del griseum tectalis, pero están ausentes en el manto del colículo inferior. Observando únicamente estos patrones no es posible diferenciar GT de SC en este estadio, pero combinando marcadores exclusivos del TG tales como *Esrrb* se puede apreciar un límite bien definido. Tanto GT como SC son estructuras retinorecipientes, a diferencia del colículo inferior (IC), que está involucrado en la vía acústica ascendente al tálamo (Puelles y col., 2012). El significado posible de la compartición por parte del GT y del SC de algunos códigos moleculares podría relacionarse entre otros aspectos con la generación de los códigos de efrinas y sus receptores, necesarios para el establecimiento de las correctas proyecciones retinotópicas sobre ambas regiones mesencefálicas

(Scicolone y col., 2009). Estudios experimentales en ratones transgénicos con una dosis reducida del morfógeno FGF8 (generado por el organizador ístmico) mostraron que hay una correlación entre el nivel de FGF8 y los dominios rostrocaudales mesencefálicos que son generados. Se requieren dosis mayores para la especificación de los territorios más caudales. Por tanto, una clara disminución de la dosis de *Fgf8* tiene como consecuencia la pérdida del cerebelo, de la región preístmica y del colículo inferior, conservándose y aumentando de tamaño en cambio el SC y el TG (Basson y col., 2008; no hay datos para el área ICo). Estos datos sugieren una posible activación común de una red génica compartida por el TG y el SC, resultante de posibles niveles similarmente bajos de FGF8 percibidos inicialmente por ambos territorios.

Como resultado de nuestro estudio genoarquitectónico, en contexto con otros datos en la literatura, postulamos la existencia de un nuevo dominio histogenético anteroposterior del mesencéfalo alar, que hemos denominado **área intercolicular**; ésta aparece intercalada entre los colículos superior e inferior, formando un delgado territorio transicional entre ambos. En secciones horizontales, en las que se puede observar en detalle la transición entre los colículos superior e inferior, se aprecia en esta posición la presencia de un dominio genoarquitectónicamente diferente en todos los estratos de su dimensión radial y con evidente organización laminar de sus derivados neuronales. Se ha descrito en diversos mamíferos neuronas dispuestas lateralmente al plano de las fibras de la comisura intercolicular, que forman un acúmulo denominado *núcleo intercolicular* (ICo). Se sabe que éste recibe selectivamente aferencias somestésicas desde los núcleos de los cordones posteriores del bulbo y la médula espinal cervical. En vertebrados no mamíferos se ha identificado un área intercolicular de parecida posición transicional entre los centros visual y auditivo principales, que parece ser somestésica, en particular receptora de información que alertaría al animal de estímulos vibratorios (Blomqvist y col., 1990; Künzle, 1993; Pritz y Stritzel, 1989; RoBards y col., 1976; Schroeder y Jane, 1976). Estudios en gatos en los que se analizaron estímulos visuales, auditivos y táctiles mostraron que el núcleo intercolicular recibe exclusivamente modalidades somatosensoriales, a diferencia del colículo superior, que recibe señales visuales, auditivas y somatosensoriales (en distintos estratos), o el colículo inferior, cuyas aferencias son auditivas y somatosensoriales (Blomqvist y col., 1990). Los estudios previos por tanto han definido el núcleo intercolicular como un centro específicamente somatosensitivo mesencefálico, que podría tener un carácter funcional

más sensorial que sensorimotor (RoBards y col., 1976; Blomqvist y col., 1990). En términos de RoBards et al. (1976), la modalidad somestésica estaría representada anatómicamente en el mesencéfalo de una forma al menos tan extensa como la visión o la audición; estos autores propusieron en aquel momento un mesencéfalo alar con al menos tres porciones (colículo superior, área intercolicular y colículo inferior), si bien el área intercolicular era concebida solamente como un núcleo aislado. Nosotros proponemos que el núcleo ICo clásico es la parte más visible de un área histogénica completa alar (nuestro ICo), cuyos otros derivados estarían repartidos en diversos subdominios dorsoventrales (el núcleo ICo pertenecería al subdominio mayoritario dorsolateral) y sus respectivos estratos. Este concepto parece más parsimonioso que imaginar en el campo alar del mesencéfalo una estructura nuclear aislada extra, como una isla difícil de explicar causalmente en el contexto de los colículos superior e inferior. Desafortunadamente, tanto el área como el núcleo intercolicular han recibido escasa atención en el ratón (ver revisión en Puelles y col., 2012).

Según se desprende de nuestra conjetura, además del núcleo intercolicular, presente exclusivamente en el subdominio DL, en el que también se encuentran los colículos, cabría esperar, primero, otros derivados del mismo subdominio distribuidos en estratos dentro de DL, incluyendo una región PAG con identidad molecular propia, así como otras poblaciones de posiciones respectivamente profunda y superficial al núcleo intercolicular propiamente dicho (tales regiones también muestran poblaciones con sensibilidad táctil; Blomqvist y col., 1990). En segundo lugar, el área intercolicular además debería tener otros subdominios dorsoventrales de posición respectiva dorsal interna, dorsal externa y ventrolateral, que se añadirían al subdominio dorsolateral que hemos estado discutiendo (cada uno con sus respectivos estratos). Algunas de nuestras observaciones con ciertos marcadores génicos, así como la idea de que el subnúcleo externo del torus semicircular de las aves pueda ser un componente del área ICo (ver más abajo), apoyan estas predicciones, si bien es necesaria una investigación específica para examinar con más atención los detalles implicados.

En el caso del colículo inferior (IC), es también a partir de E12.5 cuando hay evidencia molecular que permite individualizarlo genoarquitectónicamente. A partir de E14.5, ciertos genes, como *Foxp1*, *Pax7* o *Tfap2B*, se caracterizan por perder su expresión previa en el manto del colículo inferior (IC). Así mismo, hemos hallado marcadores – p.ej. el *Npy*- que se expresan predominantemente en el manto del IC. Los marcadores

génicos identificados en esta región serán útiles para comprender las bases causales que llevan a la especificación de sus diversas poblaciones celulares, insuficientemente descritas en la actualidad, siendo además herramientas disponibles para interpretar lo que ocurre con los derivados mesencefálicos en las distintas líneas transgénicas en las que se altera el organizador ístmico (Puelles y col., 2012; Ferran y Puelles 2012; Puelles 2013). Varios de los marcadores moleculares presentes o ausentes en el colículo inferior muestran un patrón similar en la región preístmica (por ej. ausencia de expresión de *Pax7*, junto a expresión de *Npy*), aun cuando cada territorio tiene facetas moleculares y estructurales propias que lo distinguen. Esto podría tener alguna relación con efectos comunes mediados por la cercanía al organizador ístmico, ya que la concentración de FGF8 debe ser más alta en este territorio caudal del mesencéfalo.

Hemos identificado asimismo molecularmente la región preístmica (PI) en el ratón, a partir de E12.5. Ésta pertenece al mesómero m2, que representa un estrecho anillo transversal completo del tubo neural intercalado entre el m1 y la región ístmica rombencefálica (donde se forma el organizador ístmico). Consistentemente con la idea de que m2 es un componente del mesencéfalo, el preístmico presenta el marcador general mesencefálico, el factor de transcripción *Otx2*. De hecho, ya desde E13.5 su señal es más importante en el PI que en el IC (donde progresivamente se pierde). El preístmico se corresponde con la región alar de m2, que es su parte más desarrollada (donde sobresalen los núcleos superficiales subbraquial y sagulum, así como el núcleo cuneiforme a nivel intermedio; Puelles y col., 2012). La región basal correspondiente se intercala en el estrecho intersticio existente entre el núcleo oculomotor común (m1) y el núcleo troclear (ístmico) (Hidalgo-Sánchez y col., 2005; Puelles y col., 2012; Puelles, 2013). La región preístmica fue identificada por primera vez mediante métodos genoarquitectónicos y de embriología experimental en embriones de pollo (Hidalgo-Sánchez y col., 2005).

Nuestros datos indican que *Six3* aparece tempranamente como marcador selectivo del PI, si bien en fases más avanzadas del desarrollo parece que una importante población de neuronas *Six3*-positivas invade tangencialmente el IC desde el PI (fenómeno también observado en el pollo). Los genes *Tcf7l2* y *Tfap2B* que caracterizan la placa alar de m1 están selectivamente ausentes en PI. En cambio, los genes *Calb2*, *Tal2*, *Foxp1*, *Gata3* y *Lhx2* presentan marcada expresión en PI, con distribución diferencial con relación a su señal en IC (así como en el rombencéfalo). Finalmente, ciertos genes están expresados

en el rombencéfalo prepontino y extienden su dominio de expresión al preistmo, con o sin interrupción en el límite rombo-mesencefálico. Es el caso bien conocido de *Pax8*, *Pax5* y *Pax2* (Hidalgo-Sánchez y col., 2005). *Meis2* marca intensamente los derivados del ístmo y del IC, pero deja sin marcar las poblaciones del manto del PI. Todos estos datos nos permiten confirmar sólidamente la existencia en mamíferos del preistmo como el dominio mesencefálico alar más caudal (Puelles y col., 2012). Con los datos presentes, ahora este territorio es perfectamente diferenciable tanto del colículo inferior como del istmo, dada su peculiar identidad genoarquitectónica.

5.3 Divisiones dorsoventrales de la placa alar mesencefálica.

Tal como se describió previamente, la placa alar mesencefálica presenta cinco divisiones o dominios anteroposteriores, cuyo origen y especificación sin duda están relacionados en gran medida, si no totalmente, con la acción señalizadora del organizador ístmico (Basson y col., 2008). Adicionalmente, estas divisiones alares presentan cada una ciertas particiones dorsoventrales, que distinguimos genéricamente como subdominios, las cuales aparentemente emergen como consecuencia de acciones inductivas dorsoventrales de tipo mutuamente antagónico mediadas por las placas del techo y del suelo (Puelles y col., 2012; Puelles, 2013). Puelles y col. (2012) postularon tentativamente un modelo de subdivisión dorsoventral en el mesencéfalo constituido por tres subdominios alares (a través de las diversas divisiones anteroposteriores). De dorsal a ventral éstos fueron denominados *subdominios dorsal*, *dorsolateral* y *ventrolateral*. Han sido propuestos otros modelos donde se postulan menos particiones dorsoventrales alares. Según el modelo de divisiones dorsoventrales planteado por Nakatani y col. (2007), modificado luego por Kala y col. (2009), existirían dos dominios de este tipo, identificados por estos autores como *m1* y *m2* (desafortunadamente, estos nombres se solapan totalmente con las siglas de los mesómeros 1 y 2, por lo cual nosotros nos referiremos a estos conceptos usando mayúsculas, o sea, M1 y M2). M1 se caracteriza por la expresión de *Pax7* y M2 por la ausencia de este marcador y la expresión de *Nkx2.2* en el manto, entre otros marcadores.

Como resultado de nuestro estudio genoarquitectónico, nosotros hemos podido definir *cuatro dominios alares dorsoventrales* en lugar de los tres que esperábamos de acuerdo con el esquema basado en Puelles y col. (2012). Esencialmente, encontramos

evidencia de que el subdominio dorsal de estos autores (no distinguido por Nakatani y col., 2007 o Kala y col., 2009) debe ser dividido en partes interna y externa con relación al plano medio, dando así de dorsal a ventral los subdominios *dorsal interno*, *dorsal externo*, *dorsolateral* y *ventrolateral*.

Subdominios dorsales.

La placa del techo se puede individualizar durante la gestación y los estadios postnatales mediante marcadores tales como *Lmx1b* y *Lmx1a* (Nakatani y col., 2007). Lateralmente a la región del techo que expresa *Lmx1b* encontramos una pequeña región *Zic1* positiva, pero *Pax7*-negativa, a la que denominamos *subdominio dorsal interno* (DI). Adyacente al DI se localiza otra pequeña región, el *subdominio dorsal externo* (DE), que se caracteriza por expresar tanto *Zic1* como *Pax7*. Nakatani y col. (2007) y Kala y col. (2009) afirman en su modelo que la expresión de *Pax7* toca la placa del techo; sin embargo, no muestran imágenes de la zona correspondiente, y nuestros datos no corroboran dicha conclusión, ya que DI no expresa *Pax7*. Pensamos que el territorio *Pax7*-positivo al que estos autores se refieren corresponde básicamente a nuestros subdominios DL y DE, y han interpretado erróneamente como placa del techo un territorio más amplio que el que reconoce *Lmx1b*, correspondiente al techo más DI. Por otra parte, Puelles y col. (2012) propusieron la existencia de un dominio dorsal basándose principalmente en una columna longitudinal de neuronas paracomisurales que es adyacente a la placa del techo y es distinguible histológicamente de los derivados del dominio dorsolateral (griseum tectalis, colículo superior, area intercolicular y colículo inferior). Esta *columna paracomisural tectal* se extiende a lo largo de la totalidad de m1, y probablemente existe una formación análoga de menor tamaño en m2. Según la interpretación de Puelles y col. (2012), los estratos central e intermedio del dominio dorsal contienen respectivamente las columnas ventral y dorsal de los núcleos paracomisurales tectales (TPCV, TPCD). Estos núcleos fueron descritos inicialmente bajo el nombre de *columnas longitudinales tectales dorsal y ventral* (Saldaña y col. 2007; Aparicio y Saldaña, 2013). La columna dorsal (TPCD) está constituida exclusivamente por neuronas gabaérgicas, que están dedicadas a inhibir masivamente ciertos núcleos talámicos de tipo acústico (Aparicio y Saldaña, 2013). El TPCV recibe diversas proyecciones del sistema auditivo, básicamente del núcleo paraolivario superior, del colículo inferior y de la corteza auditiva primaria (Saldaña y col.

2007; Viñuela y col., 2011; Aparicio y col., 2010; Aparicio y Saldaña, 2013). Existe la posibilidad, no obstante, de que TPCV derive del subdominio DI y que TPCD derive del subdominio DE, obedeciendo su aparente disposición una encima de la otra a deformación morfogenética debida a la presión ejercida por el desarrollo más masivo del subdominio DL adyacente. Debido a que estas columnas han sido caracterizadas anatómica-, hodologica- y funcionalmente en roedores adultos, el posible desplazamiento relativo de partes de su manto en dirección dorsal (DE sobre DI) durante el desarrollo avanzado ha permanecido oculto. Tal hipótesis puede ser confirmada examinando la estructura de la glía radial en las columnas paracomisurales. Entre los datos más relevantes que hemos observado en estadios postnatales destaca la expresión selectiva de *Penk1* en la columna paracomisural dorsal (TPCD).

Subdominio dorsolateral.

Este subdominio mayoritario en la región alar mesencefálica ha sido ya objeto de comentario más arriba, en relación a sus derivados gris tectal, colículo superior, area intercolicular, colículo inferior y preistmo.

Subdominio ventrolateral.

El subdominio VL es claramente diferenciable de su vecino inmediato (DL) por su histogénesis diferencial, si bien se corresponde con una zona del manto alar que ha recibido escasa atención (núcleo mesencefálico profundo en algunos trabajos clásicos comparados; región laterorubral de la formación reticular). Esto aparentemente es debido a que la mayor parte del manto VL adopta una diferenciación de aspecto reticular (formación reticular mesencefálica lateral, o laterorubral), en la que no es posible reconocer masas nucleares discretas. No obstante, su territorio profundo periacueductal ha sido repetidamente reconocido como poseedor de propiedades funcionales y quimioarquitectónicas características. Notablemente, la inyección de aminoácidos excitatorios en esta región periacueductal produce reacciones de defensa pasiva (quiescencia, hiporeactividad, hipotensión, bradicardia), y la misma región aparece vinculada a la producción de efectos analgésicos de tipo opioide (células con endorfinas). Este tipo de reacción se produce normalmente cuando el animal se ve

afectado por circunstancias adversas inescapables de tipo ya sea físico (lesión) o psicológico, tales como una lesión traumática (pérdida de sangre, dolor intenso) o stress crónico (por ejemplo, por situaciones de derrota social repetida). El animal se queda quieto, o simula estar muerto. Esto contrasta con las respuestas de defensa activa que caracterizan la activación de la formación periacueductal profunda a DL, típicas de situaciones en las que el animal se siente amenazado o atacado de forma escapable, o sea, en las que lucha, o indica su disposición a luchar (Keay and Bandler, 2004 [Periaqueductal gray. Chapter 10 in Paxinos, G. The Rat Nervous System, Academic Press, San Diego. pp.243-257]).

5.4 Genoarquitectura de los estratos del colículo superior.

Existe poca información en la literatura sobre esta temática, por lo cual resumiremos nuestras observaciones.

Una marcada expresión de *Bhlhb4* aparece desde E12.5 en una población periventricular del colículo superior, correspondiendo a la prospectiva sustancia gris periacueductal (PAG). Datos sobre este marcador en la colección del Allen Brain Research Institute (<http://www.brain-map.org/>) muestran que en P56 algunas de las células periventriculares que forman parte del PAG (también presentes en el PAG de los dominios dorsal interno, dorsal externo y ventrolateral) continúan expresando *Bhlhb4*. Puede ser que esta población coincida con ciertas células NAPDHd-positivas descritas en este lugar (Keay y Bandler, 2004; su Fig.3).

Hemos observado que, además de la expresión de *Tcf7l2*, *Calb2*, *Penk1*, *Meis2*, *ParvB* y *Tac1* en el PAG adulto correspondiente al colículo superior, existe una distribución preferencial de estos marcadores en las distintas capas que componen sus tres estratos (central, intermedio y superficial). *Tcf7l2* y *Calb2*, que también se transcriben de forma marcada en el gris tectal, aparecen expresados significativamente en los estratos CS central e intermedio. *Penk1* y *Meis2* muestran un patrón similar. La señal de *ParvB* destaca en los estratos central y superficial, mientras que la de *Tac1* se restringe esencialmente al estrato superficial.

En P1, *Foxp1* aparece en el PAG y en los estratos central e intermedio; la señal de *Foxp2* está concentrada en el estrato central, que también queda destacado por la

señal de *Gata3*, al menos en E16.5. En cambio, *Tfap2B* marca selectivamente PAG y el estrato intermedio en E18.5, y *Lhx2* marca PAG y el estrato superficial.

Estos elementos de clasificación genoarquitectónica pueden servir para los estudios comparados.

5.5 Genoarquitectura comparada del tectum óptico de pollo.

Hemos completado nuestro propio análisis de marcadores en el tectum óptico de pollo y en el colículo superior del ratón con datos adicionales de ratón extraídos del Allen Developing Mouse Brain Atlas, así como de pollo existentes previamente en la colección del departamento, a efectos de tener más elementos de juicio comparativo, ya que alguno de los marcadores empleados en el pollo o el ratón, no fueron mapeados por nosotros en la otra especie.

En general, sólo parece posible alcanzar conclusiones tentativas sobre la posible homología (al menos de alguna población neuronal) del estrato periventricular del tectum de pollo con el PAG de ratón con los escasos datos disponibles. No pudimos estudiar la posible expresión selectiva de *Bhlhb4* en el estrato periventricular del pollo; *Foxp1* y *Foxp2* no aparecen expresados en el estrato periventricular del pollo. Por otra parte, tanto *Tcf4* (*Tcf7l2*) como *Tfap2B*, otros marcadores del PAG en mamífero, junto con *Meis2*, *Tac1* y *Enk* (*Penk1*), muestran señal en este estrato profundo en ambas especies.

El único marcador selectivo del estrato gris central de pollo que hemos estudiado – *Rora*– aparece desplazado en el ratón al estrato gris intermedio, incluso con algunas células positivas en el estrato superficial. Tal corrimiento de estrato central de pollo a estrato intermedio de ratón queda corroborado por la señal de *Enc1*, *Meis1* y *Meis2* (que marcan entre otros lugares el estrato central de pollo), que muestra el mismo patrón cambiante. Por otra parte, esto no indica que todo el estrato central de pollo se transforme en el ratón en el estrato intermedio, ya que hay células *Parv*-positivas en el estrato central de pollo que son comparables a una población que sigue siendo central en el ratón. Por lo tanto, tratamos aquí de poblaciones neuronales discretas que podrían haber cambiado de posición, sin alterarse otras. La idea de corrimiento de poblaciones surge asimismo al comparar *Foxp1* y *Foxp2*. En el caso de *Foxp1*, presente en los

estratos central e intermedio del ratón, sorprende ver su presencia restringida al estrato superficial del pollo (varias láminas), mientras que *Foxp2* aparece principalmente en el estrato central del ratón, así como en el estrato central, más el estrato superficial de pollo. La señal de *Enk* está presente principalmente en el estrato periventricular y en las partes profunda y superficial del estrato superficial del tectum de pollo, mientras que *Penk1* aparece en el PAG de ratón, así como en sus estratos intermedio (predominantemente) y superficial. Finalmente, *Npy* marca exclusivamente una población discreta de células muy superficiales en el pollo, que está presente, pero representada por muy pocas neuronas, en el estrato superficial del ratón.

Asumiendo que la situación en reptiles es análoga a la de aves, este análisis sugiere un gran desarrollo del PAG en el paso evolutivo de reptiles a mamíferos (con desarrollo variante y menor hacia el estrato periventricular de aves), una conservación parcial de las poblaciones primordiales del estrato gris central de saurópsidos en el estrato del mismo nombre en mamíferos, mientras que otras subpoblaciones previamente centrales pasan a una posición en el estrato intermedio de mamífero (es posible que éste esté construido sobre la base de la primitiva parte interna del estrato superficial de aves y reptiles, incrementado con nuevas subpoblaciones traslocadas del estrato central preexistente). Otras poblaciones profundas posiblemente se incorporan directamente a la parte superior del estrato superficial, dentro de una tendencia migratoria radial general que lleva en el mamífero a todas estas poblaciones neuronales superficiales a traspasar el nivel marginal embrionario en el que primitivamente ingresan las fibras del tracto óptico, formando un estrato superficial nuevo en posición subpial.

Es claro que estas nociones provisionales que parecen consistentes con nuestras observaciones y los datos disponibles en bases de datos públicas necesitan aun un análisis mucho más detallado que tenga en cuenta diversas otras variables relevantes, como son por ejemplo las conexiones de las distintas poblaciones tectales que comienzan a ser identificadas desde un punto de vista molecular. La abundancia de tipos neuronales distintos, así como de procesos migratorios radiales y tangenciales, en esta estructura dificulta enormemente la comprensión de su histogénesis conjunta. Es de esperar que en el futuro aparezcan marcadores génicos más selectivos, que permitan precisar todos estos conceptos.

5.6 Genoarquitectura del colículo inferior del ratón.

La estructura del CI se descompone habitualmente en dos regiones anatómicas más o menos subdivididas, tal como identifican en su atlas Franklin y Paxinos (2008): el núcleo central (CIC) y una cápsula celular periférica al mismo que se divide en el núcleo corticoide dorsal (DCIC) y el núcleo corticoide externo (ECIC; nótese que solamente éste presenta señales claras de laminación). El CIC se continúa rostralmente con el núcleo del brachium del colículo inferior (BIC), que puede ser entendido como una parte rostroventral del CIC, posiblemente rodeado superficialmente por una subregión análoga del ECIC. Además, desde un punto de vista histogénético existen al menos dos formaciones profundas que se relacionan con este complejo, tal como se desprende de nuestras propias observaciones. En primer lugar, hemos comprobado que el estrato gris central del colículo superior y del área intercolicular se continúa con un estrato similar intercalado profundamente entre el PAG y el CIC. Esta región no descrita previamente (en parte atribuida al ICo, al núcleo cuneiforme o al núcleo mesencefálico profundo de la formación reticular) se destaca genoarquitectónicamente del resto de formaciones del CI, y merece un nombre propio, que sugerimos sea *núcleo profundo del CI* (DpIC). Finalmente, el propio PAG presenta un territorio diferenciado dorsolateral (PAG-IC), que está radialmente relacionado con el DpIC, y a su través con el CIC y las regiones corticoides superficiales.

En general, tal como hemos comprobado, todas las regiones del CI se destacan genoarquitectónicamente de su entorno (CS, PI) por perder tempranamente totalmente o en gran medida su expresión inicial de *Otx2* y *Pax7*. Les acompaña en cierta medida el ICo, cuyo nivel de expresión de estos genes es intermedio en comparación con el que se aprecia en el CS.

Postnatalmente, el conjunto central formado por CIC y BIC (CIC/BIC) se marca selectivamente con *Tcf7l2* y *Foxp2*, acompañado en este patrón por DpIC y PAG-IC. Algunos otros marcadores identifican subpoblaciones dispersas dentro de CIC/BIC, como es el caso de *ParvB*, *Six3* y *Meis2*. Nuestras observaciones embriológicas sugieren que estas subpoblaciones molecularmente diferenciables pueden haberse originado en el preistmo, donde estos mismos marcadores identifican tempranamente células análogas. A partir de E16.5 se comienzan a detectar dentro del CIC, lo cual sugiere su migración tangencial de PI a CI. Por otra parte, las subregiones corticoides

superficiales (DCIC, ECIC) se marcan postnatalmente con *Calb2* (sólo ECIC), *Penk1*, *Meis2*, *Tac1* y *Npy*. Las células *Npy*-positivas muestran también una evolución temporal y topográfica que sugiere su migración tangencial desde el PI. El DpIC se marca selectivamente desde E16.5 en adelante con *Tfap2B*, *Lhx2* y *Gata3*.

En la literatura no existe previamente un tratamiento genoarquitectónico detallado del colículo inferior. Puelles y col. (2012) presentan en su Figura 10.7 datos sobre expresión de *Gad67* (células inhibitorias GABAérgicas) y *vGlut2* (células excitatorias glutamatérgicas). Destaca una densa población excitatoria en el PAG-IC (que sólo presenta escasas células inhibitorias en su parte más periférica), mientras que tales neuronas están presentes en número relativamente menor en el CI, siendo más abundantes en el ECIC que en DpIC, DCIC y CIC/BIC. En general son de tamaño pequeño o mediano. En cambio, DpIC, DCIC, CIC y ECIC presentan un número importante de grandes neuronas GABAérgicas, menos densas que las glutamatérgicas.

5.7 Genoarquitectura comparada del torus semicircularis del pollo.

El torus semicircular es el complejo homólogo en aves al CI de mamíferos. Nuestros datos corroboran totalmente el esquema estructural del torus propuesto quimioarquitectónicamente por Puelles y col. (1994). Esta formación consistiría básicamente en un **estrato periventricular** denso y un **estrato superficial** más laxo. Dentro del estrato periventricular se distingue una *lámina periventricular* subdividida en *partes axial* y *capsular*, cubierta por un *estrato central*, dividido a su vez también en *partes axial* (donde penetra radialmente el lemnisco lateral) y *capsular*. La región central capsular se prolonga en dirección a la placa del techo, formando un núcleo (subregión) *dorsomedial* diferenciable por la presencia más abundante de neuronas NPY-positivas (Puelles y col., 1994). Otras subregiones diferenciables de la región central capsular son el núcleo *paracentral* (en posición ventral) y el núcleo *hiliar* (en la zona de entrada del lemnisco lateral al núcleo central axial). Periféricamente a la región toral central en su zona limítrofe con el tectum óptico (homólogo del CS de mamíferos) se dispone el núcleo externo, que hemos mencionado más arriba como posible homólogo del área intercolicular. Finalmente, el estrato toral superficial que cubre al estrato periventricular presenta asimismo subregiones *axial* y *capsular*. Este estrato está alargado latero-medialmente, debido al descolgamiento morfogénico ventrolateral que

sufre la formación toral en su conjunto durante el desarrollo; comienza profundamente lateralmente, en la vecindad de los núcleos hiliar y paracentral, y alcanza la superficie pial en una reducida zona dorsomedial cercana al núcleo dorsomedial. Caudalmente se relaciona con las regiones preístmica e ístmica.

La lámina periventricular expresa *Encl1* y *Meis2* en su parte axial y *Tfap2B* y *Penk1* en su parte capsular. La formación central presenta expresión de *ParvB* y *RorA* en su parte axial, y *Meis2* y *Penk1* en su parte capsular. El núcleo dorsomedial muestra señal de *Meis2*, *Penk1*, *Npy* y *Six3*, mientras que *RorA* caracteriza asimismo a los núcleos paracentral e hiliar. Este último expresa también *ParvB* (como el núcleo central axial vecino) y *Tac1*. Finalmente, la parte axial del estrato superficial expresa *Penk1*, *RorA* y *Tac1* (mostrando cierta similitud con el núcleo hiliar con el cual contacta), mientras que la parte capsular que la envuelve expresa *Penk1*, *Npy* y *Six3*, asemejándose así al núcleo dorsomedial. Se aprecia que *Penk1* es un marcador disperso en la mayor parte del torus. *RorA* es un marcador que frecuentemente aparece asociado a zonas neurales de intensa función sensorial, por lo cual su comparación es menos relevante.

El análisis comparativo de los datos obtenidos para el CI del ratón y el torus semicircular del pollo da pistas sobre posibles homologías ya sea entre sus subdivisiones estructurales respectivas, o entre poblaciones neuronales discretas, molecularmente caracterizadas en su interior. La presencia selectiva de neuronas *Six3* y *Npy* positivas, así como una posición topológica análoga junto a la placa del techo sugiere que el DCIC de ratón puede ser homólogo del núcleo dorsomedial de pollo. Ambos comparten asimismo expresión de *Meis2*. El ECIC en general ocupa una posición comparable a la formación superficial del pollo. Ambas presentan células *Penk1*, *Npy* y *Tac1* positivas, si bien claramente el ECIC está mucho más poblado y adquiere una estructura corticoide que no se aprecia en el estrato superficial del pollo. El CIC/BIC de ratón, que también es la diana principal del lemnisco lateral, claramente se corresponde con el complejo central toral de pollo, compartiendo expresión de *ParvB* y *Meis2*. El BIC se corresponde topológicamente con el cuerno rostroventral del torus, mientras que la subregión capsular dorsomedial se corresponde al parecer con el DCIC, tal como acabamos de mencionar. Sabemos, por supuesto, que esta formación central del torus/CI en ambas especies es el origen principal de la proyección de la vía acústica al tálamo (geniculado medial ventral; Puelles, 2001, Puelles y col., 2007). Por su parte, el DpIC de ratón se caracteriza por la expresión selectiva de *Tfap2B*, que también

vemos expresado en la formación periventricular capsular del pollo, su posible homólogo. Queda sin cubrir la posible homología del PAG-IC. Esta formación en general parece un desarrollo propio de los mamíferos a partir de elementos periventriculares poco desarrollados en los saurópsidos (reptiles y aves) (Puelles, 2001; Puelles y col., 2007). Puede que la parte axial de la lámina periventricular de pollo represente tal estructura primordial con respecto al PAG de mamífero.

Nuestro análisis genoarquitectónico ilumina así la anatomía comparada de la especialización acústica del mesencéfalo alar, mostrando una vez más una considerable conservación de los patrones moleculares que caracterizan diferentes subpoblaciones neuronales en ciertas subdivisiones anatómicas que no muestran un parecido morfológico o topográfico al análisis superficial, pero que descubren su identidad profunda de raíces embriológicas tanto en su contexto posicional topológico como en su perfil molecular y quimioarquitectónico en general.

6. CONCLUSIONES.

01- Los datos derivados de nuestro estudio genoarquitectónico permiten reconocer con gran precisión los límites anterior y posterior del mesencéfalo mediante marcadores adicionales a los previamente conocidos. Estos límites pueden ser reconocidos tanto durante estadios de desarrollo ulteriores a E12.5, como en la etapa posnatal.

02- Los datos genoarquitectónicos obtenidos han permitido concebir una caracterización mucho más precisa de las regiones alares de los *mesómeros 1 y 2*. Nuestros marcadores permiten identificar los principales límites de las regiones del **griseum tectalis, colículo superior, colículo inferior y preistmo** a partir de E12.5, y en todos los estadios analizados. Hasta E10.5 no hay evidencia molecular de diferencias anteroposteriores en la placa alar mesencefálica.

03- Nuestro estudio genoarquitectónico sugiere una ligera modificación del modelo de regionalización alar mesencefálica propuesto hasta la fecha, debida a la inclusión de una quinta región alar, el **área intercolicular**, que se intercala entre los dos colículos, dentro de m1.

04- Nuestro estudio genoarquitectónico también sugiere modificar el actual modelo de divisiones dorsoventrales de la placa alar mesencefálica, subdividiendo el subdominio dorsal previo en dos partes, interna y externa. Definimos así en orden dorsoventral desde la placa del techo los subdominios dorsoventrales **dorsal interno, dorsal externo, dorsolateral y ventrolateral**.

05- Los datos moleculares obtenidos permiten reconocer diferencias anteroposteriores y dorsoventrales del PAG del ratón que no habían sido reconocidas con tanto detalle hasta la fecha.

06-A partir de los datos moleculares obtenidos (*Foxp1* y *Foxp2* como ejemplo) es posible identificar distintos estratos en el griseum tectalis del ratón y el pollo, y a su vez diferenciarlos de los estratos del colículo superior o del tectum óptico adyacente.

07- Hemos observado una distribución preferencial de ciertos marcadores génicos en las distintas capas que componen los estratos del colículo superior del ratón. Datos comparables obtenidos en el tectum óptico de pollo en relación a la expresión de estos marcadores sugieren una gran complejidad de las poblaciones neuronales comparables implicadas en ambas estructuras homólogas, con aparente traslocación de ciertos tipos neuronales de unos estratos a otros, y aun de un estrato completo, el superficial, sobre el nivel de entrada de las fibras del tracto óptico, en el caso de los mamíferos.

08- Ciertos datos permiten caracterizar genoarquitectónicamente el colículo inferior del ratón y el torus semicircular del pollo durante el desarrollo y estadios postnatales. A pesar de las aparentes diferencias anatómicas entre estas estructuras, nuestro análisis permite concluir un esquema topológico esencialmente conservado en relación a la ubicación relativa de determinadas poblaciones neuronales que expresan códigos moleculares característicos. Por otra parte, nuestros datos corroboran plenamente el esquema morfológico propuesto para el torus del pollo sobre bases quimioarquitectónicas por Puelles y col. (1994).

09-Nuestros datos genoarquitectónicos permiten asimismo caracterizar unívocamente la región preístmica del ratón desde estados temprano del desarrollo, obteniéndose códigos moleculares específicos para sus derivados del dominio dorsolateral enteramente comparables con la región del mismo nombre descrita en el pollo.

10-El método genoarquitectónico demuestra ser muy potente para el análisis comparado de la estructura neuronal cerebral.

7. BIBLIOGRAFIA.

- Aparicio MA1, Saldaña E. The dorsal tectal longitudinal column (TLCd): a second longitudinal column in the paramedian region of the midbrain tectum. *Brain Struct Funct.* 2014 Mar;219(2):607-30.
- Aparicio MA, Viñuela A, Saldaña E. Projections from the inferior colliculus to the tectal longitudinal column in the rat. *Neuroscience.* 2010 Mar 17;166(2):653-64.
- Basson MA, Echevarria D, Ahn CP, Sudarov A, Joyner AL, Mason IJ, Martinez S, Martin GR. 2008. Specific regions within the embryonic midbrain and cerebellum require different levels of FGF signaling during development. *Development* 135(5):889-98.
- Caballero-Bleda, M.; Fernández, B.; Puelles, L. The pretectal complex of the rabbit: Distribution of acetylcholinesterase and reduced nicotinamide adenine dinucleotide diaphorase activities. *Acta Anat.* 144: 7–16; 1992.
- Cecconi F, Proetzel G, Alvarez-Bolado G, Jay D, Gruss P. 1997. Expression of *Meis2*, a *Knotted*-related murine homeobox gene, indicates a role in the differentiation of the forebrain and the somitic mesoderm. *Dev Dyn* 210:184–190.
- Chalupa LM. Visual physiology of mammalian superior colliculus. In: Vanegas H. (Ed) *Comparative Neurology of the Optic Tectum*, New York, London: Plenum Press, 1984: 775-818.
- Crossley PH, Martinez S, Martin GR. 1996. Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380(6569):66-8.
- Díaz, C.; Yanes, C.; Trujillo, C. M.; Puelles, L. Cytoarchitectonic subdivisions in the subtectal midbrain of the lizard *Gallotia galloti*. *J. Neurocytol.* 29:569–593; 2000.
- Dräger UC, Hubel DH. Responses to visual stimulation and relationship between visual, auditory, and somatosensory inputs in mouse superior colliculus. *J Neurophysiol.* 1975a;38:690-713.
- Drager UC, Hubel DH. Physiology of visual cells in mouse superior colliculus and correlation with somatosensory and auditory input. *Nature.* 1975b;253:203-204.
- Ebert PJ, Timmer JR, Nakada Y, Helms AW, Parab PB, Liu Y, Hunsaker TL, Johnson JE. 2003. *Zic1* represses *Math1* expression via interactions with the *Math1* enhancer and modulation of *Math1* autoregulation. *Development* 130:1949–1959.
- Fernández-Garre, P., Rodríguez-Gallardo, L., Gallego-Díaz, V., Alvarez, I.S., Puelles, L., 2002. Fate map of the chicken neural plate at stage 4. *Development* 129, 2807–2822.
- Ferran JL, Sánchez-Arrones L, Sandoval JE, Puelles L. 2007. A model of early molecular regionalization in the chicken embryonic pretectum. *J Comp Neurol* 505(4):379-403.
- Ferran JL, Sánchez-Arrones L, Bardet SM, Sandoval JE, Martínez-de-la-Torre M, Puelles L. 2008. Early pretectal gene expression pattern shows a conserved anteroposterior tripartition in mouse and chicken. *Brain Res Bull* 75(2-4):295-8.
- Ferran JL, de Oliveira ED, Merchan P, Sandoval JE, Sanchez-Arrones L, Martínez-de-la-Torre M, Puelles L. 2009. Genoarchitectonic profile of developing nuclear groups in the chicken pretectum. *J Comp Neurol* 517(4):405-51.

- Ferran JL, Ayad A, Merchan P, Morales-Delgado N, Sánchez-Arrones L, Alonso A, Sandoval JE, Bardet S, Corral-San-Miguel R, Sánchez-Guardado L.O, Hidalgo-Sánchez M, Martínez-de-la-Torre M, Puelles L. Exploring brain genoarchitecture by single and double chromogenic in situ hybridization ISH and immunohistochemistry IHC on cryostat, paraffin, or floating sections. Colección "In situ hybridization Methods" Hauptmann G. ed., within the series Neuromethods Wolz W. editor-in-chief, Springer Protocols. -, (Alemania): Springer, 2014.
- Ferran JL, Ayad A, Merchan P, Morales-Delgado N, Sánchez-Arrones L, Alonso A, Sandoval JE, Bardet S, Corral-San-Miguel R, Sánchez-Guardado L.O, Hidalgo-Sánchez M, Martínez-de-la-Torre M, Puelles L. Exploring brain genoarchitecture by single and double chromogenic in situ hybridization ISH and immunohistochemistry IHC in whole-mount embryos. Colección "In situ hybridization Methods" Hauptmann G. ed., within the series Neuromethods Wolz W., editor-in-chief, Springer Protocols. -, (Alemania): Springer, 2014
- Franklin KBJ and Paxinos G. the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 3rd edition, San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.
- García-Calero E, Martínez-de-la-Torre M, Puelles L. 2002. The avian griseum tectale: cytoarchitecture, NOS expression and neurogenesis. *Brain Res Bull* 57:353–357.
- García-López R, Vieira C, Echevarría D, Martínez S. 2004. Fate map of the diencephalon and the zona limitans at the 10-somites stage in chick embryos. *Dev Biol* 268:514–530.
- Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* Vol. 88, No. 1, January 1951.
- Hidalgo-Sánchez M, Martínez-de-la-Torre M, Alvarado-Mallart RM, Puelles L. 2005. Distinct pre-isthmus domain, defined by overlap of Otx2 and Pax2 expression domains in the chicken caudal midbrain. *J Comp Neurol* 483:17–29.
- His, W., 1895. Die Anatomische Nomenclatur. *Nomina Anatomica. Arch. Anat. Entwickl. Ges.* [Anatomische Abteilung des Arch. An. 13 f. Anat. u. Physiol.] 1895 (supplement), 1–180 [Taf. I, II].
- His, W., 1904. Die Entwicklung des menschlichen Gehirns während der ersten Monate. Hirzel, Leipzig.
- Huerta MF, Harting JK. The mammalian superior colliculus : Study of its morphology and connections. In: Vanegas H. (Ed) *Comparative Neurology of the Optic Tectum*, New York, London: Plenum Press, 1984: 687-773.
- Inoue, T., Nakamura, S., Osumi, N., 2000. Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate. *Developmental Biology* 219,373–383
- Kala K, Haugas M, Lilleväli K, Guimera J, Wurst W, Salminen M, Partanen J. Gata2 is a tissue-specific post-mitotic selector gene for midbrain GABAergic neurons. *Development*. 2009;136:253-262.
- Kuhlenbeck, H., 1973. Overall morphological pattern. In: *The central nervous system of vertebrates* Vol. 3, part II. Karger, Basel.
- Lauter G, Soll I, Hauptmann G. 2013. Molecular characterization of prosomeric and intraprosomeric subdivisions of the embryonic zebrafish diencephalon. *J Comp Neurol* 521(5):1093-1118.
- Liu, A., Li, J. Y., Bromleigh, C., Lao, Z., Niswander, L. A. and Joyner, A. L. (2003). FGF17b and FGF18 have different midbrain regulatory properties from FGF8b or activated FGF receptors. *Development* 130, 6175-6185.

- Martínez-de-la-Torre, M. Estructura del mesencéfalo y diencefalo en aves y reptiles: Aportaciones a una síntesis en la búsqueda de homologías. Doctoral thesis, University of Murcia, Spain; 1985.
- Martinez S, Wassef M, Alvarado-Mallart RM. 1991. Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene en. *Neuron* 6(6):971-81.
- Matsunaga E, Araki I, Nakamura H. 2000. Pax6 defines the dimesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development* 127:2357–2365.
- G.S. Mastick, N.M. Davis, G.L. Andrew, S.S. Easter Jr., Pax6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain, *Development* 124 (1997) 1985–1997.
- Merchan P, Bardet SM, Puelles L, and Ferran JL (2011) Comparison of pretectal genoarchitectonic pattern between quail and chicken embryos. *Front Neuroanatomy* 5, doi: 10.3389/fnana.2011.00023.
- Morales-Delgado N (2012) Diferenciación de neuronas peptidérgicas en relación a la organización genoarquitectónica del hipotálamo en el ratón. University of Castilla-La Mancha, Doctoral Dissertation.
- Morona R, Ferran JL, Puelles L, Gonzalez A. 2011. Embryonic genoarchitecture of the pretectum in *Xenopus laevis*: a conserved pattern in tetrapods. *J Comp Neurol* 519(6):1024-50.
- Nakatani T, Minaki Y, Kumai M, Ono Y. Helt determines GABAergic over glutamatergic neuronal fate by repressing Ngn genes in the developing mesencephalon. *Development*. 2007; 134:2783-2793.
- Oulad-Abdelghani M, Chazaud C, Bouillet P, Sapin V, Chambon P, Dolle P. 1997. Meis2, a novel mouse Pbx-related homeobox gene induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Dev Dyn* 210:173–183.
- Palmgren A. 1921. Embryological and morphological studies on the midbrain and cerebellum of vertebrates. *Acta Zool (Stockholm)* 2:1–94.
- Perez-Balaguer A, Puelles E, Wurst W, Martinez S. 2009. Shh dependent and independent maintenance of basal midbrain. *Mech Dev* 126(5-6):301-13.
- Puelles L (2001) Brain segmentation and forebrain development in amniotes. *Brain Res Bull* 55:695–710.
- Puelles L (2013) Plan of the developing vertebrate nervous system: relating embryology to the adult nervous system (Prosomere model, overview of brain organization). Chapter in: Rakic P and Rubenstein JLR (eds) *Comprehensive developmental neuroscience*, Elsevier, London (in press).
- Puelles L, Rubenstein JLR (1993) Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16, 472-470.
- Puelles L, Robles C, Martínez-de-la-Torre M, Martínez S. New subdivision schema for the avian torus semicircularis: neurochemical maps in the chick. *J Comp Neurol*. 1994 Feb 1;340(1):98-125.
- Puelles, L.; Guille'n, M.; Martínez-de-la Torre, M. Observations on the fate of nucleus superficialis magnocellularis of Rendahl in the avian diencephalon, bearing on the organization and nomenclature of neighboring retinorecipient nuclei. *Anat. Embryol*. 183:221–233; 1991.
- Puelles L, Rubenstein JLR (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26(9):469–476.

- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S et al (2000) Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424(3):409–438.
- Puelles L, Martínez S, Martínez-de-la-Torre M, Rubenstein JLR (2004) Gene maps and related histogenetic domains in the forebrain and midbrain. In: Paxinos G (ed) *The Rat Nervous System*, 3rd edn. Elsevier, San Diego, pp 3–25.
- Puelles L, Martínez-de-la-Torre M, Paxinos G, Watson C, Martínez S. 2007. *The chick brain in stereotaxic coordinates. An atlas featuring neuromeric subdivisions and mammalian homologies*. San Diego: Academic Press, Elsevier.
- Puelles, L., Martínez, S, Martínez-de-la-Torre, M. (2008). Morfogénesis temprana del SNC: inducción neural y neurulación. Cresta neural. Vesiculación y segmentación. Incurvación del eje neural. In: *Neuroanatomía*. Buenos Aires, Madrid, Médica Panamericana. 43-52.
- Puelles, L., Martínez-de-la-Torre, M., Bardet, S., Rubenstein, J.L.R., 2011a. Hypothalamus. In: Watson, C., Paxinos, G., Puelles, L. (Eds.), *The Mouse Nervous System*. Elsevier, New York.
- Puelles L, Ferran JL (2012) Concept of neural genoarchitecture and its genomic fundament. *Front Neuroanat* 6:47. doi:[10.3389/fnana.2012.0004](https://doi.org/10.3389/fnana.2012.0004)
- Puelles, E., Martínez-de-la-Torre, M., Watson, C., Puelles, L., 2011. Midbrain. In: Watson, C., Paxinos, G., Puelles, L. (Eds.), *The Mouse Nervous System*. Elsevier, New York.
- Rendahl H. 1924. Embryologische und morphologische Studien über das Zwischenhirn beim Huhn. *Acta Zool* 5:241–344.
- Saldaña E, Viñuela A, Marshall AF, Fitzpatrick DC, Aparicio MA. The TLC: a novel auditory nucleus of the mammalian brain. *J Neurosci*. 2007 Nov 28;27(48):13108-16.
- Sanchez-Arrones, L., Ferran, J.L., Rodríguez-Gallardo, L., Puelles, L., 2009. Incipient forebrain boundaries traced by differential gene expression and fate mapping in the chick neural plate. *Developmental Biology* 335, 43–65.
- Sánchez-Guardado, L. Ó., Irimia, M., Sánchez-Arrones, L., Burguera, D., Rodríguez-Gallardo, L., García-Fernández, J., Puelles, L., Ferran, J. L., and Hidalgo-Sánchez, M. 2011. Distinct and redundant expression and transcriptional diversity of *Meis* gene paralogs during chicken development. *Dev. Dyn.* 240:1475-1492.
- Sato, T., Araki, I. and Nakamura, H. (2001). Inductive signal and tissue responsiveness defining the tectum and the cerebellum. *Development* 128, 2461-2469.
- Scicolone G, Ortalli AL, Carri NG. 2009. Key roles of Ephs and ephrins in retinotectal topographic map formation. *Brain Res Bull* 79(5):227-47.
- Shim S, Kim Y, Shin J, Kim J, Park S. 2007. Regulation of *EphA8* gene expression by TALE homeobox transcription factors during development of the mesencephalon. *Mol Cell Biol* 27: 1614–1630.
- Shimamura K, Hirano S, McMahon AP, Takeichi M. Wnt-1-dependent regulation of local E-cadherin and alpha N-catenin expression in the embryonic mouse brain. *Development*. 1994 Aug;120(8):2225-34.
- Sieber MA, Storm R, Martínez-de-la-Torre M, Müller T, Wende H, Reuter K, Vasyutina E, Birchmeier C. 2007. *Lbx1* acts as a selector gene in the fate

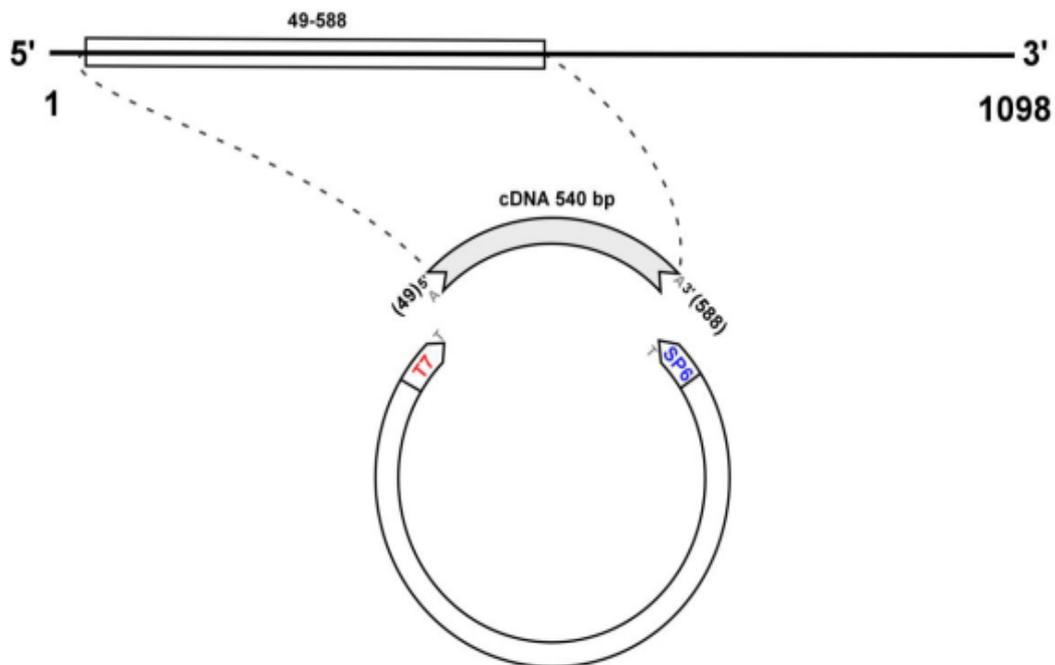
determination of somatosensory and viscerosensory relay neurons in the hindbrain. *J Neurosci* 27:4902–4909.

- Staudt, N., Houart, C., 2007. The prethalamus is established during gastrulation and influences diencephalic regionalization. *PLoS Biol.* e69, 5.
- Stein BE. Multimodal representation in the superior colliculus and optic tectum. In: Vanegas H. (Ed) *Comparative Neurology of the Optic Tectum*, New York, London: Plenum Press, 1984: 819-841
- Vaage S. 1969. The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). A morphological, histochemical and autoradiographical investigation. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* 41:3–87.
- Vaage S (1973) The histogenesis of the isthmic nuclei in chick embryos (*Gallus domesticus*). I. A morphological study. *Z Anat Entwicklungsgesch* 142:283–314
- Viñuela A, Aparicio MA, Berrebi AS, Saldaña E. Connections of the Superior Paraolivary Nucleus of the Rat: II. Reciprocal Connections with the Tectal Longitudinal Column. *Front Neuroanat.* 2011 Feb 22;5:1
- von Kupffer, C., 1906. Die Morphogenie des Zentralnervensystems. Part 3In: Hertwig, O. (Ed.), *Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltieren* Vol. 2. Fischer, Jena, pp. 1–272.
- Wilson L, Maden M. 2005. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282:1–13.
- Zhuang B, Sockanathan S. 2006. Dorsal-ventral patterning: a view from the top. *Curr Opin Neurobiol* 16:20–24.

8. ANEXOS. Genes Clonados

Insert Features:

- Name: **c-Calb2**.
- Insert length: 540 **bp** (49-592).
- NCBI Accession number: [NM_205316.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_205316.1)
- Obtained by: RT-PCR amplification with specific primers.
- Insert orientation inside of the plasmid: In relation to T7 and SP6 (p-GEM-T):



Procedures to Obtain Sense and Antisense Riboprobes:

-Enzyme to **linearize** for **antisense**: **NcoI, SphI, SacII**
 -RNA **polymerase** to transcribe **antisense**: **SP6**

- Enzyme to linearize for sense: Spel, SacI
- RNA polymerase to transcribe sense: T7

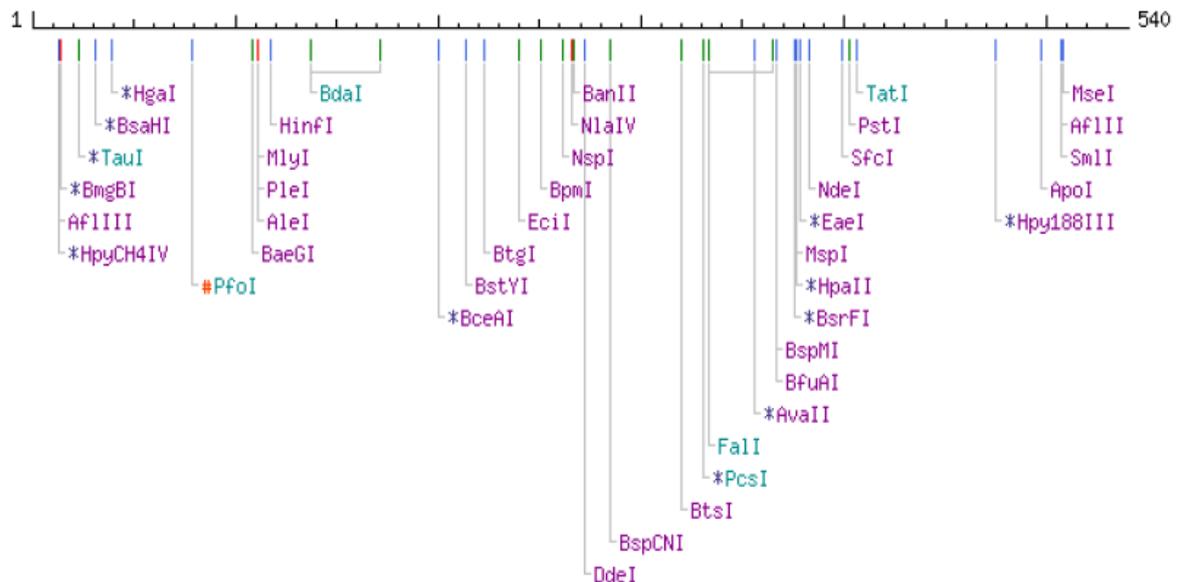
Other Features:

-Sequence of the insert: (Sequence of the PCR primers in red bold): Sequenced by Molecular Biology laboratory SAI (University of Murcia). **Clon 1**

(49)**TCGCAGTTCCTCGACGTG**TGGCGGCACTTCGACGCCGACGGGAATG
 GCTACATCGAAGGCAAAGAGCTGGAAAACCTTCTCCAGGAGCTGGAAAG
 TGCCAGGAAGGGCACTGGGGTGGACTCCAAGAGGGACAGCCTGGGCGA
 CAAGATGAAGGAGTTCATGCACAAGTATGACAAAAATGCAGACGGCAA
 ATTGAGATGGCAGAGCTGGCCCAGATCCTGCCACGGAGGAGAACTTCT
 TGCTCTGTTTCCGCCAGCATGTGGGCTCCAGCTCAGAGTTCATGGAGGC
 ATGGAGGAGGTACGACACGGATCGCAGTGGCTACATCGAAGCCAACGA
 GCTGAAGGGCTTCTTATCGGACCTGCTGAAGAAGGCGAACCGGCCATAT
 GATGAGGCCAAGCTGCAGGAGTACACGCAGACCATCCTGCGGATGTTTG
 ACATGAACGGGGACGGGAAACTGGGCTCTCCGAGATGTCCCGACTGCT
 GCCTGTGCAAGAAAATTTCTTCTTAAGTTTCAGG**GGATGAAGCTGTCTCT**
CGGAG(588).

-Restriction map of the insert.

GC=56%, AT=44%



----- CLONING VECTOR -----

NEUROBIOLOGY GROUP

Luis Puelles M. D. puelles@um.es

Dept. of Human Anatomy. School of Medicine.

University of Murcia. E-30071, Murcia, Spain;

Phone 34-968-364342 - Fax 34-968-363955

Molecular Biology advisor: José Luis Eduardo Ferran. jferran@um.es

Code: **M-0313**

Name of the cloning vector: **c-Calb2 (cDNA)**

Gene: **Gallus gallus calbindin 2, 29kDa (calretinin) (CALB2), mRNA.**

Species: **Gallus gallus.**

Purpose: **In Situ Probe**

Constructed by: **Abdelmalik Ayad** (ayad@um.es); **José Luis Eduardo Ferran (Chelo)** (jferran@um.es).

Construction date: **July, 2011.**

Plasmid Features:

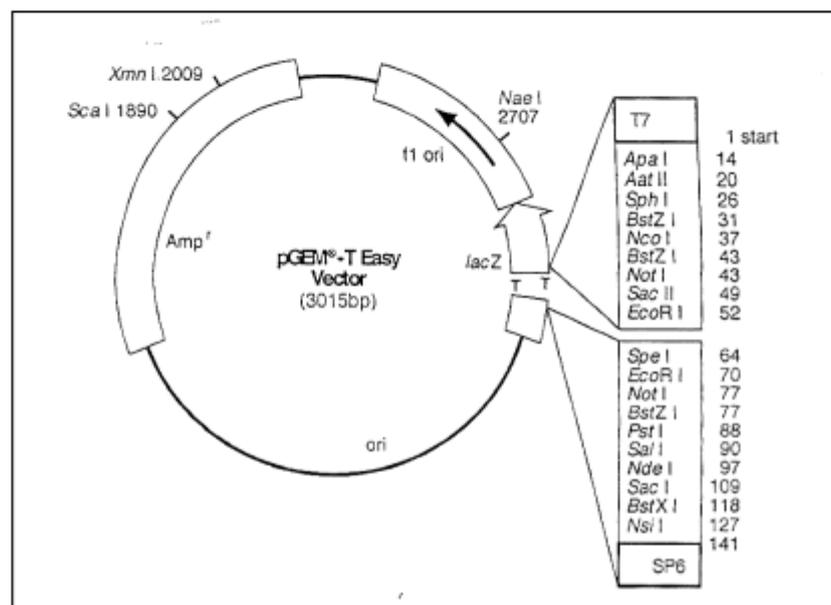
-Plasmid name: **p-GEM®-T Easy Vector Systems**

-Plasmid length: **3015bp**

-Resistance: **Ampiciline**

-Inserts can be sequenced using the following primers: **SP6 promoter primer and T7 promoter primer.**

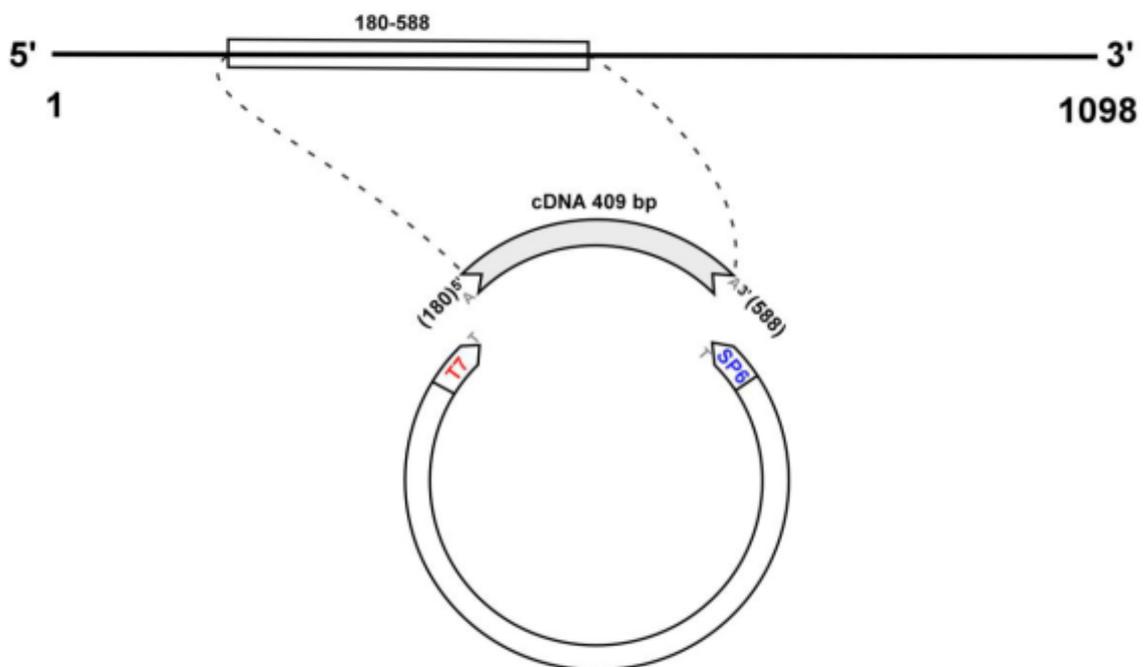
-A single digestion with BstZ1 (XmaIII, Eco521, EagI), EcoR1 or Not1 will release inserts cloned into the vector.



p-GEM®-T Easy Vector Systems Map and Sequence Reference Points

Insert Features:

- Name: **c-Calb2**.
- Insert length: 409 **bp** (180-588).
- NCBI Accession number: [NM_205316.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_205316.1)
- Obtained by: RT-PCR amplification with specific primers.
- Insert orientation inside of the plasmid: In relation to T7 and SP6 (p-GEM-T):



Procedures to Obtain Sense and Antisense Riboprobes:

- Enzyme to **linearize** for **antisense**: **NcoI, SphI, SacII**
- RNA **polymerase** to transcribe **antisense**: **SP6**

- Enzyme to linearize for sense: **SpeI, SacI**
- RNA polymerase to transcribe sense: **T7**

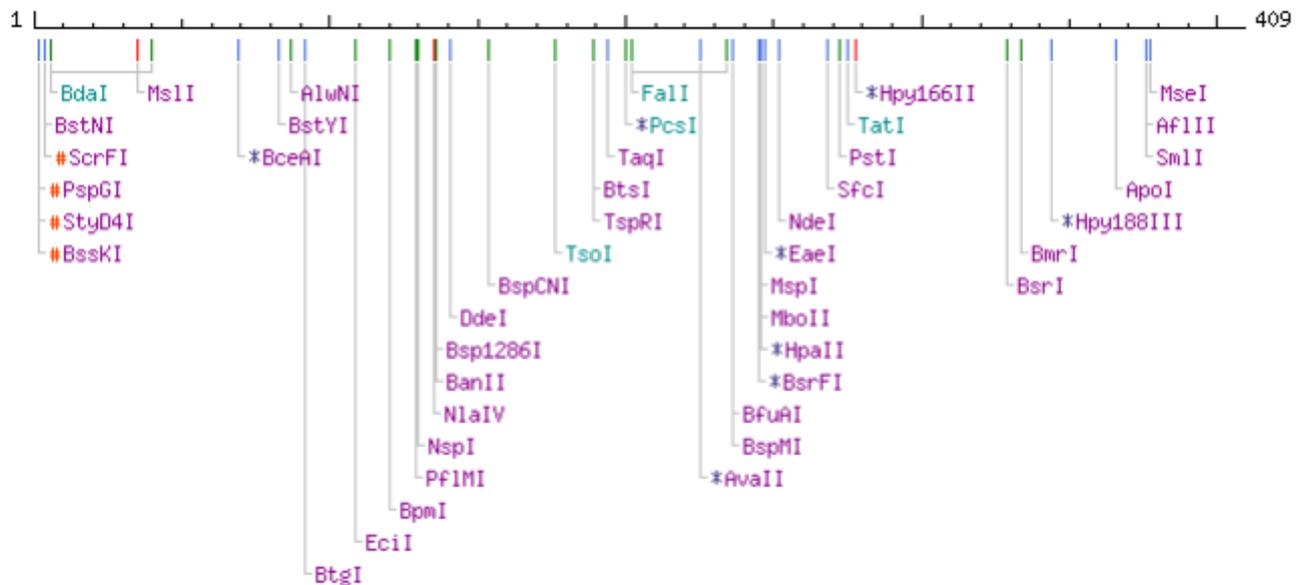
Other Features:

-Sequence of the insert: (Sequence of the PCR primers in red bold): Sequenced by Molecular Biology laboratory SAI (University of Murcia). **Clon 1**

(180)**CAGCCTGGGCGACAAGATGAAGGAGTTCATGCACAAGTATGACAA**
AAATGCAGACGGCAAATTGAGATGGCAGAGCTGGCCCAGATCCTGCCC
ACGGAGGAGAACTTCTTGCTCTGTTTCCGCCAGCATGTGGGCTCCAGCT
CAGAGTTCATGGAGGCATGGAGGAGGTACGACACGGATCGCAGTGGCT
ACATCGAAGCCAACGAGCTGAAGGGCTTCTTATCGGACCTGCTGAAGAA
GGCGAACC GGCCATATGATGAGGCCAAGCTGCAGGAGTACACGCAGAC
CATCCTGCGGATGTTTGACATGAACGGGGACGGGAAACTGGGCCTCTCC
GAGATGTCCCGACTGCTGCCTGTGCAAGAAAATTCCTTCTTAAGTTTCA
GGGATGAAGCTGTCCTCGGAG(588).

-Restriction map of the insert.

GC=55%, AT=45%



----- CLONING VECTOR -----

NEUROBIOLOGY GROUP

Luis Puelles M. D. puelles@um.es

Dept. of Human Anatomy. School of Medicine.

University of Murcia. E-30071, Murcia, Spain;

Phone 34-968-364342 - Fax 34-968-363955

Molecular Biology advisor: José Luis Eduardo Ferran. jlferran@um.es

Code: **M-0314**

Name of the cloning vector: **c-Calb2 (cDNA)**

Gene: **Gallus gallus calbindin 2, 29kDa (calretinin) (CALB2), mRNA.**

Species: **Gallus gallus.**

Purpose: **In Situ Probe**

Constructed by: **Abdelmalik Ayad (ayad@um.es); José Luis Eduardo Ferran (Chelo) (jlferran@um.es).**

Construction date: **July, 2011.**

Plasmid Features:

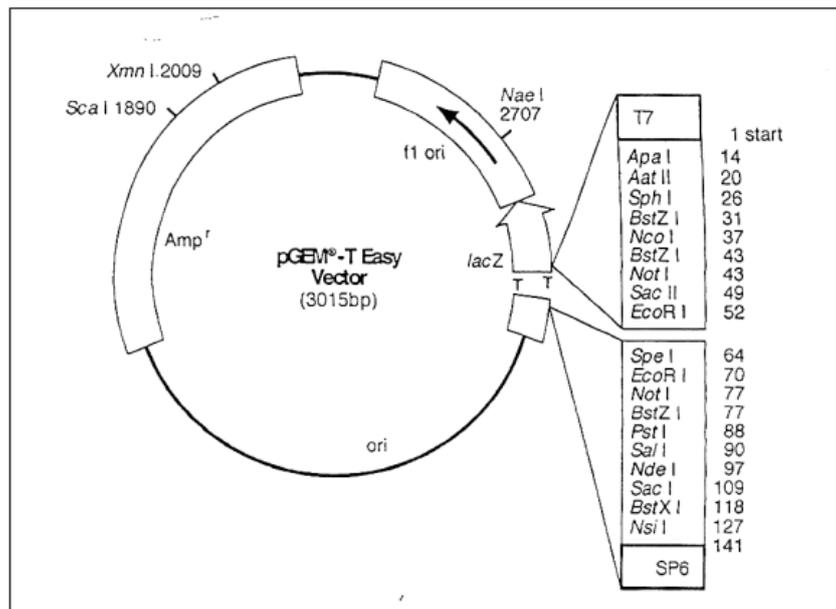
-Plasmid name: **p-GEM®-T Easy Vector Systems**

-Plasmid length: **3015bp**

-Resistance: **Ampiciline**

-Inserts can be sequenced using the following primers: **SP6 promoter primer and T7 promoter primer.**

-A single digestion with BstZ1 (XmaIII, Eco521, EagI), EcoR1 or Not1 will release inserts cloned into the vector.



p-GEM®-T Easy Vector Systems Map and Sequence Reference Points

Insert Features:

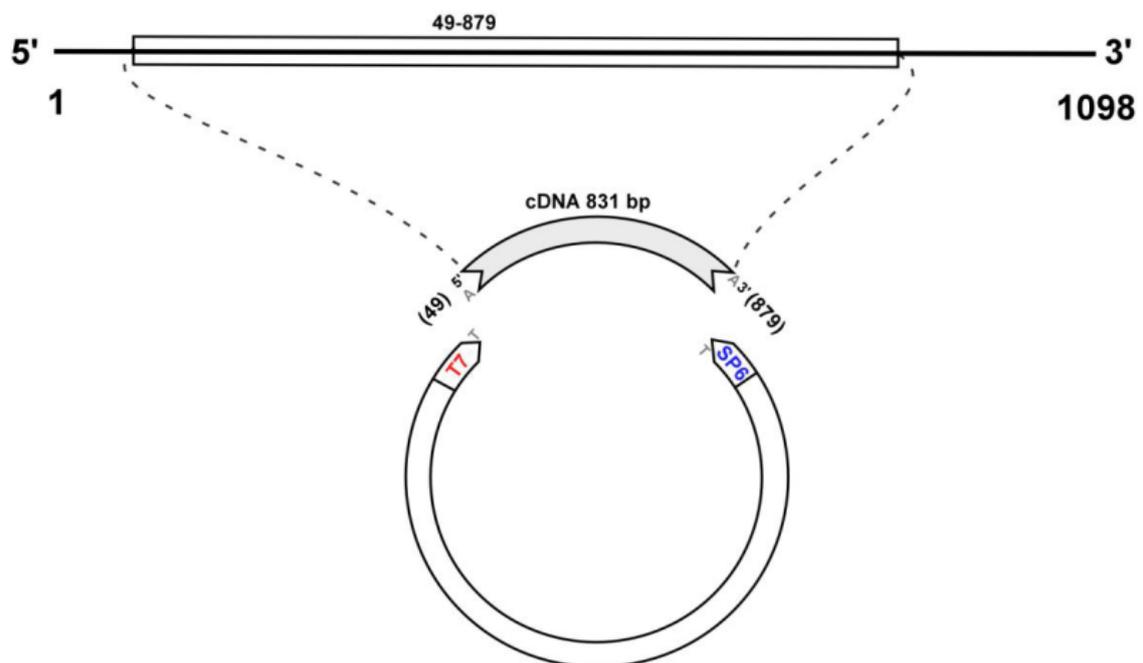
-Name: **c-Calb2**.

-Insert length: 831 **bp** (49-879).

-NCBI Accession number: [NM_205316.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_205316.1)

-Obtained by: RT-PCR amplification with specific primers.

- Insert orientation inside of the plasmid: In relation to T7 and SP6 (p-GEM-T):

**Procedures to Obtain Sense and Antisense Riboprobes:**

-Enzyme to **linearize** for **antisense**: **SphI, SacII**

-RNA **polymerase** to transcribe **antisense**: **SP6**

-Enzyme to linearize for sense: SphI, SacI

-RNA polymerase to transcribe sense: T7

----- CLONING VECTOR -----

NEUROBIOLOGY GROUP

Luis Puelles M. D. puelles@um.es

Dept. of Human Anatomy. School of Medicine.

University of Murcia. E-30071, Murcia, Spain;

Phone 34-968-364342 - Fax 34-968-363955

Molecular Biology advisor: José Luis Eduardo Ferran. jlferran@um.es

Code: **M-0368**

Name of the cloning vector: **m-Esrrb (cDNA)**

Gene: **Mus musculus estrogen-related receptor beta (ESRRB), mRNA**

Species: **Mus musculus.**

Purpose: **In Situ Probe**

Constructed by: **Abdelmalik Ayad** ayad@um.es, **José Luis Eduardo Ferran (Chelo)** (jlferran@um.es).

Construction date: **January, 2012.**

Plasmid Features:

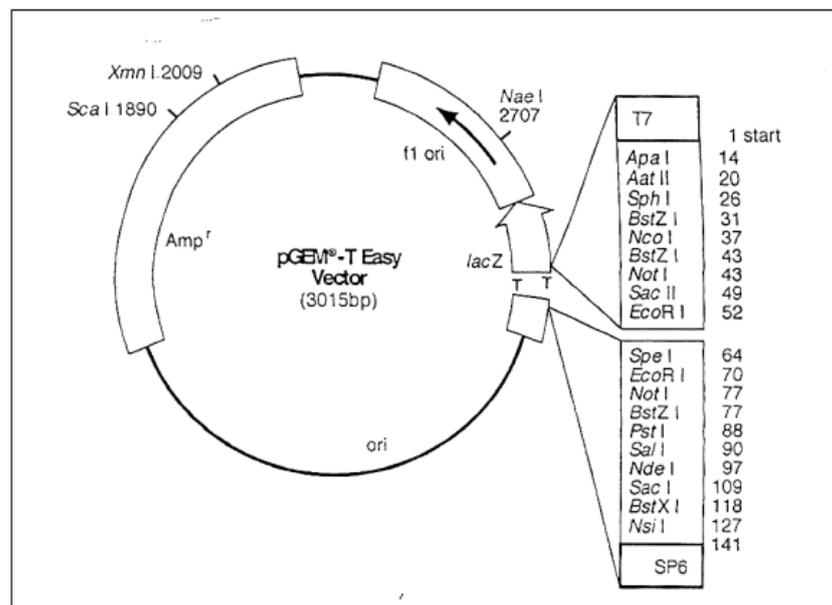
-Plasmid name: **p-GEM®-T Easy Vector Systems**

-Plasmid length: **3015bp**

-Resistance: **Ampiciline**

-Inserts can be sequenced using the following primers: **SP6 promoter primer and T7 promoter primer.**

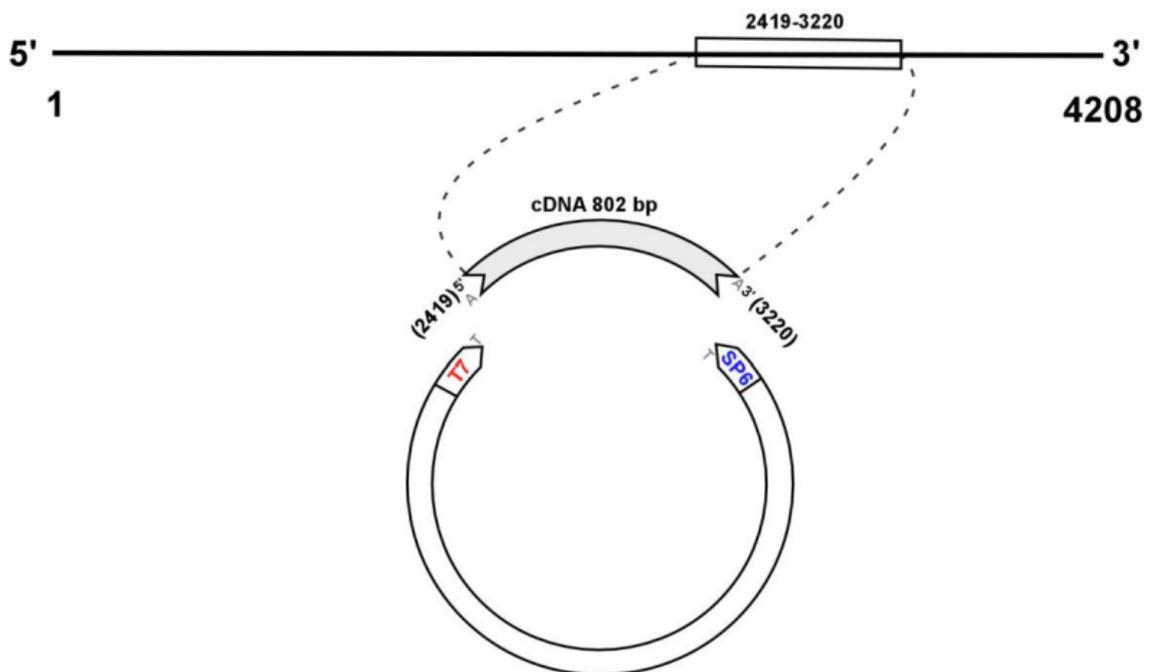
-A single digestion with BstZ1 (XmaIII, Eco521, EagI), EcoR1 or Not1 will release inserts cloned into the vector.



p-GEM®-T Easy Vector Systems Map and Sequence Reference Points

Insert Features:

- Name: **m-Esrrb**
- Insert length: 802 **bp** (2419-3220)
- NCBI Accession number: [NM_011934.4](#)
- Obtained by: RT-PCR amplification with specific primers.
- Insert orientation inside of the plasmid: In relation to T7 and SP6 (p-GEM-T):



Procedures to Obtain Sense and Antisense Riboprobes:

- Enzyme to **linealize** for antisense: **NcoI, SphI, SacII**
- RNA **polymerase** to transcribe antisense: **SP6**

- Enzyme to linealize for sense: **NdeI, SpeI**
- RNA polymerase to transcribe sense: **T7**

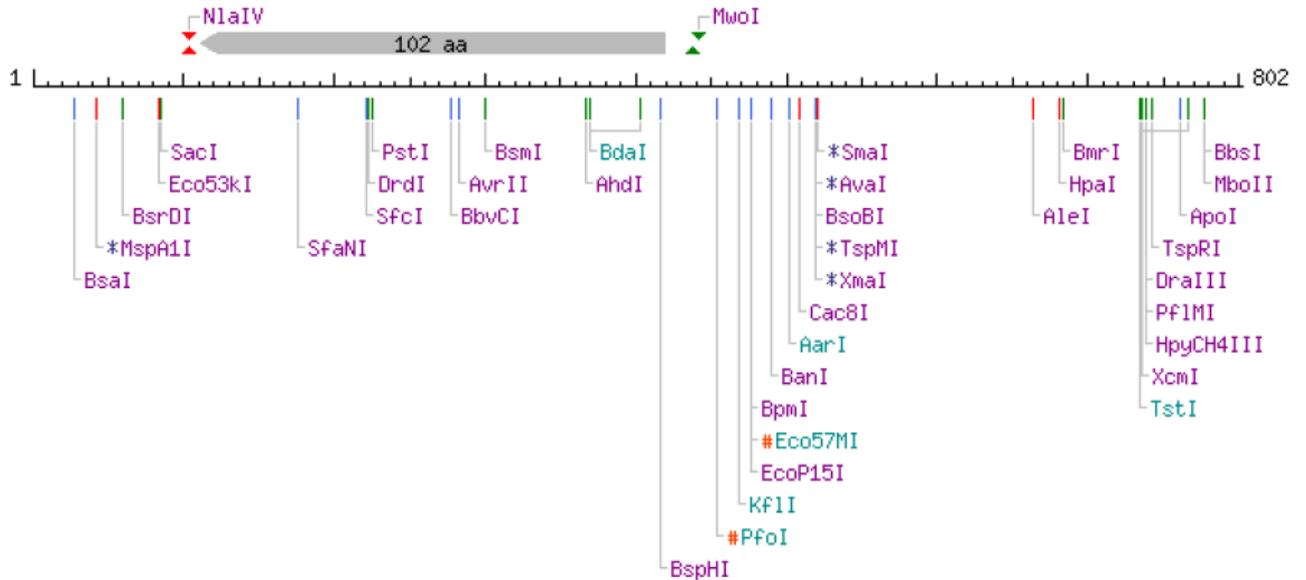
Other Features:

-Sequence of the insert: (Sequence of the PCR primers in red bold): Sequenced by Molecular Biology laboratory SAI (University of Murcia). **Clon 1**

(2419)**GTCAGTAGCTTAGGTTGGGGTGT**AGGATAGCAGAGAGACCCAGCG
 GTAGAGGGAAAGTCTCATTGCACCTCGGAAAGGAAGGAGCTCTAAAGGT
 CCCCTTGGCCCCTCCCTTACCTCATAAAAAGGCAAGGCTTGGCTTTGTG
 CCATAGGAGGGCAGCCTCCTGGCATTTCACACCAGGGATGTTTGTATGCAG
 CCCTCCTGGGTCAATTCCCGGCAAGACCCTGCAGTCTGGTTGTCGTATAG
 GGTGCTCCACCAACCACCGCAGTCCTAAAACCCCTCAGCCCTAGGCAC
 ATGAATGCACCTTTCACCCACCCAAAAGGCAGTCCCAGGCTCATGCTGT
 GTGTGTCCTTGGGTTTGGGTTGACAGGATGTCCTAAAGATGAAGCGGTTT
 ATTCTGGAAAATGGACACGCCACTTTCATGACAAGTCTCCGGCTTTACC
 TGCTCTGATCCCTTCTGGAGTGCAAGGGTCCCCTCTTTCAGGCGTTCTG
 GCACCTGCCACTACTGCTGGCTCTGCCTCCCGGGTGACACCTCTAGGAG
 ACTGGTCACTTCACAGACTTAATGCTAAACTTCCCAGAGAGCCTTTCCC
 TGCCCTTTTGCCACAAAGGGGTTTCATGCCTCTGCATGGGCTCTCCTTGC
 CCATGATCCAAGGTAGATAACCACTTTTGTGTTAAACTGGGTTAACTCTTA
 GGGGCTGGGTTTAGCTATCCTGGCTTCTGAAAACCTCCCCCAGCCACAC
 TGTGGAGAGGGGTGTCACCTAAAATTCCACCTAGTTCTC**AGAATGTCTT**
CTGGGCCTATG AA (3220).

-Restriction map of the insert.

GC=54%, AT=46%



----- **CLONING VECTOR** -----

NEUROBIOLOGY GROUP

Luis Puelles M. D. puelles@um.es

Dept. of Human Anatomy. School of Medicine.

University of Murcia. E-30071, Murcia, Spain;

Phone 34-968-364342 - Fax 34-968-363955

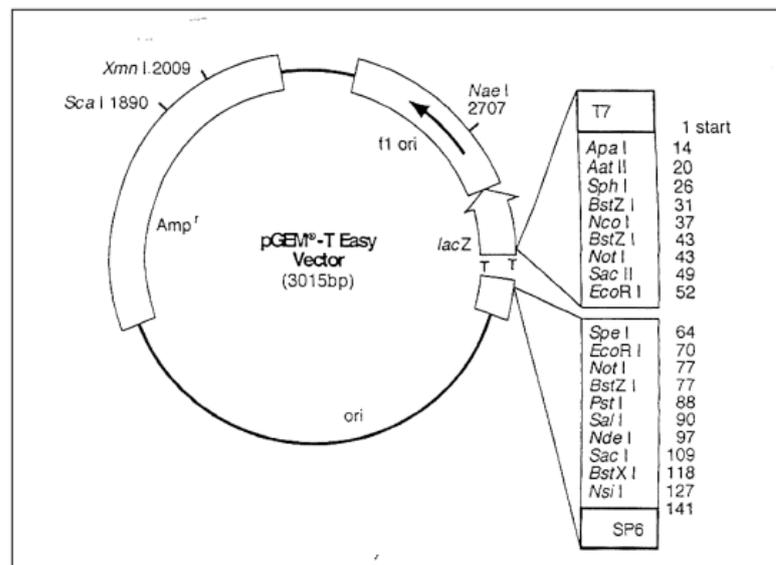
Molecular Biology advisor: José Luis Eduardo Ferran. jlferran@um.esCode: **M-0309**

Name of the cloning vector:

cSCGN (cDNA)

Gene: **Gallus gallus secretagoin, EF-hand calcium binding protein (Scgn), mRNA.**Species: **Gallus gallus domesticus.**Purpose: **In situ hybridization study.**Constructed by: **Abdelmalik Ayad** (ayad@um.es) ; **José Luis Eduardo Ferran (Chelo)** (jlferran@um.es)Construction date: **July 2011****Plasmid Features:**-Plasmid name: **p-GEM®-T Easy Vector Systems II**-Plasmid length: **3015bp**-Resistance: **Ampiciline**-Inserts can be sequenced using the following primers: **SP6 promoter primer and T7 promoter primer.**

-A single digestion with BstZ1 (XmaIII, Eco521, EagI), EcoR1 or Not1 will release inserts cloned into the vector.



p-GEM®-T Easy Vector Systems Map and Sequence Reference Points

Insert Features:

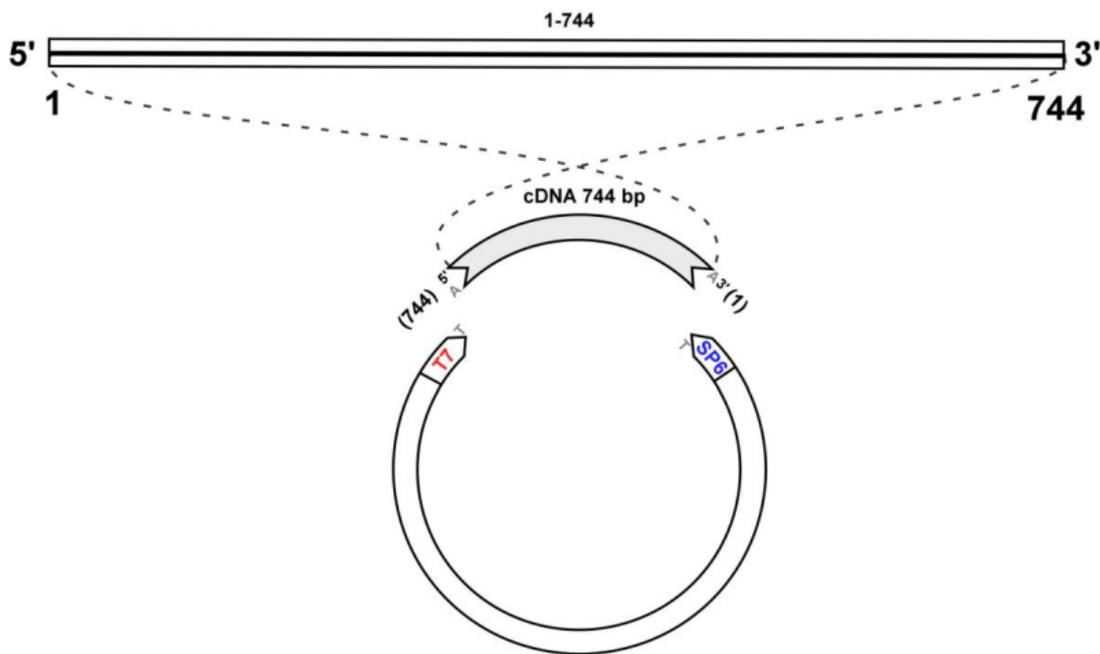
-Name: **cSCGN**

-Insert length: **744 bp** (1-744).

-NCBI Accession number:

-Obtained by: RT-PCR amplification with specific primers.

- Insert orientation inside of the plasmid: In relation to T7 and SP6 (p-GEM-T):

**Procedures to Obtain Sense and Antisense Riboprobes:**

-Enzyme to **linearize** for **antisense**: NdeI, SpeI
 -RNA **polymerase** to transcribe **antisense**: **T7**

-Enzyme to linearize for sense: NcoI, SphI

-RNA polymerase to transcribe sense: SP6

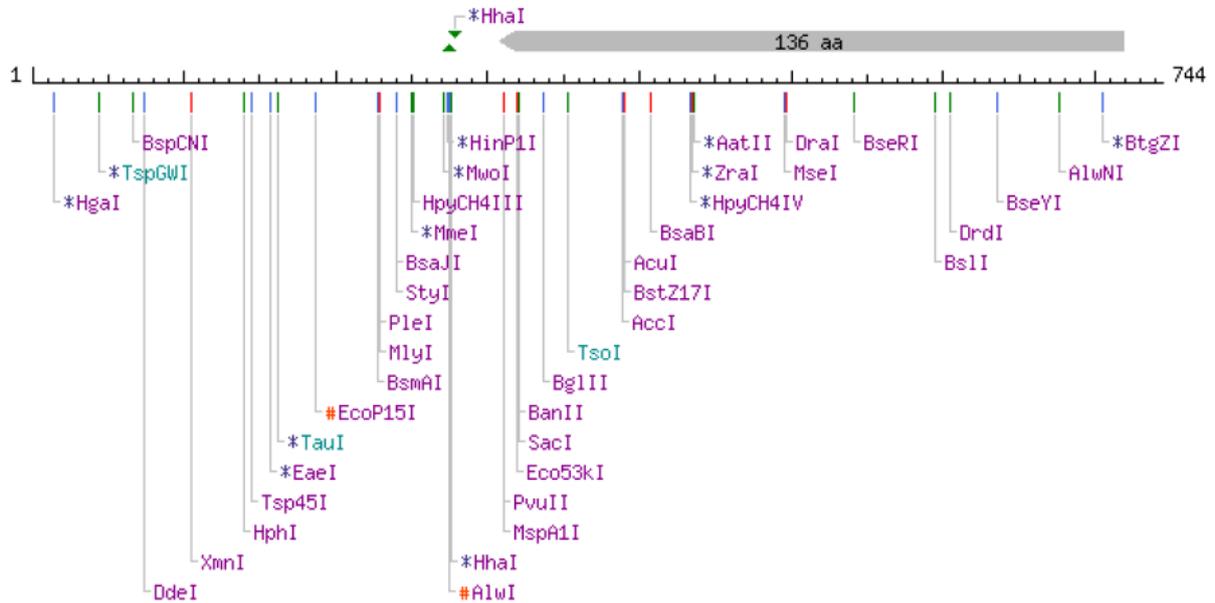
Other Features:

-Sequence of the insert (primer sequence in red bold): Sequenced by Molecular Biology laboratory SAI (University of Murcia). (Clon 1)

(1) **GCTTCGACGCCGACGACAAC**GGCTACATCGAAGGGAAAGAGCTTGA
 CAACTTTTTCCGTCATCTCCTGGAGAACTGAGGCCAGATGACACCATC
 ACAGAAGAAGAAGTTCAGAGGATGAAGGAGCAGTTCATGTCTGCCTAT
 GATGTCACCACAGATGGCCGCTTGCAAATCCAAGAGCTTGCAAATGTG
 ATCTTGCCAGATGATGAAAACCTCCTGCTGCTTTTCCGACGGGAGACTC
 CCTTGGACAACAGTGTGGAGTTCATGCGGATCTGGCGCAGTTACGATG
 CTGACGGCAGTGGATTTATTTTCAGCTGGAGAGCTCAAAGATTTCTGCG
 AGATCTTCTTGCAGCATAACAGGGTGGTTACTGAAGTAAAGCTGGAA
 GAGTATACTGATACGATGATGAAAATCTTTGACAAAAACAAGGATGGAC
 GTCTGGACCTGAATGACCTGGCAAGGATTCTGGCCCTCCAGGAAAATT
 TCCTTCTTCAATTTAAAATGGATGCTTGCAGCACAGAGGAAAGGAGGA
 GAGATTTTCGAGAAAATCTTTGCACACTACGATGTTAGTAAAACGGGAGC
 ACTTGAAGGCCCAGAAGTGGACGGGTTTGTCAAAGACATGATGGAAC
 GGTCAAGCCCAGCATCAGTGGAGTGGACCTGGACAAATTTTCGTCAGAT
 TCTGCTCAACCACTGCGATGTGAACAGGGATGGGAAAATTCAAAAATC
AGAACTGGCCTTGTGCCTTG(744)

-Restriction map of the insert.

GC=47%, AT=53%



----- CLONING VECTOR -----

NEUROBIOLOGY GROUP

Luis Puelles M. D. puelles@um.es

Dept. of Human Anatomy. School of Medicine.
University of Murcia. E-30071, Murcia, Spain;
Phone 34-968-364342 - Fax 34-968-363955

Molecular Biology advisor: **José Luis Eduardo Ferran.** jlferran@um.es

Code: **M-0286**

Name of the cloning vector: **c-EphA4 (cDNA)**

Gene: **Rattus norvegicus Eph receptor A4 (Epha4), mRNA.**

Species: **Rattus norvegicus, strain PVG.**

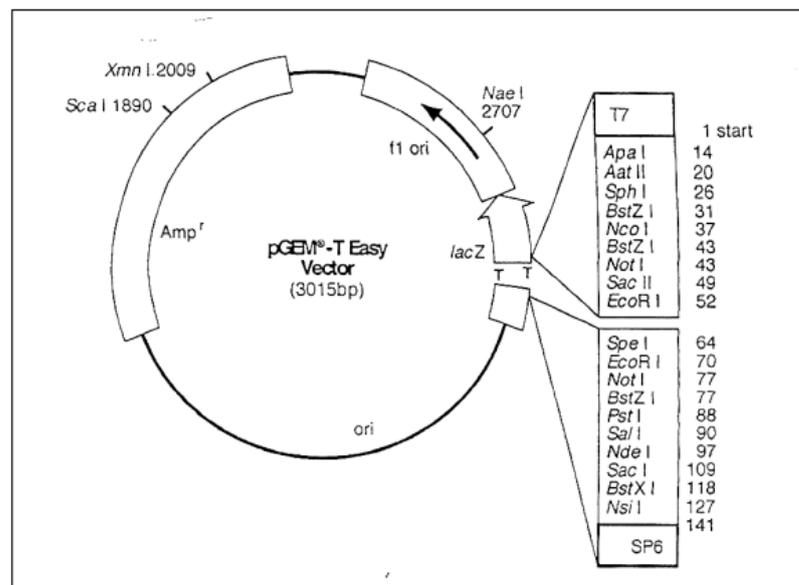
Purpose: **In Situ Probe**

Constructed by: **Abdelmalik Ayad** (ayad@um.es); **José Luis Eduardo Ferran (Chelo)** (jlferran@um.es).

Construction date: **May, 2011.**

Plasmid Features:

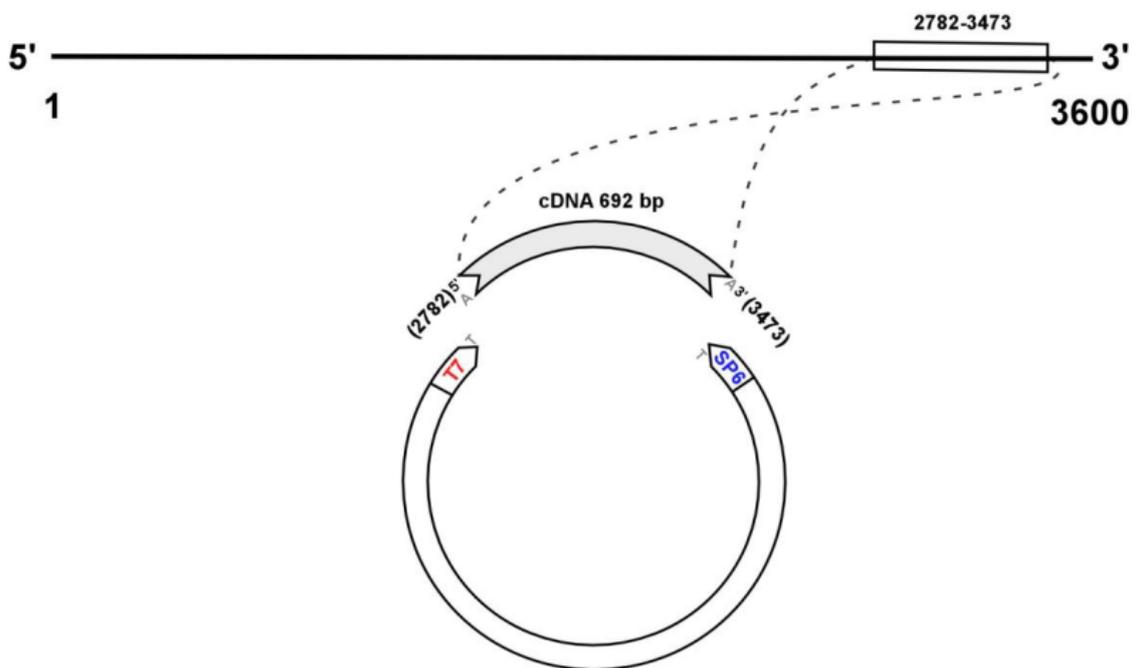
- Plasmid name: **p-GEM®-T Easy Vector Systems**
- Plasmid length: **3015bp**
- Resistance: **Ampiciline**
- Inserts can be sequenced using the following primers: **SP6 promoter primer and T7 promoter primer.**
- A single digestion with BstZ1 (XmaIII, Eco521, EagI), EcoR1 or Not1 will release inserts cloned into the vector.



p-GEM®-T Easy Vector Systems Map and Sequence Reference Points

Insert Features:

- Name: **c-EphA4**
- Insert length: 692 **bp** (2782-3473)
- NCBI Accession number: [NM_204781.1](#)
- Obtained by: RT-PCR amplification with specific primers.
- Insert orientation inside of the plasmid: In relation to T7 and SP6 (p-GEM-T):



Procedures to Obtain Sense and Antisense Riboprobes:

- Enzyme to **linearize** for **antisense**: **SpeI, SacI**
- RNA **polymerase** to transcribe **antisense**: **T7**

- Enzyme to linearize for sense: NcoI, SphI,
- RNA polymerase to transcribe sense: SP6

----- **CLONING VECTOR** -----

NEUROBIOLOGY GROUP

Luis Puelles M. D. puelles@um.es

Dept. of Human Anatomy. School of Medicine.

University of Murcia. E-30071, Murcia, Spain;

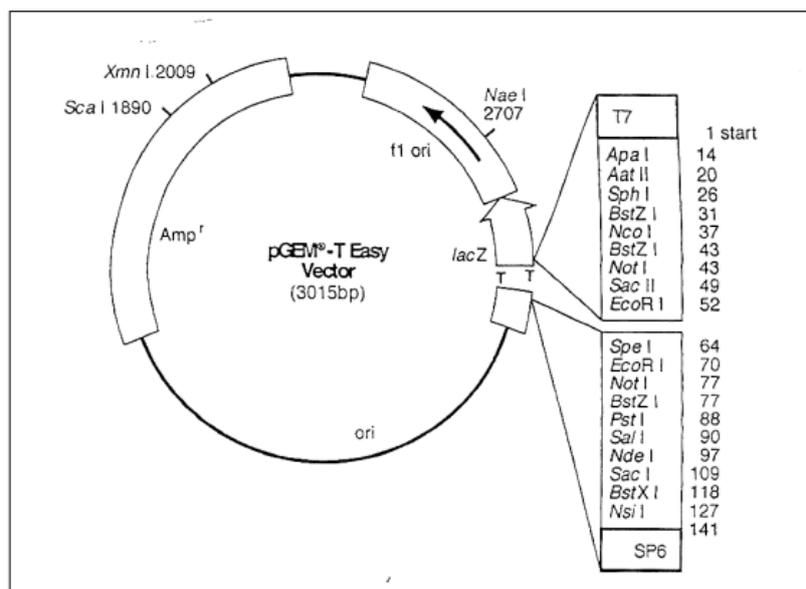
Phone 34-968-364342 - Fax 34-968-363955

Molecular Biology advisor: José Luis Eduardo Ferran. jlferran@um.esCode: **M-0284**

Name of de cloning vector:

XtNr4a2 (cDNA)Gene: **Xenopus tropicalis nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2, mRNA.**Species: **Xenopus tropicalis.**Purpose: **AS study, 5' region including intron2.**Constructed by: **Abdelmalik Ayad** (ayad@um.es), **José Luis Eduardo Ferran (Chelo)** (jlferran@um.es)Construction date: **may 2011****Plasmid Features:**-Plasmid name: **p-GEM®-T Easy Vector Systems II**-Plasmid length: **3015bp**-Resistance: **Ampiciline**-Inserts can be sequenced using the following primers: **SP6 promoter primer and T7 promoter primer.**

-A single digestion with BstZ1 (XmaIII, Eco521, EagI), EcoR1 or Not1 will release inserts cloned into the vector.



p-GEM®-T Easy Vector Systems Map and Sequence Reference Points

Insert Features:

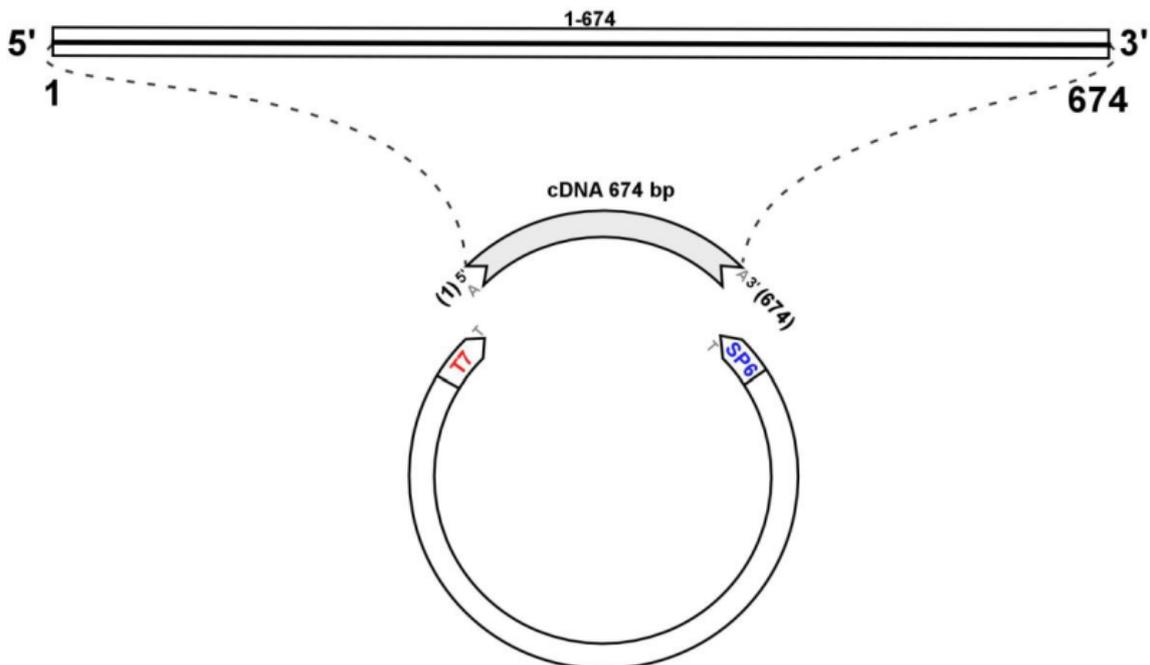
-Name: **XTrNr4a2**

-Insert length: **674 bp** (1-674).

-NCBI Accession number: Exon and intron sequences. Partial exon2-intron2-partial exon3.

-Obtained by: RT-PCR amplification with specific primers.

- Insert orientation inside of the plasmid: In relation to T7 and SP6 (p-GEM-T):

**Procedures to Obtain Sense and Antisense Riboprobes:**

-Enzyme to **linealize** for **antisense**: **Not useful to be used for in situ.**

-RNA **polymerase** to transcribe **antisense**:

-Enzyme to linealize for sense:

-RNA polymerase to transcribe sense:

Other Features:

-Sequence of the insert (Sequence of de exon2-3 in red bold): Sequenced by Molecular Biology laboratory SAI (University of Murcia). (Clon 1)

(1)**TTGGAAAGTTTGTTCGACAAGAAATACAACACTGTCCTCCTTTACCT
ACATCGAAAACCCACAGCCCGGCAGAAGGTTTGTCCTTTATTTGTG
GAGAGCAATTATATTGGCTAAAAGGGTAGTGGGGGGGCGATTAAATTG
GGCAAGGGTAGTGTATGGGGTTATCGTTAATGGTAATCGTCTGTAAGG
AATAATTACATAGGGAAGCGCTGAGATTTTGAGCAACAATTTCTAGTGC
GATTGAAGTCCTGTTGGGTTACAGACCGGGGGTGTCTCAGTGGGGTA
GACGGCAAGAGGGGTACAATGGTGATGGGAAGTATCCAACCTGAACAGT
ATGGGTATCTATTCAATTGTTTCATTTACAGCCATGCCCTGTGTTTCAGG
CTCAGTATGGGTCATCGCCTCAAGGAGCCAGCCCAGCTTCCCAGAGCT
ACACTTACCACTCTTCAGGAGAATACAGCTCCGATTTCTTAACTCCAGA
GTTTGTCAAGTTTAGCATGGACCTCACCAACACTGAAATCACTGCCACC
ACTTCTCTCCCAGTTTTAGTACCTTTATGGACAACACTACAACAAGTT
ACGACGTCAAGCCTCCTTGCTTGTACCAAATGCCCTCTCCGGCCAGCA
GTCTTCTGTAAAAGTGGAAGATATACAGATGCACGGCTACCAA (674)**

----- CLONING VECTOR -----

NEUROBIOLOGY GROUP

Luis Puelles M. D. puelles@um.es

Dept. of Human Anatomy, School of Medicine.

University of Murcia. E-30071, Murcia, Spain;

Phone 34-968-364342 - Fax 34-968-363955

Molecular Biology advisor: José Luis Eduardo Ferran. jlferran@um.es

Code: **M-0282**

Name of de cloning vector: **c-Pvalb (cDNA)**

Gene: **Gallus gallus Parvalbumin B, mRNA.**

Species: **Gallus gallus.**

Purpose: **In Situ Probe**

Constructed by: **Abdelmalik Ayad (ayad@um.es) ; José Luis Eduardo Ferran (Chelo) (jlferran@um.es).**

Construction date: **May, 2011.**

Plasmid Features:

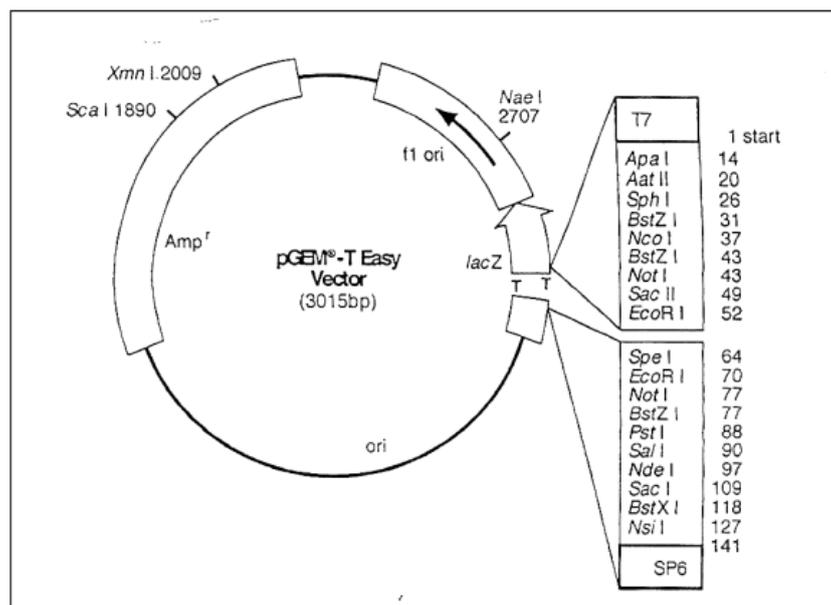
-Plasmid name: **p-GEM®-T Easy Vector Systems**

-Plasmid length: **3015bp**

-Resistance: **Ampiciline**

-Inserts can be sequenced using the following primers: **SP6 promoter primer and T7 promoter primer.**

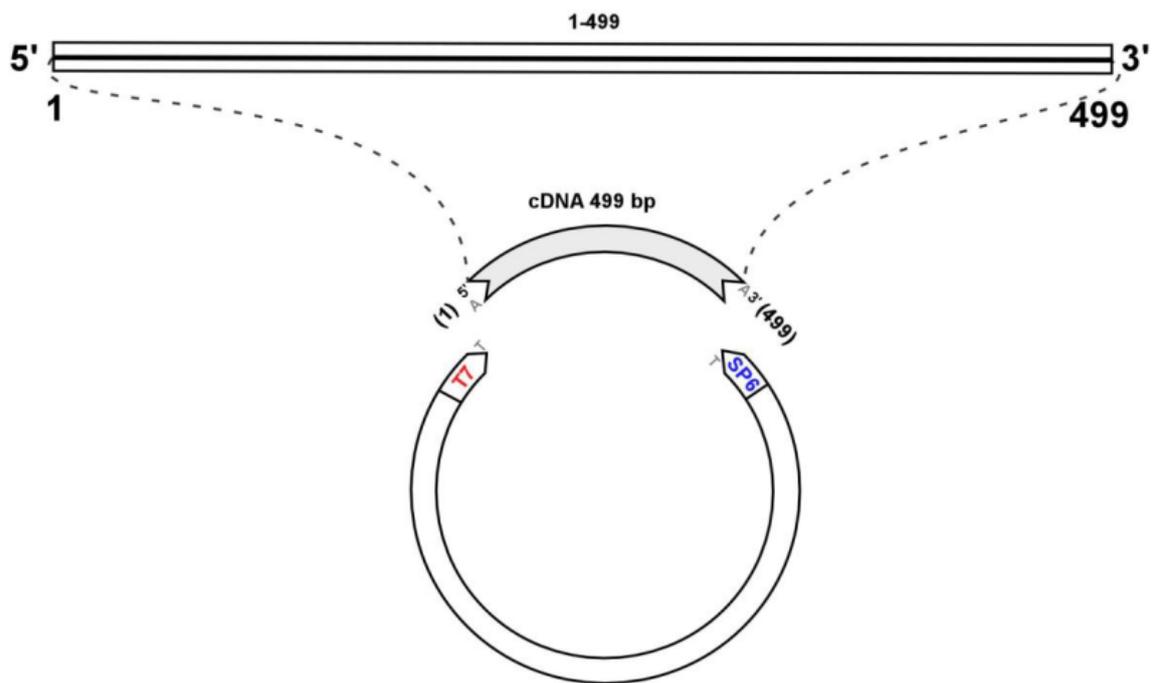
-A single digestion with BstZ1 (XmaIII, Eco521, EagI), EcoR1 or Not1 will release inserts cloned into the vector.



p-GEM®-T Easy Vector Systems Map and Sequence Reference Points

Insert Features:

- Name: **c-Parv**
- Insert length: 499 **bp** (1-499)
- NCBI Accession number:
- Obtained by: RT-PCR amplification with specific primers.
- Insert orientation inside of the plasmid: In relation to T7 and SP6 (p-GEM-T):



Procedures to Obtain Sense and Antisense Riboprobes:

-Enzyme to **linearize** for **antisense**: **NcoI, SphI, SacII**
 -RNA **polymerase** to transcribe **antisense**: **SP6**

- Enzyme to linearize for sense: NdeI, PstI, SacI
- RNA polymerase to transcribe sense: T7

----- CLONING VECTOR -----

NEUROBIOLOGY GROUP

Luis Puelles M. D. puelles@um.es

Dept. of Human Anatomy, School of Medicine.

University of Murcia. E-30071, Murcia, Spain;

Phone 34-968-364342 - Fax 34-968-363955

Molecular Biology advisor: José Luis Eduardo Ferran. jlferran@um.es

Code: **M-0281**

Name of the cloning vector: **c-Calb1 (cDNA)**

Gene: **Gallus gallus calbindin 1, 28kDa (CALB1), mRNA.**

Species: **Gallus gallus.**

Purpose: **In Situ Probe**

Constructed by: **Abdelmalik Ayad (ayad@um.es) ; José Luis Eduardo Ferran (Chelo) (jlferran@um.es).**

Construction date: **May, 2011.**

Plasmid Features:

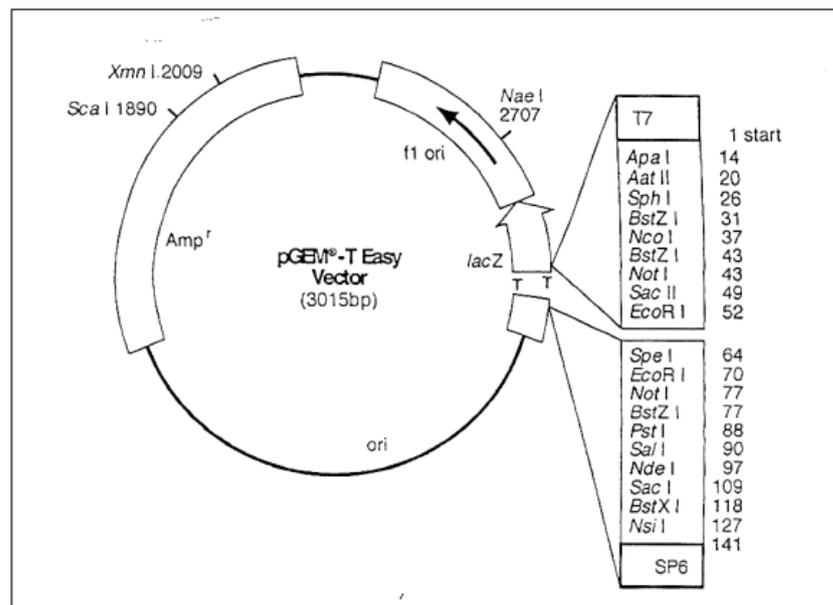
-Plasmid name: **p-GEM®-T Easy Vector Systems**

-Plasmid length: **3015bp**

-Resistance: **Ampiciline**

-Inserts can be sequenced using the following primers: **SP6 promoter primer and T7 promoter primer.**

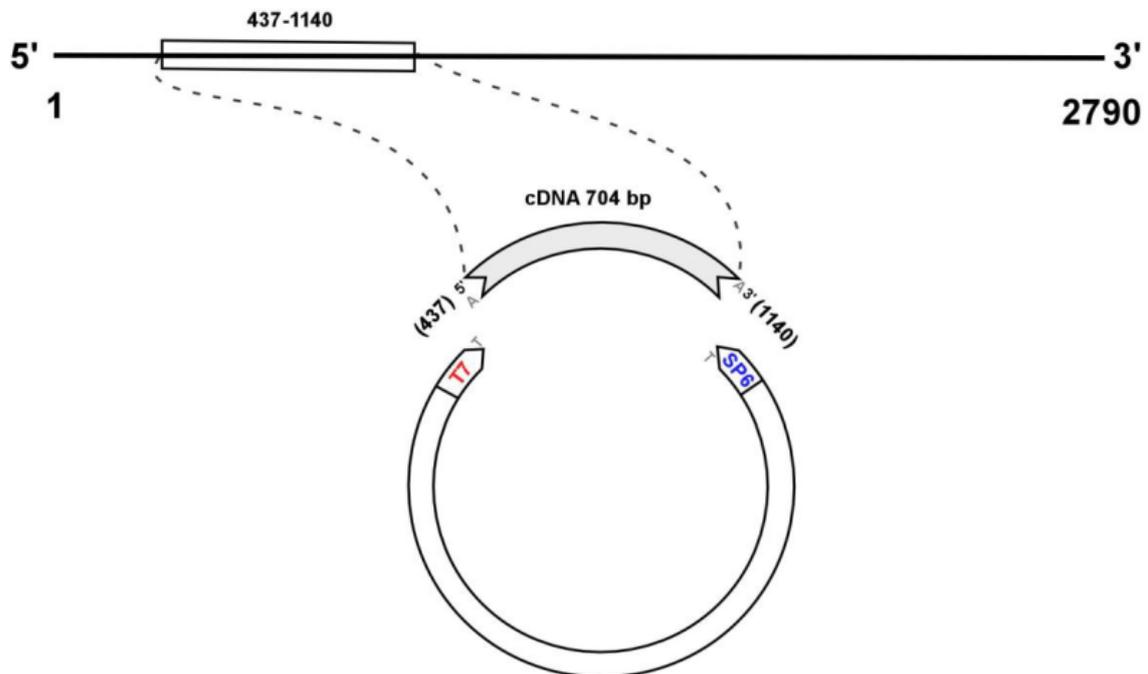
-A single digestion with BstZ1 (XmaIII, Eco521, EagI), EcoR1 or Not1 will release inserts cloned into the vector.



p-GEM®-T Easy Vector Systems Map and Sequence Reference Points

Insert Features:

- Name: **c-Calb1**
- Insert length: 704 **bp** (437-1140)
- NCBI Accession number: [NM_205513.1](#)
- Obtained by: RT-PCR amplification with specific primers.
- Insert orientation inside of the plasmid: In relation to T7 and SP6 (p-GEM-T):



Procedures to Obtain Sense and Antisense Riboprobes:

- Enzyme to **linearize** for **antisense**: **NcoI, SphI, SacII**
- RNA **polymerase** to transcribe **antisense**: **SP6**

- Enzyme to linearize for sense: NdeI, PstI, SacI
- RNA polymerase to transcribe sense: T7

Other Features:

-Sequence of the insert: (Sequence of the PCR primers in red bold): Sequenced by Molecular Biology laboratory SAI (University of Murcia). **Clon 1**

(437)**ACAGTGACCACAGTGGTTTC**ATTGATTCTGAGGAACTTAAGAGTTTC
 TTGAAAGATTTATTACAGAAAGCAAATAAGCAGATTGAAGACTCAAAGCT
 AACAGAATATACAGAAATAATGCTCAGGATGTTTGATGCAAACAATGATG
 GAAAATTGGAGCTTACTGAACTGGCCAGGCTACTCCCAGTACAGGAAAA
 TTTTCTTATTAATTTTCAGGGTGTCAAATGTGTGCAAAGAGTTCAATAA
 AGCCTTTGAGATGTACGATCAAGATGGCAATGGATATATAGATGAAAATG
 AACTTGATGCACTACTGAAGGATCTCTGTGAAAAGAACAAAAAGGAATT
 AGACATTAACAACCTTGCGACATAACAAGAAAAGCATCATGGCCTTGTCTG
 ATGGAGGGAAGCTTTACCGAGCAGAACTGGCTCTCATTCTCTGTGCTGA
 GGAAAATTAAACTCTTCTCTCATGTCCACTTAACTAGTGATGATTCTAT
 CTACACAATAACTGTGCACTATAAGGGAGTAGGCTGTATTTTTAACTGC
 ATATAGAAAATTAGCCAGGATGTGTGGCACATTCCTTTAAGTTTGTCTTA
 TACTGTTTGTAAATGTACAGTTTTTGTAAACAATAAGATTGATAAAGAGAATG
 TCTATGTTTGGGCCAGTCTGTATATTCAAAGAA**CTAAAACATGTTGGG**
GTTGGA(1140).

-Restriction map of the insert.

