

UVIC

Universitat de Vic
**Escola Politècnica
Superior**



Trabajo de Fin de Grado

Estudio del desarrollo y conectividad de las neuronas
vasotocinérgicas en el prosencéfalo de pollo

María Abascal Guerrero

Grado en Biotecnología

Tutor: Josep Bau Macià (Licenciado y doctor en Biología. Profesor de biología animal y técnicas del laboratorio en la Universidad de Vic)

Directora: Ester Desfilis Barceló (Investigadora y doctora en Biología, Grupo de evolución y desarrollo del cerebro. Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), universitat de Lleida.

Vic, Junio de 2014

“Aquel que duda y no investiga, se torna no sólo infeliz, sino también injusto” (Blas Pascal)

ÍNDICE

1. RESUMEN	Pág. 3
2. SUMMARY	Pág. 4
3. INTRODUCCIÓN	Pág. 5
3.1 El cerebro	Pág. 5
3.2 La amígdala	Pág. 9
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	Pág. 18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 20
6. RESULTADOS	Pág. 24
6.1 Experimentos de localización de Otp y AVT	Pág.24
6.2 Experimentos de trazado de conexiones	Pág. 34
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	Pág. 36
8. CONCLUSIONES	Pág.41
9. AGRADECIMIENTOS	Pág. 42
10. BIBLIOGRAFÍA	Pág. 43
11. ANEXOS	Pág. 50

1. RESUMEN

Título: *Estudio del desarrollo y conectividad de las neuronas vasotocinérgicas en el prosencéfalo de pollo*

Palabras clave: Amígdala, hipotálamo, vasopresina/vasotocina, Otp

Autora: María Abascal Guerrero

Tutores: Dra. Ester Desfilis Barceló (IRBLleida) y Dr. Josep Bau Macià (UVic)

Fecha: Junio de 2014

En este *Trabajo de Fin de Grado* se estudia el origen embrionario de las distintas poblaciones neuronales que forman la amígdala medial extendida. La amígdala es una estructura del cerebro anterior involucrada en otorgar un significado emocional a los estímulos ambientales y en el control de distintos aspectos del comportamiento social (p.ej. comportamientos sexual, maternal, agresivo y afiliativo). Ante dichos estímulos, la amígdala pone en marcha una serie de reacciones de carácter motor, autonómico y endocrino que constituyen la respuesta emocional. Algunos desórdenes de carácter neuropsiquiátrico en humanos están relacionados con una disfunción en el control de las emociones y del comportamiento social, y varios de ellos se asocian a alteraciones en el desarrollo de la amígdala.

El objetivo del presente trabajo ha sido investigar el origen de las neuronas de la amígdala medial extendida en embriones de pollo (E15 y E18) mediante ensayos de inmunocitoquímica, técnica utilizada para localizar las células que contienen el neuropéptido vasotocina (AVT) y proteínas reguladoras del desarrollo (la producida a partir del gen Otp) para ayudar en la delimitación de los distintos dominios embrionarios del prosencéfalo y distintas subdivisiones de la amígdala extendida. Los resultados de estos ensayos se combinaron con ensayos de trazado de conexiones para analizar la conectividad de las neuronas vasotocinérgicas de esta estructura. Los resultados obtenidos sugieren que las neuronas AVT-positivas podrían derivar del dominio Supra-Opto-Paraventricular (SPV), y algunas poblaciones alcanzarían su posición definitiva dentro del propio dominio por migración radial, mientras que otras invadirían otros dominios cerebrales por migración tangencial.

En conclusión, la investigación proporciona importantes datos que clarifican aspectos relevantes del desarrollo y organización adulta de la amígdala extendida, y ayuda a establecer las bases para una mejor comprensión del control neural de las emociones y el comportamiento social en condiciones normales y patológicas.

2. SUMMARY

Title: *Study of the development and connectivity of vasotocinergic neurons in the chicken forebrain*

Keywords: Amygdala, hypothalamus, vasopressin/ vasotocin, Otp

Author: María Abascal Guerrero

Tutors: Dra. Ester Desfilis Barceló (IRBLleida) and Dr. Josep Bau Macià (UVic)

Date: June 2014

The study of this *Final Project* is the embryonic origin of the different neuronal populations that form the medial amygdala. The amygdala is a forebrain structure involved in giving emotional significance to environmental stimuli, and in controlling various aspects of social behavior (eg sexual, maternal, aggressive and affiliative behaviors). Given these stimuli, the amygdala triggers a series of reactions with motor, autonomic and endocrine character, constituting the emotional response. Some neuropsychiatric disorders in humans are related to a dysfunction in the control of emotions and social behavior, and several of them are associated with alterations in the development of the amygdala.

The aim of this study is to investigate the origin of neurons in the medial extended amygdala in chicken embryos (E15 and E18) by immunocytochemistry assays, a technique used to locate cells containing the neuropeptide vasotocin (AVT) and development regulatory proteins (produced from Otp gene) to assist in the delineation of different embryonic forebrain domains and different subdivisions of the extended amygdala. The results of these tests were combined with fate map assays for analyzing the connectivity of the vasotocinergic neurons in this structure. These results suggest the AVT-positive neurons could derive from the Supra-Opto-Paraventricular domain (SPV), and some populations could reach their final position within the domain itself by radial migration, while others could invade other brain domains by tangential migration.

In conclusion, the research provides important data that clarify relevant aspects about the development and adult organization of the extended amygdala, and helps lay the groundwork for a better understanding of the neural control of emotions and social behavior in normal and pathological conditions.

3. INTRODUCCIÓN

Las emociones y las relaciones sociales no son propiedad única y exclusiva de los seres humanos. Todos los vertebrados han dedicado una parte de sus neuronas a la complicada tarea del control de las emociones (Lindquist et al., 2012). Y es en este punto donde la amígdala entra en escena. Estudios recientes de carácter neurofisiológico y neuropsicológico, muestran cómo algunos desórdenes neuropsiquiátricos, asociados con alteraciones del control de las emociones y del comportamiento social, como serían los trastornos del espectro autista, la esquizofrenia y otras psicopatías (personalidad límite), así como los trastornos del estado de ánimo (depresión, ansiedad, estrés post-traumático, fobias), están relacionados con alteraciones en el desarrollo y/o la función de la amígdala (LeDoux, 1992, 2000).

3.1. El cerebro

¿Qué es?

El cerebro funciona como receptor y procesador de la información de los estímulos tanto externos como internos del organismo, así como generador de respuestas adaptativas. Regula sus principales actividades como son la percepción, la cognición, las emociones y la memoria. En definitiva, define lo que somos.

Es la integración coordinada y precisa de las funciones de las diferentes estructuras neurales, la que define la función del cerebro (Martínez, 2011). Y ésta, a su vez, depende del desarrollo de varias subregiones anatómicas, cada una de las cuales presenta un riguroso patrón de conexiones. Este proceso es el resultado de un concreto desarrollo de patrones espacio-temporales de los procesos moleculares y celulares que construyen la compleja estructura del sistema nervioso central (SCN) (Martínez, 2011). Por tanto, tiempo y espacio son esenciales en el desarrollo genoarquitectónico (la genética regula la estructura) del cerebro (Martínez, 2011). El estudio del desarrollo cerebral ayuda a entender su organización y también su función.

En los últimos años, los resultados obtenidos de análisis transcriptómicos (de expresión genética) del desarrollo neural, han demostrado que es necesario que haya un equilibrio entre las secuencias espacio-temporales de expresión de genes reguladores del desarrollo para que el cerebro se desarrolle con normalidad (Martínez,

2011; Colas, 2001). Alteraciones genéticas y otros factores epigenéticos pueden alterar este equilibrio y producir algunas anormalidades estructurales que darán lugar a malformaciones congénitas.

¿Cómo se forma?

Respecto a la morfogénesis cerebral, la neurulación es el proceso fundamental de la embriogénesis que culmina en la formación del tubo neural después de un repliegue progresivo de la placa neural temprana, que se va curvando progresivamente (Martínez, 2011; Colas, 2001). Este tubo neural temprano, en la mayoría de los vertebrados forma una estructura prolongada, y antes del final de la neurulación, su porción más anterior experimenta cambios morfológicos drásticos. En esta región se desarrollan las tres vesículas cerebrales primarias: el prosencéfalo (cerebro anterior), mesencéfalo (cerebro medio) y el romboencéfalo (cerebro posterior). Posteriormente cada una de ellas se subdivide para formar otras subestructuras. El prosencéfalo queda subdividido en dos vesículas más: el prosencéfalo secundario (en la parte más rostral) que dará lugar al telencéfalo, vesícula óptica y al hipotálamo, y en la zona más caudal, el diencéfalo que formará el tálamo, pretectum y otras estructuras (Medina, 2008; Puellas, 2001, 2004). Por su parte, el mesencéfalo se divide en el tectum localizado en la porción dorsal y el tegmentum en una posición ventral; y el rombencéfalo, que rodea al cuarto ventrículo, quedará dividido en tres subestructuras: el bulbo, la protuberancia y el cerebelo.

El descubrimiento de genes reguladores que se expresan en regiones concretas del cerebro anterior en desarrollo, ha aportado nuevas herramientas para la identificación de los diferentes campos o dominios de desarrollo en este boceto cerebral, así como el poder definir sus propiedades moleculares e histogenéticas (Puelles, 2004; Rubenstein et al., 1998; Wilson and Rubenstein, 2000; Cobos et al., 2001) (Figura 1)

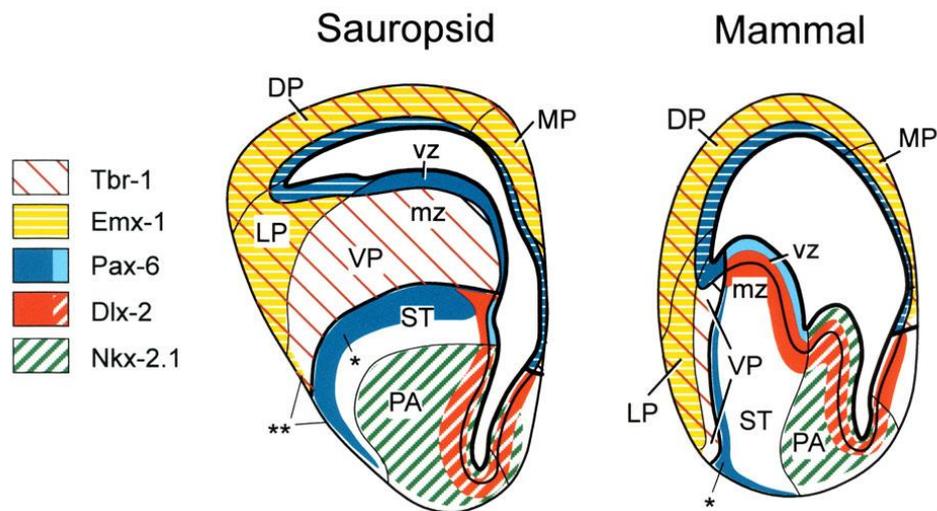


Figura 1. Distribución de diversos marcadores génicos (listados a la izquierda) en el telencéfalo de reptiles y aves (saurópsidos) y mamíferos. Si bien se observan importantes diferencias cuantitativas (masa tisular que expresa determinado gen), llama la atención que el esquema topológico de la configuración global de áreas está totalmente conservado. Ello implica que todos los cerebros mantienen un esquema estructural común.

Imagen extraída de “Gene maps and related histogenetic domains in the forebrain and midbrain”. Puelles, L. 2004

Los progenitores de las células nerviosas, las neuronas y también algunos tipos de glía, que en conjunto formarán las estructuras cerebrales, se encuentran en el neuroepitelio de la placa y en el tubo neural en desarrollo. Dentro del SNC o en tejidos no-neurales próximos, la expresión de determinados genes en lugares precisos del embrión provoca un gradiente de difusión de moléculas de señalización. Las señales moleculares difunden por el epitelio y actúan sobre receptores específicos expresados en las células neuroepiteliales, y además, regulan en cada lugar la expresión de un conjunto específico de factores de transcripción. El conjunto de estos factores en un grupo de progenitores determina su proliferación, neurogénesis, diferenciación celular y, finalmente, la aparición de conexiones y sus propiedades funcionales (Puelles and Rubenstein, 2003; Martínez, 2011). A medida que avanza el desarrollo, los progresos de codificación molecular evolucionan desde un estado inicial con alta capacidad regulativa, hacia estados más estables que caracterizarán la identidad molecular de las poblaciones neuronales generadas en cada dominio cerebral (Martínez, 2011).

La distribución espacio-temporal de estas señales morfogénicas muestra la topología de la región y, además genera un tipo de clasificación para cada uno de los grupos de células progenitoras presentes en la pared del tubo neural. Esto es el proceso conocido como regionalización (Martínez, 2011; Puelles, 2004, 2007).

El Modelo topológico segmentario o más comúnmente conocido como Modelo Prosomérico es el que describe este proceso de regionalización de la placa y tubo neural. Este modelo propone que el cerebro anterior embrionario se subdivide en un patrón cuadrículado donde los patrones moleculares longitudinales (columnas) y transversales (segmentos) se intercalan para definir los diferentes campos de desarrollo (cada región de epitelio que contiene el esbozo de un área del cerebro) (Puelles and Rubenstein, 1993). (Figura 2)

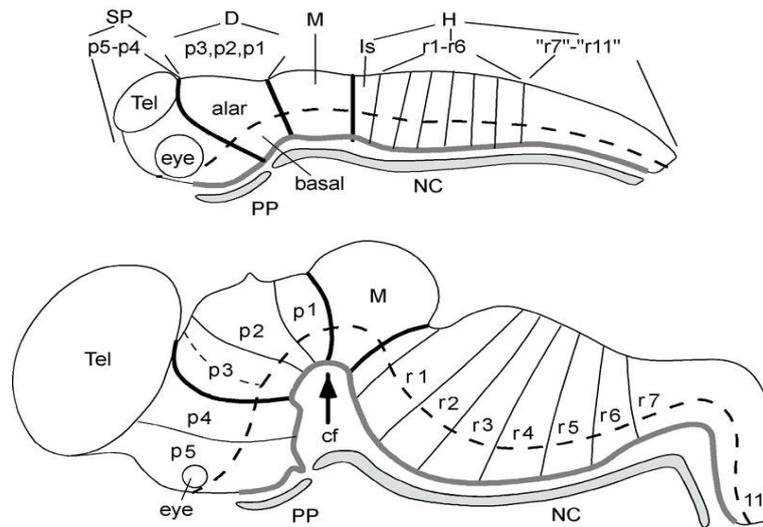


Figura 2. Esquema basado en el Modelo Prosomérico que representan dos momentos del desarrollo embrionario del cerebro. Véase como las subdivisiones regionales iniciales resultan progresivamente deformadas debido al crecimiento diferencial de ciertas regiones. Imagen obtenida del Allen Institute for Brain Science.

Este plan general de guía segmentaria es reconocible en el primordio neural de todos los cordados, por lo que como conquista evolutiva debió significar un gran avance funcional y adaptativo. Como resultado, el número de zonas longitudinales y segmentos transversales, y sus principales subdivisiones, son comunes y constantes en todos los cerebros de vertebrados, lo que permite una fácil comparación de la topología del cerebro entre las especies y una mejor extrapolación de los mecanismos causales. Sin embargo, variaciones en los mecanismos genéticos que regulan el desarrollo de este plan son las que generan deformaciones o cambios en la estructura, y son también el origen de las diferencias estructurales entre los cerebros de las diferentes especies de vertebrados (Puelles and Rubenstein, 1993). (Figura 3)

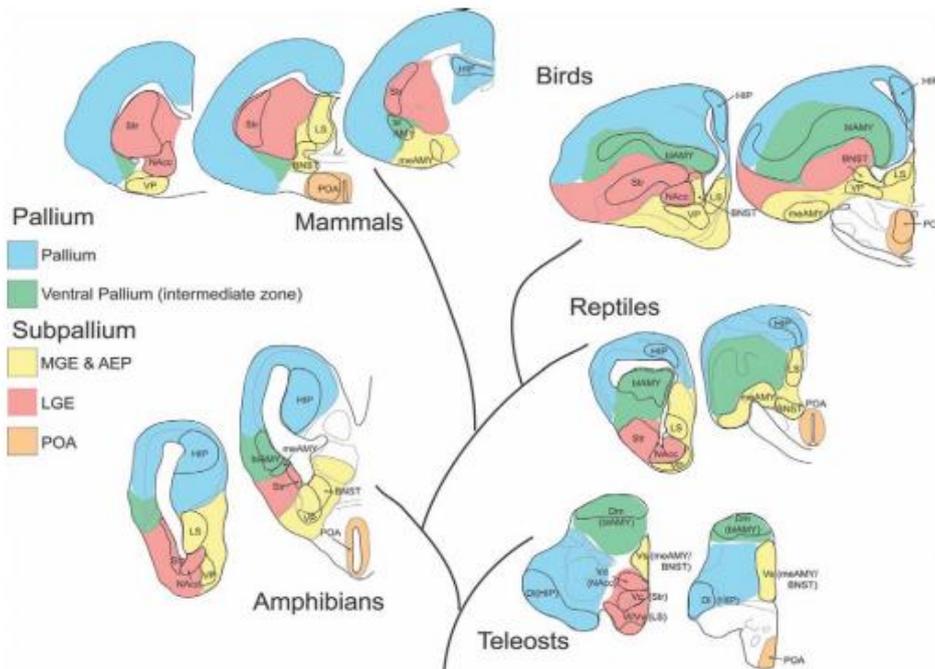


Figura 3. Evidencias del desarrollo de homólogas neuronales en diferentes vertebrados. Abreviaciones: AEP: Área entopeduncular; LGE: Eminencia gangliónica lateral; MGE: Eminencia gangliónica medial; POA: Área preóptica. Imagen extraída de “The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis”. O’Conell y Hoffmann 2011.

El Modelo Prosomérico hace hincapié en los patrones compartidos, y puede ser fácilmente utilizado para reconocer homólogas, estudiar los procesos diferenciales de desarrollo e identificar los patrones patológicos, como fenotipos mutantes (Pombero et al., 2007; Puelles and Rubenstein, 1993).

3.2. La amígdala

Introducción

La amígdala es una estructura cerebral con forma “almendrada” (proviene del griego *amygdale*, almendra), descrita por primera vez en mamíferos como un conjunto de núcleos neuronales situado en las profundidades de cada lóbulo temporal (Figura 4). El complejo amigdalino está presente en el telencéfalo ventrolateral de todos los tetrápodos y, probablemente, de todos los vertebrados (aunque en peces su presencia todavía es objeto de intenso debate). Sin embargo, en algunos aspectos de su organización se observan diferencias entre mamíferos, saurópsidos (reptiles y aves) y anfibios (Revisado en Moreno and González, 2007; Medina et al., 2011).

El estudio de la organización anatómica y funcional de la amígdala, así como de su evolución, tiene un enorme interés debido a que este complejo de núcleos forma parte de numerosos sistemas funcionales directamente implicados en el control del sistema

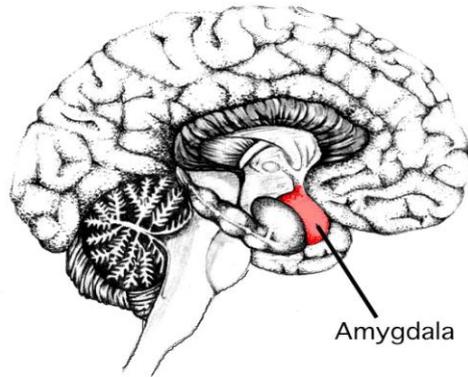


Figura 4. Localización de la amígdala en el cerebro humano adulto. Visión lateral. Imagen extraída de “The emotional Brain”, LeDoux 1998

neuroendocrino, la homeostasis y las respuestas emocionales, así como en diferentes aspectos del comportamiento de los animales directamente relacionados con la supervivencia y la reproducción (comportamiento agresivo, maternal, de huida, de cortejo, de apareamiento, etc.) (Revisado en LeDoux 2000, 2007; Amaral, 2003).

Además, anomalías en la activación de la amígdala se han relacionado con distintos trastornos neuropsiquiátricos como psicopatías, trastornos del espectro autista, depresión y trastornos obsesivo-compulsivos (TOC) (Gao et al. 2009; Amaral et al., 2008; Phelps and LeDoux, 2005).

Tradicionalmente los núcleos que conforman la amígdala han sido divididos en dos grandes complejos en base a su conectividad y a su implicación en sistemas funcionales idénticos. Por un lado, el complejo basolateral que incluye los núcleos lateral, basal y basal accesorio, y por el otro, el complejo centromedial formado por los núcleos central y medial (Revisado en LeDoux, 2007). Actualmente, se ha propuesto extender este último complejo (centromedial) hasta el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST, *bed nucleus of the stria terminalis*) constituyendo lo que actualmente se denomina amígdala extendida (Alheid et al., 1995).

En cuanto a las conexiones amigdalinas, la amígdala está conectada con múltiples áreas localizadas en distintas zonas del cerebro. Cada núcleo amigdalino posee un conjunto de aferencias y eferencias único (Revisado en LeDoux, 2007). El complejo basolateral es la principal entrada de información a la amígdala. El núcleo lateral recibe inputs de los sistemas sensoriales visual, auditivo, somatosensorial (incluyendo dolor), olfativo y gustativo (aunque la información olfativa y gustativa llega también a

otros núcleos). Estas aferencias sensoriales se originan tanto en núcleos talámicos de relevo sensorial, como en zonas sensoriales asociativas de la corteza cerebral. Los núcleos de este complejo basolateral también reciben otras aferencias, principalmente de áreas corticales asociativas, de la corteza entorrinal y del hipocampo. Por otra parte, la amígdala extendida recibe inputs sensoriales desde el bulbo olfativo (principal y accesorio), el tronco encefálico (gustativo, visceral y dolor), la corteza sensorial visceral (principalmente la corteza insular) y desde el hipotálamo. (Figura 5)

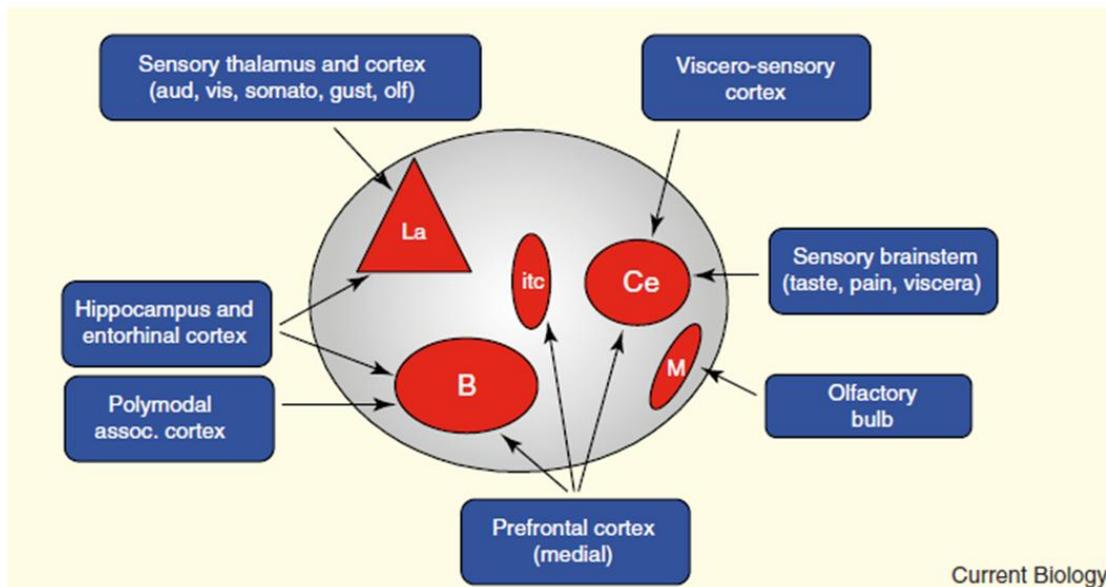


Figura 5. Inputs a algunos núcleos específicos de la amígdala. Abreviaciones: B, Núcleo Basal; Ce, Núcleo Central; itc, Células intercaladas; La, Núcleo Lateral; M, Núcleo Medial. Imagen extraída de "The Amygdala (review)", LeDoux 2007.

Respecto a las eferencias, el complejo basolateral proyecta a los núcleos amigdalinos central y medial, a la corteza prefrontal, a otras áreas corticales asociativas (implicadas en distintos aspectos cognitivos), áreas temporales implicadas en la memoria (como la corteza entorrinal) y al estriado (implicado en las respuestas motoras). Las eferencias de la amígdala extendida son más amplias y complejas, pues proyecta a distintos núcleos hipotalámicos implicados en el control del sistema nervioso simpático y del sistema neuroendocrino (por ejemplo al sistema hipotálamo-hipofisario), áreas del tronco encefálico que controlan las respuestas motoras (sustancia gris periacueductal), el sistema nervioso parasimpático (núcleo motor del vago) y áreas de origen de los distintos sistemas ascendentes moduladores, que tienen como neurotransmisores las monoaminas norepinefrina (NE), dopamina (DA) o serotonina (5HT), o bien la acetilcolina (ACh). (Figura 6)

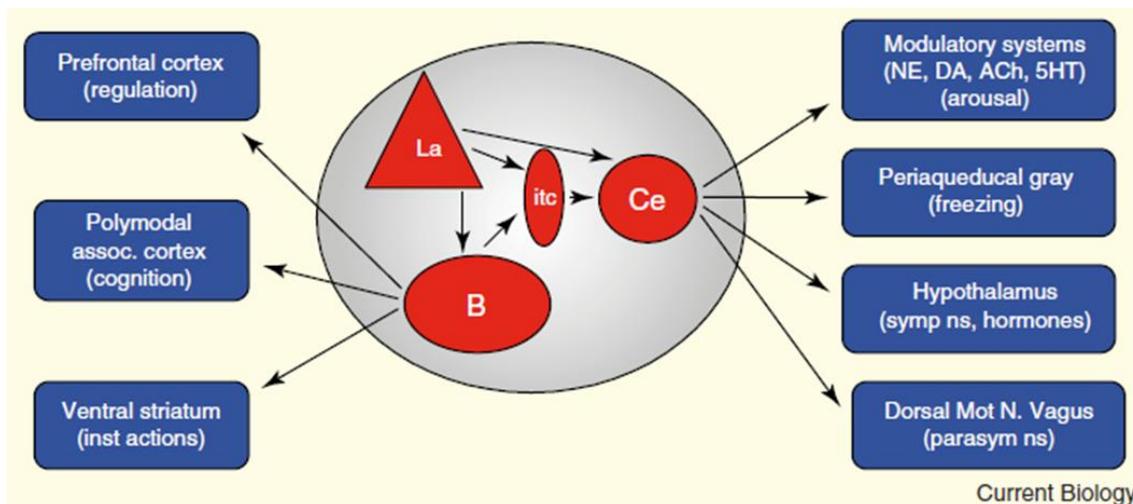


Figura 6. Outputs de algunos núcleos específicos de la amígdala.

Abreviaciones: B, Núcleo Basal; Ce, Núcleo Central; itc, Células intercaladas; La, Núcleo Lateral; M, Núcleo Medial.

Imagen extraída de "The Amygdala" (review), LeDoux 2007

Estudios recientes sobre el desarrollo embrionario de la amígdala han demostrado que sus núcleos tienen una estructura similar a la de un mosaico, con neuronas de diferente origen embrionario, que además expresan distintos factores de transcripción durante el desarrollo. Estos estudios también sugieren que las neuronas con el mismo origen embrionario y perfil de expresión génica podrían estar interconectadas, proyectar a las mismas dianas y estar involucradas en la misma función (Medina and Abellán 2011; Medina et al., 2011, 2013). La mayoría de los estudios e investigaciones que se han realizado hasta el momento sobre las conexiones y la implicación de la amígdala en distintos aspectos del comportamiento no han tenido en cuenta la heterogeneidad de su composición. Esto podría explicar la aparente paradoja de que un mismo núcleo amigdalino participe en comportamientos en cierta medida antagónicos como son el cortejo y la agresión. Algunas investigaciones recientes apuntan a que la segregación funcional en la amígdala ocurriría a nivel de tipos celulares y no de núcleos (Choi et al., 2005), y esto supone un cambio de paradigma con importantes implicaciones funcionales, que exige nuevas aproximaciones experimentales para comprender la implicación de la amígdala en distintos aspectos del comportamiento y las consecuencias funcionales de sus anomalías.

El presente trabajo pretende aplicar este nuevo enfoque al estudio de la población neuronal de la amígdala medial extendida que expresa el factor de transcripción Otp y, en particular, la subpoblación que contiene el neuropéptido vasopresina (vasotocina en vertebrados no-mamíferos), que está involucrado en distintos aspectos del comportamiento social, como cuidados parentales y relaciones de pareja (Wang et al., 1994; Young et al., 1998).

La amígdala medial

Dentro de la amígdala, el núcleo de la amígdala medial es particularmente interesante por su papel tan crucial en diferentes aspectos del comportamiento social (Canteras et al., 1995; Swansson, 2000). La amígdala medial forma parte de la amígdala medial extendida, un corredor de células del telencéfalo basal que se extiende desde la amígdala centromedial al núcleo del lecho de la estría terminal (BST), el cual constituye el punto de salida más importante hacia los centros efectores del hipotálamo y tronco encefálico (Petrovich et al., 1984).

La principal función de la amígdala medial es procesar la información sensorial que recibe desde el bulbo olfatorio y otros núcleos amigdalinos, y controlar la función del hipotálamo, la región del cerebro encargada de la regulación hormonal. La amígdala medial tiene conexiones recíprocas con múltiples núcleos hipotalámicos, los cuales, a su vez, proyectan a numerosas regiones del tronco cerebral. Estas rutas de conexiones están relacionadas con la regulación del comportamiento social y reproductivo (Swansson, 1998; Choi et al., 2005).

En los mamíferos que dependen en gran medida de las señales olfatorias para la reproducción y otras interacciones sociales, como es el caso de los roedores, la amígdala medial es una estructura muy compleja constituida por cuatro subdivisiones: anterodorsal (MeAD), anteroventral (MeAV), posterodorsal (MePD) y posteroventral (MePV) (de Olmos et al., 1985, 2004; Canteras et al., 1995; Swansson, 2000; Martínez-García et al., 2012). En cuanto a las proyecciones a los centros preóptico e hipotalámico involucrados tanto en la defensa como en la reproducción, parece que las partes anterior y posteroventral de la amígdala medial están relacionadas con la agresión/defensa (Canteras et al., 1995; Dielenberg et al., 2001; McGregor et al., 2004; Fendt et al., 2005) mientras que la parte posterodorsal está más relacionada con el control neuroendocrino (Canteras et al., 1995; Simerly, 2004) y el comportamiento sexual (Fernandez-Fewell and Meredith, 1994; Bressler and Baum, 1996; Heeb and Yahr, 1996; Swansson, 2000; Simerly, 2004).

Estudios recientes sobre la amígdala medial en ratas adultas muestran la presencia de tres subpoblaciones diferentes de neuronas, cada una de las cuales expresa un factor de transcripción distinto (Lhx6, Lhx9 o Lhx5) teniendo un conjunto de proyecciones diferente y estando involucradas en diferentes funciones (Choi et al., 2005). (Figura 7)

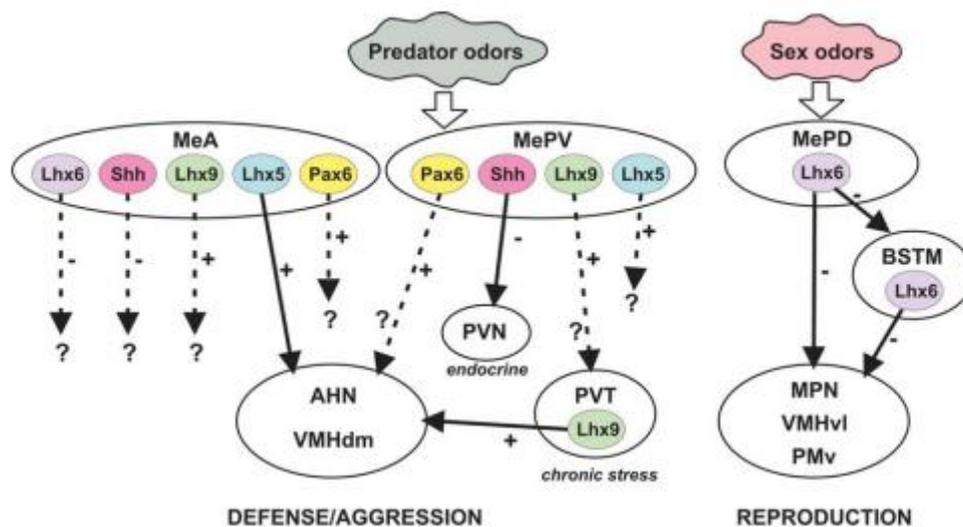


Figura 7. Diagrama que representa las diferentes subpoblaciones neuronales presentes en las subdivisiones de la amígdala medial en roedores, basándose en el diferente origen embrionario y perfil genético. Las conexiones de algunas de estas células son conocidas, lo que sugieren que cada subtipo celular principal está implicado en una ruta funcional concreta.

Abreviaciones: AHN, núcleo hipotalámico anterior; BSTM, núcleo medial de la estria terminal; MeA, amígdala medial anterior; MePD, amígdala posterodorsal; MePV, amígdala posteroventral; MPN, núcleo preóptico medial; PMv, núcleo premamilar ventral; PVN, núcleo hipotalámico paraventricular; PVT, núcleo talámico paraventricular; VMHdm, núcleo hipotalámico ventromedial, parte dorsal; VMHvl, núcleo hipotalámico ventromedial, parte ventrolateral.

Imagen extraída de "The olfactory amygdala in amniotes: An evo-devo approach", Abellán et al. 2013.

La población neuronal que expresa Lhx5 también expresa Otp, y está localizada en la parte anterior de la amígdala medial, preferentemente en la zona anteroventral (MeAV). Dichas células son activadas cuando se producen encuentros agresivos del animal con sus congéneres, y proyectan a targets hipotalámicos involucrados en la defensa. Además, algunas células Otp-positivas también están presentes en el dominio BST, incluyendo el BSTM (Bardet et al., 2008; García-Moreno et al., 2010) Se ha propuesto que esta subpoblación de neuronas que expresa Lhx5/Otp se origina en el hipotálamo.

Descripción del hipotálamo según el Modelo Prosomérico

El actual Modelo Prosomérico sostiene que el hipotálamo es una entidad rostral del cerebro anterior, situada en posición ventral al telencéfalo y rostral al diencefalo, que se subdivide dorsoventralmente en los dominios longitudinales alar, basal y suelo. Además queda separado rostrocaudalmente en dos regiones transversales: por un lado el hipotálamo terminal (la región más rostral), y por otro lado el hipotálamo peduncular (situado entre la región terminal y el diencefalo).

En base a estudios genoarquitectónicos y de migración celular, el área preóptica está excluida del hipotálamo, quedando así como parte del subpallio (Bulfone et al., 1993; Rubenstein et al., 1998; Puelles et al., 2000, 2004, 2012; Gelman et al., 2011; Bardet et al 2010; Medina y Abellán, 2012). (Figura 8)

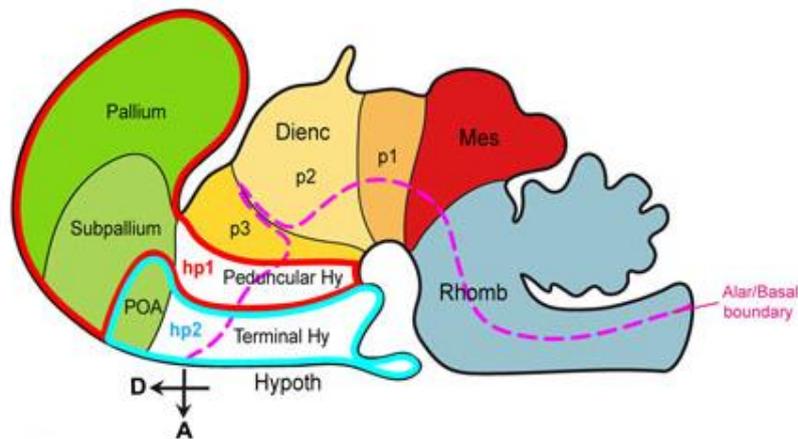


Figura 8. Esquema del cerebro anterior que representa la posición general, organización morfológica y subdivisiones principales del hipotálamo. Imagen extraída de “Regionalized differentiation of CRH, TRH, and GHRH peptidergic neurons in the mouse hypothalamus”, Morales-Delgado 2013.

La expresión diferencial de algunos genes del desarrollo muestra la existencia de un patrón dorsoventral a través del hipotálamo, definiendo dominios típicamente longitudinales que se superponen tanto sobre el hipotálamo terminal como el hipotálamo peduncular, y que además comparten unos marcadores moleculares determinados (Puelles et al., 2012).

El dominio alar más dorsal es el dominio Supra-Opto-Paraventricular (SPV) que se caracteriza por la expresión del gen homeobox *Ortopedia* (*Otp*) y la ausencia de la expresión de los genes *Dlx* (*Distal-less*) e *Islet-1*. Este dominio SPV produce neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas para los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular; y pequeñas subpoblaciones de estas células han sido observadas también en la amígdala medial y/o dominio BST de algunos roedores (de Vries and Buijs, 1983; Caffé et al, 1987; Wang, 1995; Wang and De Vries, 1995; Wang and Lufkin, 2000; de Olmos et al., 2004).

Recientes estudios muestran cómo células que expresan vasopresina y oxitocina son incapaces de diferenciarse en los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular de ratones *knockout* para el gen *Otp*; y además en estos mutantes, las células

vasopresinérgicas también desaparecen en la amígdala medial extendida (Wang and Lufkin, 2000). Basándose en esta evidencia, se ha sugerido que al menos, una parte de las células derivadas del SPV de la amígdala medial/dominio BST contienen vasopresina (Bupesh et al., 2011; Median et al., 2011).

En vertebrados no-mamíferos (pollos, anfibios, reptiles), el dominio SPV también expresa *Otp* y parece producir células para la amígdala medial-BST. En particular, en los pollos, este dominio también expresa *Lhx5*, y algunas células que expresan este factor de transcripción también se observan en la amígdala medial, pero su origen es incierto, ya que podrían derivar de la eminencia pretalámica que también expresa este gen *Lhx5* (Abellán et al., 2010). En cualquier caso, lo que sí parece probable es que la subpoblación celular que expresa *Otp* estuvo presente en la amígdala medial-BST de un antecesor amniota común (Medina et al., 2011).

Es interesante ver como el dominio SPV puede haber cambiado de tamaño durante la evolución de los amniotas debido a variaciones en la expresión del gen *Nkx2.1* en la zona alar del hipotálamo (Medina, 2008; van der Akker et al., 2008), y esto ha podido afectar a la migración de las subpoblaciones celulares derivadas del SPV a la amígdala medial (Medina et al., 2011). Como se ha mencionado anteriormente, se ha propuesto que el dominio SPV produce células vasopresinérgicas y oxitocinérgicas para el BSTM y para la amígdala medial en mamíferos. En el cerebro de estos vertebrados, la vasopresina y oxitocina juega un rol muy importante en diferentes aspectos del comportamiento social, incluyendo el reconocimiento social, cuidado maternal y los vínculos de pareja. Por consiguiente, una regulación negativa de *Nkx2.1* puede haber actuado como fuerza impulsora para la evolución de la amígdala medial extendida, y en la adquisición de un control más sofisticado del comportamiento social. (Figura 9)

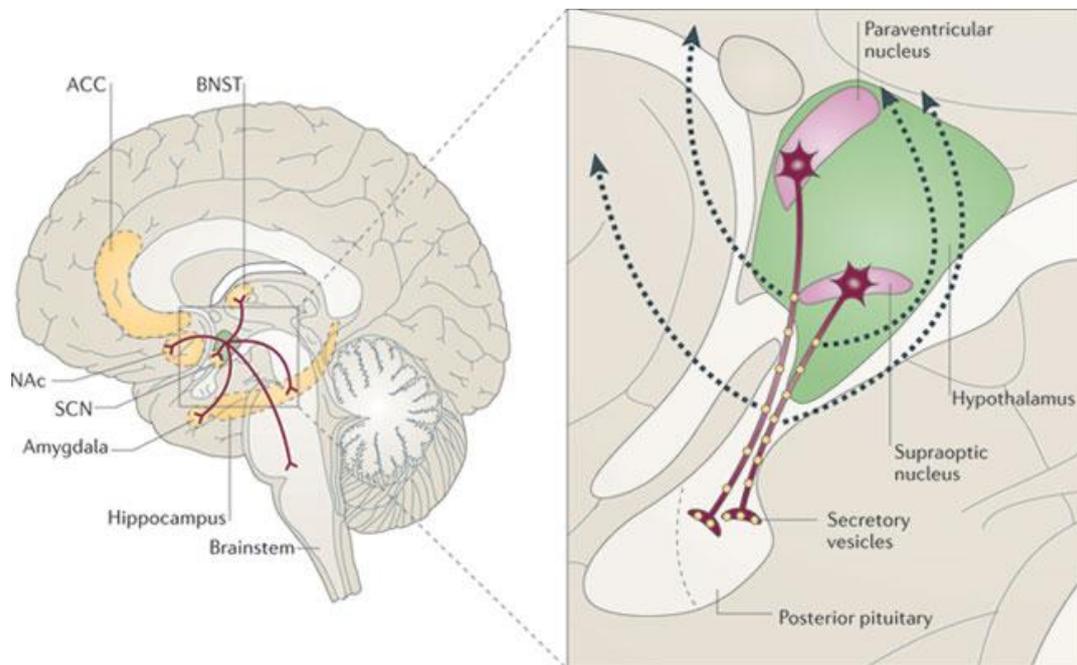


Figura 9. Neurofisiología de la Oxitocina y AVP. La oxitocina y vasopresina son sintetizadas en neuronas localizadas en los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo, y procesadas a lo largo de las proyecciones axonales en el lóbulo posterior de la hipófisis, en el que se almacenan en vesículas secretoras y se liberan en circulación periférica. Además de esta versión de terminales axonales, hay liberación de OXT y AVP en el espacio extracelular, lo que resulta no sólo en la acción local, sino también en su difusión a través del cerebro para alcanzar objetivos distantes. Por lo tanto, ambos péptidos tienen funciones periféricas y centrales.

Abreviaciones: ACC, corteza cingulada anterior; BNST, lecho del núcleo de la estría terminal; NAc, núcleo acumén; SCN, núcleo supraquiasmático.

Imagen extraída de "Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine", Andreas Meyer-Lindberg et al. 2011.

Aunque hay estudios previos sobre la distribución de vasopresina/vasotocina en el cerebro de distintas especies de vertebrados (incluyendo el pollo), existen discrepancias importantes sobre la localización de los distintos grupos neuronales que expresan este neuropéptido. Estas discrepancias pueden ser debidas a la dificultad para comparar áreas cerebrales homólogas en especies diferentes. Para este propósito el estudio del origen embrionario de estas neuronas en base al Modelo Prosomérico ha demostrado ser de gran utilidad. Estudios previos en el pollo han mostrado que el BSTm contiene células inmunoreactivas a la vasotocina, pero se desconoce su origen embrionario. Como ya se ha comentado anteriormente, algunos autores han sugerido que las neuronas con el mismo origen embrionario y perfil de expresión génica podrían estar interconectadas, proyectar a las mismas dianas, y estar involucradas en la misma función. Actualmente, se desconocen las proyecciones de las neuronas que expresan Otp y/o vasotocina. Nuestro trabajo pretende poner a prueba si las neuronas de la amígdala extendida que expresan vasotocina están interconectadas con las neuronas hipotalámicas vasotocinérgicas. Para realizar esta

investigación, se han llevado a cabo ensayos de inmunocitoquímica y trazado de conexiones para así estudiar la distribución de las células que expresan Otp y vasotocina y sus proyecciones.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo forma parte de una investigación más amplia en la que se analiza la organización y evolución de la amígdala utilizando un enfoque de la biología evolutiva del desarrollo, mediante el estudio de patrones de expresión combinatorio de determinados genes reguladores del desarrollo. Estos genes codifican factores de transcripción o proteínas de señalización que se expresan durante el desarrollo con unos patrones de combinación específicos que ayudan a delimitar las subdivisiones progenitoras básicas del tubo neural, así como sus derivaciones estructurales (Revisado por Puelles and Medina, 2002; Medina, 2007). Las secuencias codificantes de la mayoría de estos genes reguladores están altamente conservadas entre las diferentes especies de vertebrados, de la misma manera que también lo están sus patrones de expresión en el cerebro y médula espinal. Y son las variaciones evolutivas que han tenido lugar a nivel de regiones reguladoras de estos genes, o bien a nivel de factores de transcripción o cofactores que se unen a éstas, las que se cree que están detrás de la divergencia evolutiva (Carroll et al., 2001; Davidson, 2006).

Es por esto que el análisis comparativo de dichos genes es de especial importancia para (1) analizar molecularmente las diferentes subpoblaciones celulares de la amígdala, y así establecer una correlación entre orígenes embrionarios específicos, factores de transcripción y vías/rutas funcionales; (2) investigar la presencia de subtipos celulares idénticos en diferentes vertebrados mediante el análisis de factores de transcripción durante el desarrollo y (3) detectar posibles variaciones del desarrollo que pueden estar detrás de la evolución de la amígdala.

Este trabajo se centra en la expresión del Otp, un gen regulador del desarrollo altamente conservado. Este gen lo hemos estudiado en la amígdala de embriones de pollo (*Gallus gallus domesticus*) de 15 días (E15). El Otp emplea distintos mecanismos de regulación para modular la expresión de marcadores moleculares específicos en el hipotálamo en desarrollo (Wang et al, 2000). Su estudio nos interesa porque explica la capacidad de las neuronas inmigrantes de alcanzar una región cerebral alejada a la de su formación, es decir, las células neuronales que expresan este gen, son capaces de

desplazarse desde una zona cerebral concreta a otra. En estudios previos de otros autores, al inactivarlo de forma experimental (utilizando ratones *knockout*) descubrieron que las células del hipotálamo no podían iniciar su viaje migratorio para alcanzar los núcleos de la amígdala, lo que causaba una deficiencia celular que se traducía en un volumen menor de los núcleos que constituyen la amígdala (García Moreno et al., 2010). Además, el *Otp* inicia la cascada de diferenciación que da lugar a la expresión de vasopresina (AVP) (vasotocina en vertebrados no-mamíferos, AVT), de especial importancia por su papel en el comportamiento social.

Finalizado el periodo mitótico tiene lugar la migración neuronal (mecanismo que llevará a los cuerpos neuronales hasta el lugar donde realizarán sus funciones definitivas), y una vez alcanzado su destino, los neuroblastos se diferencian y desarrollan su arborización dendrítica y axonal estableciendo conexiones sinápticas con otras neuronas. La hipótesis con la que trabajamos es que las neuronas con el mismo origen embrionario en el hipotálamo, y que posteriormente migran hacia la amígdala, establecen conexiones sinápticas entre ellas. Es decir, algunas neuronas tienen la capacidad de abandonar su lugar de origen, el hipotálamo, y colonizar el cerebro anterior donde se mezclan con las neuronas “locales” para formar la amígdala, y su axón proyectaría a las neuronas del mismo fenotipo que permanecen en el hipotálamo. Con la investigación llevada a cabo en este trabajo pretendemos comprobar esta hipótesis mediante el estudio del origen y distribución de las neuronas que contienen vasotocina, sus patrones de migración y su conectividad neuronal.

La información que extraeríamos del estudio sería muy útil para entender mejor el conectoma, es decir, el conjunto de conexiones y circuitos funcionales que establecen las neuronas, y que nos permitirá obtener una descripción estructural del cerebro y una mayor profundización en sus mecanismos funcionales.

Por tanto, el objetivo del estudio de este trabajo se centra en entender el origen y distribución de neuronas que contienen vasotocina, sus patrones de migración y su conectividad neuronal. Y para ello, la investigación se ha dividido en las siguientes etapas:

1. Estudiar la expresión de vasotocina (AVT) y *Otp* en el cerebro de embriones de pollo de estadios avanzados, 15 y 18 días (E15, E18) mediante inmunocitoquímica.

2. Analizar la conectividad neuronal en embriones de estadios avanzados mediante ensayos de trazado de conexiones (utilizando como trazadores dextranaminas combinadas con fluorocromos) en cultivos organotípicos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se han utilizado embriones de pollo (*Gallus gallus domesticus*) de días embrionarios 15 (E15) y 18 (E18). Los animales han sido tratados de acuerdo a las regulaciones y leyes de la Unión Europea (2010/63/EU) y del Gobierno Español (Decreto Real 223/1998, más recientemente el Decreto Real 1021/2005) sobre el cuidado y manejo de los animales en investigación.

Los embriones de pollo se obtienen de huevos comprados en la Granja Santa Isabel (Córdoba), que se incuban a una temperatura de 37°C, y sus cerebros son procesados para llevar a cabo ensayos de inmunocitoquímica y para la preparación de cultivos organotípicos.

Se obtuvieron muestras de tejido de todos los animales para su posterior sexado genético, ya que las células inmunoreactivas a la vasotocina del BSTm aviar son sensibles a esteroides sexuales y presentan dimorfismo sexual, lo cual parece estar relacionado con las diferencias en el comportamiento entre machos y hembras (Panzica et al., 2001, 2012). Sin embargo todavía no se dispone de los resultados de dicho sexado, lo cual quedaría pendiente.

Perfusión

Los embriones de pollo recién sacados del huevo fueron anestesiados con una inyección intramuscular de una solución de Doletal (0.2mL, dilución 1:100). A continuación, se procedió a una inyección intracardíaca con suero fisiológico (5-10 mL) seguida de una inyección intracardíaca con el fijador paraformaldehído (7-10 mL, 4%). Posteriormente se extrae el cerebro y se deja en paraformaldehído 4% durante 15 minutos para seguidamente pelarlo (quitarle las meninges) y post-fijarlo in situ en paraformaldehído 4% (por inmersión), a una temperatura de 4°C, durante 24h y en agitación suave (30rpm).

Inmunocitoquímica

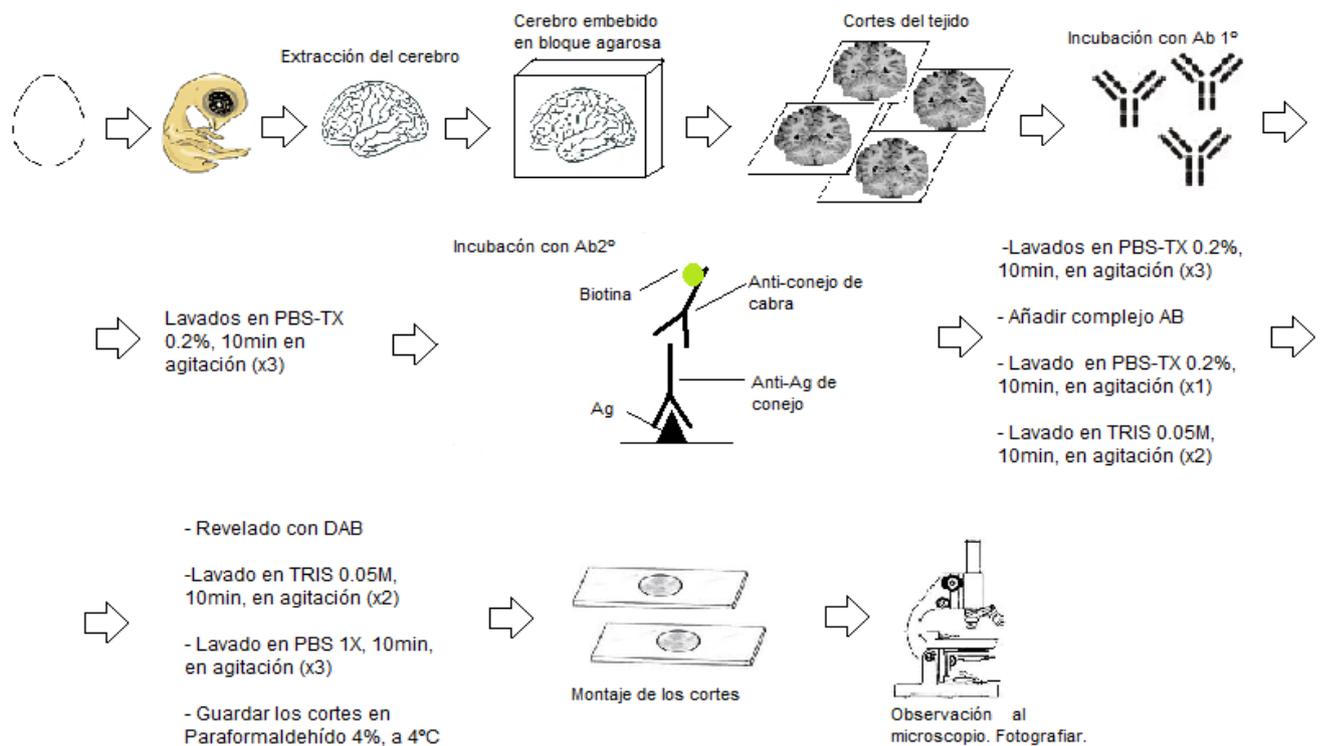
Para los ensayos de las poblaciones neuronales que expresan AVT y Otp fueron utilizados 12 cerebros embrionarios de pollo (7 de E15 y 5 de E18). Una vez fijados los cerebros, se encastraron en una solución de agarosa al 4% (Agarose D1 LOW EEO, 500g, Laboratorios Conda) a una temperatura de 40°C-42°C. Una vez solidificado el bloque con el cerebro embebido, se talló de forma que los cortes del tejido, de 80 µm de grosor, tuvieran un plano oblicuo (30°). El tejido fue cortado con el vibrátomo (Leica VT 1000S). Las secciones se guardaron en una solución de PBS 1X en una placa de 6 pocillos en series alternas, y posteriormente fueron procesadas mediante inmunocitoquímica para detectar AVT (en 3 cerebros de los E15 y 3 de los E18) y Otp (en 4 cerebros de E15 y en 2 de E18). (Ver en anexos tabla 2 para el seguimiento de los animales).

El proceso cuenta con una serie de 3 lavados con PBS-TX (0.2%) en agitación (56rpm) durante 10 minutos, un lavado en PBS-TX (0.2%)- H₂O₂ (0.9%) en agitación (50rpm) durante 20 minutos para reducir las peroxidasas endógenas, otra serie de tres lavados con PBS-TX (0.2%) en agitación (56rpm) durante 10 minutos y la incubación de los cortes de tejido con el anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios empleados fueron el anticuerpo anti-VP que reconoce la AVT y el anticuerpo anti-Otp para localizar las células que expresan este gen. (Ver tabla 1 para los detalles sobre los anticuerpos utilizados). Dichos anticuerpos fueron diluidos en PBS-TX al 0.2% en las medidas de 1:5000 y 1:1000+10% sérum de cabra respectivamente, y después incubados sobre los cortes del tejido durante 2 días a 4°C bajo una agitación suave (30rpm) y constante.

Tras la incubación y los posteriores lavados en PBS-TX al 0.2%, las muestras de tejido fueron incubadas con el anticuerpo secundario (anti-rabbit biotinilado, en una dilución 1:200) durante una hora y media a temperatura ambiente y en agitación constante a 50rpm. A continuación, y tras los respectivos lavados en PBS-TX al 0.2%, los cortes fueron incubados con el complejo avidina-biotina (ABC kit; Vector; dilución 0.003%) durante una hora a temperatura ambiente y en agitación constante (40rpm). La inmunomarcación fue revelada con el compuesto diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), y posteriormente fueron lavados varias veces con una solución de TRIS 0.05M y después con PBS-TX al 0.2%, siempre lavados de 10 minutos y en agitación constante a 50rpm. Finalmente los cortes se dejaron

sumergidos en paraformaldehído al 4%, durante 24 horas a 4°C para su posterior montaje.

Las secciones se montaron en un portaobjetos y se cubrieron con medio de montaje (Glycerol Gelatin, Sigma, GG1-15mL) a una temperatura de 50°C para posteriormente colocar el cubreobjetos. A continuación se estudiaron y fotografiaron con un microscopio Leica modelo DMR con una cámara Zeiss modelo AxioCam HRc. (Figura



10)

Figura 10. Representación esquemática del proceso de un ensayo de inmunocitoquímica.

Tabla 1. Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Antígeno reconocido	Inmunogen	Información general	Dilución
Anti-VT	Vasotocina	Arginina-vasopresina (Sigma) conjugado con tiroglobulina	EMD Millipore corporation; rabbit polyclonal	1:5000
Anti-Otp	Orthopedia Homeobox (Otp)	Péptido sintético dirigido hacia el C-terminal del Otp humano	Antibodies-online GmbH (Germany); rabbit polyclonal	1:1000+10% sérum normal de cabra

Cultivos organotípicos

Para estudiar la conectividad neuronal, se hicieron cultivos organotípicos con los cortes de los cerebros embrionarios de pollos E15 (2 cerebros en total). Para su extracción, los embriones se depositaron sobre una placa de disección con medio de cultivo de glucosa, oxigenado y sobre una base de hielo para mantener en todo momento al órgano vivo.

Los cerebros fueron cortados en láminas de 300 μm de grosor y en un plano oblicuo (30°) utilizando el vibrátomo (Leica VT 1000S). A continuación, los cortes fueron depositados sobre una placa de cultivo porosa (Millicell-CM, 0.4 μm pore diameter; 30 mm insert diameter; Millipore) e incubados con el medio de cultivo DMEM (DMEM F-12, Gibco, supplemented with 5% fetal bovine serum, 0.1mM glutamine, 6.5mg/ml D-glucose, 1% supplement N2, and 1% penicilline) en una incubadora de CO₂ al 5% y a 37°C durante una hora, antes de la aplicación del trazador axónico dextramina de 3000 MW con Texas Red (Molecular Probes, D-3328) mediante un capilar de vidrio, sobre la zona del dominio hipotalámico Supra-Opto-Paraventricular (SPV), también en la parte medial sobre los núcleos de la estría terminal (BSTm) y en la amígdala medial (MeA). Una vez aplicado el trazador axónico, los cortes del tejido fueron incubados en el medio de cultivo neurobasal (Neurobasal; Gibco; supplemented with 5% fetal bovine serum, 0.1mM, glutamine, 6.5 mg/ml D-glucose, 1% supplemented B27; Gibco; and 1% penicillin) en la incubadora de CO₂ al 5% y 37°C durante 24 horas. Transcurrido este periodo, los cortes fueron fijados con un tampón fosfato de paraformaldehído al 4% (pH 4.7) durante 8 minutos y posteriormente, guardados en un sistema tampón fosfato (0.1M, pH 7.4) que contiene ácido de sodio al 0.1%, hasta la observación y análisis de las muestras en el microscopio confocal (Leica TCS SP2).

6. RESULTADOS

6.1 Experimentos de localización de Otp y vasotocina

Desde edades muy tempranas del desarrollo, el patrón adulto de las agrupaciones neuronales del sistema hipotalámico-hipofisario que se observa en pollos queda bien establecido (Tennyson et al., 1986). En este trabajo prestamos especial atención a los resultados obtenidos en pollos E15 en los que la expresión de AVT y Otp ya se manifiesta con notoriedad, y también en E18 en los que esta expresión todavía es más remarcada.

Los anticuerpos empleados en los ensayos de inmunocitoquímica han funcionado correctamente. Por su parte, el anticuerpo anti-VT nos ha permitido observar la morfología de las células, ya que éstas acumulan el neuropéptido en el citoplasma, por lo que se pueden ver con gran detalle las dendritas y axones de las neuronas. Por otra parte, con el anticuerpo anti-Otp, observamos cómo el marcaje queda restringido al núcleo de las células, puesto que es un factor de transcripción y la proteína se acumula en el núcleo.

En cuanto a los ejemplares utilizados, en los embriones de pollo E15 se observan células vasotocinérgicas en muchas regiones encefálicas (incluidas las de interés como el dominio SPV, el corredor de células del BSTm y la amígdala medial), al igual que ocurre con los E18, aunque en este caso, tal y como se ha comentado anteriormente, el número de células es mayor, puesto que se encuentran en un estadio más avanzado del desarrollo.

Además, hemos apreciado cierta variabilidad en la expresión de AVT particularmente al ver que uno de los ejemplares de 18 días (E18) presentó una expresión más restringida del neuropéptido (no se observó marcaje en algunos núcleos), y aunque no se han sexado todavía los animales (queda pendiente), este hecho se podría relacionar con el dimorfismo sexual ya comentado anteriormente, y en el que los machos muestran una expresión mayor que las hembras.

A continuación se describirán los diferentes grupos vasotocinérgicos del prosencéfalo en relación con los dominios propuestos por el Modelo Prosomérico.

6.1.1 Expresión de Otp

La expresión de Otp es de gran utilidad a la hora de delimitar los diferentes dominios embrionarios del prosencéfalo y de las distintas subdivisiones de la amígdala medial extendida. La expresión diferencial de este gen del desarrollo muestra la existencia de un patrón dorsoventral a través del hipotálamo, que define típicamente dominios longitudinales que se superponen tanto sobre el hipotálamo terminal como el hipotálamo peduncular.

Las zonas de mayor densidad celular Otp-positivas indican la localización del dominio SPV, y esto nos ha servido para compararlo con los resultados obtenidos con vasotocina. Además, hemos observado que en regiones no pertenecientes al dominio SPV, pero en las que se observa expresión de vasotocina, también la hay de Otp, lo cual sugiere que todas las neuronas AVT-positivas podrían derivar del dominio SPV y habrían alcanzado otras localizaciones en los diferentes campos cerebrales por migración tangencial. (Fig.11)

FIGURA 11. COMPARACIÓN Otp-AVT

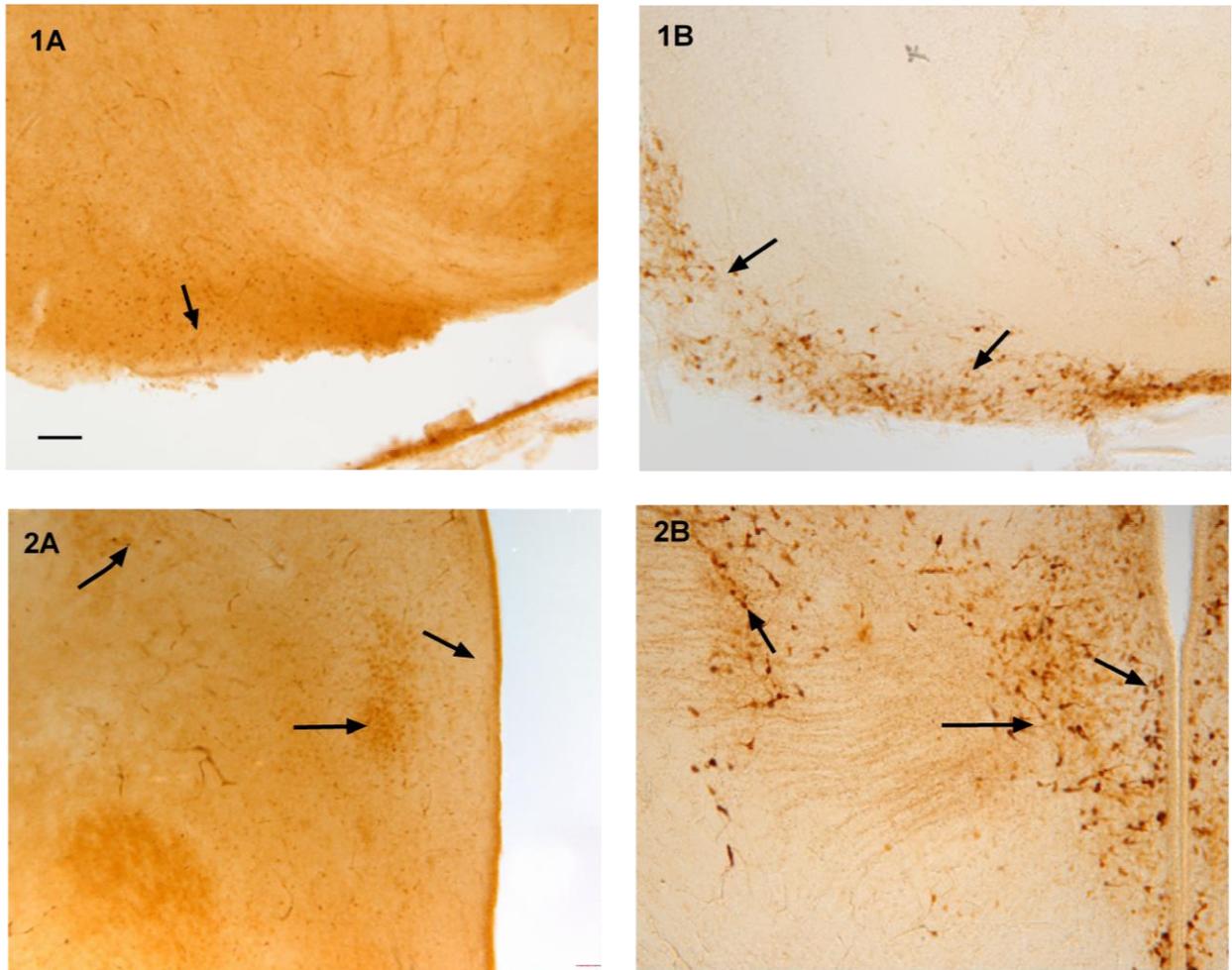


Fig.11 A-B. Comparación de la expresión de Otp (columna izquierda, A) y de AVT (columna derecha, B) en cortes cerebrales de pollo E15. **1,** Nivel telencefálico, se observan células neuronales localizadas en la región subpial rostral, **A,** la flecha señala los núcleos celulares Otp positivos; **B,** se aprecian los somas y algunas dendritas de las células AVT-positivas. **2,** Nivel del dominio Supra-Opto-Paraventricular (SPV) (nivel hipotalámico). **A,** células OTP-positivas en posición que corresponde a los grupos AVT-positivos del SPV peduncular (SPVp): el periventricular (Gp) próximo al tercer ventrículo (v3), el grupo medial (Gm) y algunas células del grupo lateral (Gl); **B,** se observa la expresión de AVT en los mismos grupos celulares. Barra=100µm

6.1.2 Expresión de Vasotocina (AVT)

El neuropéptido arginina-vasotocina (AVT, en no-mamíferos) y su homólogo en mamíferos, arginina-vasopresina (AVP) influyen en una gran variedad de comportamientos sexuales típicos y propios de cada especie de vertebrados, y además proporcionan un sustrato neural integrador para la modulación dinámica de dichos comportamientos mediante estímulos endocrinos y sensoriales.

En los resultados obtenidos observamos cómo las células neuronales AVT-positivas están localizadas principalmente en el hipotálamo, formando parte del dominio Supra-Opto-Paraventricular (SPV) y del dominio Supraquiasmático (SC). Además, también se observan en el telencéfalo, en particular en la región subpalial. Y al mirar las fibras, se puede ver cómo estas neuronas proyectan a otras regiones del cerebro y de la hipófisis.

Hipotálamo

❖ Dominio Hipotalámico Supra-Opto-Paraventricular (SPV)

En este dominio se aprecian dos regiones bien diferenciadas, por un lado la región hipotalámica terminal en una posición ventral al área preóptica (respecto al eje neural), y por otro lado la región hipotalámica peduncular caudalmente respecto a la terminal y rostral al diencéfalo.

Región hipotalámica terminal (SPVt): Se observan dos grandes grupos celulares AVT-positivos.

-Grupo celular periventricular (Gp): Donde predominan las neuronas parvocelulares y sobre todo de tamaño medio. Hay muy pocas magnocelulares. (Fig.12B)

-Grupo celular superficial (Gs): Constituido por neuronas magnocelulares y de tamaño medio, que podrían corresponder con el núcleo supraóptico rostral o ventral de otros autores. (Fig.12B)

Región hipotalámica peduncular (SPVp): Se observan cinco grupos celulares vasotocinérgicos.

-**Grupo celular periventricular (Gp):** Son células neuronales principalmente parvocelulares y de tamaño medio, con alguna neurona magnocelular. (Fig.12D)

-**Grupo celular medial (Gm):** Está formado por neuronas parvocelulares y alguna magnocelular esporádica. (Fig.12D)

-**Grupo celular lateral (Gl):** Es un grupo que contiene un gran número de células, la mayoría son neuronas magnocelulares, con la presencia de algunas parvocelulares. Determinados autores las han considerado como parte del corredor amígdalo-hipotalámico y han denominado a este grupo como BSTm3. (Fig.12D)

-**Grupo lateral-dorsal (Gld):** A niveles caudales se observa en una posición próxima al ventrículo lateral una población AVT-positiva formada por neuronas de gran tamaño, que en algunos cortes parece mostrar una continuidad con el grupo lateral. Este grupo algunos autores lo denominan BSTmc (Fig.12E).

-**Grupo celular superficial (Gs):** Constituido completamente por neuronas magnocelulares que podrían corresponder al núcleo supraóptico externo (SOe). (Fig.12D)

❖ **Dominio Hipotalámico Supraquiasmático (SC)**

En este dominio se observan células de tamaño medio y pequeño a nivel periventricular. Se puede ver una continuidad entre estas neuronas y las del grupo periventricular del dominio SPV, lo cual sugiere que podrían derivar y descender de este dominio. (Fig.12C, 12D, 12E)

Telencéfalo

Región Subpial: En esta región telencefálica se distinguen cuatro grupos celulares de neuronas AVT-positivas.

-Grupo celular subpalial rostral (Spr): Está situado en una posición lateral y medial a la banda diagonal, lo cual sugiere que estas células podrían derivar del grupo superficial del dominio SPV. (Fig.13A; Fig.14A)

-Grupo celular periventricular (Gp): Está formado por neuronas de tamaño medio y parvocelulares situadas próximas al tercer ventrículo (v3) del dominio preóptico (PO). Se observa una continuidad entre estas células y las que se localizan en el dominio SPV, es decir, este grupo celular periventricular podría derivar del SPV y haber migrado dorsalmente hasta su posición actual. (Fig.12B)

-Grupo celular en relación al núcleo de la comisura anterior (Gca): Es un grupo de células de tamaño medio con algunas neuronas magnocelulares localizadas en la zona periférica del tracto de la comisura anterior (ca). (Fig.12C; Fig.14B)

-Grupos de la amígdala medial extendida: Es un conjunto de grupos neuronales vasotocinérgicos diferentes:

-Grupos parvocelulares del BSTm: Situados en una posición medial, se distinguen dos núcleos: el núcleo dorsolateral (BSTm1) y el núcleo ventromedial (BSTm2). (Fig.12D; Fig.14C)

-Grupo de la amígdala medial (MeA): En una posición ventromedial a la amígdala central, se encuentran unas pocas células de tamaño magnocelular y con poca expresión del neuropéptido AVT. Estas células parecen estar en relación con el núcleo supraóptico externo (SOe). (Fig.12C; Fig.14D)

Distribución de las fibras vasotocinérgicas

Las fibras procedentes de las células neuronales vasotocinérgicas que se observan pueden ser tanto gruesas como delgadas. Las fibras gruesas abandonan el PVN y el SO y corren por el hipotálamo lateral para migrar ventralmente en dirección a la eminencia media y la neurohipófisis. Por su parte, las fibras AVT-positivas delgadas son observadas en múltiples regiones del cerebro, incluyendo el telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo. La morfología de estas fibras puede variar desde hilos cortos o largos lisos, hasta estructuras punteadas que sugieren la existencia de terminales axónicos (botones de paso) (Fig.15B)

FIGURA 12. EXPRESIÓN DE AVT (E15)

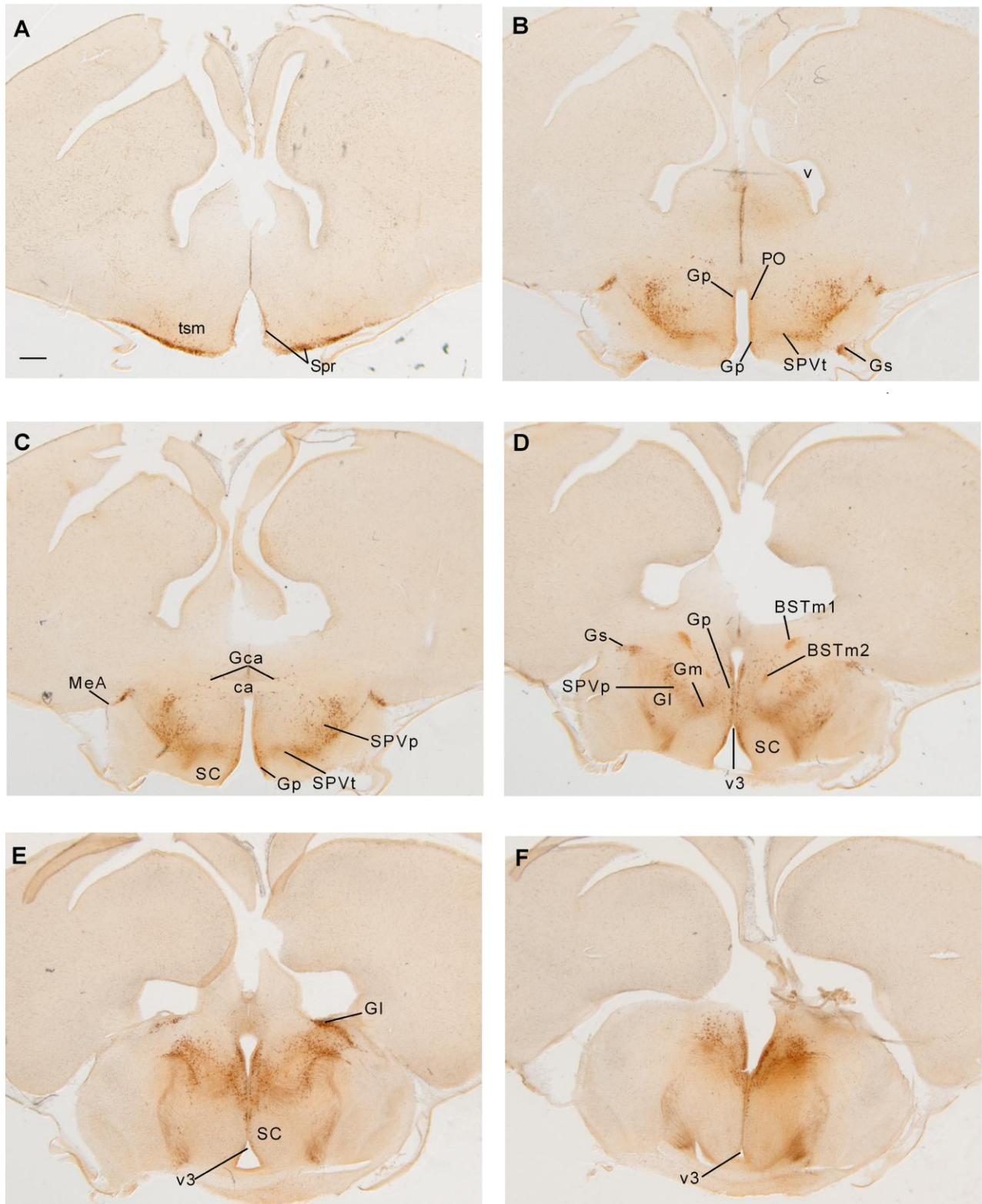


FIG.12 A-F. Expresión de vasotocina en cortes cerebrales ordenados de rostral (A) a caudal (F) en el estadio E15 de pollo. **A,** Nivel telencefálico, se observa el grupo celular subpalial rostral (Spr). También el tracto septomesencefálico (tsm) por encima de este grupo celular. **B,** Nivel del dominio Supra-Opto-Paraventricular (SPV), detalle del SPV terminal, se observa sus grupos periventricular (Gp) y superficial (Gs). También se ve el dominio preóptico (PO) y el grupo periventricular (Gp) de la región preóptica. **C,** A nivel telencefálico, se observa el grupo celular de la comisura anterior (Gca); a nivel hipotalámico se ve el dominio supraquiasmático (SC), la región SPV terminal (SPVt) y la región SPV peduncular (SPVp). **D,** Nivel hipotalámico, se ve el dominio SPV peduncular (SPVp) con los grupos celulares periventricular (Gp), medial (Gm), lateral (Gl) y superficial (Gs); Nivel telencefálico subpalial, se observan dos grupos diferenciados de neuronas parvocelulares en el dominio BSTm: el núcleo BSTm1 y el núcleo BSTm2. Además se detalla la localización del tercer ventrículo (v3) y de nuevo la del dominio supraquiasmático (SC). **E,** Nivel hipotalámico, se observa el dominio SC, y el grupo lateral-dorsal (Gld) de la región SPVp que algunos autores lo han denominado BSTmc y que se localiza próximo al ventrículo lateral (v). **F,** Se observa de nuevo el tercer ventrículo (v3) y marcaje a nivel caudal del SPVp. Barra=500µm

FIGURA 13. EXPRESIÓN DE AVT (E18)

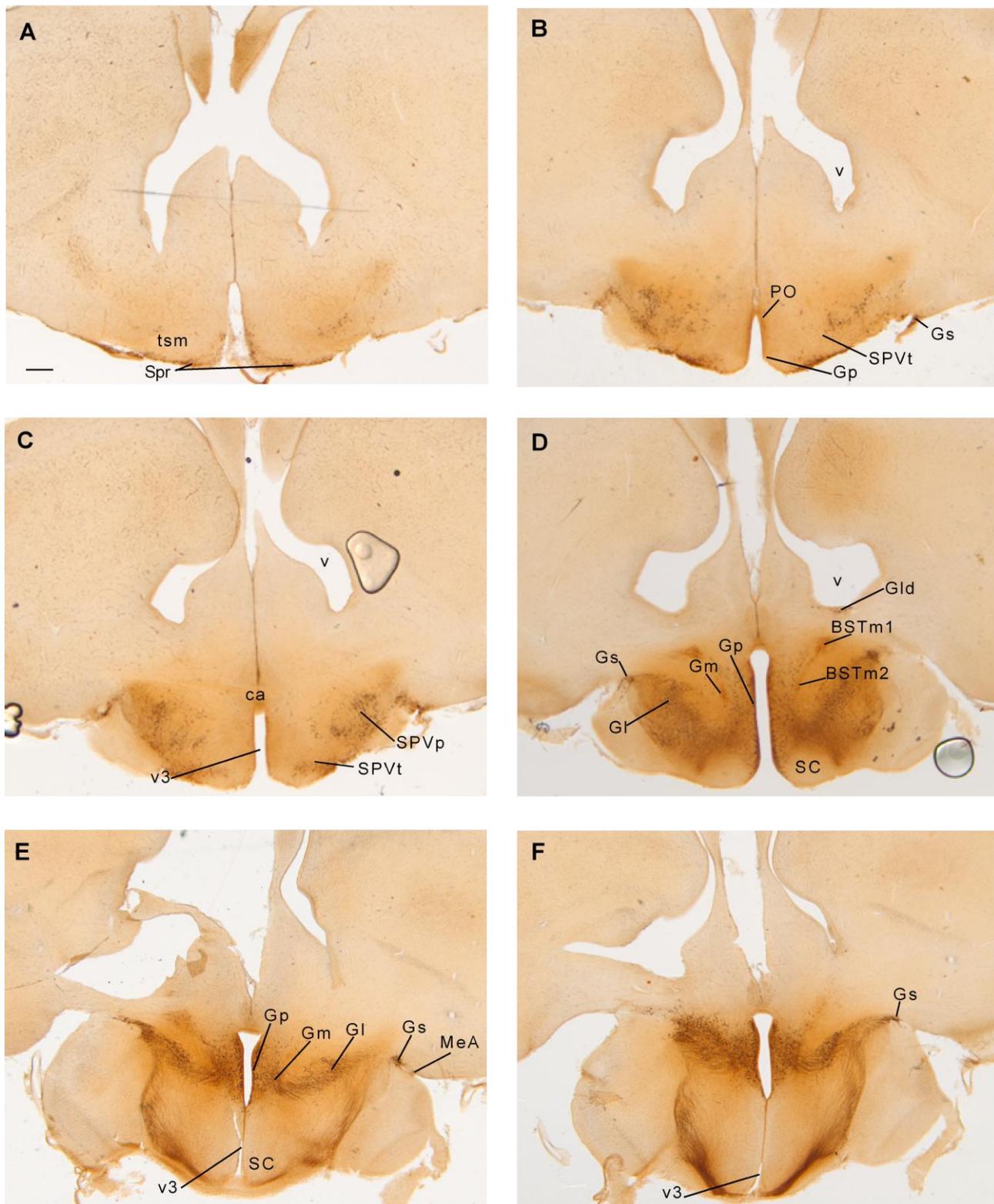


Fig.13 A-F. Expresión de vasotocina en cortes cerebrales ordenados de rostral (A) a caudal (F) en el estadio E18 de pollo. Se observan los mismos dominios y grupos celulares que en E15. **A**, Nivel telencefálico, se observa el grupo celular subpalial rostral (Spr) en posición lateral y medial a la banda diagonal. También el tracto septomesencefálico (TSM) por encima de este grupo celular. **B**, Nivel del dominio Supra-Opto-Paraventricular (SPV), detalle del SPV terminal, se observa sus grupos periventricular (Gp) y superficial (Gs). También se puede ver el dominio preóptico (PO). **C**, A nivel telencefálico, se observa la comisura anterior (ca); a nivel del dominio SPV (nivel hipotalámico), se detallan las posiciones de las regiones del SPV terminal (SPVt), y el SPV peduncular (SPVp). También se observa el tercer ventrículo (v3). **D**, Nivel hipotalámico, se ven los grupos celulares periventricular (Gp), medial (Gm), lateral (Gl) y superficial (Gs) que forman parte del dominio SPVp. A este mismo nivel también se observa el dominio supraquiasmático; Nivel telencefálico subpalial, se observan dos grupos diferenciados de neuronas parvocelulares en el dominio BSTm, el núcleo BSTm1 y el núcleo BSTm2, y el grupo celular lateral-dorsal (Gld) en posición dorsal y en contacto con el ventrículo lateral (v) de la región SPVp que algunos autores lo han denominado BSTmc. **E**, Nivel hipotalámico, se observa el dominio SC, y se ven los grupos celulares periventricular (Gp), medial (Gm), lateral (Gl) y superficial (Gs) que forman parte del dominio SPVp; Nivel telencefálico, se observa el grupo celular de la amígdala medial (MeA). **F**, Se observa de nuevo la posición del tercer ventrículo (v3). Barra=500µm

FIGURA 14. DETALLES NEURONALES

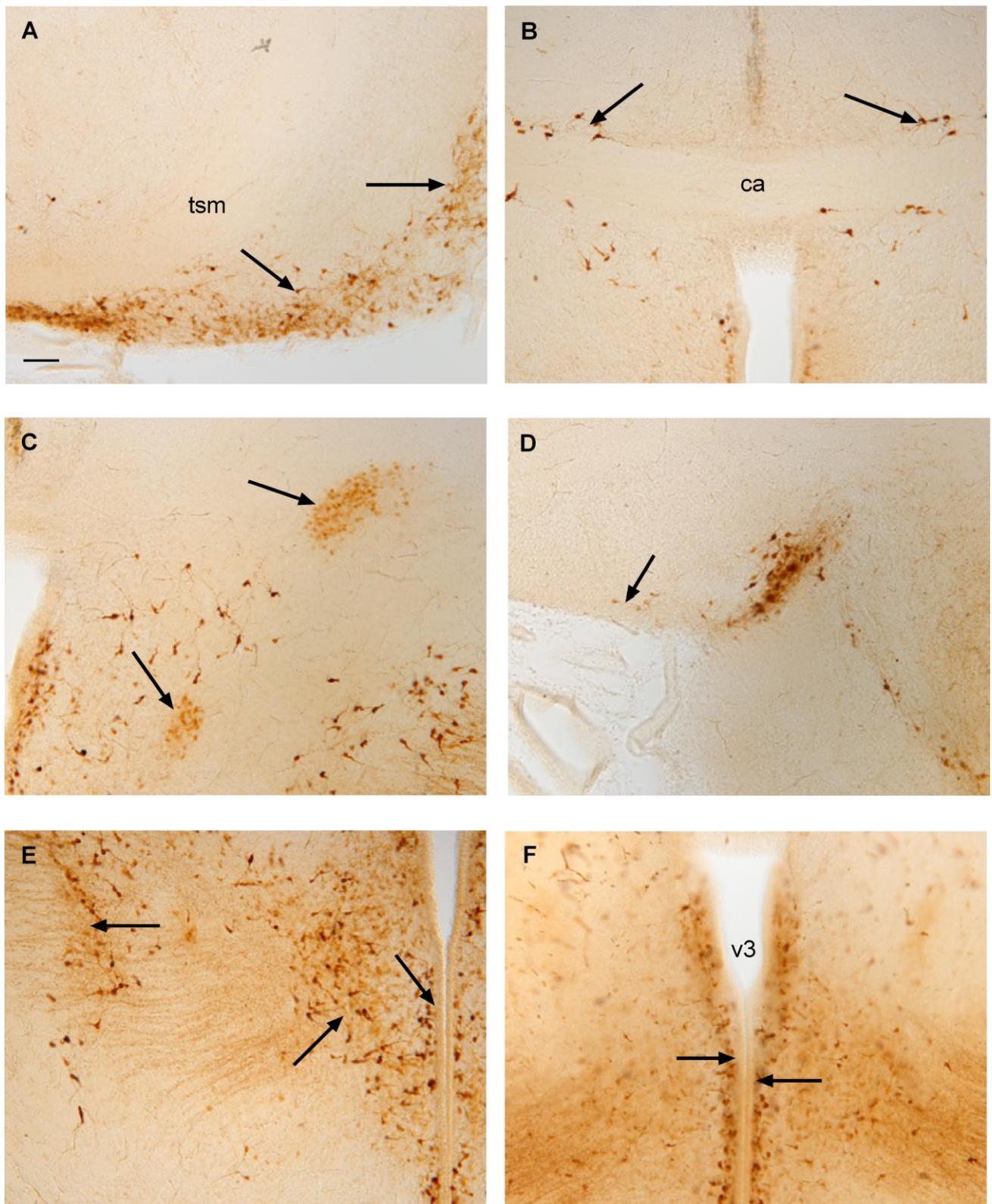


Fig.14 A-F. Detalles de zonas cerebrales de interés con expresión de AVT en cortes de cerebros de pollo E15. **A**, Nivel telencefálico, observan neuronas en la región subpial rostral. Se pueden ver los cuerpos celulares de las neuronas y en algunas de ellas también las dendritas y axones. **B**, Nivel telencefálico, se observa la comisura anterior (ca) y a ambos lados neuronas de tamaño medio con algunas magnocelulares. **C**, Nivel telencefálico subpial, se observa en detalle dos grupos diferenciados de neuronas en el dominio BSTm, el núcleo BSTm1 en posición dorsolateral, y el núcleo BSTm2 en posición ventromedial. Nótese la diferencia entre estas neuronas, que son parvocelulares, y el resto de neuronas que son de tamaño medio y magno. **D**, Nivel telencefálico, se pueden observar unas pocas neuronas inmunorreactivas en la amígdala medial (MeA). Son células magnocelulares con poca expresión de AVT que parecen estar en relación con el grupo superficial (Gs) del SPVp (que algunos autores denominan núcleo supraóptico externo, SOe). **E**, Nivel hipotalámico, se observan los grupos periventricular (Gp), medial (Gm) y lateral (Gl) del SPVp. **F**, Nivel hipotalámico, se puede observar en gran detalle el tercer ventrículo (v3) y cómo se distribuyen las neuronas a lo largo de sus paredes. También se aprecia la fina capa de células endimarias que lo recubren (AVT-negativas). Barra=100µm

FIGURA 15. DETALLES NEURONALES

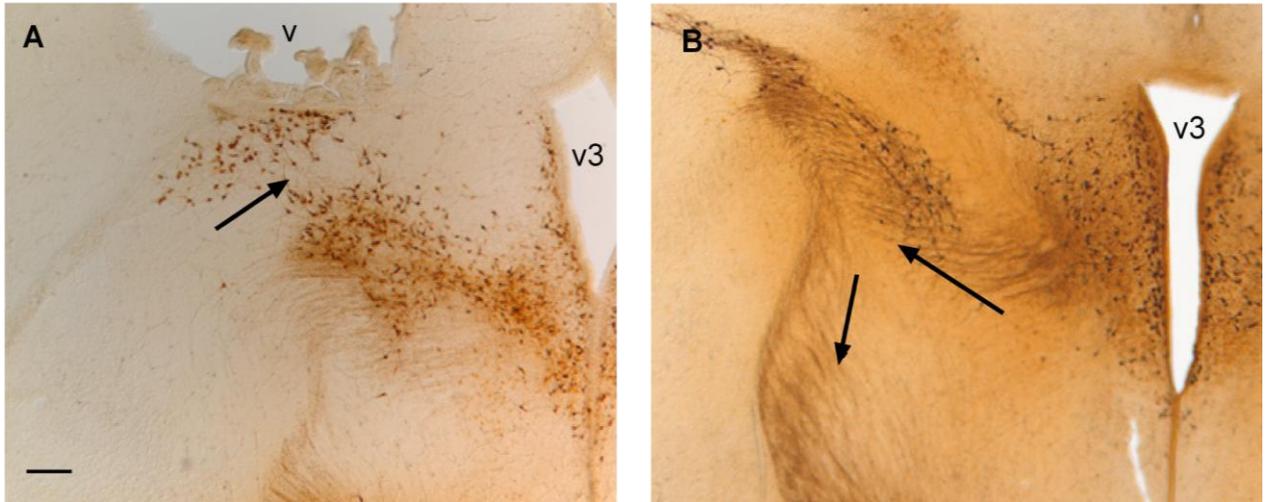


Fig.15 A-B. Detalles de zonas cerebrales de interés con expresión de AVT en cortes de cerebros de pollo E15 (A) y E18 (B). **A**, Nivel hipotalámico, se observa a nivel del dominio SPVp el grupo celular lateral (Gl) y el grupo lateral-dorsal (Gld) próximo a la superficie del ventrículo lateral (v) y que otros autores denominan BSTmc. Se puede apreciar algunas neuronas (flecha) entre ambos grupos celulares. **B**, Nivel hipotalámico, se ven los axones correspondientes a los grupos celulares periventricular (Gp) y medial (Gm) del SPVp (que otros autores denominan núcleo paraventricular, PVN) y los procedentes del grupo celular superficial de este mismo dominio SPVp (lo que algunos autores denominan núcleo supraóptico externo, SOe) que convergen lateralmente y discurren en dirección ventral (hacia la eminencia media y la neurohipófisis). Las flechas marcan la dirección de las fibras. Barra=100µm

6.2 Experimentos de trazado de conexiones

El estudio del trazado de conexiones es fundamental para así poder establecer los circuitos neuronales.

Las 100.000 millones de neuronas junto con las miles de millones de conexiones hacen de los seres humanos lo que somos. Todos los vertebrados poseen un sistema nervioso central en el que se distinguen agrupaciones de cuerpos neuronales (centros nerviosos) separados por haces de fibras (tractos) que conectan a unos centros con otros o con estructuras periféricas. Se trata de un auténtico sistema de conexiones con capacidad de controlar la captación de estímulos, procesar la información y elaborar respuestas adecuadas a éstos.

En primer lugar, los resultados obtenidos en estos experimentos (Figura16) han demostrado que todas las variables a tener en cuenta las hemos escogido correctamente. Por un lado, la edad embrionaria de los pollos seleccionados (E15) ha sido la adecuada ya que en los experimentos de expresión de AVT y Otp en este estadio del desarrollo ya se observaba un gran número de células vasotocinérgicas y Otp-positivas; además el ángulo de corte del cerebro (30° aproximadamente) ha permitido observar tanto las células AVT-positivas hipotalámicas como las que han migrado al BSTm de la amígdala medial extendida, es decir todo el corredor celular de nuestro interés. También hemos comprobado que los cortes sobreviven adecuadamente a los tiempos de incubación (entre 6h y 24h), que el trazador axónico empleado funciona correctamente (los somas neuronales, pero sobre todo los axones quedan muy marcados y definidos al observar la preparación en el microscopio confocal) y que el transporte celular se desarrolla con normalidad y según lo previsto.

En cualquier caso, estos resultados obtenidos son sólo unos resultados preliminares. Ha sido una puesta en marcha de la técnica. El interés radica en ver si las neuronas con el mismo origen embrionario, que posteriormente migran a diferentes zonas del cerebro, mantienen una conexión.

FIGURA 16. EXPERIMENTO DE TRAZADO DE CONEXIONES

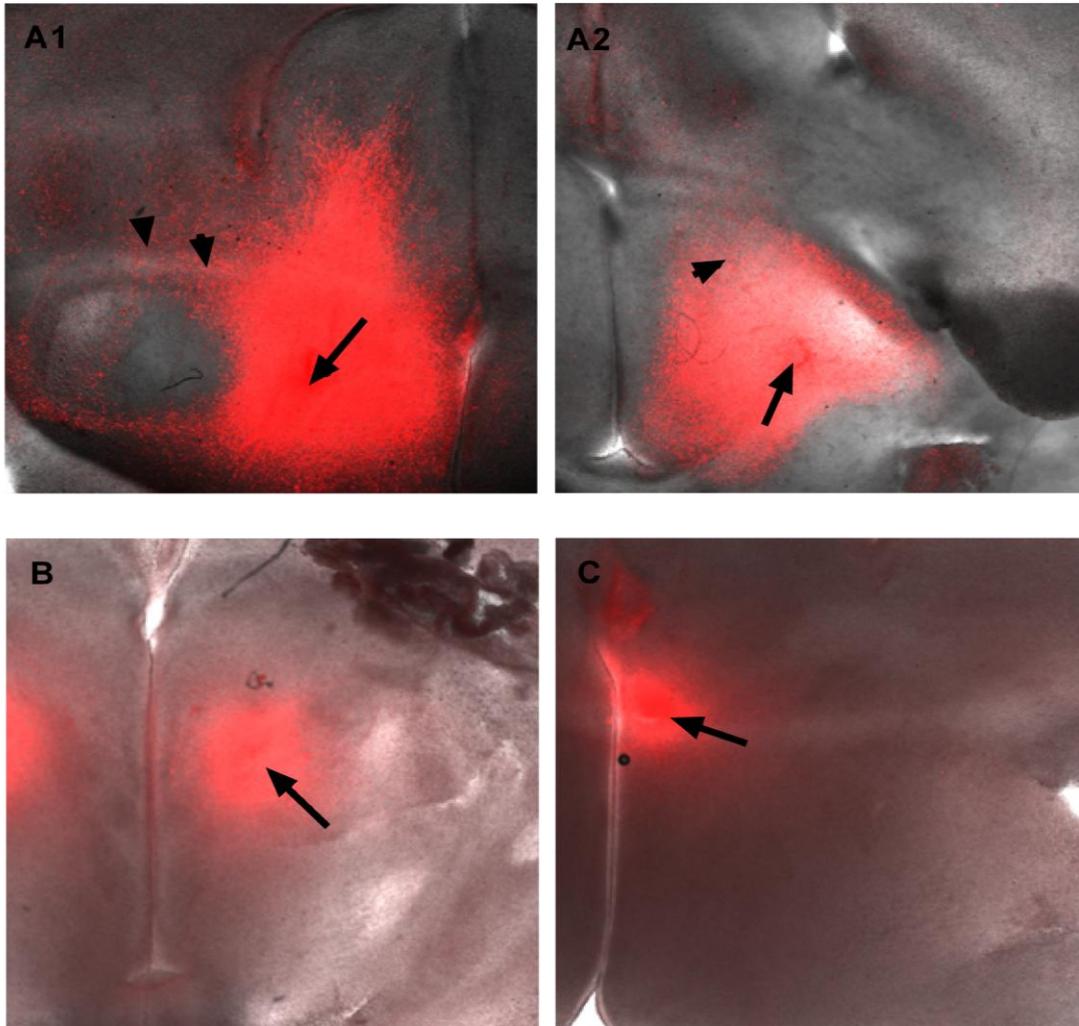


Fig.16 A-C. Imágenes tomadas en microscopio confocal Leica TCS SP2, a 4x, con el trazador dextranamina Texas Red de cerebro de pollo E15. **A**, se corresponde a un mismo corte cerebral, tanto en A1 (hemisferio izquierdo) como en A2 (hemisferio derecho), la zona de deposición del trazador (marcado en la imagen con una flecha) se corresponde a la región del dominio SPV peduncular, y lo que se observan son células en la zona del dominio del BST (marcado en la imagen con una flecha). **B**, la zona del pinchazo (marcado en la imagen con una flecha) se ha hecho en una posición más ventral del dominio SPV peduncular, a penas se observan células en este tipo de corte, que ya es demasiado caudal. **C**, se corresponde a un corte cerebral en el que la zona del pinchazo del trazador (marcado en la imagen con una flecha) es a nivel preóptico-comisural. No se aprecian a penas células en la zona de interés (el corredor BSTm).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los experimentos de localización de Otp y vasotocina sugieren que las células neuronales vasotocinérgicas derivan del dominio SPV y han migrado tangencialmente a otras regiones cerebrales. Además el análisis de las fotografías de las células con expresión de Otp nos ha permitido localizar el dominio SPV y ver cómo coincide al comparar su posición con los resultados obtenidos en vasotocina. En estos últimos resultados, también podemos apreciar cómo las neuronas AVT-positivas proyectan a regiones del cerebro diferentes, incluyendo la hipófisis.

En cuanto a los resultados de los experimentos de trazado de conexiones, aunque todavía no son firmes o contundentes, nos han permitido poner a punto la técnica. Lo que propinan estos resultados es probar de explicar que aquellas neuronas con el mismo origen embrionario, y que después migran a diferentes regiones cerebrales, permanecen conectadas.

Comparación de nuestros resultados con estudios previos

En primer lugar, en cuanto a la comparación de los resultados obtenidos en esta investigación sobre el pollo, con estudios similares realizados con otras aves, parece ser que el patrón de distribución de células neuronales AVT-positivas que hemos observado en este trabajo, también ha sido descrito en otras especies aviares, tanto oscinas como no-oscinas (Kiss et al., 1987; Balthazart et al., 1996). Por ejemplo, en todas las aves galliformes, incluido el pollo, las células vasotocinérgicas de la región preóptica periventricular están dispersas a lo largo de la pared del tercer ventrículo (Viglietti-Panzica, 1986). El grupo de células de la región del núcleo BSTm está también descrito en ambos tipos de aves, oscinas (Kiss et al., 1987) y no oscinas (Aste et al., 1998). Además, en el caso de las galliformes, algunas neuronas de tamaño medio y magnocelular se pueden observar en la región más rostral del tálamo dorsal, mientras que por su parte, éstas no están presentes en las especies aviares oscinas (Kiss et al., 1987), dato que también se ha visto en este estudio.

Según otros autores (Tennyson et al., 1986), la distribución de los grupos neuronales en el hipotálamo, en pollo, queda establecida entre los estadios E12 y E17 del desarrollo embrionario. En este trabajo, observamos cómo en embriones de pollo E15

(un estadio intermedio a los citados en el trabajo de Tennyson et al., 1986) las neuronas AVT-positivas ya muestran una distribución y organización concreta y característica.

Haciendo una comparación de los resultados obtenidos en pollo con dos aves en particular, hemos analizado los estudios de Berck et al. (1982) en la paloma y de Goossens et al. (1977) sobre el estornino. La posición de las neuronas vasotocinérgicas que forman parte del sistema hipotalámico-hipofisario del pollo exhibe muchas similitudes con la posición de neuronas AVT-positivas en estas otras dos especies de aves, aunque con algunas diferencias claras. Por ejemplo, los somas neuronales AVT-positivos parecen extenderse en grandes cantidades de forma más rostral en el pollo que en el estornino, particularmente los grupos celulares ventrales y laterales. El grupo superficial del dominio SPV peduncular (Gs del SPVp), que otros autores denominan núcleo supraóptico externo (SOe), se puede observar en el estornino, pero no en la paloma. En cambio, en el pollo, este Gs del SPVp, es un grupo celular pequeño pero conciso formado por neuronas de gran tamaño y con dendritas prominentes.

Además, un núcleo celular que autores como Berck et al. (1982) denominaron grupo dorsal accesorio (DD1) en la paloma, se localiza en una posición lateral al haz prosencefálico lateral (LFB) a nivel de la comisura palial. Sin embargo, en el pollo es probable que el Gs del SPVp y el grupo celular dorsolateral sea un mismo grupo continuo de neuronas que mantiene una asociación muy próxima con el tracto septomesencefálico (tsm) a medida que se mueve progresivamente a una posición más dorsolateral, caudalmente en el hipotálamo. Otro grupo dorsal accesorio denominado por Berck et al. (1982) como DD2 en la paloma, parece corresponderse con el grupo periventricular del SPV peduncular (Gp del SPVp) en el pollo (y que en este trabajo ya hemos comentado anteriormente), el cual parece correr de forma continua siguiendo un patrón en forma de ala sobre el LFB a nivel del núcleo dorsomedial anterior del tálamo. En pollo, este corredor celular en forma de ala parece estar formado principalmente por neuronas parvocelulares con algunas de tamaño medio intercaladas (Tennyson et al., 1985). Esta observación también la hemos podido apreciar en nuestros resultados.

Tal y como Berck et al., (1982) apuntó, puede que no sea posible asignar una total homología entre todos los grupos celulares AVT-positivos aviares y los núcleos supraóptico (SO), Supraquiasmático (SC) y Paraventricular (PVN) de mamíferos, dado

que las conexiones neuronales y los orígenes embrionarios no están del todo claros. Aunque es interesante destacar la presencia de un mayor número de grupos AVT-positivos en aves, y en particular en el pollo, respecto a los descritos en mamíferos. En cambio en lo que hace referencia a la amígdala medial extendida, estudios en ratón muestran un grupo numeroso de neuronas vasopresinérgicas en el núcleo medial de la amígdala lo que contrasta con las escasas células observadas en nuestro estudio (Fig.14D). Y esto es interesante porque estudios previos en aves (incluida el pollo) niegan la presencia de células vasotocinérgicas en la amígdala medial, dato que nosotros, con nuestros resultados, podemos refutar.

Por otra parte, en el BSTm de la gran mayoría de vertebrados (desde anfibios a mamíferos) hay presentes células vasopresinérgicas/vasotocinérgicas sin variaciones aparentes entre especies en cuanto a su abundancia (Wang et al., 1997). Nuestros resultados confirman este hecho, pues hemos observado diferentes grupos de neuronas que forman parte del corredor celular del telencéfalo basal que se extiende desde la amígdala centromedial al núcleo del lecho de la estría terminal (BST).

Origen y migración de los grupos vasotocinérgicos

En cuanto a la comparación de los resultados obtenidos en esta investigación sobre el desarrollo de las poblaciones vasotocinérgicas y su migración en el pollo, los perfiles inmunoreactivos que observamos en las imágenes publicadas por Tennyson et al., (1986) en embriones del estadio E17, podemos ver que son muy similares a las que hemos obtenido nosotros. En base a la observación en estadios más tempranos de células con morfología de neuroblastos en migración, y a la aparición temporal de las distintas poblaciones neuronales, Tennyson et al. (1986) proponen que las células que migran lo hacen desde la zona ventricular del hipotálamo caudal a localizaciones más rostrales, ya que los primeros somas inmunoreactivos los encuentran localizados en el hipotálamo caudal, a nivel de las decusaciones supraópticas y del quiasma óptico. Sin embargo, muchas de las migraciones que estos autores interpretan como “rostro-caudales” nosotros las consideraríamos “ventro-dorsales” según el Modelo Prosomérico que hemos aplicado en nuestro trabajo, como por ejemplo las migraciones desde el SPV terminal a la región preóptica. Los resultados derivados de los ensayos de inmunocitoquímica implican que estas neuronas sintetizan el péptido vasotocina mientras están migrando. En este trabajo vemos algunas células AVT-positivas con morfología alargada y expresión débil de AVT próximas al ventrículo y a

la superficie cerebral que podrían representar neuroblastos migradores. Este hecho ha sido contrastado con estudios previos (Tennyson et al., 1985; 1986) en embriones de pollo en los que se obtuvieron resultados similares. Además, aunque en los experimentos de migración realizados no se ha podido determinar la distancia que recorre una célula individualmente, se puede decir que hay un claro movimiento desde posiciones ventrales a rostrales en la maduración neuronal en el hipotálamo (Tennyson et al., 1985; 1986).

Nuestros resultados, en base a los datos obtenidos durante la investigación, muestran que el dominio hipotalámico SPV produce neuronas AVT-positivas que formarán parte de la amígdala medial extendida, incluyendo el núcleo de la amígdala medial y el BSTm. Este dominio puede subdividirse en dos regiones diferenciadas, tal y como hemos descrito en el apartado de resultados. Por un lado, respecto a la región SPV terminal (SPVt), pensamos que puede dar lugar a dos grupos celulares que son el grupo periventricular (Gp), el cual creemos que son células que no migrarían, y el grupo superficial (Gs) formado por neuronas que se habrían desplazado radialmente hasta la superficie. Además, también pensamos que esta región en particular podría ser el lugar de origen de las neuronas vasotocinérgicas que encontramos en el telencéfalo, y que serían las de la región subpalial rostral (Spr) y las del grupo periventricular de la zona preóptica, así como, probablemente, de las del dominio supraquiasmático. Mientras que, por otro lado, a partir de la región del SPV peduncular (SPVp) parece que todos los grupos celulares que observamos estarían originados en este dominio. El grupo periventricular (Gp) no muestra ningún tipo de migración y permanecería próximo a la pared del tercer ventrículo (v3); el grupo medial (Gm) ya experimentaría un ligero desplazamiento hasta ocupar la zona en la que lo observamos; por su parte, el grupo lateral (Gl) recorrería una distancia mayor que el Gm y el grupo superficial (Gs) sería el grupo de neuronas que más habrían migrado (desde el tercer ventrículo hasta la superficie). Respecto al grupo lateral-dorsal (Gld) que ocupar una posición próxima al ventrículo lateral (v), nos surge la duda de si esta población neuronal es un núcleo celular que bien forman parte del dominio SPV y que ha podido migrar a posteriori hacia su localización actual, o bien no formaría parte de este dominio y serían células que ya han nacido in situ en esa región próxima al ventrículo lateral. Aunque no descartamos ninguna de las dos opciones, la idea que defendemos (pese a haberlo descrito como parte del SPV) es que seguramente sean dos grupos celulares diferentes, a pesar de observar una cierta continuidad entre las células de este grupo y las del grupo lateral (Gl). Sin embargo, algunos autores

defienden la otra opción basándose en la evidencia de que el ventrículo lateral (v) termina conectando con el tercer ventrículo en lo que se conoce como foramen interventricular de Monro. Este foramen interventricular está formado por un conjunto de canales que permiten que el fluido cerebroespinal producido en los ventrículos laterales alcance el tercer ventrículo y luego el resto de el sistema ventricular del cerebro. Por lo tanto, según ellos, las neuronas del Gld sí podrían originarse en el dominio SPV y posteriormente migrar hasta el ventrículo lateral dando lugar a esta población particular que denominan BSTmc. A parte de todo esto, proponemos que esta región SPVp podría dar lugar a algunas células del dominio supraquiasmático, aunque nuestros resultados no permiten ver exactamente qué neuronas aporta cada dominio).

En cuanto a las poblaciones neuronales de la región subpalial telencefálica que muestran nuestros resultados, proponemos que los grupos celulares del subpalio rostral y grupo periventricular podrían tener su origen en el dominio SPV terminal (SPVt) tal y como hemos mencionado anteriormente. Mientras que en relación a los grupos neuronales que forman parte de la comisura anterior y de la amígdala medial extendida, creemos que migran tangencialmente desde este dominio SPV para ocupar diferentes regiones del subpalio. Por su parte, los núcleos BSTm1 y BSTm2 quedan situados en posición medial al núcleo BST y el núcleo de la amígdala medial (MeA) formado por muy pocas células y además de baja expresión del neuropéptido AVT alcanzan una posición ventromedial respecto al núcleo de la amígdala central. Algunos autores proponen que la MeA podría estar en relación con lo que ellos denominan núcleo supraóptico externo (y que nosotros hemos definido como grupo superficial (Gs) del SPVp).

Estudio de conexiones

Los resultados obtenidos en el estudio de trazado de conexiones son esperanzadores en el sentido de la viabilidad de estos experimentos, y en el interés de que las poblaciones neuronales AVT-positivas con un mismo origen embrionario mantienen las conexiones. Este ensayo ha sido interesante en el sentido de que hemos dado un primer paso para poner a prueba la hipótesis de que las neuronas vasotocinérgicas que migran a diferentes dominios, podrían mantener algún tipo de afinidad química con células neuronales que se han originado en el mismo dominio, formando así circuitos funcionales, aunque expresen o no el mismo neuropéptido.

Por tanto, lo que aporta nuestra investigación es un intento de explicar el lugar de origen embrionario y tipo de migración que experimentan distintas poblaciones neuronales, algunas de las cuales se quedan en su dominio de origen (como es el caso de las poblaciones celulares del dominio supraóptico, SO), mientras que otras se desplazan alcanzando otros dominios (como ocurre con las neuronas del dominio supraquiasmático (SC) y de otras regiones del subpalio). Además, los datos que hemos obtenido en esta investigación, sugieren que las neuronas que migran a otros dominios son de tipo magnocelular y de tamaño medio.

Todas estas ideas que nosotros proponemos no dejan de ser más que hipótesis que tendríamos que seguir poniendo a prueba mediante ensayos de migración in vitro en cortes cerebrales con la orientación adecuada para tener en un mismo plano el dominio SPV y el núcleo de la amígdala medial (MeA). Son unos resultados muy prometedores con un interés no tanto teórico sino metodológico.

8. CONCLUSIONES

La validez del Modelo Prosomérico para comparar los cerebros de diferentes clases de organismos ha sido avalada por un gran número de estudios llevados a cabo sobre un amplio abanico de especies de vertebrados. Su aplicación ayuda para comprender mejor los mecanismos moleculares de la especificación regional del cerebro durante la evolución de los vertebrados, y ya que la morfogénesis es el resultado de una serie de procesos histogénéticos, el estudio genoarquitectónico comparado entre diversos grupos de especies a lo largo del desarrollo, muestra los mecanismos subyacentes en la formación y modelado del cerebro adulto (Puelles and Ferran, 2012).

Las principales conclusiones que podemos extraer de toda esta investigación son:

- La expresión de Otp permite delimitar la subdivisión progenitora Supra-Opto-Paraventricular (el dominio SPV) del tubo neural, así como sus derivaciones estructurales (sobre todo el dominio SPV)
- La expresión de AVT permite diferenciar distintos grupos neuronales situados en distintas divisiones del hipotálamo, pero también en el área preóptica, amígdala medial extendida y otras áreas del subpalio.

- Nuestros resultados indican que el sistema vasotocinérgicos del pollo es más complejo que el descrito en el ratón y en otros mamíferos, ya que comprende muchos más grupos neuronales.
- En la amígdala propiamente dicha de pollo apenas hay unas pocas células vasotocinérgicas, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos donde este núcleo muestra una gran población de neuronas muy agrupadas.
- La presencia de células Otp-positivas en todas las áreas que contienen neuronas AVT-positivas sugiere que, las neuronas vasotocinérgicas podrían derivar del dominio SPV. La disposición de las células en relación a los datos publicados sobre la extensión de los distintos dominios sugiere que algunas de las poblaciones alcanzarían su posición definitiva dentro del propio dominio por migración radial (grupos periventricular, medial, lateral y superficial), mientras que otras invadirían otros dominios cerebrales por migración tangencial (para confirmar esta idea habría que hacer estudios de migración y/o co-localización de AVT y Otp).

9. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación ha sido realizado bajo la supervisión de las Doctoras Loreta Medina y Ester Desfilis Barceló a quienes me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento, por hacer posible la realización de este estudio. Además, de agradecer su paciencia, tiempo y dedicación que tuvieron para que todo saliera de manera exitosa.

También agradecer a mis compañeras de laboratorio, a Alba por su gran dosis de paciencia conmigo a la hora de explicarme y enseñarme todas las técnicas que durante la investigación he tenido que utilizar, por su carisma y saber estar conmigo. A Bea y Sheila por su compañerismo, su alegría y ayuda. A Antonio Abellán, por todo lo que me ha enseñado, y por ayudarme una y otra vez con sus “trucos” que hacían que todo resultase más sencillo.

A mi tutor de la universidad Josep Bau Macià. A mi familia, por apoyarme incondicionalmente y confiar en mí. Todos ellos han sido y son parte de este trabajo.

10. BIBLIOGRAFIA

Artículos citados

- ABELLÁN, A.; MENUET, A.; DEHAY, C.; MEDINA, L.; RETAUX, S. 2010. "Differential expression of LIM-homeodomain factors in Cajal-Retzius cells of primates, rodents, and birds". *Cereb Cortex* 20:1788–1798.
- ABELLÁN, A.; VERNIER, B.; RETAUX, S.; MEDINA, L. 2010. "Similarities and differences in the forebrain expression of Lhx1 and Lhx5 between chicken and mouse: insights for understanding telencephalic development and evolution". *J Comp Neurol* 518:3512–3528.
- ALHEID, G.F.; DE OLMOS, J.; BELTRAMINO, C.A. 1995. "Amygdala and extended amygdala in the rat nervous system". *Academic*, p. 495–578
- ALIFRAGIS, P.; PARNAVELAS, J.G.; NADARAJAH, B. 2002. "A novel method of labeling and characterizing migrating neurons in the developing central nervous system". *Exp Neurol* 174:259-265.
- ASTE, N.; BALTHAZART, J.; ABSIL, P.; GROSSMANN, R.; MÜHLBAUER, E.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; PANZICA, G.C. 1998. "Anatomical and neurochemical definition of the nucleus of the stria terminalis in Japanese quail (*Coturnix japonica*)". *J Comp Neurol* 396:141-157.
- BALTHAZART, J.; ABSIL, P.; FOIDART, A.; HOUBART, M.; HARADA, N.; BALL, G.F. 1996. "Distribution of aromatase-immunoreactive cells in the forebrain of zebra finches (*Taeniopygia guttata*): implications for neural action of steroids and nuclear definition in the avian hypothalamus". *J Neurobiol* 31:129-148
- BALTHAZART, J.; TAZIAUX, M. 2009. "The underestimated role of olfaction in avian reproduction". *Behav Brain Res* 200:248–259
- BARDET, S.M.; MARTINEZ-DE-LA-TORRE, M.; NORTH CUTT, R.G.; RUBENSTEIN J.L.R.; PUELLES, L. 2008. "Conserved pattern of OTP-positive cells in the paraventricular nucleus and other hypothalamic sites of tetra pods". *Brain Res Bull* 75:231–235.
- BARDET, S.M.; FERRAN, J.L.; SANCHEZ-ARRONES, L.; PUELLES, L. 2010. "Ontogenetic expression of sonic hedgehog in the chicken subpallium". *Front Neuroanat* Doi: 10.3389/fnana.2010.00028
- BERNROIDER, G.; LEUTGEB, S. 1994. "V1-receptor mediated effects of vasotocina on motivational mnemonic and aversive components of sexual learning in quail". *Soc Neurosci Abstr* 20:1602.
- BERK, M.L.; REAVES, T.A.; HAYWARD, I.N. 1982. "The localization of vasotocin and neurophysin neurons in the diencephalon of the pigeon *Columba lioia*". *J Com p Neurol* 204:392-406.

- BRESSLER, S.C.; BAUM, M.J. 1996. "Sex comparison of neuronal Fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation". *Neuroscience* 71:1063–1072.
- BUCK, L.B. 2000. "The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals". *Cell* 100:611–618.
- BULFONE, A.; PUELLES, L.; PORTEUS, M.H.; FROHMAN, M.A.; MARTIN, G.R.; RUBENSTEIN, J.L. 1993. "Spatially restricted expression of Dlx-1, Dlx-2 (Tes-1), Gbx-2, and Wnt-3 in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries". *J Neurosci* 13(7):3155–3172.
- BUPESEH, M.; LEGAZ, I.; ABELLÁN, A.; MEDINA, L. 2011. "Multiple telencephalic and extratelencephalic embryonic domains contribute neurons to the medial extended amygdala". *J Comp Neurol* 519:1505-1525. Doi:10.1002/cne.22581
- CAFFE, A.R.; VAN LEEUWEN, F.W.; LUITEN, P.G. 1987. "Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus". *J Comp Neurol* 261:237–252.
- CANTERAS, N.S.; SIMERLY, R.B.; SWANSON, L.W. 1995. "Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat". *J Comp Neurol* 360:213–245.
- CARROLL, S.B.; GRENIER, J.K.; WEATHERBEE. 2001. "From DNA to Diversity. Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design". Malden, MA: Blackwell Science Inc.
- CASTAGNA, C.; ABSIL, P.; FOIDART, A.; BALTHAZART, J. 1998. "Systemic and intracerebroventricular injections of vasotocina inhibit appetitive and consummatory components of male sexual behavior in Japanese quail". *Behav. Neurosci* 112:233-250
- CHOI, G.B.; DONG, H.W.; MURPHY, A.J.; VALENZUELA, D.M.; YANCOPOULOS, G.D.; SWANSON, L.W.; ANDERSON, D.J. 2005. "Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus". *Neuron* 46:647–660.
- CHOI, G.B. et al. 2005. "Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus". *Neuron* 46, 647-600
- COLAS, J.F.; SCHOENWOLF, G.C. 2001. "Towards a cellular and molecular understanding of neurulation". *Dev Dyn.* 221:117–145 (Review).
- DAVIDSON, E.H. 2006. "The regulatory genome: gene regulatory networks in development and evolution". San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
- DE OLMOS, J.; ALHEID, G.F.; BELTRAMINO, C.A. 1985. "The Rat Nervous System". Sydney: Academic Press. p 223–334
- DE OLMOS, J.S.; BELTRAMINO, C.A.; ALHEID, G. 2004. "Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey". Amsterdam: Elsevier Academic Press. p 509–603.
- DE VRIES, G.J.; MILLER, M.A. 1998. "Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain". *Prog Brain Res* 119:3-20.

- DIELENBERG, R.A.; HUNT, G.E.; MCGREGOR, I.S. 2001. "When a rat smells a cat: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor". *Neuroscience* 104:1085–1097.
- EISTHEN, H.L. 1997. "Evolution of vertebrate olfactory systems". *Brain Behav Evol* 50:222–233.
- FENDT, M.; ENDRES, T.; LOWRY, C.A.; APFELBACH, R.; MCGREGOR, I.S. 2005. "TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing". *Neurosci Biobehav Rev* 29:1145–1156.
- GARCÍA MORENO, F.; PEDRAZA, M.; DI GIOVANNANTONIO, L.G.; DI SALVIO, M.; LÓPEZ MASCARAQUE, L.; SIMEONE, A.; DE CARLOS, J.A. 2010. "A neuronal migratory pathway crossing brain boundaries populates amygdala nuclei". *Nature Neuroscience*. DOI: 10.1038/nn.2556.
- GOOSSENS, N.; BLAHSCR, OKSCHE, A.; VANDESANDC, F.; DIERICKX, K. 1977. "Immunocytochemical investigation of the hypothalamo-neurohypophysial system in birds". *Cell Tissue Res* 184: 1-1 3
- GOODSON, J.L. 1998. "Territorial aggression and dawn song are modulated by septal vasotocina and vasoactive intestinal polypeptide in male field sparrows (*Spizella pusilla*)". *Horm Behav* 34:67-77.
- GONZALEZ, A.; MORONA, R.; LOPEZ, J.M; MORENO, N.; NORTHCUTT RG. 2010. "Lungfishes, like tetrapods, possess a vomeronasal system". *Front Neuroanat* 4:130. doi:10.3389/fnana.2010.00130.
- HEEB, M.M.; YAHR, P. 1996. "c-Fos immunoreactivity in the sexually dimorphic area of the hypothalamus and related brain regions of male gerbils after exposure to sex-related stimuli or performance of specific sexual behaviors". *Neuroscience* 72:1049–1071.
- HEYMANN, E.W. 2006. "The neglected sense—olfaction in primate behavior, ecology, and evolution". *Am J Primatol* 68:519–524.
- JOHNSTON, R.E. 1998. "Pheromones, the vomeronasal system, and communication. From hormonal responses to individual recognition". *Ann NY Acad Sci* 855:333–348.
- KELLER, M.; BAUM, M.J.; BROCK, O.; BRENNAN, P.A.; BAKKER, J. 2009. "The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior". *Behav Brain Res* 200:268–276.
- KIHLSTRÖM, J.E.; DANNINGE, I. 1972. "Neurohypophysial hormones and sexual behavior in males of domestic fowl (*Gallus domesticus*) and the pigeon (*Columba livia*)". *Gen Comp Endocrinol* 18:115-120.
- KISS, J.Z.; VOOHUIS, T.A.M.; VAN EEKELLEN, J.A.M.; DE KLOET, E.R.; DE WIED, D. 1987. "Organization of vasotocin-immunoreactive cells and fibers in the canary brain". *J Comp Neurol* 263:347-364.

- KOLLACK-WALKER, S.; NEWMAN, S.W. 1997. "Mating-induced expression of c-fos in the male Syrian hamster brain: role of experience, pheromones, and ejaculations". *J Neurobiol* 32:481–501.
- LINDQUIST, K.; WAGER, T.; KOBER, H.; ELIZA BLISS-MOREAU.; FELDMAN BARRETT, L. 2012. "The brain basis of emotion: A meta-analytic review". *Behavioral and Brain Sciences* (2012) 35, 121-202; doi: 10.1017.
- LANUZA, E.; HALPERN, M. 1998. "Efferents and centrifugal afferents of the main and accessory olfactory bulbs in the snake *Thamnophis sirtalis*". *Brain Behav Evol* 51:1–22.
- LEDOUX, J.E. 1992. "Brain mechanisms of emotion and emotional learning". *Neurobiol* 2, 191–197.
- LEDOUX, J.E. 1998. "The Emotional Brain". New York: *Simon and Schuster*.
- LEDOUX, J.E. 2000. "Emotion circuits in the brain". *Annu Rev Neurosci* 23, 155–184.
- LEDOUX, J.E. 2007. "The Amygdala". *Current Biology*, Vol 17 No 20R868
- LEGAZ, I. 2006. "Caracterización genética y origen de las neuronas de la región claustrorodentaria en ratón". PhD Dissertation, University of Murcia.
- LEUTGEB, S.; 1995. "Social preference in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*): hormonal modulation" [thesis]. Salzburg (Austria): University of Salzburg.
- LOHMAN, A.H.; SMEETS, W.J. 1993. "Overview of the main and accessory olfactory bulb projections in reptiles". *Brain Behav Evol* 41:147-155.
- MARTINEZ-GARCIA, F.; OLUCHA, F.E.; TERUE, L. V.; LORENTE, M.J.; SCHWERDTFEGGER, W.K. 1991. "Afferent and efferent connections of the olfactory bulbs in the lizard *Podarcis hispanica*". *J Comp Neurol* 305:337–347.
- MARTINEZ-GARCIA, F.; NOVEJARQUE, A.; LANUZA, E. 2007. "Evolution of the amygdala in vertebrates". *Evolution of nervous systems: a comprehensive reference. Volume 2: Non-mammalian Vertebrates*. Academic Press-Elsevier. p 255–334.
- MARTINEZ-GARCIA, F.; NOVEJARQUE, A.; GUITIERREZ-CASTELLANOS, N.; LANUZA, E. 2012. "Piriform cortex and amygdala". *The Mouse Nervous System*. Academic Press. p 140–172.
- MARTINEZ-MARCOS, A.; LANUZA, E.; HALPERN, M. 2002. "Neural substrates for processing chemosensory information in snakes". *Brain Res Bull* 57:543–546.
- MARTINEZ-MARCOS, A. 2009. "On the organization of olfactory and vomeronasal cortices". *Prog Neurobiol* 87:21–30.
- MARTÍNEZ, S. 2011. "Mecanismos generales del control molecular de la formación de las regiones del cerebro durante el desarrollo". *Bol ECEMC Rev Dismor Epidemiol VI (nº1)*: 9-16.

- MCGREGOR, I.S.; HARGREAVES, G.A.; HUNT, G.E. 2004. "Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam". *J Neurosci* 24:4134-4144.
- MEDINA, L. 2007. "Field homologies". *Evolution of Nervous Systems: A Comprehensive Reference. Vol 1: Theories, Development, Invertebrates*. Amsterdam: Academic Press-Elsevier. p 73–87.
- MEDINA, L. 2008. "Evolution and embryological development of forebrain". *Encyclopedic reference of neuroscience*. Berlin: Springer. p 1172-1192.
- MEDINA, L.; ABELLAN, A. 2011. "Subpallium in The Mouse Nervous System" *Academic Press/Elsevier* 173–220.
- MEDINA, L.; ABELLAN, A. 2012. "Subpallial structures". *The Mouse Nervous System. Elsevier Academic Press*, San Diego, pp 173–220.
- MEYER-LINDENBERG, A.; DOMES, G.; KIRSCH, P.; HEINRICHS, M. 2011. "Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine". (2011). *Nature Review Neuroscience*, Vol. 12(9) 524-538. Doi: 10.1038/mm3004.
- MOMBAERTS, P. 2006. "Axonal wiring in the mouse olfactory system". *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:713–737.
- MOORE, F.L.; LOWRY, C.A.; ROSE, J.D. 1994. "Steroid-neuropeptide interactions that control reproductive behaviors in an amphibian". *Psychoneuroendocrinology* 19:581-592.
- MORENO, N.; GONZALEZ, A. 2007. "Development of the vomeronasal amygdala in anuran amphibians: hodological, neurochemical, and gene expression characterization". *J Comp Neurol* 503:815–831.
- MUNISAMY, B.; LEGAZ, I.; ABELLÁN, A.; MEDINA, L. 2011. "Multiple telencephalic and extratelencephalic embryonic domains contribute neurons to the medial extended amigdala"
- O'CONNELL, L.A.; HOFMANN, H.A. 2011. "The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis". *J Comp Neurol* 519(18):3599-3639.
- PANZICA, G.C.; PLUMAR, I. L.; GARCÍA-OJEDA, E.; DEVICHE, P. 1999. "Central vasotocin-immunoreactive system in a male passerine bird". *The Journal of comparative neurology* 409:105-117.
- PANZICA, G.C.; ASTE, N.; CASTAGNA, C.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; BALTHAZART, J. 2001. "Steroid-induced plasticity in the sexually dimorphic vasotocinergic innervation of the avian brain: behavioral implications". *Brain Res Brain Res Rev* 37: 178–200.
- PANZICA, G.C.; BAKTHAZART, J.; PESSATTI, M.; VIGLIETTI-PANZICA, C. 2002. "The parvocellular vasotocin system of Japanese quail: a developmental and adult model for the study of influences of gonadal hormones on sexually differentiated and behaviorally relevant neural circuits". *Environ Health Perspect* 110(suppl 3):423–428.

- PETROVICH, G.D.; CANTERAS, N.S.; SWANSON, L.W. 2001. "Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems". *Brain Res* 38: 247–289.
- PHELPS, E.; LEDOUX, J.E. 2005. "Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior". *Neurosci* 31:137-45.
- POMBERO, A.; VALDÉS, L.; VIEIRA, C.; MARTÍNEZ, S. 2007. "Developmental mechanisms and experimental models to understand forebrain malformative diseases". *Genes Brain Behav*; Suppl 1:45-52 (Review).
- PUELLES, L.; RUBENSTEIN, J.L. 1993. "Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggests a neuromeric organization". *Trends Neurosci* 16: 472–479.
- PUELLES, L.; KUWANA, E.; PUELLES, E.; BULFONE, A.; SHIMAMURA, K.; KELEHER, J.; SMIGA, S. 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. 2001. "Brain segmentation and forebrain development in amniotes". *Brain Res Bull* 55: 695–710.
- PUELLES, L.; MEDINA, L. 2002. "Field homology as a way to reconcile genetic and developmental variability with adult homology". *Brain Res Bull* 57:243–255
- PUELLES, L.; RUBENSTEIN, J.L. 2003. "Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model". *Trends Neurosci* 26: 469–476.
- PUELLES, L.; MARTÍNEZ, S.; MARTÍNEZ-DE-LA-TORRE, M.; RUBENSTEIN, J.L. 2004. "Gene maps and related histogenetic domains in the forebrain and midbrain; in Paxinos". *The Rat Nervous System, Elsevier-Academic Press*, pp 3-25.
- PUELLES, L.; MARTINEZ-DE-LA-TORRE, M.; BARDET, S.; RUBENSTEIN, J.L. 2012. "Hypothalamus". *The Mouse Nervous System. Elsevier Academic Press*, pp 221–312
- PUELLES, L.; FERRAN, J.L. 2012. "Concept of neural genoarchitecture and its genomic fundament". *Front Neuroanat* 6:47.
- RZASA, J.; EWY, Z. 1982. "The effect of ovarian steroids in the response of the hen uterus to the neurohypophysial hormones". *Acta Physiol Pol* 33:249-255.
- REINER A, KARTEN HJ. 1985. Comparison of olfactory bulb projections in pigeons and turtles. *Brain Behav Evol* 27:11–27.
- RUBENSTEIN, J.L.; MARTINEZ, S.; SHIMAMURA, K.; PUELLES, L. 1994. "The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model". *Science*, 28;266 (5185):578–580 (Review).
- RUBENSTEIN, J.L.; SHIMAMURA, K.; MARTINEZ, S.; PUELLES, L. 1998 "Regionalization of the prosencephalic neural plate". *Annu Rev Neurosci* 21:445–477.
- SHINE, R.; MASON, R.T. 2012. "An airborne sex pheromone in snakes". *Biol Lett* 8:183–185.
- SÖDERSTEN, P.; BOER, G.J.; DE VRIES, G.J.; BUIJS, R.M.; MELIN, P. 1986. "Effects of vasopressin on female sexual behavior in male rats". *Neurosci* 69:188-191.

- SWANEY, W.T.; KEVERNE, E.B. 2009. "The evolution of pheromonal communication". *Behav Brain Res* 200:239–247.
- SWANSON, L.W.; PETROVICH, G.D. 1998. "What is the amygdale?" *Trens Neurosci.* 21, 323-331
- SWANSON, L.W. 2000. "Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior". *Brain Res* 886:113–164.
- TENNYSON, V.M.; HOU-YU, A.; NILAVER, G.; ZIMMERMAN, E.A. 1985. "Inmunocytochemical studies of vasotocina and mesotocin in the hypothalamo-hypophysial system of chicken". *Cell Tissue Research*, 239:279-291
- TENNYSON, V.M.; NILAVER, G.; HOU-YU, A.; VALIQUETTE, G.; ZIMMERMAN, E.A. 1986. "Inmunocytochemical study of the development of vasotocina/mesotocin in the hypothalamo-hypophysial system of the chic embryo". *Cell Tissue Research* 243:15-31
- VOORHUIS, T.A.M.; DE KLOET, E.R.; DE WIED, D. 1991. "Effect of vasotocina analog on signaling behavior in the canary". *Horm Behav* 25:549-559.
- WANG, Z. 1995. "Species differences in the vasopressin-immunoreactive pathways in the bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdaloid nucleus in prairie voles (*Microtus ochrogaster*) and meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*)". *Behav Neurosci* 109:305–311.
- WANG, Z.; DE VRIES, G.J. 1995. "Androgen and estrogen effects on vasopressin messenger RNA expression in the medial Amygdaloid nucleus in male and female rats". *J Neuroendocrinol* 7:827–831
- WANG, W.; LUFKIN, T. 2000. "The murine *Otp* homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus". *Dev Biol* 227:432–449.
- WILSON, S.W.; RUBENSTEIN, J.L. 2000. "Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon". *Neuron* 28: 641–651..
- YOSHIHARA, Y. 2009. "Molecular genetic dissection of the zebrafish olfactory system". *Results Probl Cell Differ* 47:97–120.
- GAO, Y.; GLENN, A.L.; SCHUG, R.A.; YANG, Y.; RAINE, A. 2008. "The Neurobiology of Psychopathy: A Neurodevelopmental Perspective". *Canadian Journal of Psychiatry*; Dec 2009; 54(12):813-823.

11. ANEXOS

Tablas

Tabla 2. Seguimiento de los animales				
Nº	Estadio	Día sacrificio	Ensayo	Ab 1º
CM 1	E15, HH41	25/02/14	Inmunohistoquímica	Anti-VT
CM2	E15, HH41	25/02/14	Inmunohistoquímica	Anti-Otp
CM3	E15, HH40	27/02/14	Inmunohistoquímica	Anti-VT
CM4	E15, HH41	27/02/14	Inmunohistoquímica	Anti-VT
CM5	E18, HH44	20/03/14	Inmunohistoquímica	Anti-VT
CM6	E18, HH44	20/03/14	Inmunohistoquímica	Anti-VT
CM7	E18, HH44	20/03/14	Inmunohistoquímica	Anti-VT
CM8 *	E15, HH40	20/03/14	Inmunohistoquímica	Anti- Otp
CM9	E15, HH40	20/03/14	Inmunohistoquímica	Anti- Otp
CM10	E15, HH40	20/03/14	Inmunohistoquímica	Anti- Otp
CM11	E18, HH44	25/03/14	Inmunohistoquímica	Anti- Otp
CM12	E18, HH44	25/03/14	Inmunohistoquímica	Anti- Otp
CM13	E15, HH40	09/04/14	Cultivos Organotípicos	---
CM14*	E18, HH44	05/05/14	Cultivos Organotípicos	---
CM15*	E18, HH44	05/05/14	Cultivos Organotípicos	---
CM16*	E18, HH44	05/05/14	Cultivos Organotípicos	---
CM17	E15, HH41	08/05/14	Cultivos Organotípicos	---

*El experimento con CM8, CM14, CM15 y CM16 ha resultado fallido. No se tienen resultados.