

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

Vicerrectoría de Ciencias de la Salud



Proyecto de Evaluación Final

Análisis del patrón temporal y espacial de la expresión de EBF2 en el hipotálamo durante el desarrollo de circuitos que regulan conductas motivadas en ratones.

En opción al título de
Licenciatura en Ingeniero Biomédico
Licenciatura en Nutrición

Autores

191988 Héctor Alonso González Miranda (IBI)
519033 Daniela Alejandra Villanueva Cuevas (IBI)
536954 Daniela Hernández Morales (LNU)

Asesor

Dr. Román Vidal Tamayo Ramírez

San Pedro Garza García, Nuevo León, 30 de noviembre 2019

Agradecimientos

Es momento de agradecer a aquellos que nos hicieron llegar hasta aquí, a las personas que nos formaron y dejaron huella en nosotros hasta hacernos quienes somos hoy en día.

Primero que nada gracias a nuestros padres por nunca cortarnos las alas, por darnos una educación basada en valores y principios para hacernos personas de bien, por siempre estar ahí para recordarnos quienes somos y de donde venimos y por siempre alentar nuestros sueños sin importar que tan imposibles sonarán. Sin ustedes no seríamos ni una fracción de los profesionistas en los que hoy nos estamos convirtiendo. Esto es por y para ustedes, papás.

Gracias también a nuestros hermanos, los cuales tuvieron que soportar nuestro mal humor, nos subieron el ánimo después de un mal día o simplemente estaban ahí para nosotros en las desveladas.

Queremos agradecer a nuestros maestros, aquellos que dejaron un mensaje grabado en nuestro corazón desde el inicio en nuestra educación, a aquellos que nos compartieron su vocación, nos enseñaron las bases de las matemáticas, la física, biología y química y nos retaron a dar más de nosotros porque sabían de lo que éramos capaces. Pero en especial queremos agradecer al profesor cuyos retos veíamos imposibles, cuyos exámenes veíamos complicados y cuya sabiduría nos dejaba boquiabiertos, gracias Dr. Román Vidal Tamayo por la paciencia y el conocimiento compartido, no pudimos tener mejor asesor de PEF. Y no podemos dejar de lado a Damaris, Horacio y Juan por siempre salvarnos en el laboratorio.

A nuestros directores de carrera, Hiram Cantú Campos e Idalia Caballero Cantú quienes a lo largo de la carrera hicieron de todo para mantener esa chispa de amor a

nuestra profesión y por siempre buscar nuestro crecimiento personal y académico no solo en el aula, sino en diferentes ámbitos.

Y por último pero no menos importante a nuestro gran equipo de trabajo; Cecy, Lore, Blanca, Tavo, Daniela, Karina y Gaby quienes se convirtieron en amigos y cómplices. Los chistes, las risas, los bailes, las canciones y las bromas van a estar siempre en nuestros mejores recuerdos.

Sin todos ustedes esto no hubiera sido posible.

Índice

I.Resumen	5
II.Marco Teórico	6
2.1 Conductas Motivadas	6
2.1.1 Necesidades fisiológicas.	7
2.2 El Hipotálamo.	7
2.2.1 Estructura anatómica del hipotálamo	8
2.2.2 El hipotálamo y sus funciones	10
2.3.1 Regulación homeostática.	11
2.3.2 Regulación de la ingesta de alimentos.	12
2.3.2.1 Hambre,saciedad y balance energético	13
2.4 El Sistema límbico y su relación con el hipotálamo	14
2.4.1 Sistema de motivación y recompensa	17
2.4.2 La habénula y sus proyecciones	18
2.5 EBF2	19
2.6 tGFP (Tau-Green Fluorescent Protein)	20
2.7 Genotipos de ratón	20
2.8 Características de Ratón KO	21
2.9 Patologías	22
2.9.1 Narcolepsia	22
2.9.2 Infertilidad	23
2.9.3 Enanismo	23
2.9.4 Obesidad	23
III.Pregunta de Investigación	24
IV.Justificación	24
V.Hipótesis	26
VI.Objetivos	26
VII.Metodología	26
7.1 Bioterio	27
7.2 Sacrificio de ratones y obtención del cerebro	28
7.2.1 Ratones Embrionarios	28
7.2.2 Ratones Postnatal de 0 a 7 días	30
7.2.3 Ratones Postnatal de 8 días en adelante	30
7.3 Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)	31
7.3.1 Electroforesis	33
7.3.2 Corroboración del Genotipo	35
7.4 Cortes del Encéfalo	36
7.4.1 Congelación del espécimen	36
7.4.2 Fijación	37

7.4.3 Cortes y capturas	38
7.5 Inmunofluorescencia	39
7.5.1 Primera Incubación	40
7.5.1 Segunda Incubación	41
7.6 Capturas en microscopio	41
7.7 Procesamiento de imágenes	43
7.7.1 Capturas z-stack	43
7.7.2 Apotome deconvolution	45
7.7.3 Orthogonal projection	46
7.7.4 Background subtraction	47
7.8 Etiquetado de imágenes	48
7.9 Análisis y comparación	49
7.10 Duración de experimentos	49
VIII.Resultados	50
8.1 Expresión de EBF2-tGFP y TH en los circuitos de motivación y recompensa de ratones en las diferentes etapas del desarrollo de ratones HET.	50
8.2 Desarrollo de los circuitos DDCS y MFB en ratones Homocigotos.	60
IX.Conclusión y Discusión	60
9.1 EBF2 es un marcador temprano de los principales circuitos de motivación y recompensa	60
9.2 EBF2 no es determinante para el establecimiento del DDCS	61
9.3 La expresión de EBF2 desaparece en algunos núcleos del DDCS a partir de los 21 días postnatales.	62
9.4 La expresión de EBF2 desaparece de las fibras del MFB en algún periodo de tiempo entre los 0 y 7 días postnatales.	63
X. Anexos	63
Anexo I. Listado de materiales para Sacrificio y Extracción de cerebro.	63
Anexo II. Listado de materiales para PCR.	64
Anexo III. Listado de materiales para Electroforesis.	64
Anexo IV. Listado de materiales para Cortes de cerebro.	65
Anexo V. Listado de materiales para Inmunofluorescencia.	65
Anexo VI. Lentes objetivos del microscopio de fluorescencia.	66
Anexo VII. Recetas de sustancias utilizadas en los procedimientos de la metodología.	67
Paraformaldehído (PFA)	67
Phosphate Buffer Saline (PBS 1X)	68
PBS Tween	69
Tris Acetato (TAE 1X)	70
XI. Índice de imágenes	70
XII. Siglas	72
XIII.Referencias	72

I. Resumen

Las conductas motivadas son aquellas que tienen como objetivo satisfacer una necesidad de supervivencia de un organismo, y entre ellas encuentran la ingesta de alimentos o de agua y la reproducción. Este tipo de conductas necesita un circuito en el sistema nervioso que mida las necesidades y genere la respuesta y el impulso interno necesario para cumplir con la tarea, lo que se conoce como sistema de motivación.

Por otra parte, para terminar con la manifestación de una conducta motivada, el sistema nervioso debe ser capaz de determinar si las necesidades han sido subsanadas y que el objetivo que dió origen a la conducta motivada se ha completado, y de eso se encargan en parte los sistemas de recompensa. Cuando existe un desajuste entre la motivación y la recompensa se presentan desórdenes como la obesidad, la anorexia o la adicción a drogas.

El diencefalo es la región del sistema nervioso donde convergen los sistemas de motivación y de recompensa, debido a que contiene circuitos que miden las necesidades (hipotálamo anterior y tuberal), que regulan la disposición a manifestar conducta (hipotálamo posterior) y que se conectan con el sistema de recompensa a través del sistema de conducción del diencefalo dorsal (DDCS, que conecta el septum, la habénula y en núcleo interpeduncular) y el haz medial del prosencefalo (MFB, que conecta el área ventral tegmental con el núcleo accumbens).

Debido a este papel central del diencefalo en la regulación de la motivación y la recompensa, es necesario comprender los mecanismos moleculares y celulares involucrados en el establecimiento de los circuitos neurales en esta región del sistema nervioso. Nuestro laboratorio demostró que el factor de transcripción EBF2 participa en el establecimiento de circuitos que mantienen la vigilia y el arousal. En este trabajo analizamos la expresión del marcador genético tau-GFP (proteína verde fluorescente) bajo el control del promotor de EBF2 en neuronas y axones del diencefalo de ratones transgénicos.

Los resultados obtenidos demuestran que la señal de EBF2-tGFP permite seguir la formación del DDCS desde el hipotálamo mediodorsal, pasando por los núcleos de la comisura anterior (BAC) y de la cama de la estría terminal (BNST) para luego formar la estría medular del tálamo y conectar con la habénula. Asimismo, en el circuito de recompensa (MFB) también se pudo observar expresión positiva de EBF2-tGFP.

Las señales que presentan los núcleos de ambos circuitos se pueden detectar en diferentes etapas del desarrollo y se demostró cada uno de estos tiene una ventana de expresión diferente.

Por último se determinó que EBF2 no participa en el establecimiento de los circuitos de motivación.

II.Marco Teórico

2.1 Conductas Motivadas

Debido a las características de la selección natural, todos los organismos procuran sobrevivir por medio de mecanismos de autoconservación (deCantanzaro, 2001). Para conseguirlo es necesario un proceso dinámico interno que energice y dirija las acciones que lleven al organismo a sobrevivir; a este proceso se le llama motivación (Dreikurs, 2000).

Las conductas motivadas, son todas aquellas acciones variables e impredecibles iniciadas por estímulos tanto externos como internos que implican conductas de desplazamiento hacia la meta y que se relacionan con la supervivencia de la especie como las conductas sexuales, la ingesta de agua y alimento, búsqueda de refugio, entre otros. Estas conductas involucran en gran medida aspectos cognitivos asociados al aprendizaje y planeación y sus efectos llegan a la activación del sistema de arousal además de tener la característica de ser placenteras. (Alcaraz & Guzmán, 2001).

Estas son reguladas principalmente por los circuitos de motivación y recompensa, especialmente por el Dorsal Diencephalic Conduction System (DDCS) y el Medial Forebrain Bundle (MFB).

2.1.1 Necesidades fisiológicas.

Una necesidad es cualquier condición propia de un organismo la cual es esencial para la vida, el desarrollo, el bienestar y su supervivencia. Las conductas motivadas llevan a los organismos a satisfacer las necesidades fisiológicas, psicológicas y sociales. Si la necesidad es obstaculizada o no se satisface, se producirán daños físicos o psicológicos, por ello surgen los motivos evitando un mayor daño al organismo (Reeve, 2010). Las necesidades fisiológicas describen una condición de deficiencia biológica que de ignorarse, sobrevienen daños o patologías corporales. Entre estas necesidades fisiológicas se encuentra el hambre (Reeve, 2010).

2.2 El Hipotálamo.

El cerebro no es solo un órgano pensante, también es el centro de la motivación y la emoción donde existen estructuras cerebrales específicas que al ser estimuladas dan lugar a estados motivacionales específicos, el hipotálamo es una de estas estructuras cerebrales (Reeve, 2010).

El hipotálamo es una estructura pequeña que representa menos del 1% del volumen total del cerebro y está formado por 20 núcleos cercanos e interconectados que cumplen con funciones independientes como lo son regular varias funciones biológicas. Por anatomía, el hipotálamo es parte del diencefalo, pero por funcionalidad, pertenece al sistema límbico.

Su importancia radica en que tiene un papel relevante en la regulación de impulsos básicos, es regulador central de la función autónoma y endocrina, además de que al

estimular este órgano se generan los deseos y el placer asociados con la ingesta de agua y comida, los compañeros sexuales y el ciclo vigilia-sueño (Krebs et. al., 2018).

2.2.1 Estructura anatómica del hipotálamo

El hipotálamo se define como la estructura bilateral del encéfalo ubicado de manera medial sobre la superficie ventral del cerebro y su desarrollo surge de la parte más anterior del tubo neural. Esta estructura se deriva del telencéfalo (Puelles et. al, 2008).

Se localiza por debajo del tálamo siendo separado de éste por el surco hipotalámico y formando el piso y paredes del tercer ventrículo. Su límite lateral es formado por el brazo posterior de la cápsula interna, mientras que los límites inferiores incluyen el quiasma óptico en la parte rostral, los tractos ópticos de forma lateral y los cuerpos mamilares en la parte caudal (Krebs et. al., 2018).

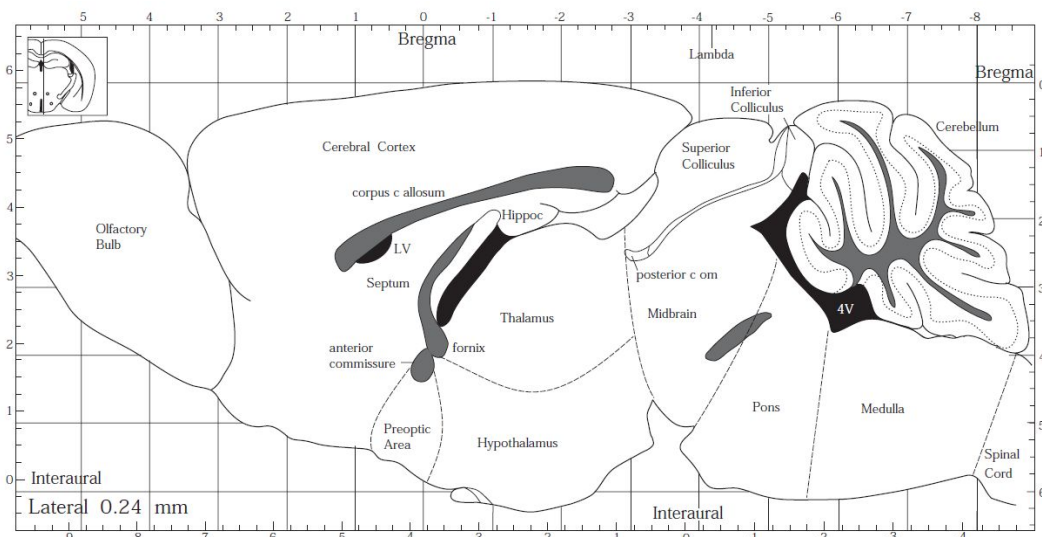


Figura 1. Dibujo de corte en plano sagital de cerebro de ratón adulto.

Se muestran los ventrículos en color negro y de blanco las partes del encéfalo (tomado de Paxinos & Franklin, 2001).

Anatómicamente se divide en 3 áreas funcionales de rostral a caudal:

- Área preóptica o anterior: es la zona más rostral del hipotálamo y descansa sobre el quiasma óptico. Incluye el núcleo Preóptico Ventrolateral (VLPO), las áreas Preópticas Lateral (LPO) y el núcleo Supraquiasmático (SCh).
- Área tuberosa: es la parte medial del hipotálamo e incluye el Hipotálamo Lateral (LH), Hipotálamo Anterior (AH) y los núcleos Dorsomedial (DMH), núcleo Ventromedial (VMH), Núcleo Paraventricular (Pa), núcleo Supraóptico (SO) y Núcleo Arcuato o Núcleo Arqueado (Arc).
- Área posterior: es la parte más caudal del hipotálamo e incluye los cuerpos mamilares y los núcleos Tuberomamilar (ML), núcleo Supramamilar (SUM) y posterior. (Saper & Lowell, 2014).

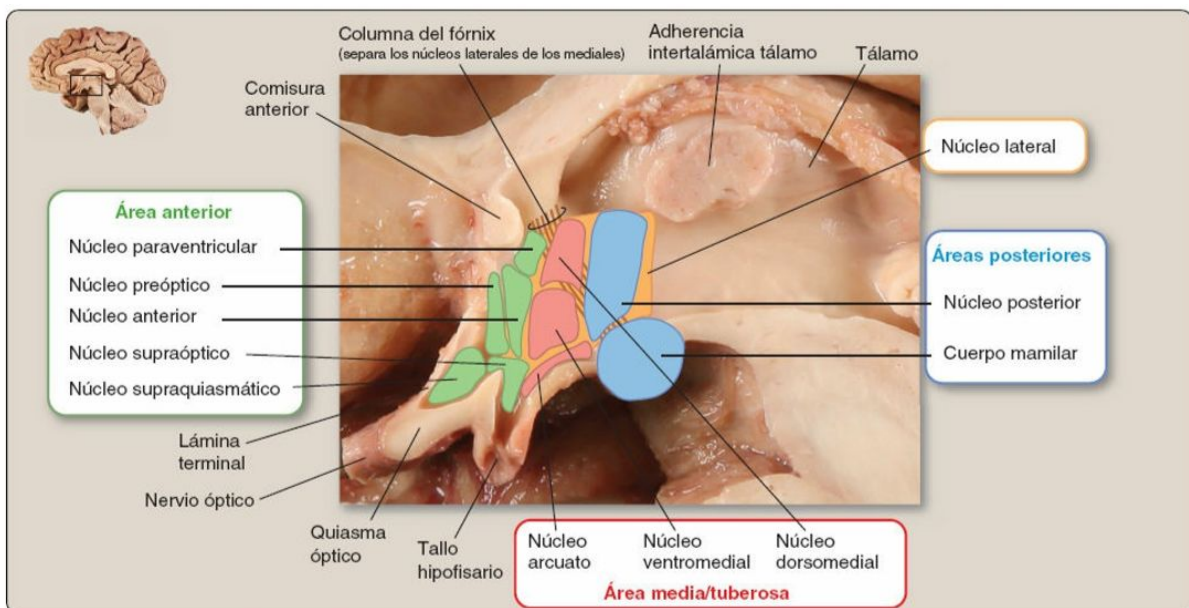


Figura 2. División del hipotálamo y sus respectivos núcleos.

En esta imagen se muestra la distribución espacial de los núcleos del hipotálamo y el área al que pertenecen (tomado de Krebs et al., 2018).

2.2.2 El hipotálamo y sus funciones

El hipotálamo es el encargado de mantener la homeostasis corporal controlando tres comportamientos básicos de supervivencia de todo ser vivo: la ingesta, la defensa y la

reproducción; estos tres son mediados a través de una serie de estímulos internos y externos los cuales permiten dar una señal a la región del hipotálamo correspondiente para generar una respuesta motora-sensitiva y/o autonómica (Sabino, 2012).

Dichos comportamientos son clasificados como conductas motivadas y están intrínsecamente relacionadas con el sistema de recompensa para mediar acciones básicas de supervivencia de la especie.

En general, el hipotálamo realiza 3 funciones principales:

- Regulación de la función endocrina: controla la función de la glándula pituitaria por medio de una conexión neural al lóbulo posterior de la hipófisis y una conexión vascular al lóbulo anterior de la hipófisis.
- Regulación de la función visceral: El área preóptica del hipotálamo activa la función parasimpática enviando señales a los pares craneales III, VII, IX y X. Por otro lado, el área posterior del hipotálamo regula la actividad simpática.
- Regulación de las funciones homeostáticas: Para esta función, la mayoría de las veces es una regulación entre la activación del área preóptica y el área posterior ya que contrarresta los efectos una de la otra (Krebs et. al., 2018).

Cada una de las zonas que conforman el hipotálamo también cumplen con múltiples funciones definidas. El área preóptica contiene un circuito integrativo de termorregulación, fiebre, balance electrolítico, vigilia-sueño, ciclo circadiano y comportamiento sexual. Por otra parte, el hipotálamo tuberal contiene un circuito de integración para la ingesta y un circuito de respuesta al comportamiento sexual, agresividad y respuestas tanto endocrinas como autonómicas. El hipotálamo posterior provee de una intensa respuesta al sistema de arousal y al hipocampo (Saper & Lowell, 2014).

Las anormalidades durante el desarrollo de circuitos neuronales dentro del hipotálamo desencadenan problemas de gran importancia como son la obesidad, la depresión, el estrés, ansiedad e infertilidad. El desarrollo del hipotálamo está dado a nivel

molecular por factores de transcripción (proteínas que tienen sitios de unión a ADN reguladores de la expresión de los genes), factores de crecimiento, neuropéptidos y otros receptores (Biran et al, 2015).

2.3.1 Regulación homeostática.

Dentro de la regulación homeostática se encuentran algunas funciones básicas que son controladas por el hipotálamo como lo son la regulación de la temperatura, la ingesta de alimento y el ciclo circadiano. Cada una de estas funciones son manejadas desde distintos grupos de núcleos como se hablaba anteriormente.

La regulación de la temperatura ocurre gracias al equilibrio entre el área preóptica que contiene neuronas sensibles a la temperatura y el área posterior que activa los mecanismos para perder calor como lo son la sudoración, vasodilatación cutánea y disminución de la tasa metabólica.

La regulación de la ingesta de alimentos también implica una red de núcleos que reciben e integran señales anorexigénicas u orexigénicas. Más adelante se detalla esta actividad.

Para el equilibrio hídrico son necesario mecanismos neurales y hormonales. Los mecanismos neurales requieren la activación de la región lateral del hipotálamo y los osmorreceptores del área preóptica, los núcleos de esta área son considerados centros de la sed. La regulación hormonal sucede a través de neuronas especializadas sensibles a la osmolaridad en el área preóptica lo cual lleva a la liberación de la Hormona Antidiurética (ADH) que influye en la reabsorción de agua y producción de la orina.

La regulación de los ritmos circadianos y los ciclos de vigilia sueño se encuentra también se encuentra en el área preóptica donde este actúa como reloj maestro controlando los ritmos circadianos fisiológicos y conductuales incluyendo la vigilia-sueño, la secreción hormonal y la termorregulación (Krebs et al., 2018).

2.3.2 Regulación de la ingesta de alimentos.

En general, la ingesta de alimentos es regulada en el área tuberal, donde los núcleos aquí presentes reciben e integran señales provenientes de nutrientes circulantes (ej. glucosa y ácidos grasos), hormonas (ej. leptina y ghrelina) así como señales provenientes del intestino y estímulos psicológicos.

El LH es conocido como el centro del hambre y al ser estimulado aumenta la ingesta de alimentos, esto sucede al recibir información aferente como información de los sentidos del gusto y olfato, información metabólica e información sensitiva. Un daño en esta zona implica la falta de hambre en el individuo.

El VMH es el centro de saciedad y su estimulación inhibe la ingesta de alimento, una lesión en esta zona lleva a una disminución en la actividad física, estimulación de la ingesta y alteración del metabolismo contribuyendo al aumento de peso.

Además, Arc, ubicado en el área tuberal, integra información relacionada con el equilibrio energético como mediador de las señales de leptina y glucosa para reducir la ingesta y aumentar el gasto energético.

Al final del proceso son los mismos núcleos los que envían señales al sistema límbico para el sistema de recompensa (Krebs et al., 2018).

2.3.2.1 Hambre, saciedad y balance energético

El proceso de alimentación comienza a partir del apetito, el cual engloba 3 diferentes conceptos: hambre, saciedad y satisfacción. Los conceptos de hambre y apetito pueden parecer similares, sin embargo existe una gran diferencia en sus significados. Se le denomina hambre a la necesidad fisiológica de ingerir alimentos, en cambio el deseo psicológico de comer asociado a experiencias sensoriales se le llama apetito.

2.4 El Sistema límbico y su relación con el hipotálamo

Existen otros tipos de conductas motivadas en las cuales el hipotálamo se ve involucrado junto a componentes diencefálicos, mesencefálicos y telencefálicos. Las interconexiones entre estos terminan resultando en la formación de uno de los circuitos más importantes para la supervivencia del organismo, llamado sistema límbico (Sokolowski & Corbin, 2012).

El sistema límbico es un sistema de estructuras nucleares y tractos situados en forma de anillo alrededor del tálamo (Rubin, Safdieh & Netter, 2008). Entrelaza estímulos externos que repercuten en una serie de comportamientos emocionales, sociales y motivacionales, entre ellos, la saciedad, el control motor, la respuesta *lucha o huida*, la memoria, entre otros (Sokolowski & Corbin, 2012).

Aunque algunos de estos comportamientos son reforzados a través del aprendizaje experimental, también existen aquellos que son innatos y que se dan sin previa experiencia empírica. Estos son influenciados por estímulos sensoriales como el tacto, el sonido y el olfato (Sokolowski & Corbin, 2012).

Las estructuras que conforman el sistema límbico pueden separarse de acuerdo a su ubicación anatómica. En primer lugar tenemos aquellas que se encuentran en el diencefalo:

- Hipotálamo: Detallado en secciones anteriores.
- Cuerpos Mamilares: Conjunto esférico de neuronas de diferente tamaño que hacen relieve en el suelo del diencefalo. Participa en procesos relacionados con el aprendizaje y memoria (García-Porrero & Hurlé, 2015).
- Núcleo Anterior del Tálamo (ANT): Envía fibras al cuerpo mamilar por el fascículo mamilar. Aporta información indirecta procedente de la corteza frontal y cingular anterior.

- Habénula (Hb): Detallado en secciones posteriores.

En el telencéfalo tenemos componentes que conforman regiones corticales y subcorticales:

- Bulbos olfatorios: masa redonda de sustancia gris localizada por arriba de la lámina cribosa del etmoides y por debajo del lóbulo frontal del cerebro. En el interior del bulbo olfatorio ocurre la sinapsis entre los axones de las células olfatorias y otras neuronas que forman parte de la vía olfatoria (Aguirre, 2017).
- Hipocampo: Ubicado en la parte anterior del lóbulo temporal en forma de caballito de mar y cuya función es la codificación de la memoria utilizando el Circuito de Papez, además tiene un papel secundario en la modulación de emociones (Rubin, Safdieh & Netter, 2008).
- Septum: Se sitúa como una estación intermedia entre el hipocampo y el hipotálamo sosteniendo conexiones bilaterales pasando por el fórnix (f). Otras proyecciones de salida del septum llegan al área preóptica y a la amígdala (García-Porrero & Hurlé, 2015).
- Amígdala: Estructura en forma de almendra localizada anterior al hipocampo, en la porción anterior de la parte medial del lóbulo temporal. Se conforma por el Núcleo Basal Lateral (LBG), núcleo cortical medial y núcleo central. Su función principal es regular la interpretación emocional medioambiental y de estímulos internos, especialmente aquellos relacionados con miedo e ira (Rubin, Safdieh & Netter, 2008).

Por último, en el mesencéfalo principalmente se encargan de procesar estímulos visuales, auditivos y somatosensitivos:

- Núcleo Dorsal Tegmental (DTg): Es una diferenciación de la parte ventral de la sustancia gris ubicada en la parte dorsal del núcleo del nervio troclear.

- Núcleo Ventral Tegmental (VTg): Se ubica inmediatamente por delante del fascículo longitudinal medial a la altura del colículo inferior.
- Núcleo Interpeduncular (IPN): estructura impar que ocupa la parte ventral del tegmento mesencefálico en el fondo del espacio perforado posterior (García-Porrero & Hurlé, 2015).

Las estructuras que permiten las conexiones al interior del sistema límbico son:

- El fascículo mamilotalámico que une el núcleo mamilar con el ANT.
- El fascículo retroflexus que une el hipocampo con los cuerpos mamilares y con el hipocampo contralateral.
- El Circuito de Papez cuya importancia yace en sus funciones de aprendizaje y está formado por neuronas piramidales del hipocampo proyectándose hacia el f, cuerpos mamilares y ANT.
- La estría terminalis (st) la cual tiene forma de C contorneando el tálamo y conectando la amígdala con el hipotálamo y los núcleos del septum con Núcleo Accumbens (NAc) (García-Porrero & Hurlé, 2015).

Existen varios componentes de este sistema que aparentan tener funciones muy específicas que no se relacionan directamente con el ámbito del proyecto, por lo que serán omitidas. En cambio, se estará haciendo mayor énfasis los constituyentes principales del sistema de motivación y recompensa y de sus respectivas proyecciones (Torico & Abdijadid, 2019).

2.4.1 Sistema de motivación y recompensa

Los circuitos de motivación y recompensa están representados principalmente por el DDCS y el MFB. Estos conectan zonas frontales del cerebro que regulan las conductas motoras y la toma de decisiones con zonas del tallo cerebral que procesa el valor de recompensa y obtienen la salida de la motivación.

El DDCS representa a la motivación y este circuito neural está compuesto por la estría medullaris (sm), la Hb y el fr y constituye un sistema de conducción rostro-caudal. La información recibida por el DDCS viaja de la porción anterior del LH, específicamente Núcleo del Lecho de la Estría Terminalis (BNST) y proyectándose hacia la habénula, la cual a su vez proyecta hacia el Núcleo Interpeduncular (IPN) el cual integra información proveniente también del Núcleo Dorsal Tegmental (DTg) y del Núcleo Ventral Tegmental (VTg). El DDCS también juega un papel crucial en los roles de modulación de comportamientos de recompensa relacionados a comportamientos dirigidos a objetivos.

Todas las estructuras anteriores operan en paralelo con el Medial Forebrain Bundle (MFB) que es un circuito neural en el prosencéfalo cuyas fibras ascendentes y descendentes van desde el Hipotálamo Lateral y Núcleo Ventral Tegmental (VTA) hasta el prosencéfalo basal y del NAc (Morgane, 1961). El MFB tiene como función principal participar en el sistema de recompensa ante estímulos que satisfacen necesidades para la supervivencia diaria como lo es alimentarse (Fakhoury, 2018).

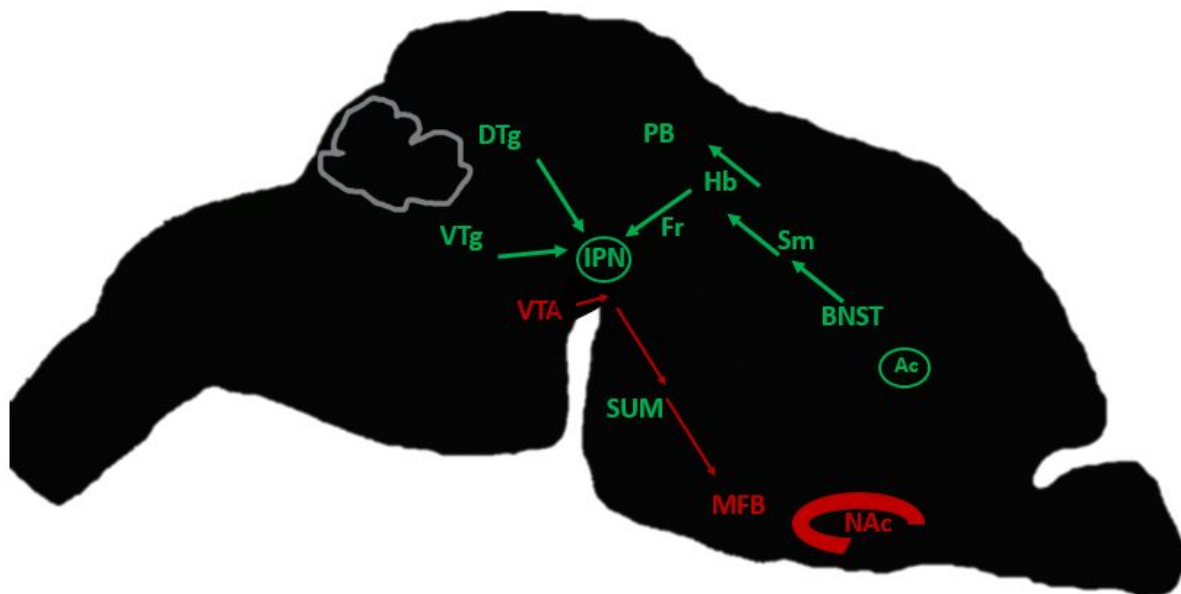


Figura 4. Conexiones de los circuitos de motivación y recompensa (Hikosaka, 2008).

Se utiliza color verde para identificar el circuito de Dorsal Diencephalic Conduction System (DDCS) y de rojo el Medial Forebrain Bundle (MFB). Ac: Comisura Anterior, BNST: Núcleo del Lecho de la Estría terminal, DTg: Núcleo Dorsal Tegmental, FR: Fasciculus Retroflexus, Hb: Habénula, IPN: Núcleo Posterior Interpeduncular,

LC: Locus Ceruleus, MFB: Medial Forebrain Bundle, NAc: Núcleo Accumbens, Sm: Estría medularis, SNc Sustancia Nígra, PB: Glándula Pineal, VTg: Núcleo Ventral Tegmental, VTA: Área Ventral Tegmental.

2.4.2 La habénula y sus proyecciones

La Habénula es formada por dos núcleos ubicados por encima del tálamo en su borde posterior cercano a la línea media, los cuales son el Núcleo Lateral de la Habénula (LHb) y el Núcleo Medial de la Habénula (MHb). Junto con la Glándula Pineal (PB) forman el epitálamo, el cual es encargado de recibir las diferentes señales aferentes del sistema límbico y de los núcleos basales (BG) para proyectarlas por medio del fascículo retroflexo (fr) hacia otras secciones más ventrales del encéfalo dedicadas a la regulación de neuronas que expresan monoaminas (dopamina, serotonina, entre otras) como el VTA y la Sustancia nigra (Sn) (Hikosaka, 2008).

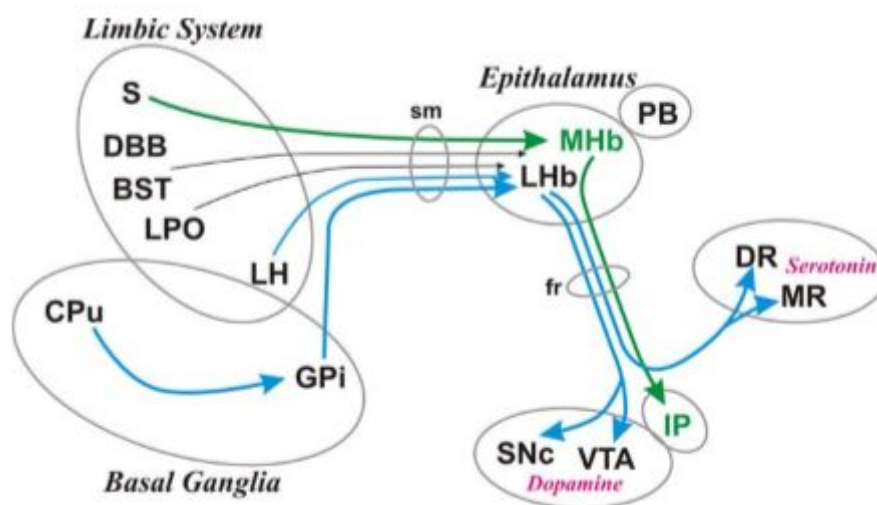


Figura 5. Conexiones aferentes y eferentes de la habénula (Hikosaka, 2008).

Se utiliza color verde para diferenciar las proyecciones eferentes del Núcleo medial de la Habénula (MHb, verde) y el Núcleo Lateral de la Habénula (LHb, azul).

2.5 EBF2

El Factor de células B tempranas 2 (EBF2, por sus siglas en inglés) pertenece a una familia de factores de transcripción hélice-bucle-hélice que son expresados en múltiples

tejidos del organismo (adipocitos, osteoblastos, células neuronales, entre otros) y son cruciales para el desarrollo de estos en etapas embrionarias y posnatales (Jin et. al, 2010).

En el sistema nervioso periférico se involucra en la diferenciación y desarrollo temprano de las células de Schwann, las cuales permiten la mielinización de las terminales axónicas eferentes y/o aferentes. Al igual de que sirve como promotor para el gen de Gliomedina, quien se contribuye a la formación de los nodos de Ranvier (Moruzzo, 2017).

Estudios en modelos de ratones *knockout (KO)* del gen EBF2 han sido capaces de describir otras funciones importantes del gen EBF2 para su desarrollo durante etapas embrionarias y post natales las cuales serán discutidas posteriormente.

2.6 tGFP (Tau-Green Fluorescent Protein)

tGFP pertenece a una familia de proteínas fluorescentes que son capaces de emitir luz verde frente a estímulos de luz azul y ultravioleta (Kendall & Badminton, 1998).

GFP cuenta con una cadena de aproximadamente 238 aminoácidos configurados en 11 hojas β , las cuales rodean a una α -hélice que forma el centro de todo el complejo proteico.

GFP tiene un pico de excitación máximo a los 395 nm y un pico de emisión máximo en los 508 nm (Kendall & Badminton, 1998).

La expresión de esta proteína fue observada por primera ocasión en una especie de medusa marina llamada *Aequorea victoria*, la cual habita primordialmente en las profundidades del océano pacífico y en la costa oeste de los Estados Unidos de América (Brejc et al. 1997).

En la actualidad GFP y sus variaciones son ampliamente utilizadas en el estudio de organelos y de la expresión de genes de interés principalmente por el hecho de que su fluorocromo se deriva de la estructura primaria del gen tGFP y no son necesarios factores exógenos o cualquier tipo de sustrato para que se produzca la fluorescencia (Brejc et al. 1997).

2.7 Genotipos de ratón

- Wild-Type (WT)

La particularidad de este genotipo de ratón es que sus dos alelos tienen una copia del gen EBF2 y, por lo tanto, no son capaces de expresar tGFP.

Para fines de la investigación no son utilizados debido a que, inclusive si se trataran con técnicas de inmunomarcación, no serían capaces de exhibir la expresión de EBF2 por la carencia de una proteína fluorescente.

- Heterocigoto (HET)

En este caso, los ratones cuentan con una copia del gen EBF2 y una del gen tGFP en sus respectivos alelos.

- Homocigoto (HOMO,KO)

Los ratones homocigotos carecen del gen EBF2, por lo que ambos de sus alelos cuentan con una copia del gen tGFP.

2.8 Características de Ratón KO

La peculiaridad del ratón homocigoto es que presenta una serie de fenotipos los cuales lo hacen infértil además de presentar otros problemas de salud como lo son la obesidad, el enanismo y la narcolepsia.

Se ha especulado que EBF2 juega un papel sumamente importante en la diferenciación temprana de los tejidos adiposos, principalmente la grasa parda. Esta es crucial para la termogénesis mediante la metabolización de los lípidos almacenados dentro de ella. Estas alteraciones traen como consecuencia un desbalance metabólico que contribuye al hecho de que el ratón KO presente obesidad (Rajakumari et al., 2013).

Estudios previos realizados en estos ratones también muestran una disminución considerable de péptidos de Orexina-A (Orx-A) dentro de los circuitos neuronales del LH,

los cuales se ven involucrados en la gestión del apetito y la satisfacción al momento de ingerir alimentos (Vidal Tamayo et al., 2011).

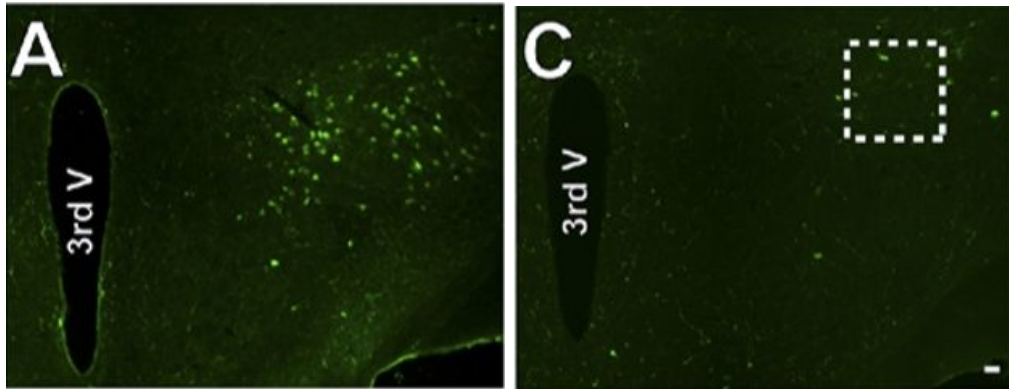


Figura 6. Tinción de Orexina A.

Disminución de poblaciones celulares productoras de Orexina A en el hipotálamo lateral del ratón KO de EBF2 (der.). (Vidal Tamayo et al. 2011)

Por otro lado, una de las principales razones por las cuales el ratón KO suele ser infértil es debido a una deficiente migración de las neuronas encargadas de la síntesis de la hormona liberadora de gonadotropina (Hipogonadismo). Esto conlleva a una alteración en la formación del eje hipotálamo-hipofisario, el cual es de suma importancia para el desarrollo de la pubertad (Corradi et al. 2003).

2.9 Patologías

De acuerdo con su etimología, la palabra patología proviene del término griego “pathos” el cual tiene numerosos significados como: sufrimiento, enfermedad o dolencia. En el ámbito de medicina una patología se define como la alteración de los componentes y el funcionamiento de un organismo vivo (Herrero, J. 2006).

2.9.1 Narcolepsia

La narcolepsia se clasifica como un trastorno del sueño que tiene como característica principal somnolencia extrema durante el transcurso del día y ataques de

sueño imprevisibles (Clínica Mayo, 2018). Además de la somnolencia esta enfermedad es acompañada de otros tres síntomas que son: cataplejía, o pérdida súbita del tono muscular, delirios, o alucinaciones vívidas y cortos episodios de parálisis del cuerpo.

Así mismo esta enfermedad tiene un origen neurológico, ya que existe una alteración en la capacidad cerebral de regular los ciclos de sueño-vigilia que son moderados por el hipotálamo. Los episodios de narcolepsia se pueden presentar en cualquier momento del día, es por esto que los individuos con esta enfermedad son incapacitados para realizar actividades que requieran de una atención constante (NINDS, 2016).

2.9.2 Infertilidad

La infertilidad es una patología que impide que una pareja sexualmente activa pueda concebir durante un periodo de más de un año. Esta enfermedad afecta a 1 de 7 parejas en edad reproductiva, lo que puede generar un estrés psicológico.

En mujeres puede ser el resultado de concentraciones altas hormonas como la prolactina, Hormona de Folículo Estimulante (HFS) y la Hormona Luteinizante (HL). Estas son hormonas producidas por el hipotálamo con fines reproductivos que se encuentran alteradas. También pueden encontrarse trastornos en el ciclo menstrual, que provocan amenorrea y anovulación lo que hace imposible la fecundación (Carrera, J et al 2019).

2.9.3 Enanismo

El enanismo se caracteriza en individuos de talla corta, que durante su etapa de desarrollo y crecimiento tuvo un déficit de producción de la Hormona de Crecimiento (GH). Habitualmente mide menos de 140 cm en hombres y 130 en mujeres (Sociedad Española de Medicina Interna, 2019).

En ratones, se caracteriza por individuos que dejan de crecer a las 6 semanas de edad y presentar un entre los 10 y 15 gr. Los ratones sanos pueden llegar a pesar hasta 40 gr y detienen su crecimiento alrededor de las 9 semanas (Behringer, et. al., 1998).

2.9.4 Obesidad

La obesidad se define como una enfermedad de origen multifactorial lo que la hace una patología compleja. Se caracteriza por la acumulación anormal de tejido adiposo que puede perjudicar la salud. Para fines prácticos la obesidad se determina a partir de un IMC mayor a 30kg/m² en hombres y mujeres. Algunas posibles causas de esta patología están relacionadas con la regulación de hambre y saciedad que tiene un rol principal en el hipotálamo (Organización Mundial de la Salud, 2018).

III. Pregunta de Investigación

Dado que los ratones KO de EBF2 presentan problemas en la conducta de ingesta de alimentos y que esta es una conducta motivada ¿Se expresa EBF2 en las neuronas que forman los circuitos de motivación (DDCS) y recompensa (MFB)?

IV. Justificación

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) (2018), México se ha declarado en un estado de emergencia sanitaria por la epidemia de obesidad y diabetes. Tan solo en el año de 2016 la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) mostró que al menos el 72.5% de los adultos en México presentaron algún tipo de sobrepeso, obesidad o diabetes. Estos diagnósticos se han visto más en mujeres en etapa reproductiva y que residen en zonas rurales.

El sobrepeso y la obesidad aumentan el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) y comorbilidades, pueden llevar a una mortalidad temprana, y reducen significativamente la calidad de vida de los individuos (Barrera-Cruz, A 2013). Es una enfermedad compleja y de origen multifactorial, ya que es el conjunto la susceptibilidad genética, los estilos de vida y del entorno y el comportamiento individual. Es por esto, que la

gestación y los primeros meses de vida son cruciales para su prevención. Asimismo dentro de estos niveles hay más factores involucrados como el ambiente familiar, comunitario y social, el entorno político, las condiciones económicas, entre otros .

En México desde el año 1980 a la actualidad, la prevalencia de sobrepeso y obesidad se ha triplicado, alcanzando cifras alarmantes. (Escobedo, M et al, 2004). A pesar de los esfuerzos realizados por Secretaría de Salud, cómo La Estrategia Nacional para la Prevención y Control del Sobrepeso, Obesidad y la Diabetes en el 2008, que tiene un enfoque educativo para la promoción de buenos hábitos alimenticios y actividad física, no ha sido suficiente para el control de peso de los mexicanos.

Otra estrategia tomada por el gobierno fue la implementación de Estrategia Mundial sobre Alimentación Saludable, Actividad Física y Salud para la prevención de enfermedades crónicas, propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y aplicada en México desde 2004. Así también en el año 2017 se actualizó la Norma Oficial Mexicana 008 que establece los criterios para sanitarios para regular el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad donde los puntos de corte de Índice de Masa Corporal (IMC) y circunferencia de cintura se han ajustado a la población mexicana.

Sin embargo, las cifras de las encuestas de salud como la ENSANUT 2016 Medio Camino y la ENSANUT 2017 han arrojado datos de mayor prevalencia de sobrepeso y obesidad que indica que las medidas de prevención y control propuestas por el gobierno de México no han tenido un impacto positivo en la salud de los mexicanos. Así también, lo que tienen en común las estrategias para el control de peso son recomendaciones generales para todos los grupos de edad entre las que destacan la reducción calórica en la dieta y la implementación de la actividad física en todas las edades.

El problema de sobrepeso y obesidad ha sido persistente en la población mexicana, por ello es de gran importancia comenzar a buscar nuevas alternativas para encontrar una solución óptima y segura. Es aquí donde se genera la pregunta si lo que se necesita para

cambiar el panorama actual es una intervención individual, que tenga como base lo particular de cada organismo, donde se consideren elementos conductuales y psicosociales que se ha demostrado tienen una repercusión en los comportamientos alimentarios de las personas (INSP, 2018).

V.Hipótesis

Si la expresión de EBF2 es necesaria para el establecimiento de los circuitos que regulan las conductas motivadas, entonces se debería identificar expresión de EBF2 en estos mismos en algún momento del desarrollo encefálico del ratón.

VI.Objetivos

General: Analizar el patrón temporal de la expresión de EBF2 en el hipotálamo durante el desarrollo encefálico en ratones y su relación con conductas motivadas.

Particulares:

- Definir si existe una compartimentación de la expresión de EBF2.
- Definir la ventana de expresión de los elementos que componen los circuitos de motivación.

VII.Metodología

La naturaleza del proyecto implica realizar una serie de actividades dentro de laboratorio. Por esto, es de suma importancia que se cuente con un esquema de trabajo sólido y confiable para cumplir con los requerimientos y objetivos propuestos en las secciones anteriores.

La metodología que se presentará a continuación es una que ha sido utilizada por el Dr. Román Vidal-Tamayo en experimentos de índole similar y ha sido adecuada a los requerimientos específicos del proyecto.

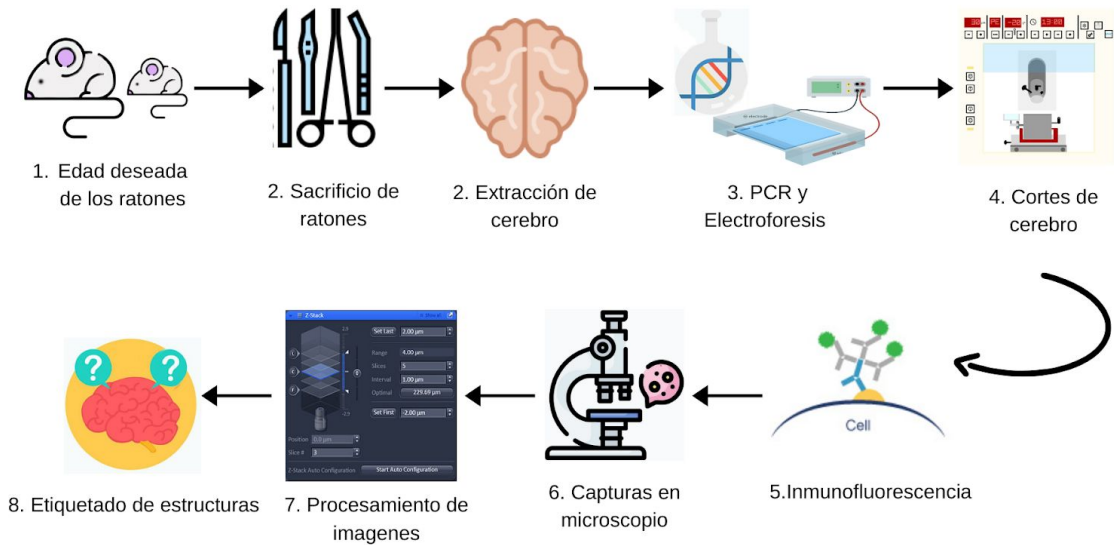


Figura 7. Metodología para obtención de resultados.

Diagrama de flujo de trabajo realizado en el laboratorio.

El proyecto ha sido aprobado por el comité de Bioética de la Universidad de Monterrey y todos los procedimientos incorporados en la metodología fueron adecuados acorde a las Normas Oficiales Mexicanas (detalladas posteriormente) y a las guías establecidas por The National Institute of Health (NIH).

7.1 Bioterio

Dentro del Laboratorio de Fisiología I de la Universidad de Monterrey se cuenta con un bioterio que cumple con las condiciones vitales para sustentar la vida y el desarrollo de los ratones acorde a la Norma Oficial Mexicana *NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio."*

Con la ayuda de un temporizador programable que controla el encendido y apagado de la habitación donde se encuentran, se establece un horario de luz/oscuridad de 12 horas entre cada uno.

Se cuenta con 6 jaulas para ratones en las cuales la mayoría de las veces se colocan 2 ratones (de la cepa $129Sv^{EBF2-GFP}$) de diferente sexo con el propósito de que formen una camada. Una vez que tienen una camada no se mueve su nido hasta que los

ratones recién nacidos cumplan una semana, esto para evitar el rechazo de la madre en los primeros días de vida. Cada jaula en condiciones normales es aseada una vez por semana y en dicha ocasión se hace un cambio total de su agua para beber y de su alimento (Purina-LABDIET 5008).

El propósito de cada camada puede alternarse entre dos opciones: que los ratones de la camada se usen como *pies de cría* o que puedan ser incorporados como parte de un experimento. El propósito de cada camada es determinado por diversos factores como el número total de pies de cría con los que se cuenta en el momento, cantidad de crías, entre otros.

7.2 Sacrificio de ratones y obtención del cerebro

Este paso involucra el sacrificio de los roedores para después diseccionar el cerebro. A manera de preservar la integridad anatómica neuronal del ratón, se utilizan distintas técnicas dependiendo de la edad y condición fisiológica.

Se siguen las consideraciones que estipula la NOM-033-ZOO-1995 Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Se requiere que el animal tenga una muerte sin sufrimiento y dolor, por este motivo nos apegamos a métodos estandarizados de anestesia pruebas de sensibilidad en el roedor al iniciar el sacrificio.

El orden de la nomenclatura que se utiliza para diferenciar cada uno de los ratones es la siguiente:

1. Número de postnatal.
2. Número de ratón.
3. Día en que se sacrificó.
4. Género del ratón.

7.2.1 Ratones Embrionarios

Para los ratones embrionarios se utilizó la siguiente técnica:

1. Se pasa a la ratona embarazada de su jaula a un espacio individual
2. Se aplica la anestesia general Pentobarbital de manera intraperitoneal a 30 °. Los mililitros de anestesia van a depender del peso de la ratona.
3. Una vez dormida, se comprueba que no tenga reflejos de sensación aplicando presión a la base de la cola.
4. Se realiza una incisión vertical desde la caja torácica hasta los genitales y se abre la cavidad hasta que se localice el corazón.
5. Se localiza la vena cava y se corta, se realiza una punción con una cánula en el ventrículo izquierdo y se perfunde el corazón.
6. Se perfunde el corazón, primero con 20 ml de PBS 1X.
7. Después se sigue la perfusión con 50 ml de PFA.
8. Se vuelve a añadir 20 ml de PBS 1X, en este momento la ratona debe de estar completamente rígida.
9. Se abre la cavidad uterina hasta localizar a los embriones y se remueven de el saco amniótico.
10. Se inspecciona cada uno de los embriones y se remueve la placenta y líquido amniótico restante.
11. Se realiza una incisión de 1 mm en la cola de los embriones para realizar PCR.
12. Se decapita a la ratona sintiendo las vértebras por detrás de las orejas y se remueve toda la piel de la cabeza.
13. Se retira el cerebro por microcirugía separándolo del cráneo y epitelio olfatorio.
14. Se coloca cada uno de los embriones en tubos individuales de 50 ml de PFA por 72 horas en un cuarto frío de 4 °C.
15. Se coloca el cerebro de la ratona en un tubo con 50 ml de PFA por 72 horas en un cuarto frío a 4°C.

16. Se mueve el cerebro y los embriones a tubos individuales con 50 ml cada uno de Sacarosa a 30% con EDTA al menos 5 días un cuarto frío a 4° C.
17. Se retiran del medio para pasar a la etapa de corte.

7.2.2 Ratones Postnatal de 0 a 7 días

Para los ratones P0 y P7 se utilizó la siguiente técnica:

1. Se pasa al ratón de su jaula a un espacio individual.
2. Se coloca al ratón en un espacio frío, en este caso una hielera por aproximadamente 10 minutos o hasta que se quede inmóvil.
3. Se corta la cabeza del ratón con un bisturí en un solo movimiento, se tocan las vértebras por detrás de las orejas para ubicar el punto de disección.
4. En caso de ser necesario se retira la piel del cuerpo.
5. Se deja la cabeza en un tubo con 50 ml PFA por 72 horas en un cuarto frío a 4°C.
6. Se mueve la cabeza en 50 ml de Sacarosa 30% con EDTA y se deja por lo menos 5 días.
7. Se remueve del medio para pasar a la etapa de corte.

7.2.3 Ratones Postnatal de 8 días en adelante

Para los ratones P8 en adelante se utilizó la siguiente técnica:

1. Se pasa al ratón de su jaula a un espacio individual.
2. Se aplica la anestesia general Pentobarbital de manera intraperitoneal para dormir al ratón.
3. Una vez dormido, se comprueba que no tenga reflejos de sensación aplicando presión a la base de la cola.
4. Se realiza una incisión vertical a la altura de la caja torácica y se abre la cavidad hasta que se localice el corazón.

5. Se localiza la vena cava y se corta, se realiza una punción con una cánula en el ventrículo izquierdo y se perfunde el corazón.
6. Se perfunde el corazón, primero con 5 ml de PBS 1X para los P14 y para 10 ml para los P21.
7. Después se sigue el PFA con 10 ml para los P14 y para los P21 20 ml.
8. Se vuelve a añadir 5 ml y 10 ml de PBS 1X respectivamente por edad, en este momento el ratón debe de estar totalmente rígido
9. Se decapita al ratón sintiendo las vértebras por detrás de las orejas y se remueve toda la piel de la cabeza.
10. Se retira el cerebro por microcirugía separándolo del cráneo y epitelio olfatorio.
11. Se coloca el cerebro en un tubo con 50 ml de PFA por 72 horas en un cuarto frío a 4°C.
12. Se mueve el cerebro a un tubo con 50 ml de Sacarosa a 30% con EDTA al menos 5 días un cuarto frío a 4° C.
13. Se retira del medio para pasar a la etapa de corte.

7.3 Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)

La reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) es un método que permite la amplificación de determinadas regiones de ADN y sirve para su análisis. Se utiliza en el laboratorio porque ayuda con la identificación de genotipo al que pertenece cada ratón.

Para fines de esta investigación, los genes diana en los experimentos de PCR son: WT, GFP y EBF2-tGFP, siendo sólo estos genes con los que se identifica si el ratón pertenece al genotipo WT, HET u HOMO.

El protocolo empleado para realizar los experimentos venía en el kit de PCR, no obstante, se hicieron modificaciones para obtener mejores resultados. Los pasos seguidos para los experimentos fueron los siguientes:

1. Se corta 1mm de cola de ratón y se coloca en un tubo de 2mL.
2. Se añade 20 µl de Buffer A, 10 µl de Buffer B y 70 µl de agua estéril destilada al tubo.
3. Se incuba por 5 min a 75°C, utilizando el agitador vórtex en intervalos de 1 min.
4. Se centrifuga a máxima velocidad por 1 minuto.
5. Se diluye la muestra 1:10 en agua destilada estéril. Se recomienda usar 70 µl para el modelo de ADN.
6. Se realizan las mezclas de Master Mix (MM) para cada gen que incluyen los primers el MyTaq HS Red Mix y agua destilada estéril. Se agrega una muestra más en los cálculos para la preparación. A continuación se muestran los cálculos a detalle:

Tabla 1. Cálculos para preparación de PCR

Cantidad para 1x de muestra	
Primers (Forward y Reverse)	.50 µl
MyTaq HS Red Mix	6.25 µl
Agua estéril destilada	3.25 µl
Total	10 µl

7. Se coloca 1 de la muestra de ADN diluida por cada 10 de Master Mix de cada gen, teniendo un total de 2 tubos de 2 µl por ratón. El ejemplo se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 2. Ejemplo de preparación final de Master Mix

Master Mix	Ratón 1	Ratón 2
EBF2-tGFP	Tubo A1	Tubo B1

GFP	Tubo A2	Tubo B2
-----	---------	---------

Al finalizar las mezclas, los tubos se llevan al termociclador Eppendorf. En la tabla siguiente se muestran los tiempos, las temperaturas y condiciones de los ciclos.

Tabla 3. Ciclos del termociclador para PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	20 segundos	35 ciclos
Templar	63°C	20 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	

El termociclador mantiene la parte superior a temperatura elevada y la parte inferior en un cambio de temperatura constante. Son necesarios los ajustes de temperatura que hace el termociclador, ya que de esta manera se rompen las cadenas de ADN. Los puntos de unión de estas moléculas son por medio de puentes de hidrógeno. Una vez que se separan la Taq polimerasa es capaz de reproducir la cadena de ADN.

7.3.1 Electroforesis

La electroforesis es una técnica utilizada para la separación de moléculas con base en su tamaño y carga eléctrica, en este caso ADN. La corriente eléctrica ayuda a movilizar y separar las moléculas por medio de un gel. Los poros del gel sirven como separadores, así permiten un movimiento más rápido de las moléculas pequeñas que las grandes (NIH, 2019).

Las bandas de cada gen tienen un tamaño específico de pares de nucleótidos, WT 100 pares de bases, GFP 200 pares de bases y EBF2-TGP 800 pares de bases. Los genes de interés mencionados anteriormente, fueron pedidos para tener un tamaño de banda específico de acorde al experimento.

El procedimiento seguido para la electroforesis es el siguiente:

1. Se prepara un gel a base de 150 mL de TAE 1x y 2 gr de agarosa. Se mezcla y calienta hasta que luzca transparente y sin grumos.
2. Cuando esté a una temperatura de 65 C° agregar 5 µl de colorante Gel Red Nucleic Acid Stain.
3. Se vierte la mezcla por la orilla inferior de la cámara (previamente sellada por los extremos y con los cepillos puestos) y se deja a temperatura ambiente hasta cuajar por 30 minutos.
4. Se coloca el gel en la cámara para electroforesis y se llena con TAE 1x.
5. Se coloca 5 µl de escalera en el primer espacio.
6. Se juntan las muestras de cada gen con sus MM en un solo tubo (A1 con A2, B1 con B2, y así sucesivamente).
7. En cada espacio se agregan 5 µl de cada tubo después de la escalera.
8. Se aplican 100 Volts constantes por 50 minutos.
9. Se utiliza el software Enduro GDS para visualizar el gel y adquisición de la imagen.
10. Se etiqueta cada banda con la nomenclatura de ratón correspondiente.

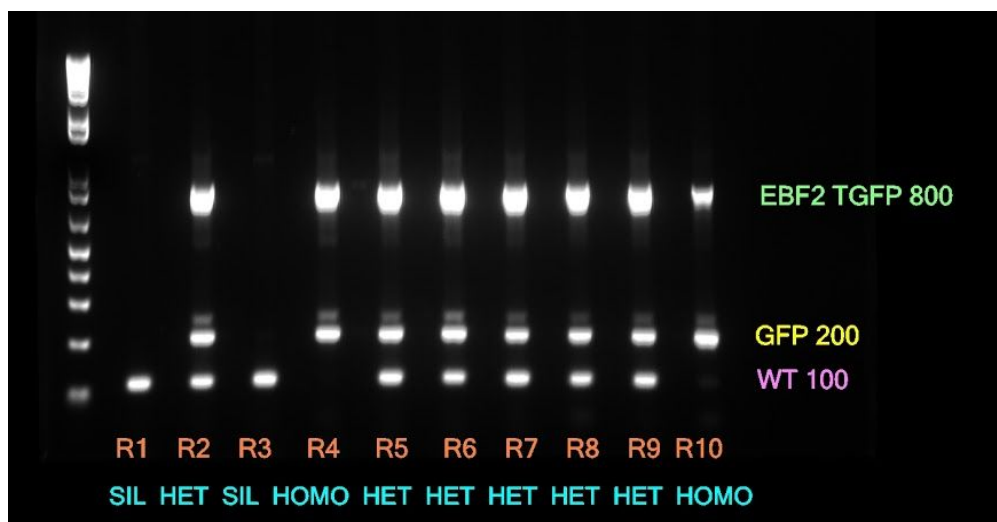


Figura 8. PCR de una camada de 10 ratones (Cisneros, Morales & Salas, 2019).

En la imagen se muestra el ejemplo de identificación del genotipo, el ratón WT o silvestre no tiene bandas transgénicas de GFP, el homocigoto (HOMO) tiene solo GFP y EB2-tGFP y el ratón heterocigoto (HET) tiene las tres bandas WT, GFP y EBF2-tGFP.

7.3.2 Corroboración del Genotipo

Existen dos aspectos fenotípicos de carácter morfológico que se presentan en el desarrollo encefálico de los ratones HOMO, los cuales pueden ser utilizados a favor para corroborar el genotipo de estos, previamente determinado por la PCR.

En el caso del cerebelo, existe una malformación de dos de sus lóbulos más dorsales. Esto hace que en el ratón se observe un lóbulo sumamente alargado y la estructura en general más compacta. (Corci, L. et. al, 2006)

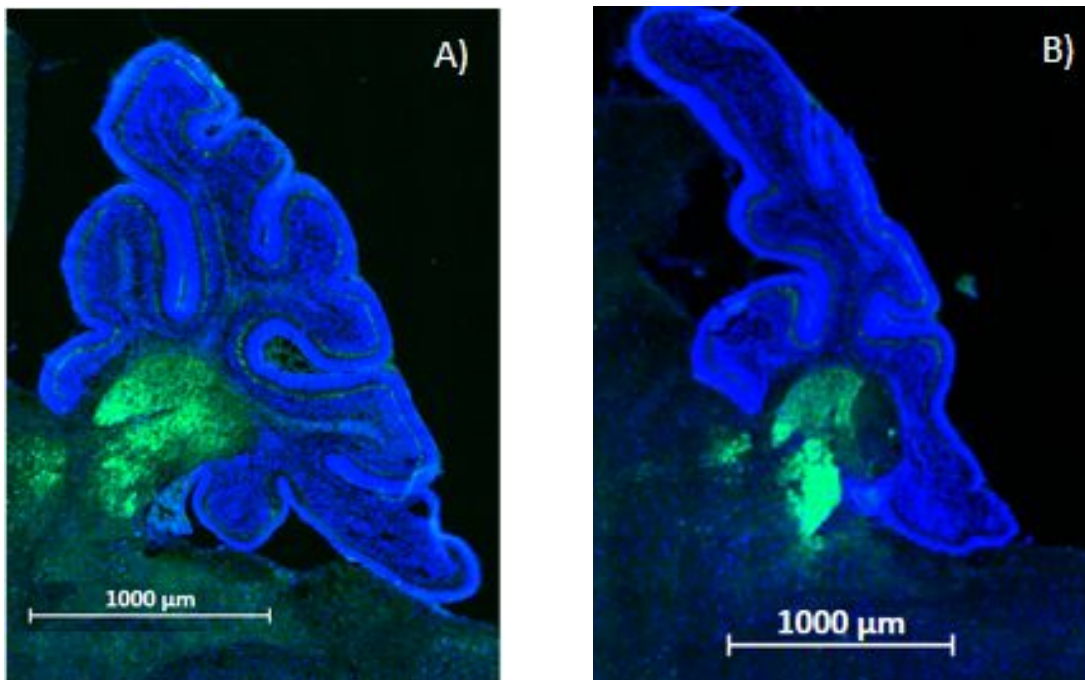


Figura 9. Cerebelos de ratones HET (A) y HOMO (B) .

Imagen representativa de un corte sagital del cerebelo de ratones HET y HOMO de siete días posnatales en los que se muestra la comparación del rasgo fenotípico que se presenta en la morfología de los cerebelos de cada uno de estos.

Asimismo, en el ratón HOMO existe una pobre diferenciación de células pertenecientes a la parte dorsal del bulbo olfatorio. Esto da como resultado la nula expresión de EBF2 en estas zonas. (Wang, S. et. al, 2004).

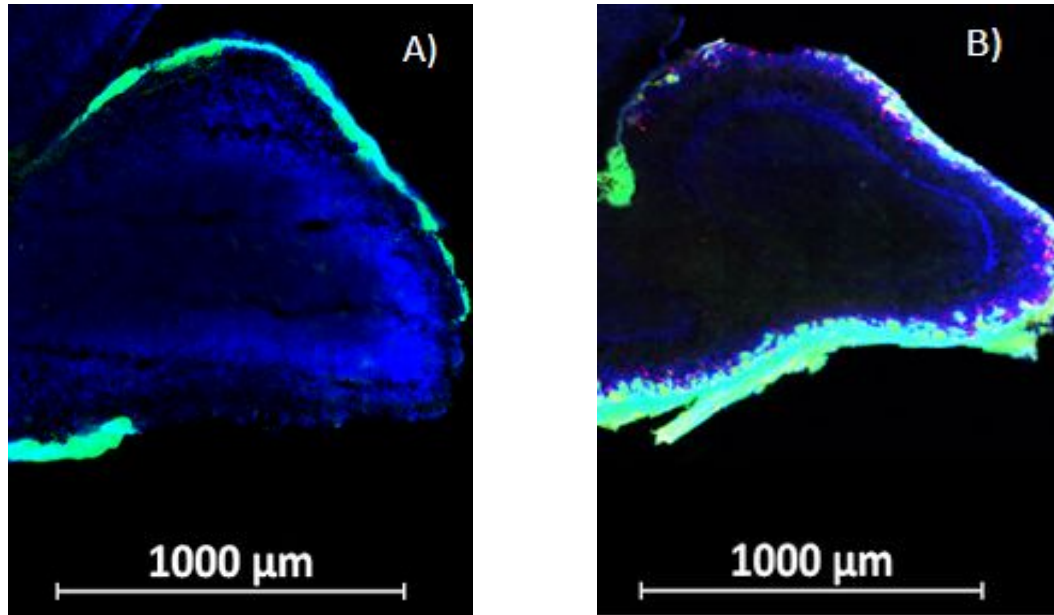


Figura 10. Bulbos olfatorios de ratones HET (A) y HOMO (B) .

Imagen representativa de un corte sagital del cerebelo de ratones HET y HOMO posnatales en los que se muestra la comparación del rasgo fenotípico que se presenta en la expresión de EBF2 en la parte dorsal de los bulbos olfatorios de cada uno de estos.

7.4 Cortes del Encéfalo

Para generar los cortes micrométricos del encéfalo de los ratones se utiliza un criostato integrado con un microtomo especializado para cortes histológicos de alta precisión de la marca Leica CM1860 UV.

El proceso de generación de cortes tiene una duración aproximada de 3-5 horas dependiendo del tejido con el que se esté tratando e implica tres etapas: La crio-sección del espécimen, la etapa de fijación y la etapa de cortes-capturas.

7.4.1 Congelación del espécimen

Es fundamental que el espécimen se encuentre congelado para evitar alteraciones morfológicas y la degradación del mismo durante el proceso para generar los cortes.

A continuación se especificarán los pasos a seguir para la crio-sección.

1. Preparar el espacio donde se estará trabajando (Microscopio Zeiss Stemi 2000 C, fuente de luz CL 1500 ECO, caja petri de vidrio, vaso de precipitado y kit de disección.
2. Identificar el tubo de 50 ml de sacarosa en el cual se encuentre el espécimen de interés (ubicado en el refrigerador de -4°C) y colocarlo en una gradilla.
3. Colocar la caja petri debajo del objetivo del microscopio, encender y colocar la fuente de luz de manera que ilumine a la caja petri.
4. Destapar el tubo de 50ml que contenga al espécimen y vaciar cuidadosamente 40 ml de sacarosa sobre el vaso de precipitado.
5. Vaciar el resto de la sacarosa sobre la caja petri junto con el espécimen de manera cuidadosa y evitando a toda costa los golpes y daños al tejido.
6. Visualizar el espécimen a través del microscopio y, dependiendo del caso, seccionar la porción de interés.
7. Secar el exceso de sacarosa del tejido con una toalla de microfibra.
8. Llenar un cubo de fijación con medio congelante Leica (OCT).
9. Sumergir el tejido dentro del cubo de fijación y esperar 40 minutos.
10. Trasladar el cubo de fijación al Criostato/microtomo y esperar a que el OCT se congele.

7.4.2 Fijación

La etapa de fijación es la más importante debido a que va a ser capaz de determinar la orientación (sagital, coronal, horizontal) y calidad de los cortes (si realmente se encuentra bien alineado el tejido).

A continuación se especificarán los pasos a seguir para la fijación.

1. Tomar el cubo de fijación, colocar la cara superior mirando al suelo y presionar fuertemente con los dedos para que se libere el OCT congelado.

2. Seccionar zonas donde no haya tejido para reducir el exceso de OCT con una navaja.
3. Determinar la orientación del espécimen, vertir OCT sobre la superficie de una platina y colocar el cubo de OCT sobre esta.
4. Esperar a que se congele y que se encuentre rígido el cubo de OCT con el espécimen en la platina.
5. Montar la platina en el eje del microtomo.
6. Cambiar la navaja del anti-roll.
7. Alinear el espécimen congelado con la navaja del anti-roll (realizando cortes a 15 μ m y cerciorándose que se generen rebanadas uniformes y sin grietas).

7.4.3 Cortes y capturas

Una vez que se se empiecen a generar cortes firmes y sin rupturas se comienza un proceso de captura del tejido en laminillas Leica Apex. Para ello es importante configurar el microtomo para generar cortes de 30 μ m.

Se capturan en juegos de 5 laminillas y se rotulan con la siguiente información:

- Edad del ratón.
- Número de ratón.
- Mes y día en el que fue sacrificado.
- Fecha del día en que se realizaron los cortes.
- Tipo de corte y número de laminilla
- Sexo del ratón.
- Genotipo del ratón

El proceso de captura se sigue de manera secuencial, es decir, el primer corte se captura en la esquina superior izquierda de la laminilla 1 y el segundo corte en la misma posición de la laminilla 2 y así sucesivamente.

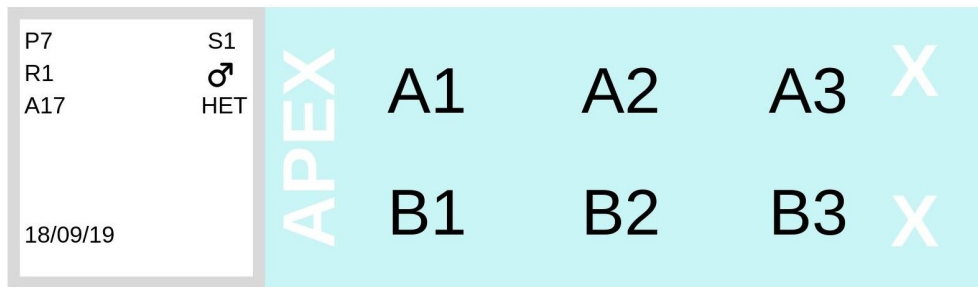


Figura 11. Ejemplo de nomenclatura de laminillas

Donde P7 significa ratón Postnatal de 7 días, R1 es el ratón 1 de su respectiva camada, A17 representa el día de sacrificio (17 de agosto), la fecha indica el día en que se hicieron los cortes, S1 es corte Sagital laminilla 1, ♂ para denotar al sexo masculino y por último HET para denominar el genotipo del ratón. La nomenclatura de los cortes es en sistema alfanumérico de manera sucesiva.

Para nombrar los tejidos individualmente se establece el número de filas como parte de una ordenación alfabética (A,B,C,D...) y las columnas como una numeración (1,2,3,4...). De tal manera que, para referirse a un tejido, se tiene que hacer referencia a una coordenada.

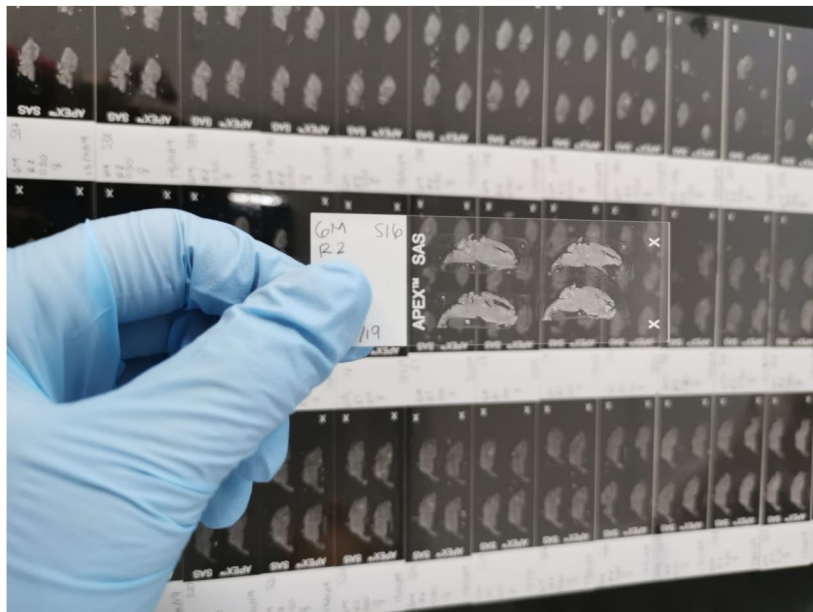


Figura 12. Cortes de cerebro de ratón adulto en plano sagital.

Sets de laminillas obtenidas durante el proceso de corte de un cerebro de ratón adulto en plano sagital. Se utilizaron un total de 50 laminillas.

El número de cortes por laminilla varía dependiendo del tamaño de estos, sin embargo, en todas las ocasiones se procura manejar el mismo número de tejidos por cada juego de laminillas.

7.5 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que se utiliza para detectar la presencia de estructuras moleculares por medio de antígenos afines. Permite la expresión fluorescencia ya que recibe luz una cierta longitud de onda (excitación), y emite luz a otra longitud de onda (emisión).

El protocolo que se utiliza en el laboratorio está estandarizado para la aplicación a fines de esta investigación y la correcta colocación de EBF2 con los neuropéptidos de los tejidos.

Se utilizan anticuerpos específicos (Anexo V) para la tinción de tGFP y de Tirosina hidroxilasa (TH), la cual es una enzima que establece el paso limitante para la síntesis de catecolaminas y es utilizada como medio de rastreo para poder observar la expresión en las zonas involucradas en el sistema de recompensa.

Previo a comenzar con la inmunofluorescencia, se retiran las laminillas del congelador que se encuentra a - 72 °C y se llevan a temperatura ambiente por 15 minutos .

La inmunofluorescencia consta de dos incubaciones: una para incubar los anticuerpos primarios y la otra con secundarios. A continuación se presenta el protocolo de cada incubación.

7.5.1 Primera Incubación

1. Se seleccionan las laminillas y se colocan en la incubadora a 37 °C por 30 minutos

2. Se hidratan las laminillas en PBS Tween por 10 min después de la incubación.
3. Se prepara el Bloqueo considerando que a cada laminilla se le aplica 150 μ l. Consta de suero de burro al 5%, Triton X-100 al 0.3% y aforar con PBS 1X. Esto es para evitar uniones no específicas de los anticuerpos.
4. Se deja a temperatura ambiente en una cámara húmeda de inmunotinción por al menos 2 horas.
5. Se empieza la primera incubación considerando que se añaden 150 μ l en cada laminilla. Para la mezcla se necesita Tween 20 al 0.1%, suero de burro al 5%, dilución óptima de los anticuerpos primarios (1:500) y aforar con PBS 1X.
6. Finalmente se cubren las laminillas en parafilm entre 24 a 48 horas en una temperatura de 4°C en cámara húmeda de inmunotinción.

7.5.1 Segunda Incubación

1. Las laminillas se retiran del cuarto frío y llevan a temperatura ambiente por 15 minutos y se retira el parafilm.
2. Se realizan tres lavados con PBS-Tween (0.1%) durante 5 minutos cada uno.
3. Se empieza la segunda incubación considerando que se añaden 150 μ l en cada laminilla. La solución consta de agregar Tween 20 al 0.1%, dilución óptima de los anticuerpos secundarios (1:500) y aforar con PBS 1X.
4. Se mantienen las laminillas a temperatura ambiente durante 2 horas en cámara húmeda de inmunotinción.
5. Se retira el exceso de solución de las laminillas y se realizan 2 lavados en PBS- Tween y una lavado de PBS de 5 minutos cada uno.

6. Se aplican 50 μ l de medio de montaje Fluoro-Gel II con DAPI y se se cubre con cubreobjeto colocandolo suavemente sobre la laminilla y ejerciendo una ligera presión en las orillas.
7. Se dejan las laminillas al menos 24 horas a 4 °C para que el medio de montaje cuaje.
8. Las laminillas se mantienen en un cuarto oscuro a 4°C.

7.6 Capturas en microscopio

El proceso para generar las capturas de los tejidos tratados con inmunofluorescencia es capaz de proveer los datos necesarios para analizar la expresión de EBF2 en el encéfalo de los ratones.

En el laboratorio de microscopía de la Universidad de Monterrey se cuenta con un microscopio de fluorescencia *Zeiss Axio Imager 2* que funciona en colaboración con un software computarizado llamado *ZEN PRO 2.0* en donde se utilizan una serie de modalidades para generar las capturas de los tejidos por medio de fluorescencia.

Con respecto al flujo de trabajo, se comienza con capturas de aumento óptico de 25x del tejido completo para obtener un amplio panorama de la expresión de EBF2 en múltiples áreas del encéfalo (Para toda información acerca de las características de los objetivos que fueron utilizados en el proyecto consultar el anexo VI). Asimismo, las capturas 25x son de gran utilidad para determinar qué zonas en específico son las que serán adquiridas posteriormente con mayores magnificaciones.

Dentro del programa *Zen PRO 2.0* existe un apartado llamado *Acquisition* en donde se configuran todos los parámetros de la captura siguiendo estos pasos:

1. Se configura el destino en donde se estarán guardando los archivos dentro de la memoria de la PC.

2. Se configura el nombre del archivo, el cual sigue un formato en donde se incluyen los datos del ratón, el objetivo que se utilizó en la captura, la zona anatómica que se va a visualizar y el número de corte, ej. P0R7M7S6 het25x-fr-A1 (ratón recién nacido, número 7, sacrificado el 7 de mayo, corte sagital, laminilla 6, heterocigoto, objetivo 25x, zona del Fascículo Retroflexus, corte A1).
3. Se selecciona el objetivo con el cual se estarán realizando las capturas.
4. Se seleccionan los canales que formarán parte de la captura, por lo general se configuran 2: EGFP y DAPI.
5. Se monta la laminilla en la platina del microscopio, se coloca una gota de agua destilada sobre el tejido con el que se trabajará y se alinea el objetivo con respecto a este tejido.
6. Dentro del programa se selecciona *Live* y se programan los puntos que delimitan la zona de la captura (se genera una matriz de posición que le dice al microscopio donde hacer la adquisición).
7. Se configuran parámetros como el tiempo de exposición de cada canal (se programa te permite ajustarlo de manera automática y este varía con respecto a la intensidad de la señal por canal).
8. Se direcciona toda la luz a la cámara *Apotome*, se enfoca el tejido con respecto a la imagen proyectada en la computadora y se comienza la adquisición.

7.7 Procesamiento de imágenes

Para obtener la mayor cantidad de información posible de cada captura es necesario procesar las imágenes obteniendo así señales con menos ruido y con mayor definición siguiendo el siguiente flujo de procesamiento:

1. Capturas z-stack
2. Apotome Deconvolution

3. Orthogonal Projection
4. Background subtraction

7.7.1 Capturas z-stack

Mediante el uso de uno de los aditamentos del microscopio llamado ApoTome.2 se pueden obtener capturas tomando en cuenta la profundidad del tejido, lo cual contribuye a maximizar la resolución espacial debido a que en ocasiones es imposible enfocar todas las células dentro de una población neuronal. Esto se logra debido a la capacidad del microscopio para realizar múltiples capturas de una misma zona del tejido variando el punto focal para cubrir varios planos de enfoque en donde pudieran encontrarse las células.

El proceso de captura en *z-stack* es similar a una captura normal, solo se le añade la programación de ciertos parámetros intrínsecamente relacionados con la configuración de este.

A continuación se muestra el proceso para realizarlo:

1. Seguir al pie de la letra toda la metodología establecida en la sección **7.6 Capturas en el microscopio** salvo el último paso.
2. Activar la opción de *z-stack*.
3. Posicionarse en una zona de interés del tejido y seleccionar la opción dentro del software llamada *Set first / last*.
4. Girar la perilla de enfoque fino en sentido de las manecillas del reloj hasta que las células en la zona de interés apenas lleguen a aparecer fuera de foco. Dar click en el apartado *Set first*.
5. Girar la perilla de enfoque fino en sentido contrario a las manecillas del reloj hasta que las células en la zona de interés vuelvan a estar fuera de foco. Dar click en el apartado *Set last*.

6. Posicionarse en el apartado llamado *Set center*. Girar la perilla de enfoque fino hasta que el punto focal se encuentre justo en medio del rango delimitado por los puntos marcados anteriormente en *Set first / last*. Darle click en *Set center*.
7. Configurar el número de *slices* a 20 y programar el grosor de cada una de estas a 1 μ m.
8. Se direcciona toda la luz a la cámara Apotome y comenzar la adquisición.

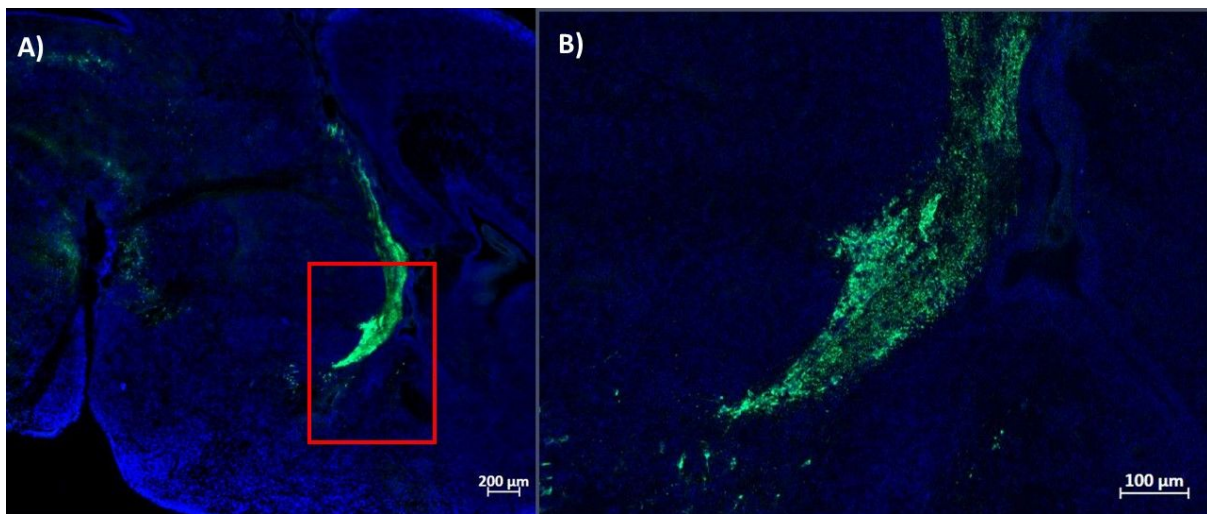


Figura 13. Comparación de imágenes sin y con captura Z-Stack.

Capturas de cerebro del ratón P0R4M7S10 HOMOCIGOTO, corte A2. En el inciso A) es una captura a 25X sin Z-Stack, dentro del rectángulo rojo se encuentra la zona a comparar (Estría Medularis). La imagen B) muestra dicha zona luego de la adquisición con Z-Stack.

7.7.2 Apotome deconvolution

Dentro de las imágenes obtenidas por medio de las capturas es normal encontrar áreas fuera de foco lo cual resulta en una pérdida de contraste y es más común en objetivo de mayor resolución. Por medio de la deconvolución se remueve aquello que está fuera del foco a través de un procesamiento matemático de cada uno de los planos de la imagen. Esto nos da como resultado una mayor claridad en la imagen y mejor representación del tejido real (Nikon, 2019).

Los pasos para realizar la deconvolución son los siguientes:

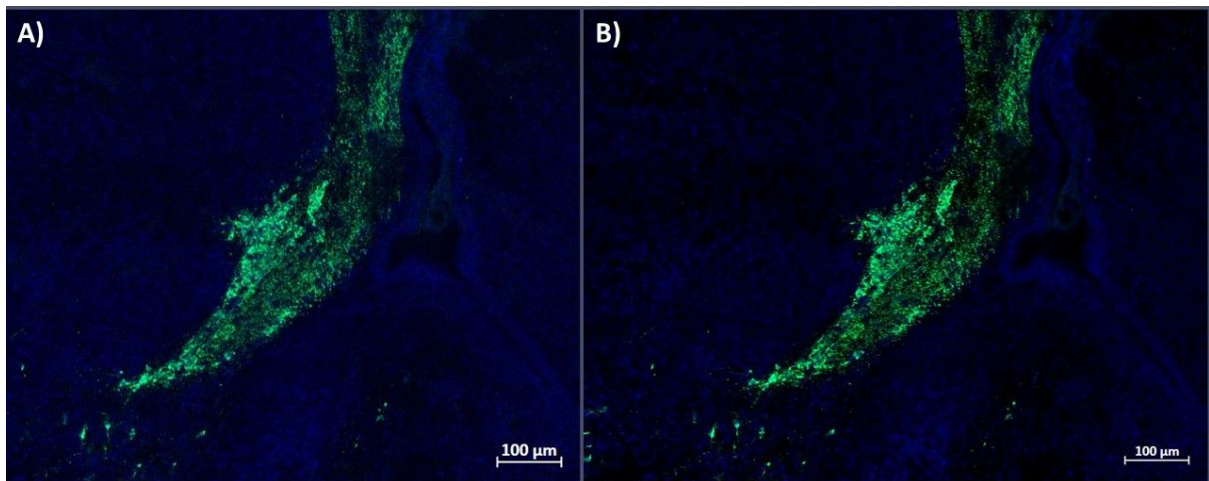


Figura 14. Comparación de imágenes antes y después de la deconvolución.

Capturas de cerebro del ratón P0R4M7S10 HOMOCIGOTO, corte A2. El inciso A) es la imagen adquirida con Z-Stack en la zona de la estría medularis. La imagen B) la misma zona luego de la deconvolución.

7.7.3 Orthogonal projection

Es la suma de los vectores perpendiculares de un mismo punto estableciendo una relación entre el vector proyectante con el proyectado mostrando así en una misma imagen distintos ángulos de un objeto. Para esto se utilizan los stacks de la imagen de los cuales se compara un mismo punto en distintos planos (Dickison, 2019).

Los pasos a seguir son:

1. En el menú *Processing* del programa *Zen PRO 2.0* seleccionar el método *Orthogonal Projection*.
2. Subir la imagen a procesar desde el icono de carpeta en la parte superior izquierda de la pantalla.
3. Determinar los parámetros para el procesamiento de la siguiente manera: Projection Plane: Frontal (XY)
Method: Medium

Start Position: 1

Thickness: Según el número de slices que se generaron en el z-stack.

4. Asegurarse que el *Input* corresponda con la imagen a procesar que se desea.
5. Seleccionar *Apply*.

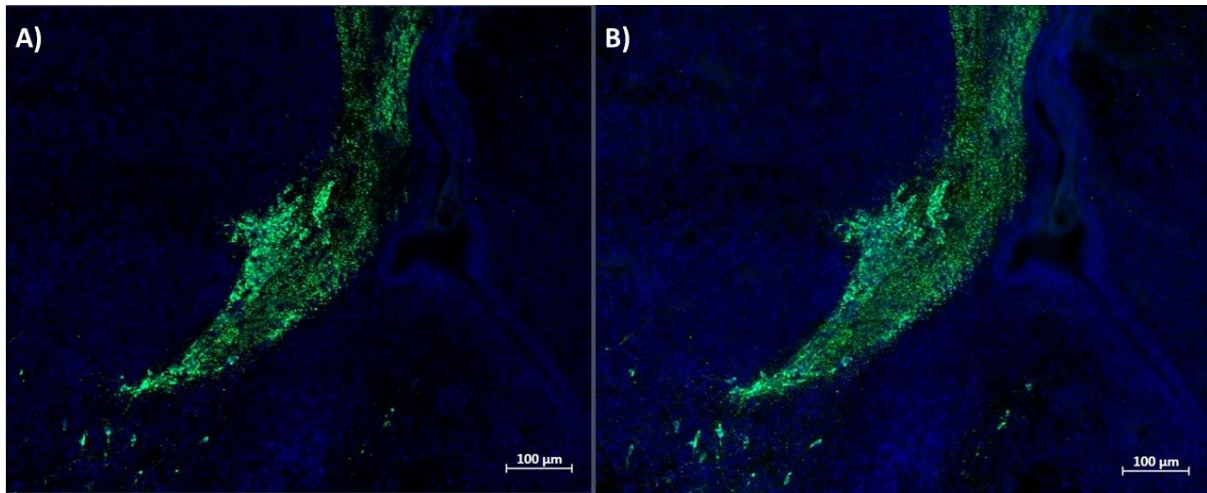


Figura 15. Comparación de imágenes antes y después del Orthogonal Projection.

Capturas de cerebro del ratón P0R4M7S10 HOMOCIGOTO, corte A2. El inciso A) es la imagen procesada con deconvolución. La imagen B) muestra el mismo corte después de la aplicación del Orthogonal Projection. Ambas imágenes son de la zona de la Estría Medular.

7.7.4 Background subtraction

Las imágenes obtenidas cuentan con cierto nivel de ruido proveniente de diversas fuentes durante la captura, por ello es necesario un proceso de eliminación de ruido que permita obtener las señales de fluorescencia reales de cada imagen. El *background subtraction* remueve todas aquellas señales que no provengan de fluorocromos por medio de un algoritmo del software utilizado (Dickison, 2019).

Esto se obtiene por medio de los siguientes pasos:

1. En el menú *Processing* del programa *Zen PRO 2.0* seleccionar el método *Background Subtraction*.
2. Subir la imagen a procesar desde el icono de carpeta en la parte superior izquierda de la pantalla.

3. Determinar los parámetros para el procesamiento de la siguiente manera:
 Radius:100
4. Asegurarse que el *Input* corresponda con la imagen a procesar que se desea.
5. Seleccionar *Apply*.

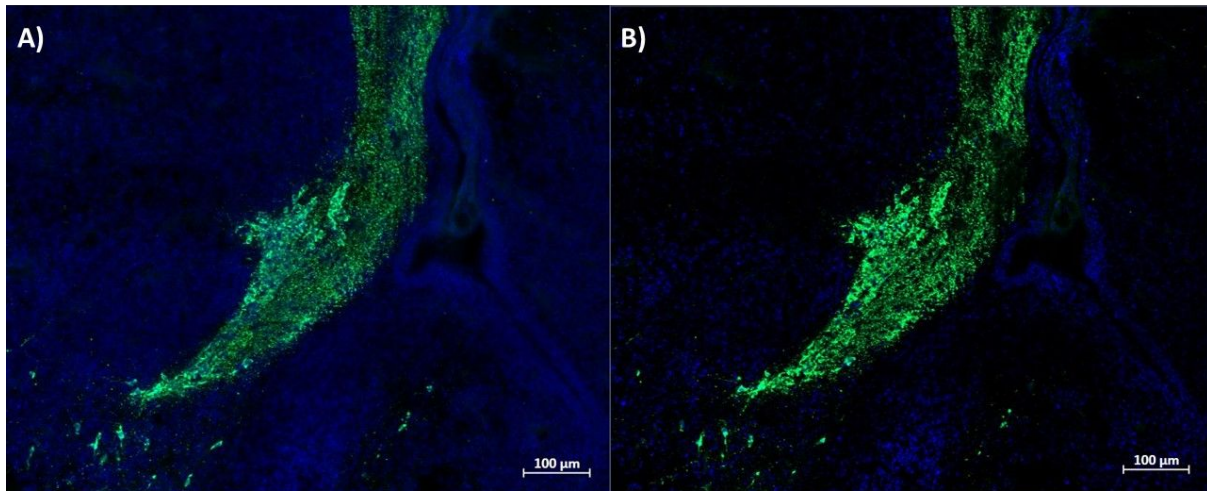


Figura 16. Comparación de imágenes antes y después del Background Subtraction.

Capturas de cerebro del ratón P0R4M7S10 HOMOCIGOTO, corte A2. El inciso A) es la imagen procesada con Orthogonal Projection. La imagen B) muestra el mismo corte después de la aplicación del Background Subtraction. Ambas imágenes son de la zona de la Estría Medular.

7.8 Etiquetado de imágenes

Lo primero es identificar las zonas del cerebro y grupos neuronales presentes en la imagen utilizando atlas de neuroanatomía de ratón de acuerdo a la edad. Posterior a esto se etiqueta la zona para ponerle nombre.

Para el etiquetado se realizan los siguientes pasos:

1. Subir la imagen a procesar desde el icono de carpeta en la parte superior izquierda de la pantalla.
2. Identificar las zonas del cerebro basado en el atlas correspondiente
3. Ir al menú *Graphics* --> *Text* y agregar las etiquetas necesarias.
4. Agregar escala desde el menú *Graphics* y seleccionar *Scale bar*.

5. Guardar la imagen.

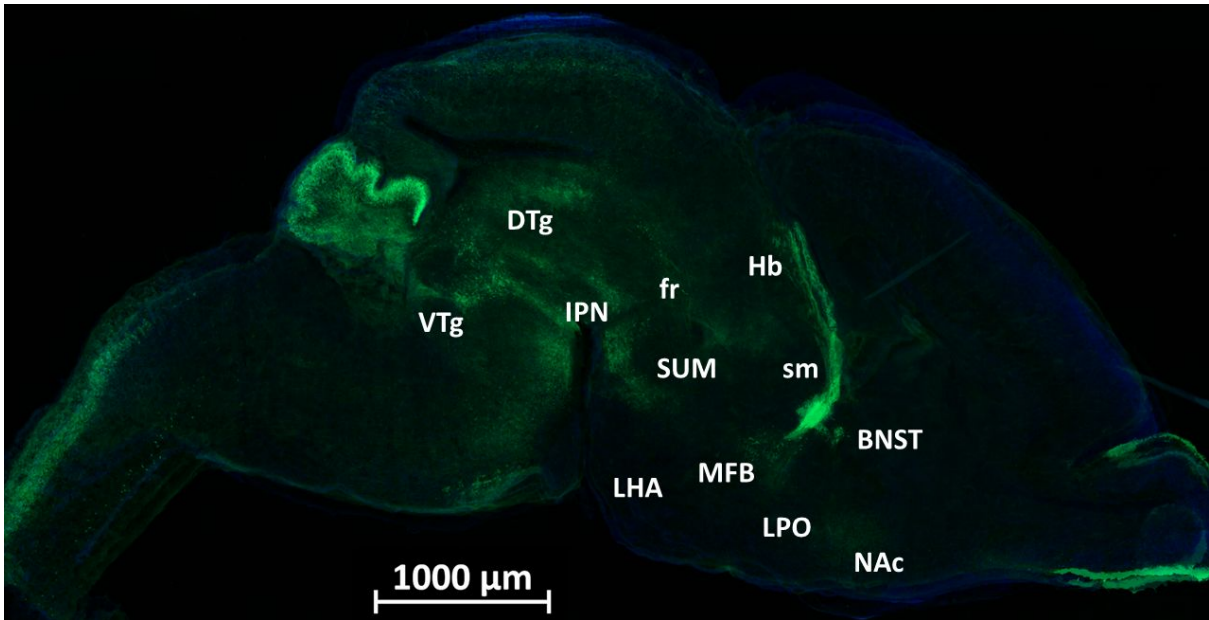


Figura 17. Ejemplo de etiquetado.

Imagen representativa de ratones recién nacidos procesada, con el etiquetado de las áreas de interés.

7.9 Análisis y comparación

El último paso de nuestra metodología es el analizar y comparar las imágenes. Para ellos se cuenta con una tabla de excel donde se coloca la información de identificación de cada corte, la estructura cerebral observada y el número de células con las que se cuenta en esta zona.

Posterior a esto se realiza la comparación de cada una de las las zonas en diferentes ratones, la distribución espacial y temporal de estas, la cantidad de células y las diferencias entre ratones Homocigotos y Heterocigotos. Cabe mencionar que es importante hacer la comparación entre zonas teniendo las imágenes a una misma escala, la cual puede modificarse sobre la imagen.

7.10 Duración de experimentos

Todos los procedimientos realizados requieren de varias horas para asegurar un resultado satisfactorio y de calidad. Se requiere un total de 100 horas 20 minutos para realizar toda la metodología en 6 cortes. En la *Figura 17* se muestra el tiempo que requiere cada una de las actividades.

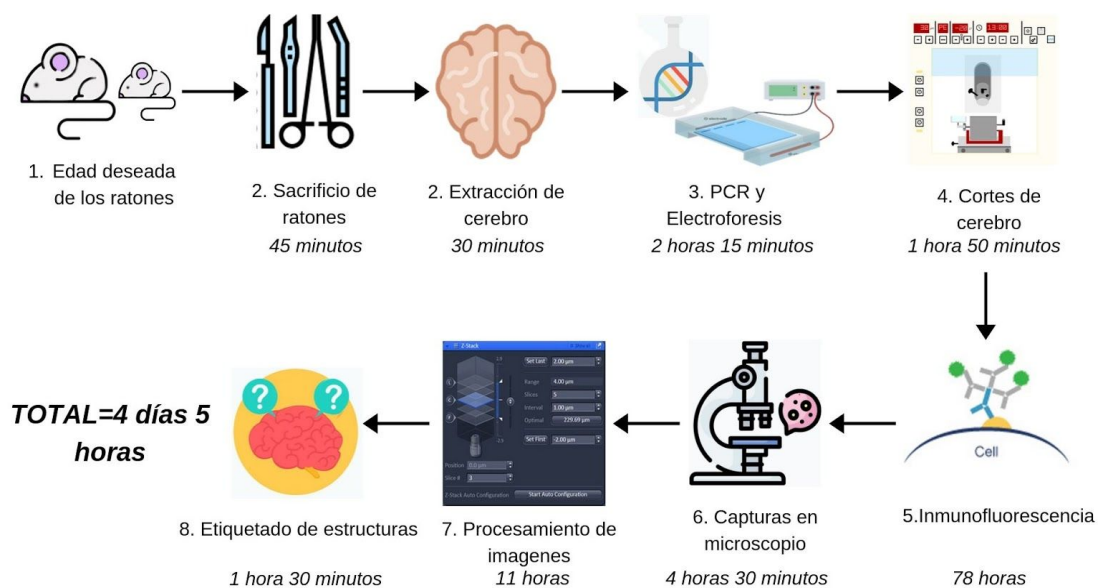


Figura 18. Cronograma de la metodología realizada para 6 cortes.

El tiempo total es de 100 horas 20 minutos, equivalente a 4 días 5 horas de trabajo continuo, ininterrumpido.

VIII.Resultados

8.1 Expresión de EBF2-tGFP y TH en los circuitos de motivación y recompensa de ratones en las diferentes etapas del desarrollo de ratones HET.

De acuerdo a los experimentos realizados con respecto a la metodología planteada previamente, el DDCS presenta expresión positiva de EBF2-tGFP en los núcleos que lo conforman, al igual que en los axones que establecen las interconexiones entre sus estructuras.

Los componentes diencefálicos que proyectan las señales de entrada para este circuito (SUM, LHA, LPO y BNST) también muestran expresión positiva de EBF2-tGFP. Las capturas en el microscopio con objetivos de mayor aumento óptico y la inclusión del *hardware-software* especializado para el procesamiento de las imágenes fueron capaces de mostrar con mayor detalle la compartimentalización de las neuronas de estas estructuras y la naturaleza de sus terminales axónicas.

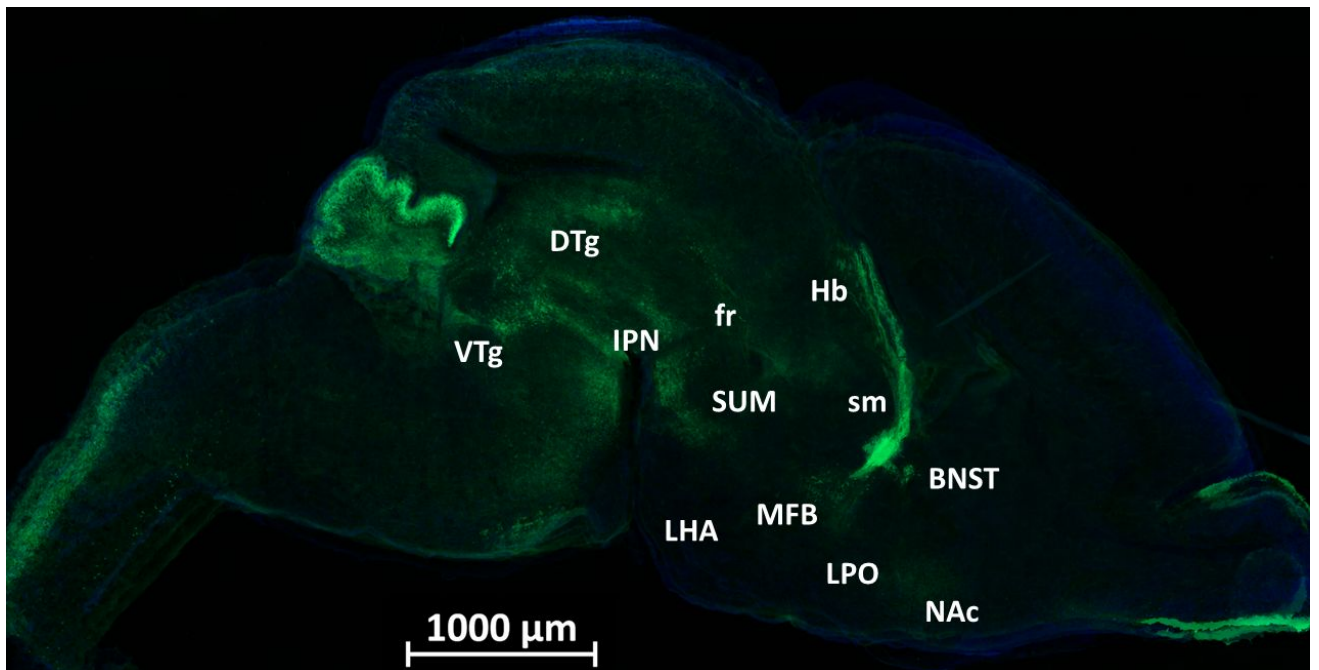


Figura 19. Expresión de EBF2 en el DDCS en ratones neonato.

Ensamblaje de un conjunto de cortes sagitales con respecto al eje lateromedial de un ratón heterocigoto recién nacido en el cual es posible apreciar la formación de los elementos del circuito que conforman al DDCS con señal positiva de EBF2-tGFP. Adquisición de 2 canales: EGFP (verde) y DAPI (Azul).

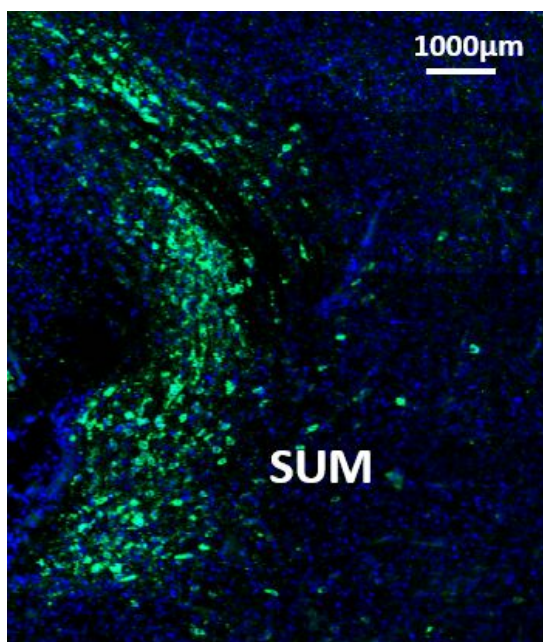


Figura 20. Tinción de EBF2-tGFP en los somas de los cuerpos mamilares

Imagen representativa de cortes sagitales en ratones HET neonatos donde se muestran numerosas neuronas que conforman la parte lateral y medial del SUM. Adquisición de 2 canales: EGFP (Verde) y DAPI (Azul). Obtenida a través del procesamiento ApoTome 2.0

El flujo de la señal continua con la proyección ascendente de las vías eferentes de los núcleos previamente mencionados hacia la Hb, esto sucede a través de las numerosas fibras de la sm.

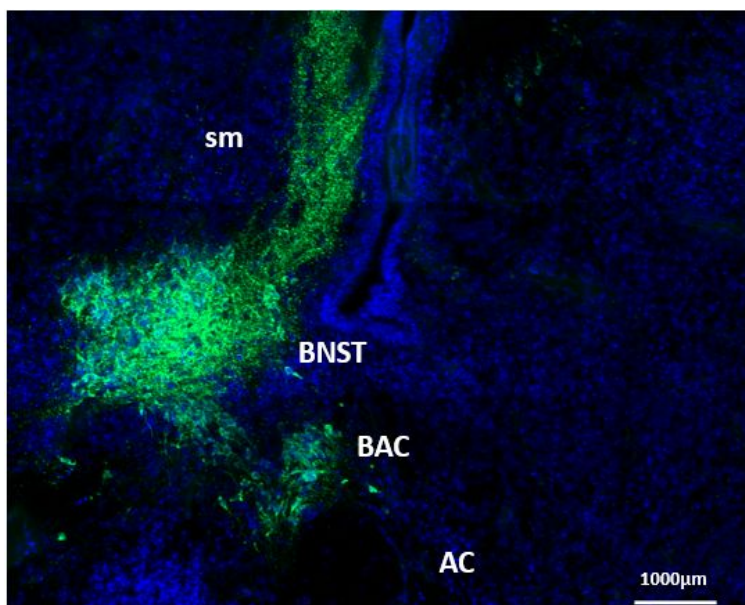


Figura 21. Origen de las proyecciones ascendentes que son transmitidas a través de la sm.

Imagen representativa de cortes sagitales en ratones HET neonatos donde se muestran la compartimentalización de las neuronas pertenecientes al BNST que, en conjunto con el BAC, proyectan hacia la sm. Adquisición de 2 canales: EGFP (Verde) y DAPI (Azul). Obtenida a través del procesamiento ApoTome 2.0

Por otra parte, las proyecciones descendentes de la Hb son establecidas mediante el fr y es importante hacer notar que a comparación con la sm, la expresión dentro de estas fibras resulta menor (*Figura 22*).

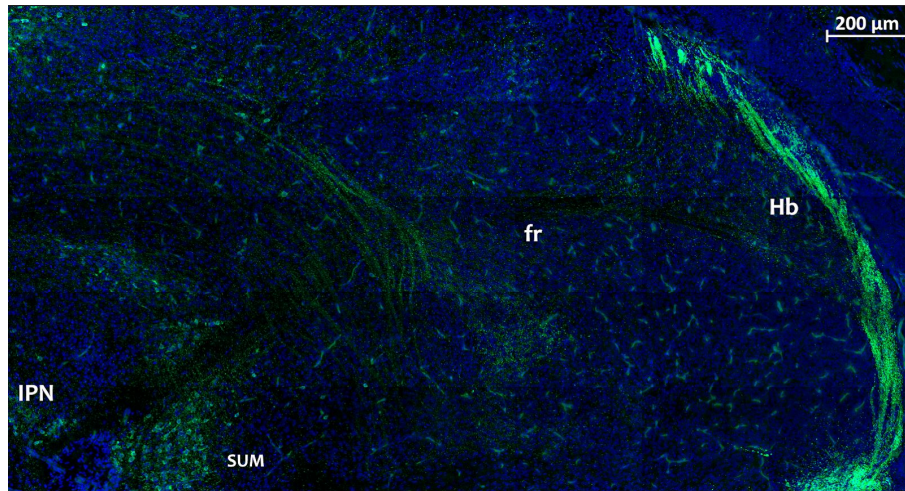


Figura 22. Proyecciones descendentes del fasciculus retroflexus (fr).

Imagen representativa de cortes sagitales de cerebro de ratones HET neonatos donde se muestran axones pertenecientes al fr que cruzan el tálamo para formar la conexión entre la Hb y el IPN. Adquisición de 2 canales: EGFP (Verde) y DAPI (Azul) .

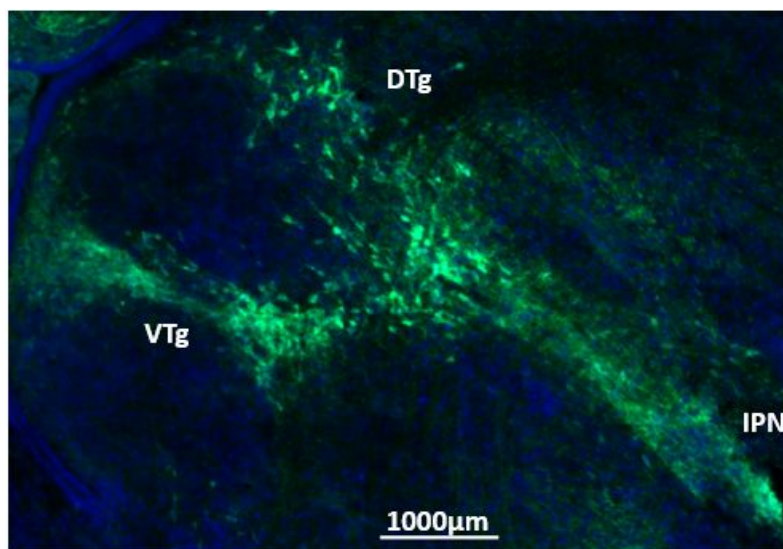


Figura 23. Integración de señales aferentes en el Núcleo Interpeduncular.

Imagen representativa de cortes sagitales de cerebro de ratones HET neonatos donde se muestran las señales aferentes del VTg y DTg hacia el IPN. Adquisición de 2 canales: EGFP (Verde) y DAPI (Azul) .

El IPN, mostrado en la *Figura 23* cuenta con señales aferentes del VTg y el DTg, y sirve como mediador entre los circuitos de motivación y los de recompensa.

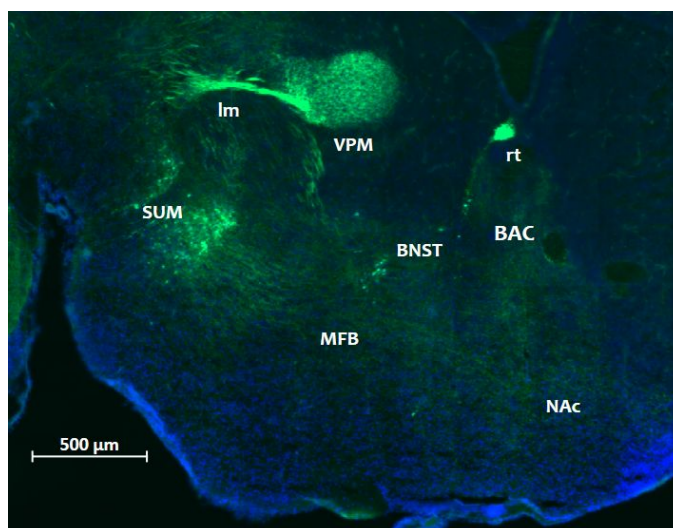


Figura 24. Medial Forebrain Bundle (MFB) expresando EBF2.

Imagen representativa de cortes sagitales de cerebro de ratones P0 HET en donde se muestran fibras axónicas pertenecientes al MFB que cruzan el hipotálamo hacia el NAc expresando EBF2-tGFP. Adquisición de 2 canales: EGFP (Verde) y DAPI (Azul) .

Ahora bien, haciendo mención del circuito MFB se puede observar la expresión de EBF2-tGFP , al igual que en el DDCS, en los núcleos y axones que conforman este circuito en ratones recién nacidos (*Figura 24*), estos componentes se ubican en la parte ventral del diencefalo, destacando el NAc que recibe proyecciones provenientes del VT. Por otro lado, se observó que en etapas posteriores del desarrollo, la señal de este factor de transcripción desaparece en estas zonas. (*Figura 25*).

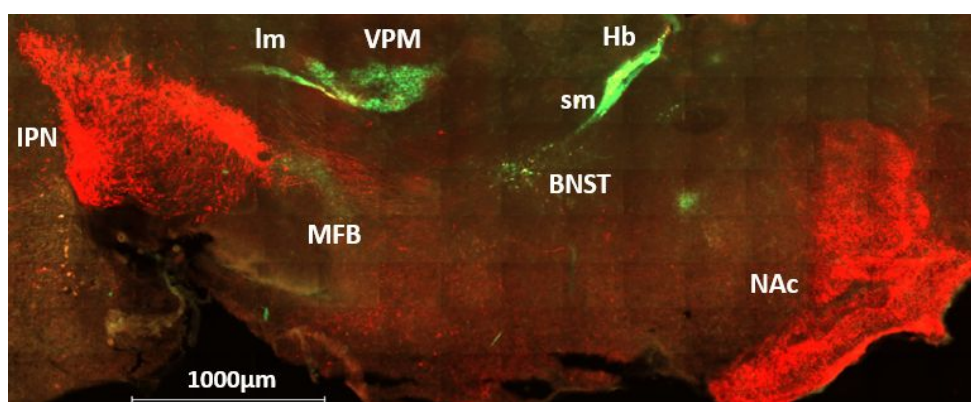


Figura 25. Medial Forebrain Bundle (MFB) expresando TH.

Imagen representativa de cortes sagitales de cerebro de ratones de días de edad HET en donde se muestran fibras axónicas pertenecientes al MFB que cruzan el hipotálamo hacia el NAc expresando TH únicamente. Adquisición de 2 canales: EGFP (Verde) y TH (rojo) .

Se realizaron cortes en planos coronales para poder determinar, de acuerdo a la morfología y ubicación de cada núcleo, su nombre y sus conexiones. Esto se realizó siguiendo la metodología antes mencionada, así como la búsqueda de los núcleos de los circuitos en diversos atlas para realizar una comparación exhaustiva.

Asimismo, los cortes en este plano permitieron observar circuitos que son imposibles de apreciar en el plano coronal, como el que une a las proyecciones del CEA que inervan el LHA (Figura 27), los cuales también forman parte de circuitos de motivación (Especialmente relacionados en la ingesta de alimentos).

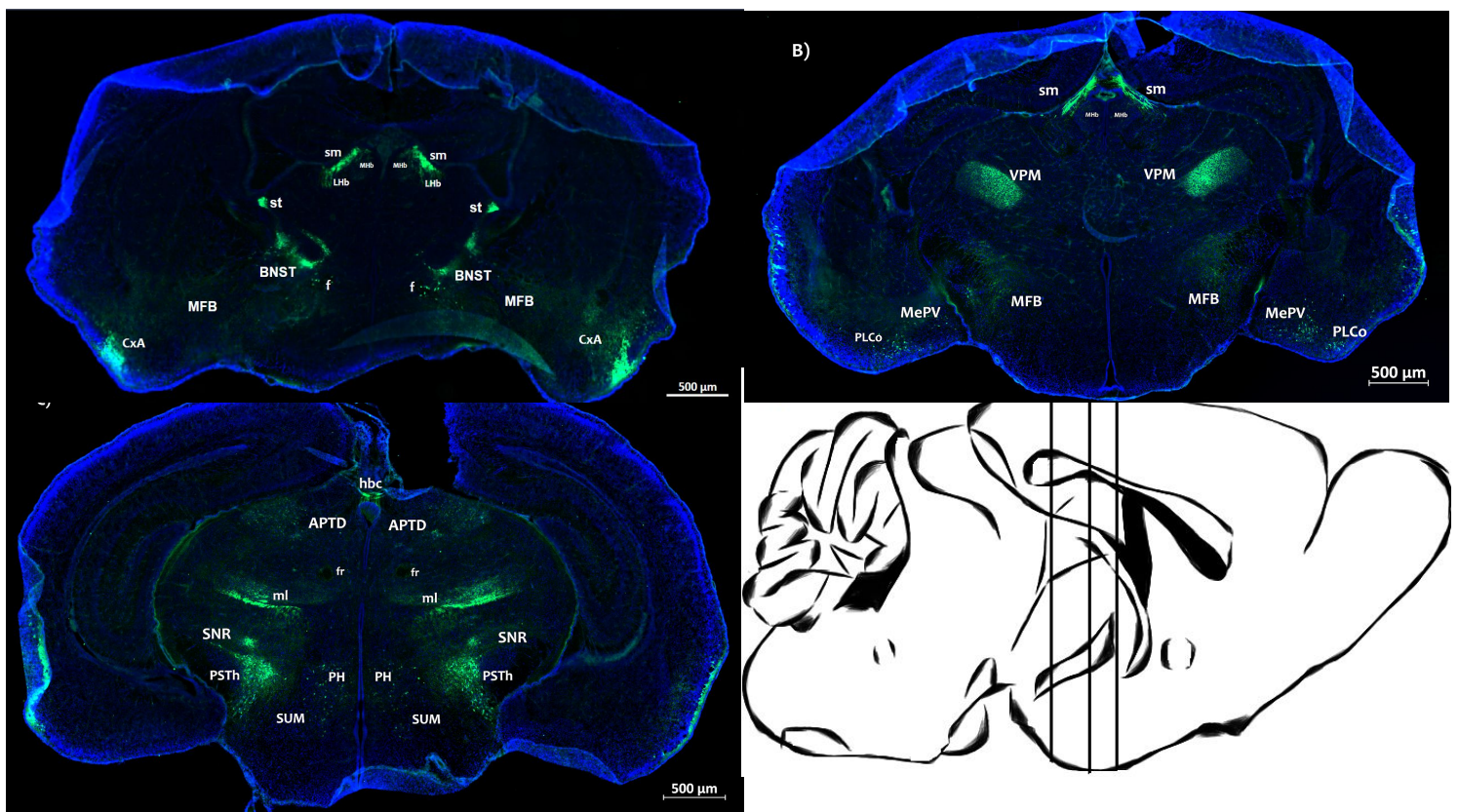


Figura 26. Desarrollo del DDCS a lo largo del plano coronal.

Imagen representativa de 3 cortes coronales de un ratón HET neonatal en donde se aprecian los componentes de los circuitos DDCS y MFB en zonas diencefálicas. A) Se nota expresión de EBF2-tGFP en el LHA y en la amígdala (CxA), al igual que en la sm y los núcleos de la Hb. B) Se presenta una dorsalización de los axones de la sm, al igual que la aparición los cuerpos pineales (PB); el MFB aún se presenta con expresión de EBF2. C) Comienza a aparecer la expresión de EBF2 en los cuerpos mamilares y en las porciones del PH. D) Imagen de referencia que ilustra un plano sagital en el cual se marcan las alturas de las secciones coronales de los cortes A, B y C.

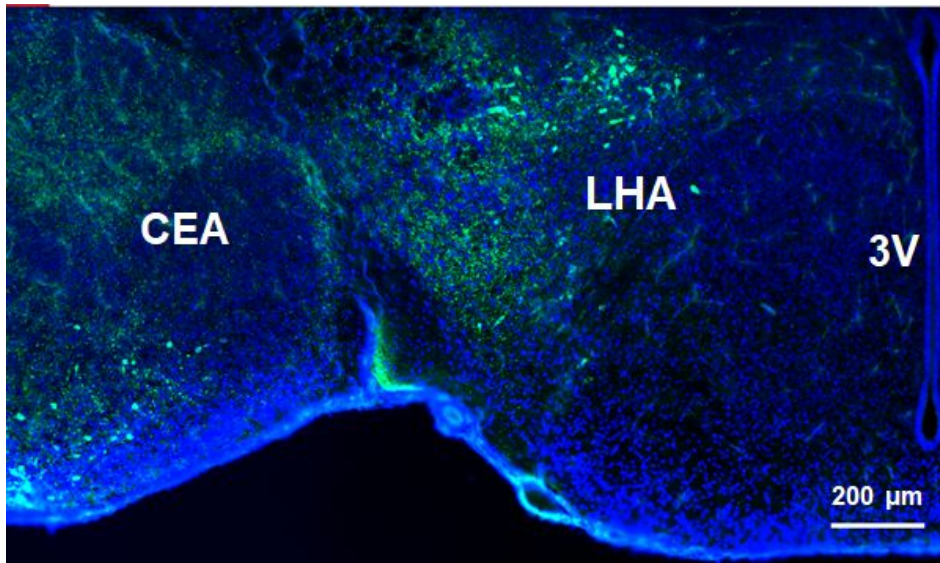


Figura 27. Expresión de EBF2 en fibras que inervan al Núcleo Central de la Amígdala (CEA).
 Captura multicanal (EGFP, DAPI) representativa de cortes coronales del cerebro de ratones neonatales en donde se muestra la presencia de EBF2 en axones que establecen conexiones entre el LHA y el CEA.

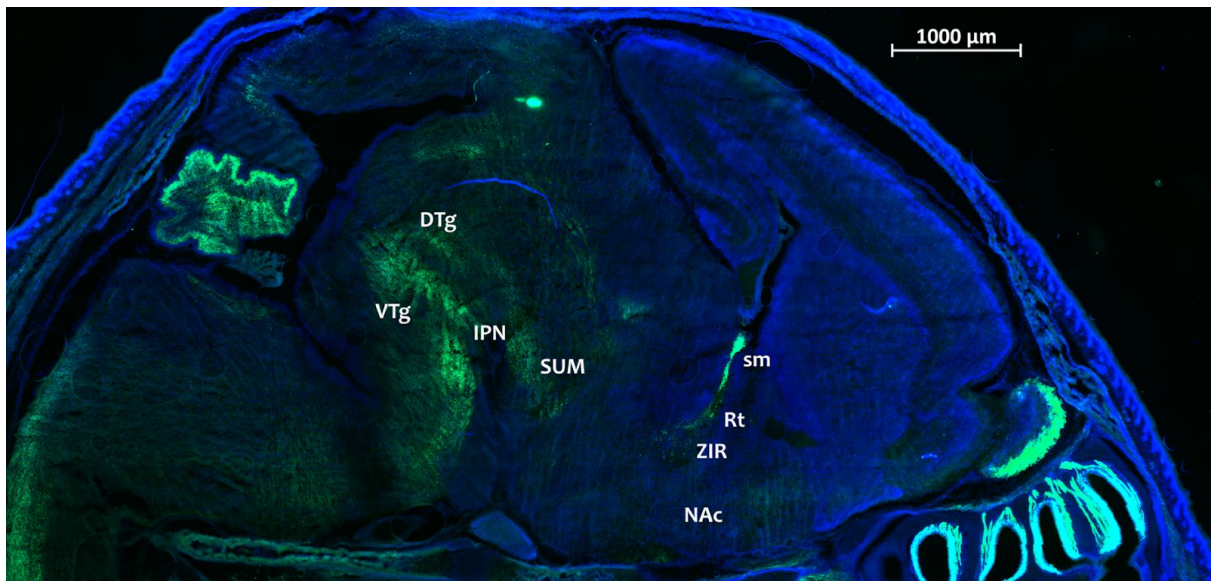


Figura 28. Expresión de EBF2 en el DDCS en embriones.
 Captura multicanal (EGFP, DAPI) representativa de cortes sagitales de cerebro de ratones embrionarios de 17 días post monta en donde se muestran estructuras pertenecientes del DDCS en el mesencéfalo y diencéfalo.

En la *Figura 28* se puede observar que el circuito DDCS ya se encuentra desarrollado a la edad de 17 días posteriores a la fecundación (E17). Esto es debido a que la expresión de EBF2 en todos sus constituyentes es similar a la que se ve en un ratón recién nacido.

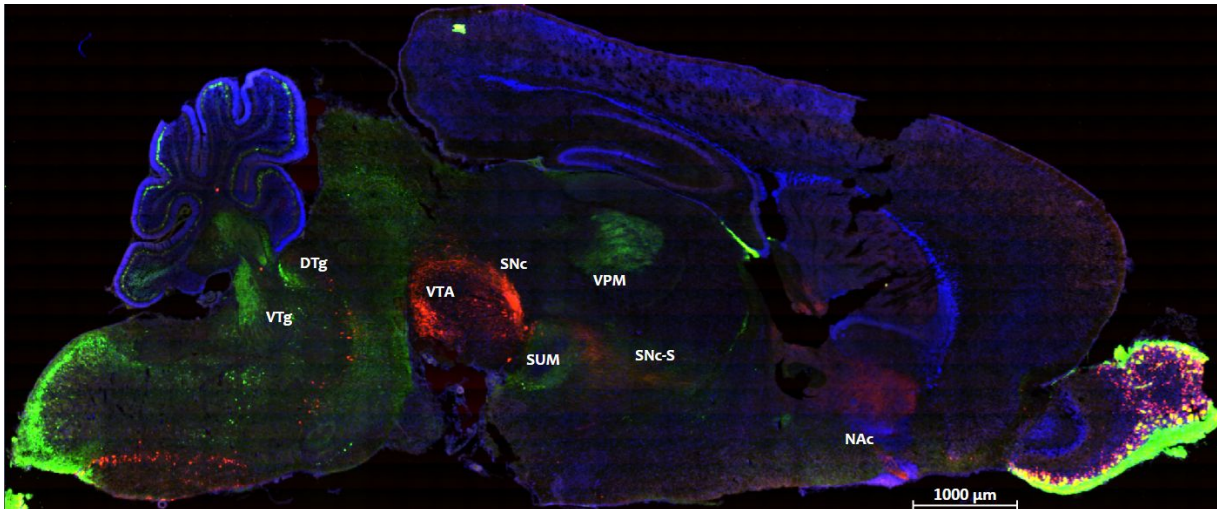


Figura 29. Expresión de EBF2 y dopamina en el DDCS y el sistema de recompensa de ratones de 7 días de edad.

Captura multicanal (EGFP, DAPI, TH) representativa de cortes sagitales de cerebro de ratones HET de 7 días de nacidos en donde se muestran estructuras pertenecientes del DDCS y MFB en el mesencéfalo y diencefalo.

La tinción de TH es capaz de marcar núcleos que son formados por neuronas dopaminérgicas pertenecientes al sistema de recompensa como el VTA, la SNc, el LC y el NAc. La expresión de EBF2 en el DDCS sigue presente en zonas como la Hb y el BAC pero desaparece en el VTg y DTg (*Figura 29*).

En cuanto al MFB es de relevancia mencionar que en el ratón p7 sucede un caso similar al del embrión E17. Esto debido a que no se observan proyecciones axónicas que comuniquen al VTA con el NAc expresando EBF2 ni TH. Esto quiere decir que en algún punto entre los 17 días posteriores a la fecundación y los 7 días después de nacer se desarrolla el MFB y expresa EBF2. Es por esto que este factor de transcripción juega un papel importante en la diferenciación postnatal temprana de ciertos complejos neuronales dentro del mismo MFB.

Por otra parte, es de importancia destacar que existe un grupo de axones que recorren desde el NAc hacia el Indusium Griseum (IG). El IG es una estructura que rodea al cuerpo calloso de manera dorsal y cruza por el Hipocampo.

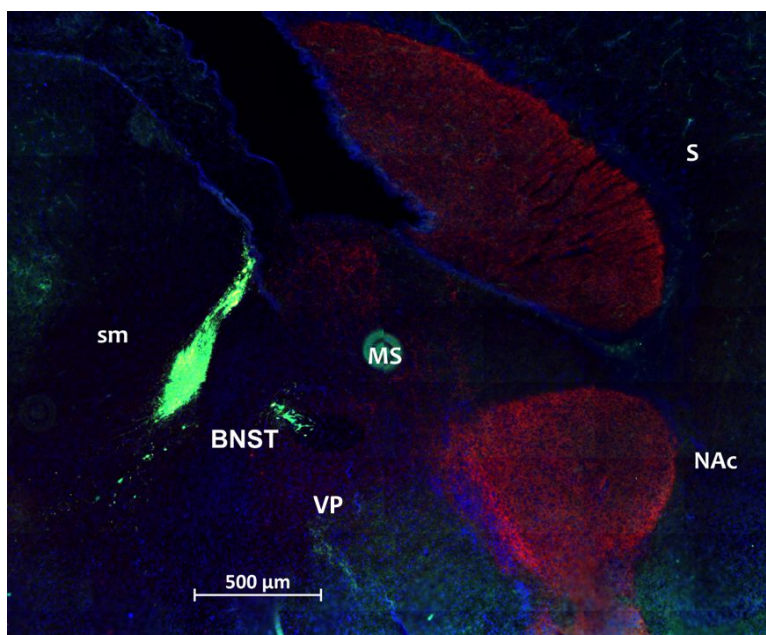


Figura 30. Expresión de EBF2 y dopamina en el DDCS y el sistema de recompensa de ratones de 14 días de edad.

Captura multicanal (EGFP, DAPI, TH) representativa de cortes sagitales de cerebro de ratones HET a los 14 días de nacidos. Se observa que la expresión de EBF2 y TH continúa existiendo en los circuitos de DDCS y MFB en el diencefalo.

En los ratones de 14 días de edad las proyecciones axónicas de la sm y la presencia de la población de neuronas caudales a la CA continúan expresando EBF2.

Una de las ventajas de utilizar técnicas de inmunomarcación con tinción de TH es la posibilidad visualizar estructuras completas cuyas neuronas expresan dopamina; mismas que sirven como un medio de referencia que contribuye a la orientación anatómica de las demás áreas de interés. En la *Figura 30* se aprecian el Núcleo Septal (SN), el NAc y el estriado (S) teñidos completamente con TH.

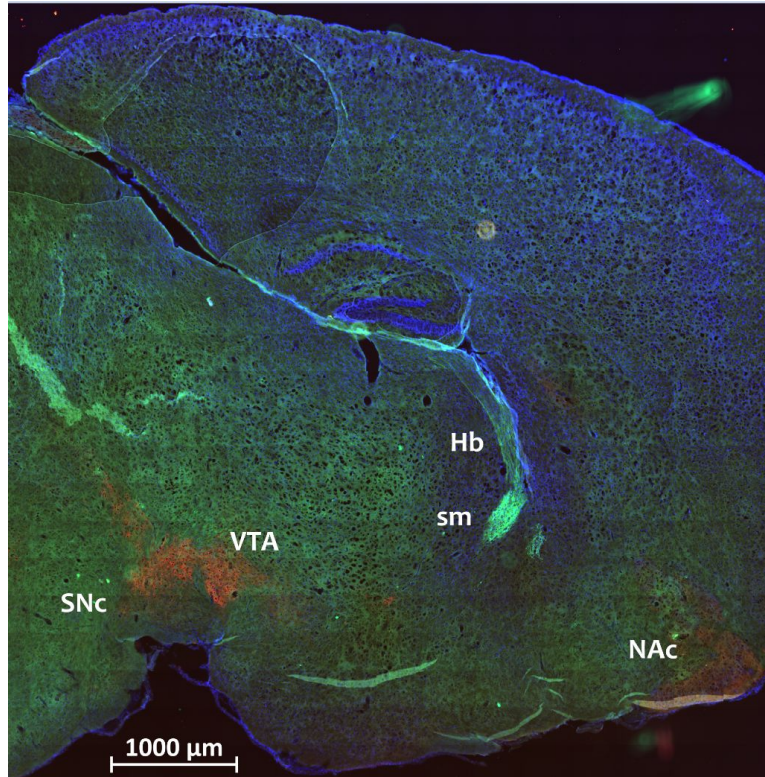


Figura 31. Expresión de EBF2 y dopamina en el DDCS y el sistema de recompensa de ratones de 21 días de edad.

Captura multicanal (EGFP, DAPI, TH) representativa de cortes sagitales de cerebro de ratones HET de 21 días de nacidos. La expresión de EBF2 en los componentes mesencefálicos del DDCS disminuye considerablemente al punto de no verse, en los componentes diencefálicos prevalece la expresión de este factor de transcripción en la Hb y sm únicamente.

A los 21 días de edad, la expresión de EBF2 desaparece en gran medida de los componentes mesencefálicos (VTg, DTg) en el circuito DDCS, así como del núcleo neural SUM en el diencefalo. El complejo de la st y la Hb continúan con expresión positiva del factor de transcripción, lo que sugiere su gran importancia para la transmisión de las señales eferentes del sistema límbico hacia la Hb a lo largo de la vida del ratón.

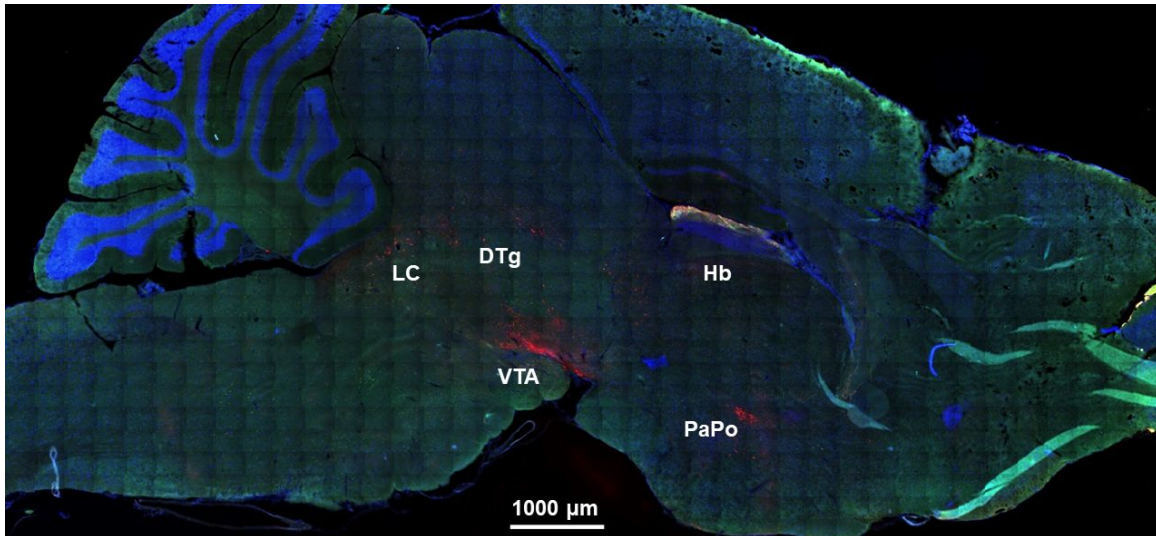


Figura 32. Expresión de EBF2 y dopamina en la Hb en ratones de 6 meses de edad.

Captura multicanal (EGFP, DAPI, TH) representativa de cortes sagitales de cerebro de ratones HET a los 6 meses de edad. La expresión de EBF2 continúa expresándose únicamente en la Hb.

Continuando a los seis meses de edad se observa que la expresión de EBF2 en la Hb sigue estando presente. Además, los componentes principales del sistema de recompensa presentan señal positiva de TH, lo que indica que la producción de monoaminas dopaminérgicas frente a estímulos del sistema de recompensa sigue siendo funcional a la edad de 6 meses.

8.2 Desarrollo de los circuitos DDCS y MFB en ratones Homocigotos.

Figura 33. Expresión de EBF2 y dopamina en los circuitos de DDCS y MFB en ratones de 7 días de nacidos.

Captura multicanal (EGFP, DAPI, TH) representativa de cortes sagitales de cerebro de ratones HOMO a los 7 días de edad. La expresión de EBF2 y TH se encuentra presente en diversos núcleos neuronales del DDCS y MFB.

En el caso de ratones HOMO a los 7 días de nacidos presentan expresión de EBF2 a lo largo del circuito del DDCS en zonas de la Hb y sm mientras que en el circuito del MFB se expresa en el *Ventral Pallidum* (VP). Esto indica que en ratones HET de la misma edad no se presenta bajo este factor de transcripción.

Por otro lado la expresión de TH está presente en el VTA y NAc al igual que su homólogo HET.

IX. Conclusión y Discusión

9.1 EBF2 es un marcador temprano de los principales circuitos de motivación y recompensa

Los resultados obtenidos por nuestro equipo de trabajo colocan al factor de transcripción EBF2 como un marcador total del circuito de motivación DDCS durante etapas tempranas del desarrollo encefálico del ratón.

El emparejamiento de los múltiples cortes representativos de los ratones en etapa posnatal (P0) a lo largo del eje lateromedial fueron capaces de reconstruir dicho circuito y demostrar que realmente existe expresión positiva de EBF2-tGFP en todos los núcleos del DDCS y sus respectivas interconexiones (*Figura 19*).

En la actualidad no existe registro de algún marcador que se exprese dentro de todos los componentes del DDCS, únicamente se han reportado marcadores parciales que sólo son capaces de teñir algunas estructuras en específico.

El hecho de que se haya podido identificar un marcador neuronal de este circuito es de suma importancia, debido a que en próximos experimentos se podrá monitorear la funcionalidad que tienen las neuronas de los núcleos pertenecientes al DDCS frente a condiciones normales y alteradas. Lo cual contribuirá a la determinación del verdadero rol que tiene EBF2 dentro de las conductas motivadas del ratón.

En cuanto a los circuitos de recompensa, EBF2 se expresa en las fibras del MFB, las cuales establecen conexiones con zonas ricas en dopamina y de importancia para determinar el valor hedónico de la recompensa (*Figura 24*). Aún queda por determinar los mecanismos moleculares que relacionan a la expresión de EBF2 con la integración de los circuitos de motivación y recompensa

9.2 EBF2 no es determinante para el establecimiento del DDCS

Los resultados presentados con respecto a ratones HOMO son capaces de descartar el hecho de que EBF2 juegue un papel importante para la formación de las neuronas pertenecientes a los núcleos del DDCS ni para la correcta fasciculación de sus proyecciones axonales debido a que en los cerebros de ratones HET y HOMO se pueden apreciar dichas estructuras con sus respectivas interconexiones (SUM, sm, Hb).

Para terminar de justificar la compartimentalización del circuito DDCS en ambos genotipos, se planea hacer experimentos en ratones HOMO recién nacidos (P0) con el propósito de generar una imagen ensamblando sus cortes sagitales distribuidos a lo largo del eje lateromedial para establecer la comparación con el ensamblaje que representa a los ratones HET P0 (*Figura 19*).

9.3 La expresión de EBF2 desaparece en algunos núcleos del DDCS a partir de los 21 días postnatales.

Con respecto a los datos obtenidos de distintas etapas del desarrollo encefálico de los ratones, se conjetura que la expresión de EBF2 pasa por un periodo transitorio en algunas neuronas y axones pertenecientes a los componentes del DDCS entre los 0 y 21 días de edad.

El hecho de que EBF2 sea un factor de transcripción abre la posibilidad de que éste

participe en la expresión de alguna enzima o neuropéptido que esté relacionado con la regulación de las conductas motivadas durante la ventana de tiempo antes mencionada.

Para estudiar más a fondo lo anterior, es importante caracterizar los neurotransmisores expresados por neuronas EBF2-tGFP positivas con el propósito de realizar experimentos con marcadores de dichos neurotransmisores y determinar si la ausencia de EBF2 en ratones HOMO afecta en la expresión y/o compartimentalización que tienen estos. Lo cual nos permitirá entender el papel fisiológico específico que tiene EBF2 dentro de los circuitos de motivación.

Por otra parte, es importante notar como en la Hb se mantiene la presencia de señal positiva de EBF2-tGFP (*Figura 32*). Esto sirve como indicador para que dicho factor de transcripción pueda tener cierta funcionalidad dentro de algún mecanismo molecular aún no descrito que lo relaciona con las conductas de motivación durante etapas más prolongadas del desarrollo o inclusive durante toda la vida del ratón. Esto deberá ser justificado con experimentos en ratones de edades adultas en las que se modifique la actividad de la Hb a través de técnicas de optogenética.

9.4 La expresión de EBF2 desaparece de las fibras del MFB en algún periodo de tiempo entre los 0 y 7 días postnatales.

A diferencia de que en los circuitos de motivación la señal de EBF2-tGFP desaparece aproximadamente a los 21 días posnatales, dentro de los fascículos del MFB dicha expresión cesa en algún periodo previo a los 7 días posnatales.

En la *figura 25* se pueden apreciar algunas las fibras axónicas del MFB teñidas de TH que precisamente establecen un vínculo entre la VTA y el NAc. Esto se puede ligar al hecho de que todo este circuito expresa dopamina constantemente, sin embargo, no se presenta expresión positiva de EBF2-tGFP sobre estos mismos axones.

La perspectiva actual es determinar si todas las fibras del MFB que expresan EBF2 observadas en la *figura 24* coexpresan TH o si existe una diferenciación entre ellas lo cual

resulte que establezcan conexiones entre la VTA y el NAc de manera paralela. El responder esta incógnita servirá para dar un panorama más extenso para entender la relación de EBF2 con los circuitos de recompensa y su integración con las señales provenientes de los circuitos de motivación.

Por último, cabe mencionar que en el encéfalo de los ratones en estado prenatal de 17 días post monta aún no se aprecian las fibras del MFB teñidas con expresión de EBF2-tGFP. Esto indica que existe una ventana de expresión entre esta etapa y la de 7 días posnatales, la cual debe ser determinada realizando experimentos con ratones HET.

Por ende, se tendría que determinar la ventana de esta expresión realizando experimentos con ratones de edades más próximas al periodo posnatal (21 días).

X. Anexos

Anexo I. Listado de materiales para Sacrificio y Extracción de cerebro.

Los materiales utilizados en el proceso de sacrificio son los siguientes:

- Kit de disección que contenga: bisturí, tijeras y pinzas de diferentes tamaños
- Cánula
- Caja petri
- Tabla de disección
- 4 jeringas de 20 ml
- tubo de 50 ml
- PBS 1X
- PFA

Los materiales utilizados en el proceso de extracción de cerebro son los siguientes:

- Kit de disección que contenga: bisturí, tijeras y pinzas de diferentes tamaños
- Tubo de 50 ml
- PFA

- Sacarosa 30%

Anexo II. Listado de materiales para PCR.

Los materiales utilizados para este proceso son los siguientes:

- MyTaq Extract-PCR Kit, de la empresa Bioline.
- Primers Reverse y Forward de GFP y EBF2-TGFP
- Buffers incluidos en el kit los cuáles son: Buffer A, Buffer B y el MyTaq HS Red Mix.

Anexo III. Listado de materiales para Electroforesis.

Los materiales utilizados en este proceso son:

- Tris Acetato 1x (TAE)
- Agarosa
- Gel Nucleic Acid Stain.
- Cámara de electroforesis
- Pipetas de diferentes mediciones

Anexo IV. Listado de materiales para Cortes de cerebro.

Los materiales utilizados para este proceso son los siguientes:

- Medio de congelación (OCT)
- Cubo de congelación
- Kit de disección
- Toallas limpiadoras de baja pelusa

Anexo V. Listado de materiales para Inmunofluorescencia.

Los materiales utilizados para este proceso son los siguientes:

- Anticuerpos primarios

Tabla 4. Anticuerpos primarios

Diana	Hospedero	Casa Comercial	Catálogo	Dilución

GFP	Pollo	Genscript	A01694	1:500
GFP	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-048-03	1:500
TH	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-070-47	1:500

- Anticuerpos secundarios

Tabla 5. Anticuerpos secundarios

Diana	Conjugado	Hospedero	Casa Comercial	Catálogo	Dilución
IgG de oveja	Alexa Fluor 594	Burro	Jackson ImmunoResearch	713-546-147	1:500
IgG de oveja	Alexa Fluor 647	Burro	Jackson ImmunoResearch	713-166-147	1:500
IgG de conejo	Alexa Fluor 594	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-586-152	1:500
IgG de conejo	Alexa Fluor 647	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-546-152	1:500
IgG de cabra	Alexa Fluor 594	Burro	Jackson ImmunoResearch	705-586-147	1:500
IgG de pollo	Alexa Fluor 488	Burro	Jackson ImmunoResearch	703-545-155	1:500

- PBS 1X
- Suero de burro
- Triton X-100
- PBS-Tween 20
- Tween 20
- Medio de montaje de Fluoro-Gel II con DAPI
- Pipetas de diferentes mediciones

Anexo VI. Lentes objetivos del microscopio de fluorescencia.

Tabla 6. Listado de lentes objetivos utilizados con sus características relevantes.

Aumento óptico	Apertura Numérica	Medios de inmersión	Sistema óptico	Espesor del vidrio de recubrimiento (mm)	Distancia de trabajo (mm)
20x	0.5	Sin inmersión	Infinity Color Corrected System (ICS)	0.17	2.0
25x	0.8	Agua, Aceite de Silicón o Glicerina	Infinity Color Corrected System (ICS)	0-0.17	0.57
40x	1.2	Agua, Aceite de Silicón o Glicerina	Infinity Color Corrected System (ICS)	0.14-0.19	0.28

Anexo VII. Recetas de sustancias utilizadas en los procedimientos de la metodología.

- ❖ Paraformaldehído (PFA)

Ingredientes para preparar 50 ml:

- PFA
- Hidróxido de Sodio (NaOH) 1m
- PBS 1x

Materiales:

- 4 tubos de 50 ml
- Báscula científica
- 1 vaso de precipitado
- Espátula

Procedimiento:

1. Se marca 4 tubos de 50 ml con nombre PFA.
2. Se coloca 3 gotas de NaOH y 50 ml de PBS 1x en dos tubos de 50 ml cada uno.
3. En los otros dos tubos de 50 ml se pone 2 gr de PFA en cada uno.
4. Se calientan los dos tubos con PBS 1X y NaOH en el microondas, deben de alcanzar los 65 °C.
5. Se vacían los tubos con PBS 1 y NaOH en los tubos con 2 gr de PFA, se tapan y agita para mezclar.
6. Se dejan reposar el hielo por al menos 15 min
7. Se mide el PH para verificar que se encuentre en 7.5

❖ Phosphate Buffer Saline (PBS 1X)

Ingredientes para preparar 1 L:

Tabla 7. Ingredientes para PBS 1X con peso molecular y gramaje total

Ingrediente	Peso molecular	Gramaje total
Cloruro de Sodio (NaCl)	137 mM	8 gr
Cloruro de Potasio (KCl)	2.7 mM	0.2 gr
Fosfato de Sodio	10 mM	1.44 gr

(Na ₂ HPO ₄)		
Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	2 mM	0.24 gr

Materiales:

- 1 bote de 1 L de vidrio Pyrex
- Báscula científica
- Espátula
- Tiras de PH
- 1 L de agua desionizada

Procedimiento:

1. Se pesan todos los ingredientes en la báscula científica y se colocan en el bote de 1L.
2. Se verte 900 mL de agua desionizada y se agita para mezclar.
3. Se verifica el Ph con una tira para que esté en 7.5.
4. Se afora a 1 L y se mete en el autoclave para su esterilización.

❖ PBS Tween

Ingredientes para preparar 1 L:

- 1 ml de Tween 20
- 999 ml de PBS 1X

Materiales

- Bote de vidrio Pyrex de 1 L
- Pipeta variada
- Tiras de PH

Preparación:

1. Se coloca en el bote de vidrio Pyrex de 1 L el mililitro de Tween 20.
2. Se verte 999 ml de PBS 1X y se agita para mezclar.
3. Se verifica que el PH de la solución esté en 7.5.
4. Se mete a la autoclave para su esterilización.

- Sacarosa 30%

Ingredientes para preparar 1 L:

- 1 L de PBS 1X
- 300 gr de Sacarosa

Materiales:

- Bote de vidrio Pyrex de 1 L
- Báscula científica
- Espátula

Procedimiento:

1. Se pesan 300 gr de Sacarosa y se colocan en el bote de vidrio Pyrex de 1 L.
 2. Se verte 900 ml de PBS 1X y se agita para mezclar.
 3. Se verifica que el PH de la solución esté en 7.5.
 4. Se afora a 1 L y se mete en el autoclave para su esterilización
- ❖ Tris Acetato (TAE 1X)

Ingredientes para preparar 1 L:

- 20 ml de TAE 50X
- 980 ml de agua desionizada

Materiales

- Bote de vidrio Pyrex de 1 L
- Pipeta variada

- Tiras de PH

Procedimiento

1. Se coloca en el bote de vidrio Pyrex de 1 L el mililitro de Tween 20.
2. Se verte 980 ml de agua desionizada y se agita para mezclar.
3. Se verifica que el PH de la solución esté en 7.5.

Anexo VIII. Resumen de ratones procesados

Tabla 7. Edad, genotipo, ratones procesados y estructuras expresando EBF2.

Edad	Genotipo	Número de ratones procesados	Estructuras que expresan EBF2
E17	HET	1	BNST,DTg, fr, Hb, IPN,LHA, LPO, sm, SUM, VTg
P0	HET	2	BNST,DTg, fr, Hb, IPN,LHA, LPO, MFB, NAc, sm, SUM, VTg
P7	HET	1	BNST,DTg, fr, Hb, IPN,LHA, LPO, sm, SUM, VTg
P7	HOMO	2	BNST,DTg, fr, Hb, IPN,LHA, LPO, sm, SUM, VTg
P14	HET	1	BNST, Hb, IPN,LHA, sm, SUM
P21	HET	1	Hb, sm
6M	HET	1	Hb

XI. Índice de imágenes

Figura 1. Dibujo de corte en plano sagital de cerebro de ratón adulto.	8
Figura 2. División del hipotálamo y sus respectivos núcleos.	9
Figura 3. Circuitos de activación e inhibición de la ingesta de alimentos en el hipotálamo.	13
Figura 4. Conexiones de los circuitos de motivación y recompensa.	17

Figura 5. Conexiones aferentes y eferentes de la habénula.	18
Figura 6. Tinción de Orexina A.	21
Figura 7. Metodología para obtención de resultados.	26
Figura 8. PCR de una camada de 10 ratones.	33
Figura 9. Cerebelos de ratones HET (A) y HOMO (B) .	34
Figura 10. Bulbos olfatorios de ratones HET (A) y HOMO (B) .	35
Figura 11. Ejemplo de nomenclatura de laminillas.	38
Figura 12. Cortes de cerebro de ratón adulto en plano sagital.	38
Figura 13. Comparación de imágenes sin y con captura Z-Stack.	44
Figura 14. Comparación de imágenes antes y después de la deconvolución.	45
Figura 15. Comparación de imágenes antes y después del Orthogonal Projection.	46
Figura 16. Comparación de imágenes antes y después del Background Subtraction.	47
Figura 17. Ejemplo de etiquetado.	48
Figura 18. Cronograma de la metodología realizada para 6 cortes.	49
Figura 19. Expresión de EBF2 en el DDCS en ratones neonato.	50
Figura 20. Tinción de EBF2-tGFP en los somas de los cuerpos mamilares.	51
Figura 21. Origen de las proyecciones ascendentes que son transmitidas a través de la sm.	51
Figura 22. Proyecciones descendientes del <i>fasciculus retroflexus</i> (fr).	52
Figura 23. Integración de señales aferentes en el Núcleo Interpeduncular.	52
Figura 24. Medial Forebrain Bundle (MFB) expresando EBF2.	53
Figura 25. Medial Forebrain Bundle (MFB) expresando TH.	53
Figura 26. Desarrollo del DDCS a lo largo del plano coronal.	54
Figura 27. Expresión de EBF2 en fibras que inervan al Núcleo Central de la Amígdala (CEA)	55
Figura 28. Expresión de EBF2 en el DDCS en embriones.	55
Figura 29. Expresión de EBF2 y dopamina en el DDCS y el sistema de recompensa de ratones de 7 días de edad.	56

Figura 30. Expresión de EBF2 y dopamina en el DDCS y el sistema de recompensa de ratones de 14 días de edad.	57
Figura 31. Expresión de EBF2 y dopamina en el DDCS y el sistema de recompensa de ratones de 21 días de edad.	58
Figura 32. Expresión de EBF2 y dopamina en la Hb en ratones de 6 meses de edad.	59
Figura 33. Expresión de EBF2 y dopamina en los circuitos de DDCS y MFB en ratones de 7 días de nacidos.	69

XII. Siglas

Ácido desoxirribonucleico – ADN

Área Preóptica Lateral - LPO

Área Ventral Tegmental - VTA

Cama de la estría terminal - BNST

Comisura Anterior - AC

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición - ENSANUT

Enfermedades crónicas no transmisibles - ECNT

Estría medullaris - sm

Estría Terminalis - st

Factor de Células B tempranas 2 - EBF2

Fascículo retroflexus - fr

Folículo estimulante - HFS

Fornix - f

Glándula pineal - PB

Habénula - Hb

Heterocigoto - HET

Hipotálamo Anterior - AH

Hipotálamo Lateral - LH

Homocigoto - HOMO, KO

Hormona Antidiurética - ADH

Hormona de crecimiento - GH

Hormona Luteinizante - HL
Índice de masa corporal - IMC
Instituto Nacional de Salud Pública - INSP
Master Mix - MM
Medial Forebrain Bundle - MFB
Medio de Congelación - OCT
Microlitros – ul
National Institute of Health – NIH
Norma Oficial Mexicana – NOM
Núcleo Accumbens - NAc
Núcleo Anterior del Tálamo - ANT
Núcleo Arcuato o Núcleo Arqueado - Arc
Núcleo Basal Lateral - LBG
Núcleo del Lecho de la Comisura Anterior - BAC
Núcleo Central de la Amígdala - CEA
Núcleo Dorsal Tegmental - DTg
Núcleo Interpeduncular - IP
Núcleo Lateral de la Habénula - LHb
Núcleo medial de la Habénula - MHb
Núcleo Paraventricular - Pa
Núcleo Posterior Interpeduncular – IPN
Núcleo Septal – SN
Núcleo Supramamilar - SUM
Núcleo Supraóptico - SO
Núcleo Supraquiasmático - SCh
Núcleo Ventral Tegmental - VTg
Núcleo Ventró Lateral Preóptico - VLPO
Núcleo Ventromedial - VMH
Núcleos Basales - BG
Núcleos Dorsomedial - DMH

Núcleos Tuberomamilar - ML
Núcleo Ventral Posteromedial del Tálamo - VPM
Orexina-A - Orx-A
Organización Mundial de la Salud - OMS
Paraformaldehído - PFA
Phosphate Buffer Saline - PBS
Potencial de Hidrógeno – PH
Reacción en Cadena Polimerasa - PCR
Sistema de Conducción Dorso Diencefálico - DDCS
Sustancia Nigra - Sn
Tau-Green Fluorescent Protein - TGFP
The National Institutes of Health - NIH
Tris-Acetato - TAE
Ventral Pallidum - VP
Wild-Type – WT

XIII.Referencias

- Aguirre, F. S. (2017). Diccionario de anatomía e histología. Portal de Libros de La Universidad Nacional de La Plata, 35,95. Retrieved from <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/650>
- Alcaraz, V., & Gumá E. (2001). Transición de la motivación a la acción. En Texto de Neurociencias Cognitivas. (52-57). México: El Manual Moderno.
- Barrera-Cruz, A., Rodríguez-González, A., & Molina-Ayala, M. A. (2013). [The current state of obesity in Mexico]. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 51(3), 292–299.
- Behringer, R. R., Mathews, L. S., Palmiter, R. D., & Brinster, R. L. (1988). Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone-expressing cells. *Genes & Development*, 2(4), 453–461. <https://doi.org/10.1101/gad.2.4.453>
- Biran, J., Tahor, M., Wircer, E., & Levkowitz, G. (2015). Role of developmental factors in hypothalamic function. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(ABRIL), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00047>
- Brejč, K., Sixma, T., Kitts, P., Kain, S., Tsien, R., Ormo, K & Remington, J. (1997). Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Biophysics*, 94 (6), 2306-2311.
- Care, A., Committees, U., & Guidelines, T. A. (2013). Guidelines for the Euthanasia of Rodent Fetuses and Neonates. 12–14.
- Carranza, L. E. (2016). Fisiología del apetito y el hambre. *Enfermería Investiga.*, 1(3), 117–124. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6194254.pdf>
- Carrera, J. et al (2019). The Kidney. *Endocrine Aspects of Chronic Kidney Disease*. 58, 1912-1925.e6
- Cisneros, M., Morales, D. & Salas, D. (2019). Regulación de la expresión de orexina por el factor de transcripción de EBF2 durante el desarrollo postnatal temprano del ratón. Tesis de pregrado. Universidad de Monterrey. México.
- Mayo Clinic. (2019). Narcolepsia - Síntomas y causas - Mayo Clinic. Recuperado el 10 de Septiembre de 2019, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/narcolepsy/symptoms-causes/syc-20375497>
- Corradi, A., et. al. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. *Development*, 130 (2), 401 - 410.

Croci, L., Consalez, G. G. et. al. (2006). A key role for the HLH transcription factor EBF2COE2,O/E-3 in Purkinje neuron migration and cerebellar cortical topography. *Development*, 133(14), 2719–2729. <https://doi.org/10.1242/dev.02437>

deCantazaro, D. (2001). *Motivación y Emoción*. México: Pearson Educación.

Dickison, M., Hessling, R., Davidson, M. (2019). Practical Considerations for Spectral Imaging. Recuperado el 6 de octubre de 2019 de: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spectralimaging/considerations.html#background>

Dreikurs, E. (2000). *Motivation, A Social and Cognitive Integration of Motivation and Emotion*. Nueva York, E.U.A.: Oxford University Press.

Herrero, J. (2006). *Introducción a la patología*. Universidad de Alicante. (01-02). España.

Hikosaka, O., Sesack, S. R., Lecourtier, L., & Shepard, P. D. (2008). Habenula: Crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *Journal of Neuroscience*, 28(46), 11825–11829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3463-08.2008>

Jin, K. et al. (8 de septiembre 2010). Early B-Cell Factors Are Required for Specifying Multiple Retinal Cell Types and Subtypes from Postmitotic Precursors. *Journal of Neuroscience*, 30 (36), 11902-11916. 5 de julio de 2019, De *Journal of Neuroscience* Base de datos.

Kendall, J. & Badminton, M. (1998). *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends in Biotechnology*, 16(5), 216:24.

Krebs, C. et. al. (2018). *Neurociencia*. España: Wolters Kluwer.

Morgane, P. J. (1961). Medial forebrain bundle and “feeding centers” of the hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 117(1), 1–25. <https://doi.org/10.1002/cne.901170102>

Moruzzo, D., Nobbio, L., Sterlini, B., Consalez, GG., Benfanati, F., Schenone, A., Corradi, A. (2017). Transcription Factors EBF1 and EBF2 Are Positive Regulators of Myelination in Schwann Cells. *Molecular Neurobiology*, 54(10), 8117-8127.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2019). *Narcolepsy Fact Sheet* Recuperado el 10 de septiembre de 2019 de: <https://www.ninds.nih.gov/disorders/patient-caregiver-education/fact-sheets/narcolepsy-fact-sheet>

Nikon. (2019). *Deconvolución*. 6 de octubre de 2019, de Nikon Microscopy U Sitio web: http://www.tecnicaenlaboratorios.com/Nikon/Info_deconvolucion.htm

NOM-008-SSA3-2017. (2017). *Norma Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2017, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad*.

NOM-033-ZOO-1995. (1995). NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres

NOM-062-ZOO-1999. (1999). NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Puelles, L., et. al. (2008). Hipotálamo basal y alar. En Neuroanatomía(185-195). México: Panamericana.

Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, ShamahLevy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, et al. (2012). Encuesta Nacional de Salud. Instituto Nacional de Salud Pública.

Organización Mundial de la Salud. (2018). Obesidad. Recuperado el 7 de agosto de 2019 de: <https://www.who.int/topics/obesity/es/>

Paxinos, G. & Franklin, K. . (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Estados Unidos: Academic Press.

Porrero, J. & Hurlé, J. (2015). Neuroanatomía Humana. España: Editorial Médica Panamericana.

Rajakumari, S., Wu, J., Ishibashi, J., Woong, L., Glang, A., Won, K., Reed, R., Seale, P. (2013). EBF2 Determines and Maintains Brown Adipocyte Identity. Cell Metabolism, 17 (4), 562-574.

Ramos, R. (2014). Guía Básica en Neurociencias. España: Elsevier.

Reeve, J. (2010). Motivación y emoción. México: Mc Graw Hill.

Rivera Dommarco, JA; Colchero, MA; Fuentes, ML; González de Cosío Martínez, T; Aguilar Salinas, CA; Hernández Licona, G; Barquera, S. (2018). La obesidad en México. Estado de la política pública y recomendaciones para su prevención y control . México: Instituto Nacional de Salud Pública.

Romero-Martínez, M., et. al. (2017). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Salud Publica de Mexico, 59(3), 299–305. <https://doi.org/10.21149/8593>

Rubin, M., Safdieh, J. & Netter, F. (2008). Neuroanatomía Esencial. España: Elsevier.

Sabino, N. (2012). Hypothalamic Goal-directed Behavior – Ingestive, Reproductive and Defensive. En The Mouse Nervous System(313-336). Estados Unidos: Elsevier Science.

Saper, C. & Lowell B. (2014). The Hypothalamus. Current Biology, 24, R1111-R1116. 6 de julio de 2019, De ScienceDirect Base de datos.

Sociedad Española de Medicina Interna. (2019). Acondroplasia y enanismo. Recuperado el 8 de Septiembre de 2019 de:

<https://www.fesemi.org/informacion-pacientes/conozca-mejor-su-enfermedad/acondroplasia-y-enanismo>

Sokolowski, K., & Corbin, J. G. (2012). Wired for behaviors: From development to function of innate limbic system circuitry. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(ABRIL), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00055>

Torrice, T., & Abdijadid, S. (2019). Neuroanatomy, Limbic System. Recuperado el 6 de octubre de 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538491/>

Vidal, R. et al. (2 de junio de 2011). Aspects of the narcolepsy-cataplexy syndrome in O/E3-null mutant mice. *Journal of Neuroscience*, 183 (2011), 134-143.

Villa, A. R., Escobedo, M. H., & Méndez-Sánchez, N. (2004). Estimación y proyección de la prevalencia de obesidad en México a través de la mortalidad por enfermedades asociadas. *Gaceta Medica de Mexico*, 140(SUPPL. 2), 21–25.

Wang, S et. al. (2004). Genetic disruptions of O/E2 and O/E3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection. *Development*, 131(2004), 1377-1388.