

Reconstrucción tridimensional de los circuitos de recompensa y nocicepción en cerebro de ratones modificados genéticamente

Aguilar-Franco Miguel Alberto^{1,2}, Martínez-Estrada Moisés^{1,3}, Santillán-Zerón Moisés³, Vidaltamayo Román¹. Universidad de Monterrey¹. Universidad Marista de Mérida². CINVESTAV Unidad Monterrey³

Antecedentes: El establecimiento de un sistema nervioso funcional depende de la adecuada diferenciación celular en espacio y tiempo, así como de la formación de sinapsis neuronales que, a su vez, conforman circuitos a los que pueden atribuirse funciones específicas (1). Los factores de transcripción (FT) juegan un importante papel en la determinación de linajes celulares. Entre ellos, Ebf2 se expresa durante de la diferenciación neuronal del sistema nervioso central murino (2) y se ha observado que en su ausencia existen errores en la migración de neuronas productoras de hormona liberadora de gonadotropina (3), de las proyecciones de neuronas olfatorias (4), del desarrollo de neuronas cerebelares (5) y en el establecimiento del circuito orexinérgico (6). Nuestro laboratorio ha identificado patrones conductuales anormales en la nocicepción y el procesamiento de señales de recompensa en ratones deficientes de Ebf2, lo cual es necesario correlacionar con posibles cambios en el conectoma estructural de las neuronas que expresan dicho FT. Sin embargo, los métodos estándar para el estudio de los conectomas, como la resonancia magnética nuclear y la tomografía confocal de dos fotones, se encuentran fuera de alcance para muchos laboratorios en el mundo, dado el costo de acceso a estas técnicas. Por esta razón, planteamos generar una alternativa viable para reconstruir el conectoma estructural de las poblaciones neuronales que expresan un marcador específico.

Objetivo: Determinar el conectoma estructural de neuronas que expresan Ebf2 a partir de imágenes de fluorescencia obtenidas a partir de cortes histológicos de cerebros de ratones modificados genéticamente.

Métodos: Se utilizaron ratones transgénicos de 10 días *postpartum* que expresan el marcador fluorescente tau-GFP (TGFP) bajo el control del promotor de Ebf2 (7). Como grupo control, se utilizaron individuos hemicigotos (Ebf2^{+TGFP}), ya que no muestran diferencias conductuales al compararse con individuos WT (Ebf2^{+/+}), y se compararon con individuos homocigotos KO para Ebf2 (Ebf^{TGFP/TGFP}), como grupo experimental. Los cerebros (n=3 por grupo) fueron extraídos mediante microcirugía post-fijación por perfusión intracardiaca, criopreservados en solución de sacarosa al 20% en PBS y posteriormente seccionados con un criostato de manera coronal, sagital y horizontal a un grosor de 50 µm. Se realizó tinción de inmunofluorescencia empleando anticuerpos primarios cabra anti-GFP y anticuerpos secundarios de pollo anti-cabra acoplados a Alexa 647 (Ex= 647 nm, Em= 665 nm), así como 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para marcar los núcleos de los somas neuronales. Las imágenes fueron capturadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager Z1 bajo

un objetivo de inmersión en glicerol de 25X. La captura y procesamiento inicial de imágenes, stitching y ajuste de histograma, se realizó mediante el software Zeiss Zen Pro v.. Posteriormente, las imágenes fueron alineadas de manera semi-automática empleando el plug-in StakReg (8) en Fiji ImageJ2 y corregidas manualmente. Para recuperar cortes entre tejidos y aumentar la resolución del modelo tridimensional, se utilizó el modelo entrenado FILM (9), el cual generó 3 imágenes entre cada corte. Se diseñó un segmentador de fibras neuronales empleado el cálculo de la matriz Hessiana, el cual fue usado tomando como entrada las imágenes alineadas a 8-bits. Asimismo, los somas neuronales fueron segmentadas usando CellPose (10), mientras que para el conteo de células totales se utilizó StarDist (11). Las imágenes segmentadas fueron limpiadas manualmente y apiladas para la reconstrucción de los modelos tridimensionales mediante la paquetería Napari (12).

Resultados: FILM tuvo una *mean Intersection over Union (meanIoU)* de 0.8 ± 0.4 al compararlo con una imagen real entre dos cortes. El segmentador desarrollado tuvo una *meanIoU* de 0.76 ± 0.12 cuando se evaluó en un dataset con propiedades similares a las empleadas en el trabajo. Aunque no fue evidente algún error en la decusación de fibras somatosensoriales, se observan claros cambios morfológicos y de densidades neuronales en sitios de interés como el núcleo dorsal tegmental (DTG), núcleo parabraquial (PBN), estría terminal, núcleo principal del trigémino (PRV), núcleo ventral posteromedial, núcleo interpeduncular (IPN), habénula y estría medular comparando con el control. Los ratones $Ebf2^{TGFP/TGFP}$ presentan una disminución significativa de neuronas TGFP+ totales (disminución del 64%, t-student de 4×10^{-11}), así como en la disminución de axones que conforman los distintos circuitos.

Conclusiones: Fue posible reconstruir en tres dimensiones conectoma estructural de neuronas de interés a partir de cortes histológicos con inmunofluorescencia. La comparación de modelos obtenidos para ratones hemicigotos y KO para *Ebf2* muestra una disminución de la densidad neuronal en el PBN, DTG e IPN del cerebro de ratones homocigotos KO para *Ebf2*. Esto se correlaciona con la ingesta exacerbada de alimentos observada en individuos de este genotipo. Por otra parte, la disminución de neuronas del PRV y de fibras de la decusación trigeminal, se correlacionan con las parestesias observadas en animales KO para *Ebf2*.

Referencias:

1. Melozzi F, Bergmann E, Harris JA, Kahn I, Jirsa V, Bernard C. Individual structural features constrain the mouse functional connectome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(52):26961-26969.
2. Garel S, Marín F, Mattéi MG, Vesque C, Vincent A, Charnay P. Family of *Ebf/Olf-1*-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system. *Dev Dyn*. 1997;210(3):191-205.
3. Corradi A, Croci L, Broccoli V, Zecchini S, Previtali S, Wurst W, Amadio S, Maggi R, Quattrini A, Consalez GG: Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in *Ebf2*-null mice. *Development*. 2003;130:401-410.
4. Wang SS, Lewcock JW, Feinstein P, Mombaerts P, Reed RR. Genetic disruptions of *O/E2* and *O/E3* genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection. *Development*. 2004;131:1377-1388.
5. Chung SH, Sillitoe RV, Croci L, Badaloni A, Consalez G, Hawkes R: Purkinje cell phenotype restricts the distribution of unipolar brush cells. *Neuroscience*. 2009;164:1496-1508
6. De La Herrán-Arita AK, Zomosa-Signoret VC, Millán-Aldaco DA, Palomero-Rivero M, Guerra-Crespo M, Drucker-Colín R, Vidaltamayo R. Aspects of the narcolepsy-cataplexy syndrome in *O/E3*-null mutant mice. *Neuroscience*. 2011;183:134-43.
7. Wang SS, Tsai RY, Reed RR. The characterization of the *Olf-1/EBF*-like HLH transcription factor family: implications in olfactory gene regulation and neuronal development. *J Neurosci*. 1997;17(11):4149-58.
8. Thévenaz P, Ruttimann UE, Unser M. A Pyramid Approach to Subpixel Registration Based on Intensity. *IEEE Transactions on Image Processing*. 1998;7(1): 27-41
9. Reda F, Kontkanen J, Tabellion E, Sun D, Pantofaru C, Curless B. Film: Frame interpolation for large motion. In *European Conference on Computer Vision*. Cham: Springer Nature Switzerland. 2022:250-266.
10. Stringer C, Wang T, Michaelos S. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods*. 2021;18:100-106.
11. Schmidt U, Weigert M, Broaddus C, Myers G. Cell Detection with Star-Convex Polygons. In *Lecture Notes in Computer Science*. Springer International Publishing. 2018:265-273.
12. Sofroniew N, et al. Napari: A Multi-dimensional Image Viewer for Python. v0.5.3. Zenodo. 2024.