



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IDENTIFICACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA FORMACIÓN DE
ESTRUCTURAS ANATÓMICAS NERVIOSAS EN *MUS MUSCULUS* Y
DANIO RERIO PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA BIOLOGÍA DEL
DESARROLLO EN MODELOS ANIMALES**

Claudia Francisca Villalobos Greenhill

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: Mariana Antonia Rojas Rauco
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
2016

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----|
| RESUMEN..... | vi |
| ABSTRACT..... | vii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 2 |
| Aspectos éticos en la investigación con animales | 2 |
| Investigación en la Biología del Desarrollo | 4 |
| Desarrollo del sistema nervioso | 5 |
| Criterios para seleccionar método de eutanasia | 6 |
| HIPÓTESIS | 7 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 8 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 8 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 9 |
| RESULTADOS..... | 12 |
| Embriones de <i>Mus musculus</i> | 12 |
| Alevines de <i>Danio Rerio</i> | 19 |
| Estadística | 27 |
| CONCLUSIÓN | 37 |
| BIBLIOGRAFÍA | 38 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Tabla resumen neuroblastos en tálamo de ratón..... | 27 |
| Tabla 2: Tabla resumen neuroblastos en médula espinal de ratón..... | 27 |
| Tabla 3: Tabla resumen neuroblastos en tálamo de pez..... | 28 |
| Tabla 4: Tabla resumen neuroblastos en médula espinal de pez | 28 |
| Tabla 5: Regresión lineal de la etapa de desarrollo de <i>Mus musculus</i> contra índice talámico y medular..... | 29 |
| Tabla 6: Regresión lineal de la etapa de desarrollo de <i>Mus musculus</i> contra índice talámico | 29 |
| Tabla 7: Regresión lineal de la etapa de desarrollo de <i>Danio rerio</i> contra índice talámico y medular..... | 30 |
| Tabla 8: Regresión lineal de la etapa de desarrollo de <i>Danio rerio</i> contra índice talámico . | 31 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Fig. 1: Corte frontal cabeza ratón 12 dpc H&E/Azul de Alcían..... | 12 |
| Fig. 2: Diencéfalo ratón 12 dpc Violeta de Cresilo | 12 |
| Fig. 3: Corte transversal médula espinal ratón 12 dpc H&E/Azul de Alcían | 13 |
| Fig. 4: Médula espinal ratón 12 dpc Violeta de Cresilo | 13 |
| Fig. 5: Corte frontal cabeza ratón 12 dpc técnica de Llombart..... | 13 |
| Fig. 6: Corte transversal médula espinal ratón 12 dpc técnica de Llombart | 13 |
| Fig. 7: Corte frontal cabeza ratón 14 dpc H&E/Azul de Alcían..... | 14 |
| Fig. 8: Tálamo ratón 14 dpc Violeta de Cresilo | 14 |
| Fig. 9: Corte transversal médula espinal ratón 14 dpc H&E/Azul de Alcían | 14 |
| Fig. 10: Médula espinal ratón 14 dpc Violeta de Cresilo | 14 |
| Fig. 11: Corte frontal cabeza ratón 14 dpc técnica de Llombart..... | 15 |
| Fig. 12: Corte transversal médula espinal ratón 14 dpc técnica de Llombart..... | 15 |
| Fig. 13: Receptor fibra nerviosa ratón 14 dpc técnica de Llombart..... | 15 |
| Fig. 14: Receptor fibra nerviosa ratón 14 dpc técnica de Llombart..... | 15 |
| Fig. 15: Corte frontal cabeza ratón 17 dpc H&E/Azul de Alcían | 16 |
| Fig. 16: Tálamo ratón 17 dpc Violeta de Cresilo | 16 |
| Fig. 17: Corte transversal médula espinal ratón 17 dpc H&E/Azul de Alcían | 16 |
| Fig. 18: Médula espinal ratón 17 dpc Violeta de Cresilo | 16 |
| Fig. 19: Corte frontal cabeza ratón 17 dpc técnica de Llombart..... | 17 |
| Fig. 20: Corte transversal médula espinal ratón 17 dpc técnica de Llombart | 17 |
| Fig. 21: Receptor fibra nerviosa ratón 17 dpc técnica de Llombart..... | 17 |
| Fig. 22: Receptor fibra nerviosa ratón 17 dpc técnica de Llombart..... | 17 |
| Fig. 23: Corte frontal cabeza ratón 20 dpc H&E/Azul de Alcían | 18 |
| Fig. 24: Tálamo ratón 20 dpc Violeta de Cresilo | 18 |

| | |
|---|----|
| Fig. 25: Corte transversal médula espinal ratón 20 dpc H&E/Azul de Alcían | 18 |
| Fig. 26: Médula espinal ratón 20 dpc Violeta de Cresilo | 18 |
| Fig. 27: Corte frontal cabeza ratón 20 dpc técnica de Llobart..... | 19 |
| Fig. 28: Corte transversal médula espinal ratón 20 dpc técnica de Llobart,..... | 19 |
| Fig. 29: Receptor fibra nerviosa mano ratón adulto técnica de Llobart | 19 |
| Fig. 30: Receptor fibra nerviosa mano ratón adulto técnica de Llobart | 19 |
| Fig. 31: Cabeza pez cebra 60 hpf H&E/Azul de Alcían | 20 |
| Fig. 32: Tubo neural pez cebra 60 hpf H&E/Azul de Alcían | 20 |
| Fig. 33: Diencéfalo pez cebra 60 hpf Violeta de Cresilo | 20 |
| Fig. 34: Tubo neural pez cebra 60 hpf Violeta de Cresilo | 20 |
| Fig. 35: Cabeza pez cebra de 60 hpf técnica de Llobart | 21 |
| Fig. 36: Tubo neural pez cebra 60 hpf técnica de Llobart | 21 |
| Fig. 37: Cabeza pez cebra 72 hpf H&E/Azul de Alcían | 21 |
| Fig. 38: Tubo neural pez cebra 72 hpf tinción H&E/Azul de Alcían | 21 |
| Fig. 39: Diencéfalo pez cebra 72 hpf Violeta de Cresilo | 22 |
| Fig. 40: Tubo neural pez cebra 72 hpf Violeta de Cresilo | 22 |
| Fig. 41: Cabeza pez cebra 72 hpf técnica de Llobart..... | 22 |
| Fig. 42: Tubo neural pez cebra 72 hpf técnica de Llobart | 22 |
| Fig. 43: Cabeza pez cebra 120 hpf H&E/Azul de Alcían | 23 |
| Fig. 44: Tubo neural pez cebra 120 hpf H&E/Azul de Alcían | 23 |
| Fig. 45: Tálamo pez cebra 120 hpf Violeta de Cresilo | 23 |
| Fig. 46: Tubo neural pez cebra 120 hpf Violeta de Cresilo | 23 |
| Fig. 47: Cabeza pez cebra 120 hpf técnica de Llobart..... | 24 |
| Fig. 48: Tubo neural pez cebra 120 hpf técnica de Llobart | 24 |
| Fig. 49: Cabeza pez cebra 144 hpf H&E/Azul de Alcían | 24 |

| | |
|--|----|
| Fig. 50: Tubo neural pez cebra 144 hpf H&E/Azul de Alcían | 24 |
| Fig. 51: Tálamo pez cebra 144 hpf Violeta de Cresilo | 25 |
| Fig. 52: Médula espinal pez cebra 144 hpf Violeta de Cresilo | 25 |
| Fig. 53: Cabeza pez cebra 144 hpf técnica de Llombart | 25 |
| Fig. 54: Médula espinal pez cebra 144 hpf técnica de Llombart | 25 |
| Fig. 55: Cabeza pez cebra 160 hpf H&E/Azul de Alcían. | 26 |
| Fig. 56: Médula espinal pez cebra 160 hpf H&E/Azul de Alcían | 26 |
| Fig. 57: Tálamo pez cebra 160 hpf Violeta de Cresilo | 26 |
| Fig. 58: Médula espinal pez cebra 160 hpf Violeta de Cresilo | 26 |
| Fig. 59: Cabeza pez cebra 160 hpf técnica de Llombart | 26 |
| Fig. 60: Médula espinal pez cebra 160 hpf técnica de Llombart | 26 |
| Gráfico 1 y 2 Resumen neuroblastos contabilizados | 28 |
| Gráfico 3: Tendencia lineal índice talámico y medular ratón..... | 30 |
| Gráfico 4: Tendencia lineal índice talámico y medular pez cebra..... | 31 |

RESUMEN

La utilización de animales en investigación ha generado un dilema moral y una preocupación por parte de la sociedad de cómo éstos se ven afectados al ser objeto de estudio y cuáles con las consideraciones éticas que deben recibir, sobre todo en etapas tempranas de desarrollo donde su sensibilidad es aún más discutida. En el presente estudio se analizaron 12 embriones de *Mus musculus* de 12, 14, 17 y 20 días post coito, y 30 alevines de *Danio rerio* de 60, 72, 120, 144 y 160 horas post fertilización. Éstos fueron procesados y sometidos a las técnicas histológicas de H&E/azul de Alcian pH 2,5, Cresil Violeta e Impregnación Argéntica de Lombart, para visualizar el desarrollo y cronología de formación de receptores nociceptivos, médula espinal, tálamo y corteza cerebral que son las principales estructuras anatómicas que participan en la percepción del dolor.

Se evidenció que a los 17 días post coito el desarrollo nervioso en *Mus musculus* es lo suficientemente avanzado para percibir estímulos nocivos, mientras que en *Danio rerio* a las 160 horas post fertilización aún no ha finalizado, concluyendo que al menos hasta esta etapa no se encuentra morfológicamente desarrollado para sentir dolor.

Palabras clave: *Modelo animal, Mus musculus, Danio rerio, desarrollo, dolor, ética.*

ABSTRACT

Public concern regarding the use of animal models on research has raised a moral dilemma of how they are affected as a subject of study and which ethical considerations must be considered when handling them, especially on early development stages where their sensibility is even more argued. In the present study 12 *Mus musculus* embryos of 12, 14, 17 and 20 days post coitum and 30 *Danio rerio* larvae of 60, 72, 120, 144 and 160 hours post fertilization were analyzed. They were processed and dyed with H&E/Alcian blue pH 2,5, Cresyl Violet and Lombart silver impregnation, to visualize the development and chronological formation of the nociceptors, spinal cord, thalamus and cerebral cortex, which are the main anatomical structures that participate in pain perception.

It was demonstrated that at the stage of 17 days post coitum in *Mus musculus* the nervous system is developed enough to perceive noxious stimulus, whereas *Danio rerio*'s development at 160 hours post fertilization has not concluded, therefore up until this stage they are not morphologically able to feel pain.

Key words: *Animal model, Mus musculus, Danio rerio, development, pain, ethics.*

INTRODUCCIÓN

El estudio de las ciencias biológicas presenta una alta complejidad, debido a los distintos sistemas involucrados y como estos son afectados por un alto número de factores cuyas interacciones son dinámicas. Por esta razón es fundamental la utilización de modelos animales, en los cuales se estudia una de una serie de características que son extrapolables al humano.

En la antigüedad se pensaba que los animales no eran seres sintientes y que estaban a disposición del hombre, siendo esa la razón de su existencia. Sin embargo, con el paso de los años se ha evidenciado que los animales no sólo sienten dolor, sino que también, en una gran cantidad de especies se presenta una sensibilidad similar a la humana, debido a que poseen estructuras anatómicas nerviosas análogas, lo que ha generado una preocupación en la sociedad en cuanto a su manipulación con fines científicos.

En la biología del desarrollo es aún más difícil definir de qué manera los embriones pueden ser afectados al ser objetos de estudio, puesto que los mecanismos para definir las formas en que la conciencia y el dolor animal se desarrollan son indirectos.

Existe una fuerte aprehensión frente a que la investigación en modelos embriológicos pueda infligir sufrimiento. Es vital considerar que exista una posible experiencia de dolor en estos animales. No obstante, en estadios tempranos, las estructuras anatómicas necesarias para percibir dolor no se encuentran completamente desarrolladas, por lo que es muy importante poder definir en qué etapa específica el embrión está capacitado para sufrir, y determinar así, cuáles son los protocolos éticos que deben aplicarse en estos modelos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La utilización de modelos animales tiene distintos objetivos, como verificar una hipótesis científica, probar un producto, producir sustancias de uso médico o biológico, detectar fenómenos, conocer el comportamiento animal, entre otros. Sin embargo, la mayoría de los animales utilizados son considerados seres sintientes que pueden resultar heridos en dichos experimentos (Sotomayor, 2015).

El bienestar en los animales es considerado como un completo estado de salud mental y física, junto con la capacidad para sobreponerse a efectos ambientales. No obstante, no sólo se refiere a la ausencia de sufrimiento, sino también a la existencia de estados emocionales subjetivos positivos como placer. A raíz de este concepto se definen las Cinco Libertades, que indican que los animales no padezcan de hambre ni sed, no sufran malestar físico ni dolor, no sufran heridas ni enfermedades, no sufran miedo ni angustia, y puedan ajustarse a su comportamiento normal y esencial (Gallo *et al.*, 2009).

Aspectos éticos en la investigación con animales

La ética es la disciplina que analiza lógicamente los actos humanos, cuestionando costumbres que han sido elevadas a nivel de normas (Rivero y Paredes, 2006), es un acuerdo entre humanos (Arias, 2015) por lo que existen diversas teorías que definen el uso de animales de experimentación, siendo las más atingentes a este trabajo el contractualismo y el utilitarismo. El contractualismo se refiere a que los animales son importantes porque algunas personas piensan que lo son, por lo que los investigadores tienen una obligación hacia los protectores de animales, y deben considerar el bienestar animal (Brom, 2002). Por lo tanto el deber para con los animales, es un deber indirecto para con la humanidad (Arias, 2015). El utilitarismo indica un deber hacia los animales debido a que estos pueden sufrir. Se tienen que definir posibles alternativas y elegir el acto que genere una mayor felicidad (Brom, 2002). El hombre tiene derecho de acabar con la vida de un animal para sus propósitos, mientras se garantice durante su vida una buena existencia y una muerte indolora (Arias, 2015).

No existe consenso en cómo abordar este dilema. En un extremo está la perspectiva de los que se adhieren a los derechos de los animales. Según estos, jamás se justifica un daño hacia ellos con propósitos humanos, sin importar cuáles sean. El otro extremo es la visión que indica que los animales deben ser utilizados a disposición de los seres humanos. No obstante, la mayoría de las personas se encuentran en un punto intermedio entre ambas opiniones, y se acepta que los animales sean utilizados para la investigación bajo ciertas condiciones (Brom, 2002).

Desde el punto de vista bioético, los animales por sí mismos, no son sujetos de derechos ni de responsabilidades, por lo que no pueden ser considerados sujetos morales. No obstante poseen características que los llevan a ser considerados objetos morales, como capacidades cognitivas, capacidad para mejorar, sociabilidad y posesión de una vida. Por carecer de autonomía, los animales no pueden negarse a ser objeto de experimentación y, por tanto, la responsabilidad de no ocasionar sufrimiento y/o daños innecesarios recae en el ser humano (Rodríguez, 2007).

Por esto se busca la protección animal, que nace como una preocupación ética de la sociedad, y como la ciencia también está involucrada en las preocupaciones sociales acerca de la calidad de vida de los animales, su protección ha sido adoptada como objeto de la investigación y discusión científica (Arias, 2015).

De esta forma se han propuesto métodos para disminuir su sufrimiento y mejorar su bienestar. Surgen así las Tres “R” de experimentación animal:

- Reemplazo: reemplazar en lo posible, el uso de animales vivos por otras alternativas viables o por animales menos ‘sintientes’.
- Reducción: utilizar el número mínimo de animales que permita la obtención de resultados significativos, basándose en criterios estadísticos.
- Refinamiento: adecuar el protocolo de trabajo para cada especie para minimizar el potencial estrés, dolor, sufrimiento o daño permanente (Gallo *et al.*, 2009).

Investigación en la Biología del Desarrollo

La biología del desarrollo es un área dentro de la medicina en la cual los modelos animales son utilizados con el fin de aumentar la comprensión de procesos celulares, genéticos y morfogenéticos que forman parte de esta etapa, en contextos de normalidad o anormalidad. Dentro de los animales más utilizados se encuentran el pez *Danio rerio* y el ratón *Mus musculus*. Estas especies cumplen con una serie de características que les permiten ser seleccionados para la investigación, entre las que destacan que su genoma está parcialmente secuenciado y es similar al de los humanos, que poseen ciclos vitales cortos, lo que permite desarrollar experimentos en periodos más acotados y obtener resultados en un menor tiempo, la facilidad de su mantención, debido a que son de tamaño pequeño y no poseen requerimientos complejos, y a que generan un gran número de crías (Rojas y Colombo, 2010).

El desarrollo general del pez cebra ha sido altamente estudiado en los últimos años y aplicado como modelo animal en variadas patologías, por lo que se pueden seleccionar alevines según el número de horas post fertilización o post eclosión para evidenciar estructuras anatómicas nerviosas en formación o ya desarrolladas según lo que se estudie (Wilson *et al.*, 2002). En el caso del ratón, existen ciertas estructuras nerviosas que continúan su desarrollo incluso en la etapa post natal, no obstante para poder estudiar los fetos se recomienda que sean eutanasiados previo a su nacimiento, ya que su manipulación, o la posible presencia de una mutación genética generará un rechazo por parte de la madre que procederá a acabar con la vida de sus crías (Weber y Olsson, 2008).

Al igual que en la embriología humana, no existe evidencia certera de en qué medida estos modelos son capaces de sentir dolor, debido a que es una percepción bastante compleja que involucra procesos del sistema nervioso central, estados emocionales y procesos mentales cuyos análisis son indirectos. El dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño de tejido real o potencial. Sin embargo la percepción del dolor fetal o neonatal no involucra las mismas estructuras que participan del proceso en adultos. Los elementos celulares están siendo modificados constantemente por

factores internos y externos, además las neuronas, nociceptores y fibras nerviosas que participan en la percepción del dolor, maduran y comienzan su función en distintas etapas del desarrollo. Aun así, los elementos neurales pueden ser considerados inmaduros, pero no inactivos, ya que demuestran plasticidad (Lowery *et al.*, 2007).

Desarrollo del sistema nervioso

El desarrollo del sistema nervioso ocurre a través de la participación de muchas señales. Algunas son intrínsecas del organismo, mientras que otras son ambientales. Tanto la inducción neuronal como la formación de la placa neural a través del establecimiento de circuitos funcionales, requieren de eventos celulares que se necesitan llevar a cabo de forma coordinada en un espacio-tiempo determinado. La neurogénesis, migración celular, diferenciación celular, rutas axonales, sinaptogénesis, y remodelación sináptica son necesarias para proveer la forma y función del cerebro y médula espinal. Cada uno de estos procesos contiene muchos eventos subcelulares y moleculares que son altamente específicos. Por ejemplo, el establecimiento de una morfología neuronal específica, crecimiento axonal y la expresión de una serie de receptores, que van a permitir a la célula responder a ciertos impulsos sinápticos (Borodinsky *et al.*, 2014).

En la vida posnatal, las estructuras nerviosas asociadas a nocicepción son las siguientes; Receptores que corresponden a terminaciones nerviosas libres amielínicas dispuestas en la piel, tejidos musculares, articulares y paredes viscerales; Fibras nerviosas aferentes que son los axones de las neuronas pseudomonopolares de los ganglios raquídeos, que llegan al asta dorsal de la médula espinal; Neuronas e interneuronas de la médula espinal que constituyen la primera estación sináptica; Tractos espinotalámicos y espinoreticulares que avanzan hacia los centros superiores; Tálamo, que participa en la discriminación de los componentes sensoriales y afectivos motivacionales del dolor; y Corteza cerebral (Perena *et al.*, 2000).

Criterios para seleccionar método de eutanasia

La eutanasia es considerada como la forma más humana de acabar con la vida del animal. Deriva del término griego “*eu*” que significa bueno, y “*thanatos*” que significa muerte, buen morir, buscando minimizar o eliminar dolor o distrés (Leary *et al.*, 2013).

Al momento de seleccionar el método más adecuado para ejecutar la eutanasia, se debe tener en consideración todos los factores que van a influir en su realización, como lo son la especie, la condición del animal, el lugar físico, y el personal, que debe estar capacitado.

En el caso de los peces uno de los métodos aceptados es la congelación rápida, ya que en estos animales, y específicamente en estadíos tempranos donde el tamaño corporal es bastante reducido, ocurre de forma rápida sin causar dolor y sin provocar daños tisulares como podría ocurrir con métodos químicos. En los ratones los métodos físicos como concusión, dislocación cervical y decapitación requieren alta experiencia, equipamiento e inmovilización del animal y además es estéticamente desagradable para el operador. Adicionalmente considerando que en algunas circunstancias se requiere también eutanasiar a sus crías gestantes, es preferible la utilización de métodos químicos como el tiopental sódico inyectable intraperitoneal, que acaba con la vida de la madre y sus fetos de forma indolora y sin estrés (Gallo *et al.*, 2009).

Debido a la falta de conocimiento sobre la sensibilidad en la etapa prenatal, aún existe un fuerte cuestionamiento sobre el uso de los modelos animales y su exposición a posibles situaciones de incomodidad, sufrimiento y/o estrés, por lo que el siguiente trabajo busca evidenciar en qué etapa los embriones presentan sus estructuras nerviosas desarrolladas para ser considerados seres “sintientes”.

HIPÓTESIS

En fetos de ratón *Mus musculus* de 17 días de gestación y alevines de pez *Danio rerio* de 160 horas post fertilización no ha finalizado el desarrollo de médula espinal, tálamo y corteza cerebral, por lo que las conexiones nerviosas necesarias para la percepción del dolor no se encuentran constituidas.

OBJETIVO GENERAL

Identificar en dos modelos animales, en qué etapa del desarrollo se forman las estructuras anatómicas nerviosas, para establecer un protocolo de trabajo ético certero en la investigación con embriones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Reconocer morfológicamente la neurogénesis, tálamo, médula espinal y receptores (terminaciones nerviosas libres amielínicas) en *Mus musculus* y *Danio rerio* en el desarrollo prenatal y postnatal temprano.
2. Comparar la dinámica de formación en forma cronológica de las estructuras relacionadas con el dolor: tálamo, médula espinal y receptores entre ambos modelos animales, para identificar la especie menos “sintiente”.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de técnicas morfológicas se realizó en el Laboratorio de Embriología Comparada, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, luego de ser aprobado el anteproyecto.

Este trabajo se llevó a cabo atendiendo todas las normas éticas del trabajo con animales de Bioterio, evitando causar dolor, angustia y/o miedo.

Se utilizaron 30 larvas de pez cebra (alevines) distribuidos en cinco grupos de las siguientes edades:

| Grupo | N° peces | Edad (post fertilización) |
|--------------|-----------------|----------------------------------|
| 1 | 6 | 60 horas |
| 2 | 6 | 72 horas |
| 3 | 6 | 120 horas |
| 4 | 6 | 144 horas |
| 5 | 6 | 160 horas |

Los peces cebra fueron obtenidos del Laboratorio de Ontogenia del Desarrollo (Miguel Concha) del Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Los alevines fueron eutanasiados con un golpe de frío que es un método físico aceptado para esta especie.

En el modelo animal que corresponde a ratón, se utilizaron:

| Sexo | N° | Edad | Peso |
|-------------|-----------|-------------|-------------|
| Hembra | 6 | 6 semanas | 29-31 g |
| Macho | 3 | 6 semanas | 29-31 g |

Los ratones fueron obtenidos del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Se introdujo un macho por jaula (cada jaula con dos hembras). Al día siguiente se revisó el tapón mucoso para constatar que hubo cópula. Las hembras que lo presentaron se distribuyeron mediante aleatorización simple:

| Grupo | N° | Días post coito |
|--------------|-----------|------------------------|
| A | 3 | 12 |
| B | 3 | 14 |
| C | 3 | 17 |
| D | 3 | 20 |

Las hembras y sus fetos fueron eutanasiados con una sobredosis de solución de tiopental sódico inyectable intraperitoneal al 10% (180 mg/kg), siendo el método químico recomendable para la especie.

En ambos modelos los embriones fueron fijados en formalina al 10% en PBS e incluidos en parafina sólida. Se seccionaron en cortes sagitales seriados de 5µm de espesor en un micrótopo (Micom™), y montaron en porta objetos xilanizados siendo procesados mediante técnicas histológicas de rutina:

1.- Técnica Histológica: H&E/azul de Alcian pH 2,5: permite observar la disposición general de los tejidos y la presencia de glicosaminoglicanos. La Hematoxilina se asocia con mordientes para actuar como un colorante básico, por lo cual se une a estructuras aniónicas, coloreando los núcleos en tonos azules. La Eosina es un colorante ácido (predomina densidad de carga negativa), por lo cual se asocia y colorea estructuras catiónicas del citoplasma y matriz extracelular en diversos grados de color rosado. El azul de Alcian pH 2,5 es un colorante de carácter básico utilizado para detectar mucosustancias ácidas a nivel estructural. Se usa sobre todo para la detección de carbohidratos en tejidos animales. Permite la identificación de las sulfomucinas de color marrón, mientras las sialomucinas se colorean de azul.

2.- Técnica de impregnación argéntica de Llobart: se utiliza para la visualización de terminaciones nerviosas libres, nervios, axones mielinizados y no mielinizados. Estas estructuras se observan en color negro con un fondo dorado. Se basa en una doble impregnación con soluciones de plata concentradas. La primera impregnación sensibiliza al tejido para que la segunda impregne de manera selectiva las fibras nerviosas. Entre ambas impregnaciones se realiza la reducción con formol al 25% sin lavados interpuestos.

3.- Técnica histoquímica cresil violeta: permite observar neuronas. Este colorante es una anilina básica (cargada en forma positiva) que se une a las regiones basófilas de las células del tejido nervioso. En el citoplasma de las neuronas los cuerpos de Nissl (cúmulos de retículo endoplasmático) son fuertemente teñidas con esta tinción.

Las muestras de ambas especies fueron visualizadas en un microscopio estereoscópico (Stemi DV4, Carl Zeiss) y fotografiadas en formato digital (Canon Power Shot A-640, 10 Megapíxeles).

Dentro de los criterios para la identificación de las neuronas presentes en la médula espinal se consideraron la morfología neuronal, que incluye el núcleo con presencia de nucléolo prominente, límites neuronales definidos, ubicación y forma del cuerpo neuronal. La cuantificación neuronal se realizó sobre imágenes microscópicas mediante el método del disector, que consiste en la cuantificación del número de células contenidas en cuadrantes denominados disectores ópticos, distribuidos sistemáticamente en una plantilla previamente diseñada.

Los resultados fueron presentados a través de las fotografías capturadas para evidenciar el proceso de formación de médula espinal, tálamo y receptores, junto con las fibras nerviosas respectivas.

RESULTADOS

En relación con el primer objetivo específico, para el reconocimiento de la neurogénesis se observó la morfología celular del tálamo, médula espinal y sus estructuras precursoras respectivas.

Embriones de *Mus musculus*

1. 12 días post coito (grupo A)

El diencéfalo presenta sólo neuroblastos los cuales se caracterizan por un citoplasma definido con una forma redondeada apolar, aunque ya comienzan a diferenciarse algunos con el cuerpo celular más alargado en sus polos opuestos (Figuras 1 y 2). En la médula en formación, se evidencian las placas del techo y piso, además la capa marginal, del manto y endimaria (Fig. 3), todas las células de la capa del manto son bastante similares en su morfología (Fig. 4). Con la técnica de Llombart se pueden reconocer fibras nerviosas en el velo marginal de la médula espinal y en la corteza cerebral en formación (Figs. 5 y 6), sin embargo no se observaron receptores libres en ninguna zona del corte.

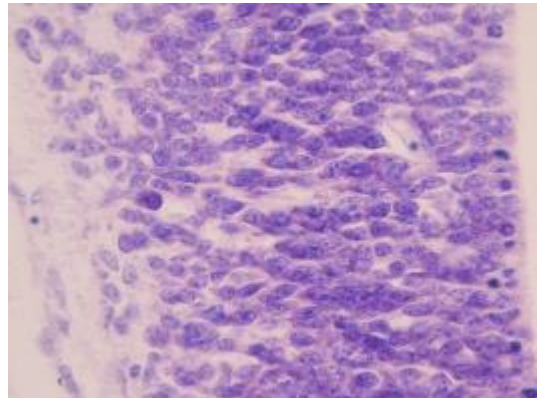


Fig. 1: Corte frontal de cabeza de ratón de 12 dpc, H&E/Azul de Alcían, 50X. (T) telencéfalo. (D) diencéfalo. Fig. 2: Diencéfalo de ratón de 12 dpc, Violeta de Cresilo, 400X. Se observan solo neuroblastos.

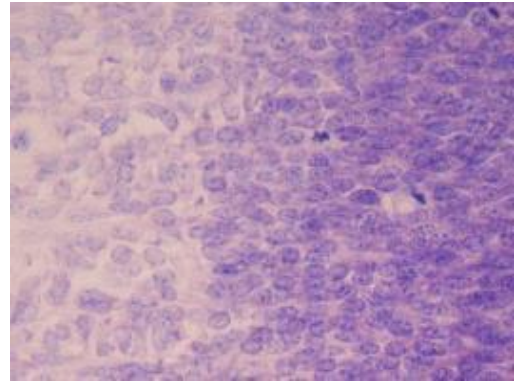
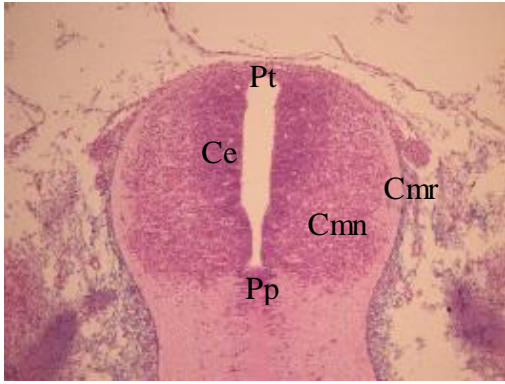


Fig. 3: Corte transversal de médula espinal de ratón de 12 dpc, H&E/Azul de Alcían, 100X. (Pt) placa del techo. (Pp) placa del piso. (Ce) capa endimaria. (Cmn) capa del manto. (Cmr) capa marginal. Fig. 4: Médula espinal de ratón de 12 dpc, Violeta de Cresilo, 400X. Neuroblastos en capa endimaria y del manto.



Fig. 5: Corte frontal de cabeza de ratón de 12 dpc, técnica de Llobart, 50X. (T) telencéfalo. (D) diencéfalo. Fig. 6: Corte transversal de médula espinal de ratón de 12 dpc, técnica de Llobart, 100X. Las fibras nerviosas (flechas) destacan el velo marginal.

2. 14 días post coito (grupo B)

El diencéfalo se encuentra más desarrollado y se distingue con más claridad la formación del tálamo e hipotálamo, se observan los plexos coroideos y la neocorteza (Fig. 7). Con respecto a las células nerviosas, aún se encuentran un gran número de neuroblastos, aunque a diferencia del anterior la gran mayoría presenta un citoplasma más alargado, y se diferencian algunas neuronas, identificadas por un cuerpo neuronal más poligonal, la presencia de cuerpos de Nissl en su citoplasma y por un mayor tamaño (Fig. 8). A nivel

medular, se distingue la sustancia gris y sustancia blanca y el número de neuronas supera considerablemente a los neuroblastos, sobre todo en las astas dorsales (Figs. 9 y 10). Con la tinción de Llobart se visualizan una gran cantidad de fibras nerviosas especialmente a la altura del tálamo donde emergen para dirigirse hacia el núcleo caudado (Fig. 11). En la médula espinal se distingue claramente las fibras nerviosas del velo marginal por su color negro. Fue posible distinguir la presencia de receptores nerviosos libres asociados principalmente a vasos sanguíneos, identificados como fascículos de fibras nerviosas en las papilas de corion (Figs. 13 y 14).

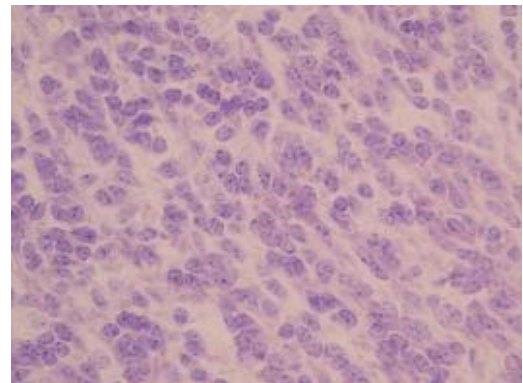
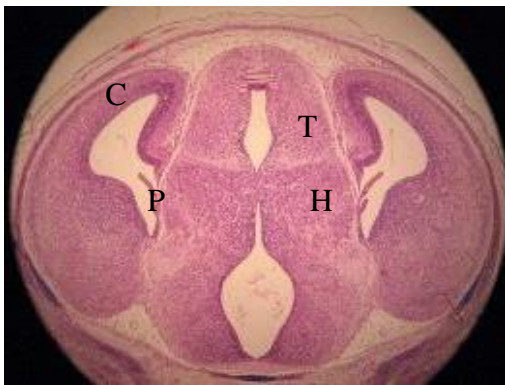


Fig. 7: Corte frontal de cabeza de ratón de 14 dpc, H&E/Azul de Alcían 50X. (T) tálamo. (H) hipotálamo. (C) neocorteza. (P) plexo coroideo. Fig. 8: Tálamo de ratón de 14 dpc, Violeta de Cresilo, 400X. Se observan neuroblastos.

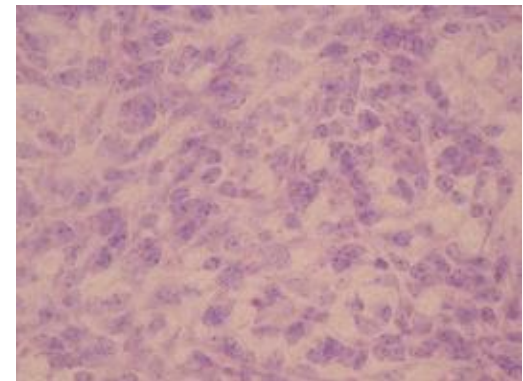
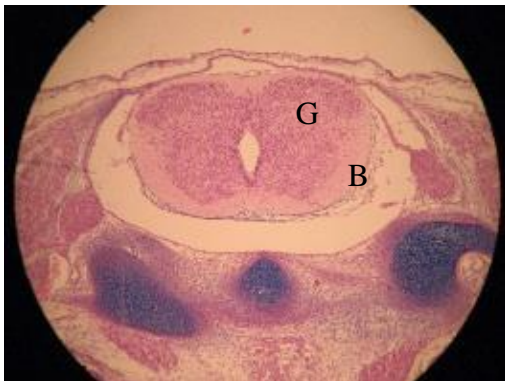


Fig. 9: Corte transversal de médula espinal de ratón de 14 dpc, H&E/Azul de Alcían, 50X. (G) sustancia gris, capa del manto. (B) sustancia blanca, velo marginal. Fig. 10: Médula espinal de ratón de 14 dpc, Violeta de Cresilo, 400X. Células nerviosas de la capa del manto.

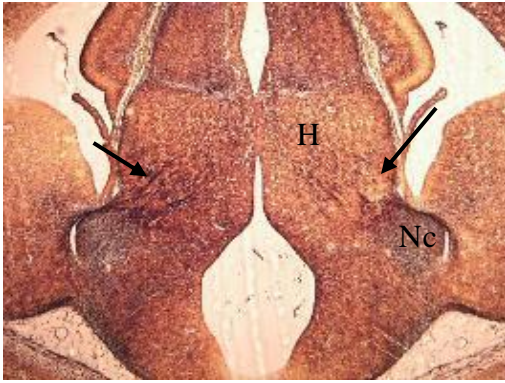


Fig. 11: Corte frontal de cabeza de ratón de 14 dpc, técnica de Llombart, 100X. Fibras nerviosas (flechas) emergiendo desde los (Nc) núcleos caudados hacia el (H) hipotálamo.

Fig. 12: Corte transversal de médula espinal de ratón de 14 dpc, técnica de Llombart, 100X. Se observa la (Cmr) capa marginal de color negro.

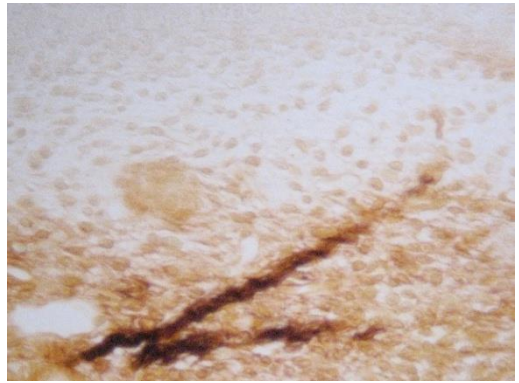
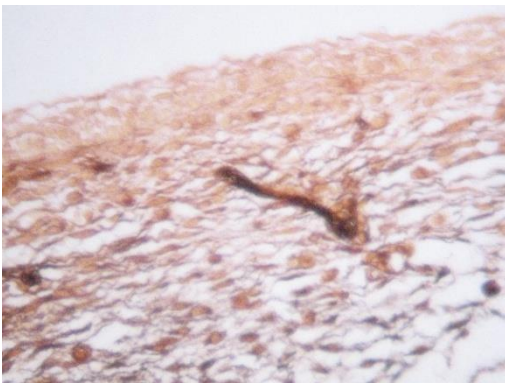


Fig. 13: Receptor de la fibra nerviosa en papilas del corion ratón de 14 dpc, técnica de Llombart, 400X. Fig. 14: Receptor de la fibra nerviosa en papilas del corion ratón de 14 dpc, técnica de Llombart, 400X.

3. 17 días post coito (grupo C)

El tálamo se encuentra más avanzado en su desarrollo, distinguiéndose ambos lóbulos con su adhesión intertalámica, se observan las acumulaciones de grupos neuronales, con su citoplasma definido, nucléolo prominente y sustancia de Nissl, que forman los distintos núcleos talámicos; posterior, lateral posterior, ventroposterolateral y ventromedial (Fig. 15). La corteza ya se encuentra diferenciada, se ve la corteza somatosensorial y la retroespinal, se identifica el hipocampo (Figs. 15 y 16). En el corte de médula espinal ésta se encuentra

completamente desarrollada, con las astas dorsales y ventrales prominentes, el canal endimario es de menor tamaño, se observa el cuerpo vertebral y un gran desarrollo de masa muscular circundante (Figs. 17 y 18). En la técnica de Lombart se puede distinguir como las fibras nerviosas van desde el tálamo hacia la corteza cerebral (Fig. 19). En la médula espinal se observa una gran cantidad de fibras nerviosas en el asta dorsal junto con fibras que cruzan al lado contrario del cual emergen y también, como fibras nerviosas llegan al asta dorsal (Fig. 20). Se observó una mayor cantidad de receptores nerviosos en distintas zonas del corte a nivel de las papilas del corion (Figs. 21 y 22).

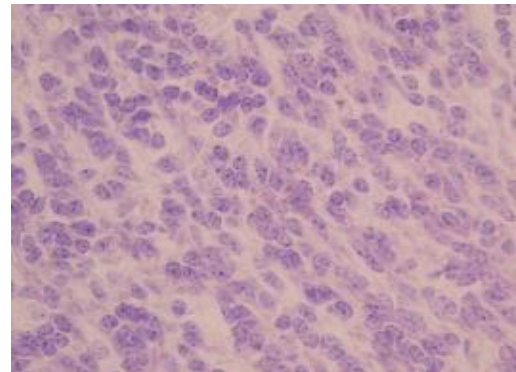
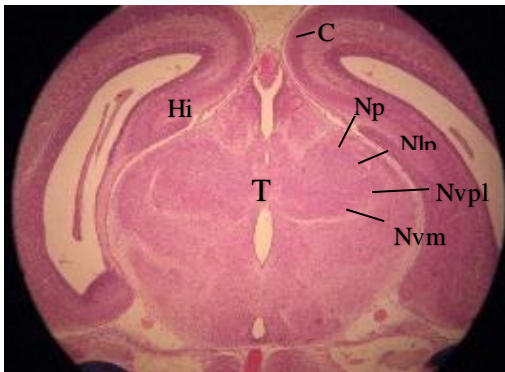


Fig. 15: Corte frontal de cabeza de ratón de 17 dpc, H&E/Azul de Alcian, 50X. Se observa (T) tálamo. (Np) núcleo posterior. (Nlp) núcleo lateral posterior. (Nvpl) núcleo ventroposterolateral. (Nvm) núcleo ventromedial. (C) corteza retroespinal. (Hi) hipocampo.

Fig. 16: Tálamo de ratón de 17 dpc, Violeta de Cresilo, 400X. Neuronas.

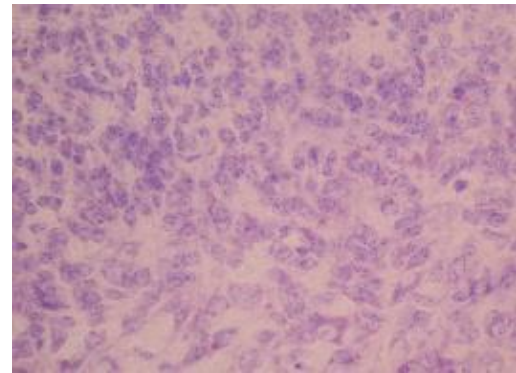
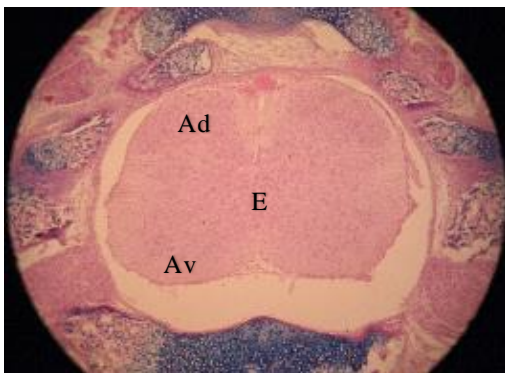


Fig. 17: Corte transversal de médula espinal de ratón de 17 dpc, H&E/Azul de Alcian, 100X. (Ad) asta dorsal. (Av) asta ventral. (E) canal endimario. Fig. 18: Médula espinal de ratón de 17 dpc, Violeta de Cresilo, 400X. Neuronas sensitivas del asta dorsal.

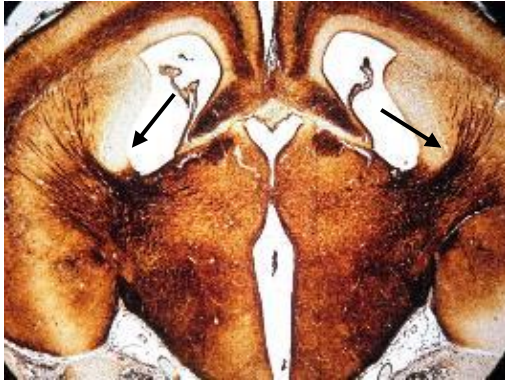


Fig. 19: Corte frontal de cabeza de ratón de 17 dpc, técnica de Llobart, 50X. Fibras nerviosas emergiendo del tálamo hacia la corteza cerebral (flechas). Fig. 20: Corte transversal de médula espinal de ratón de 17 dpc, técnica de Llobart, 100X. Fibras nerviosas cruzando hacia el lado opuesto medular (flecha).

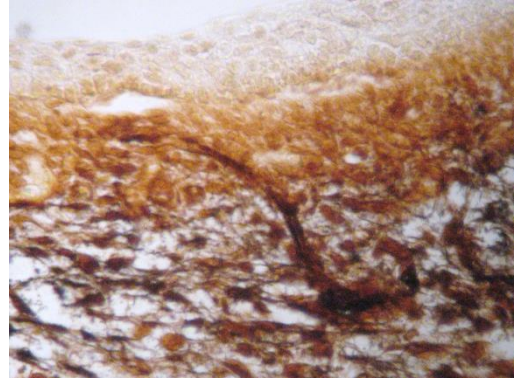
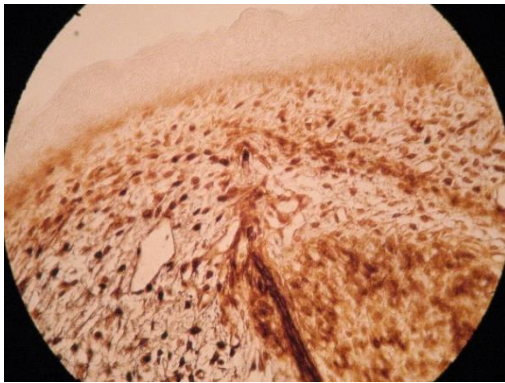


Fig. 21: Receptor de la fibra nerviosa en papilas del corion ratón de 17 dpc, técnica de Llobart, 400X. Fig. 22: Receptor de la fibra nerviosa en papilas del corion ratón de 17 dpc, técnica de Llobart, 400X.

4. 20 días post coito (grupo D)

El grupo neonato fue utilizado como referencia de las estructuras analizadas en su desarrollo total. Al igual que el grupo C se pudo observar el tálamo bien definido con sus agrupaciones neuronales y corteza cerebral (Figs. 23 y 24). De la misma forma la morfología de la médula espinal se mantiene en su organización en relación al grupo anterior. (Figs. 25 y 26). La tinción de Llobart evidenció la presencia de fibras nerviosas

respectivas al igual que en el grupo C (Figs. 27 y 28), sin embargo para una mejor identificación y comparación de los receptores nerviosos libres se adicionó un corte control de mano de ratón adulto, en el que se observó un gran número de fascículos de fibras nerviosas con fuerte coloración oscura a distintas alturas de los cortes realizados (Figs. 29 y 30).

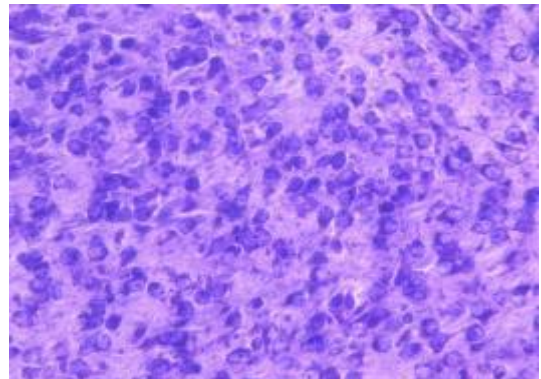


Fig. 23: Corte frontal de cabeza de ratón de 20 dpc, H&E/Azul de Alcian, 50X (T) Tálamo.

Fig. 24: Tálamo de ratón de 20 dpc, Violeta de Cresilo, 400X. Neuronas.

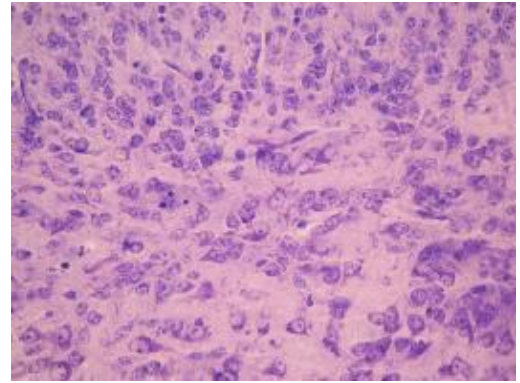
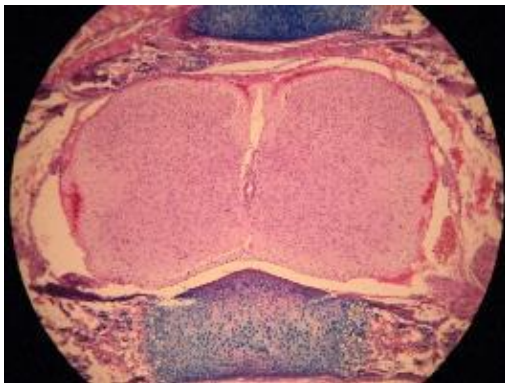


Fig. 25: Corte transversal de médula espinal de ratón de 20 dpc, H&E/Azul de Alcian, 100X. Fig. 26: Médula espinal de ratón de 20 dpc, Violeta de Cresilo, 400X. Neuronas sensitivas del asta dorsal.

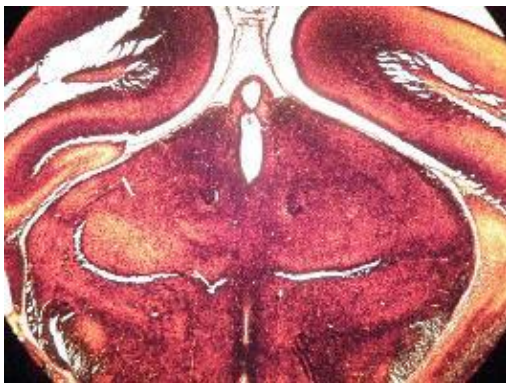


Fig. 27: Corte frontal de cabeza de ratón de 20 dpc, técnica de Lillie-Mason, 100X. (T) tálamo.

Fig. 28: Corte transversal de médula espinal de ratón de 20 dpc, técnica de Lillie-Mason, 100X

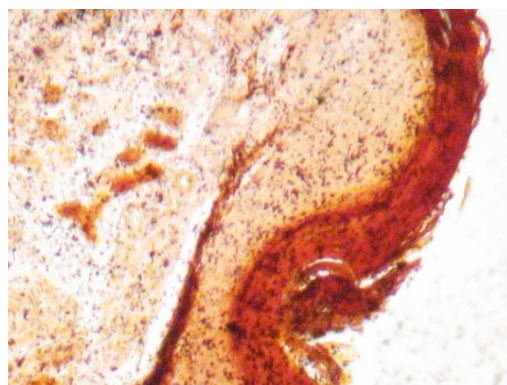
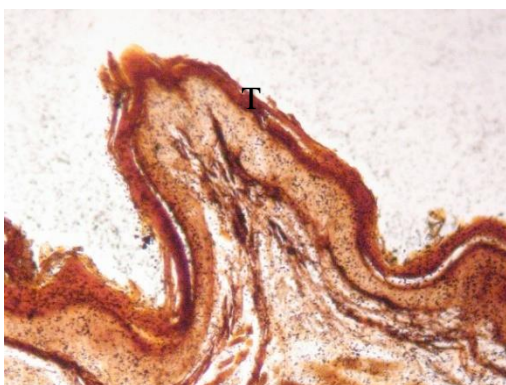


Fig. 29: Receptor de la fibra nerviosa en papilas del corion de mano de ratón adulto, técnica de Lillie-Mason, 400X. Fig. 30: Receptor de la fibra nerviosa en papilas del corion de mano de ratón adulto, técnica de Lillie-Mason, 400X.

Alevines de *Danio Rerio*

1. 60 horas post fertilización (Grupo 1)

Se observa el mesencéfalo prominente como una agrupación compacta de neuroblastos con forma redondeada y citoplasma definido, bajo este y entre los ojos se aprecia el diencéfalo con la misma morfología celular del mesencéfalo (Figs. 31 y 33). El tubo neural presenta células de tamaño uniforme, pudiendo distinguir las capas endimaria, marginal y la del manto. Se observa la notocorda de gran tamaño (Figs. 32 y 34). La técnica de Lillie-Mason

presentó una coloración oscura en la zona ventral del mesencéfalo y del diencéfalo, sin embargo resultó poco definida e inespecífica para fibras nerviosas (Fig. 35), al igual que el corte de tubo neural (Fig. 36).

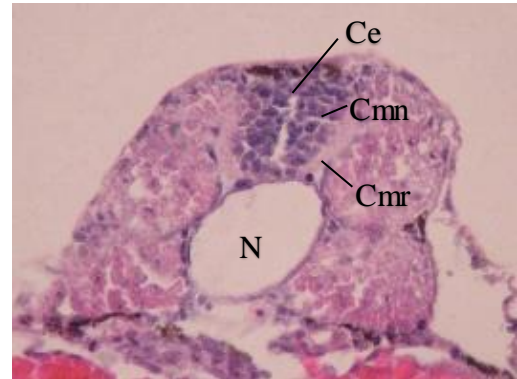


Fig. 31: Cabeza de pez cebra de 60 hpf, H&E/Azul de Alcian, 400X. (M) mesencéfalo. (D) diencéfalo. Fig. 32: Tubo neural de pez cebra de 60 hpf, H&E/Azul de Alcian, 400X. (Ce) capa endimaria. (Cmn) capa del manto. (Cmr) capa marginal. (N) notocorda.

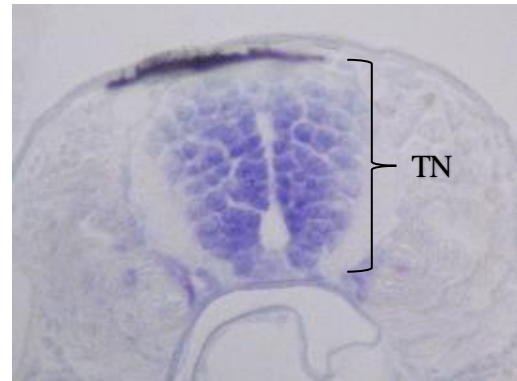
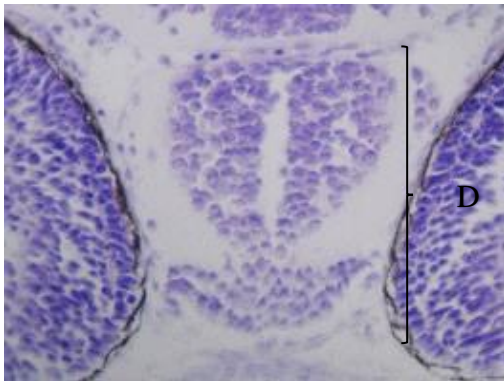


Fig. 33: Diencéfalo de pez cebra de 60 hpf, Violeta de Cresilo, 720X. Fig. 34: Tubo neural de pez cebra de 60 hpf, Violeta de Cresilo, 720X.

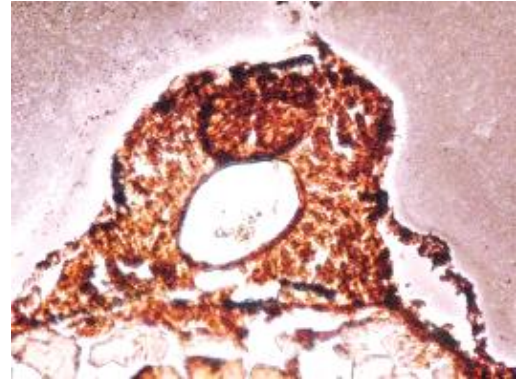


Fig. 35: Cabeza de pez cebra de 60 hpf, técnica de Llobart, 400X. Fig. 36: Tubo neural de pez cebra de 60 hpf, técnica de Llobart, 400X.

2. 72 horas post fertilización (Grupo 2)

Morfológicamente se observan pocas diferencias con el estadio anterior, sin embargo el mesencéfalo presenta un mayor desarrollo de la corteza. También se visualiza el nervio óptico (Figs. 37 y 39). El tubo neural mantiene la organización celular descrita a las 60 horas post fertilización, no presenta ningún cambio evidente (Figs. 38 y 40). La técnica de Llobart no permite distinguir fibras nerviosas en ambos cortes realizados (Figs. 41 y 42).

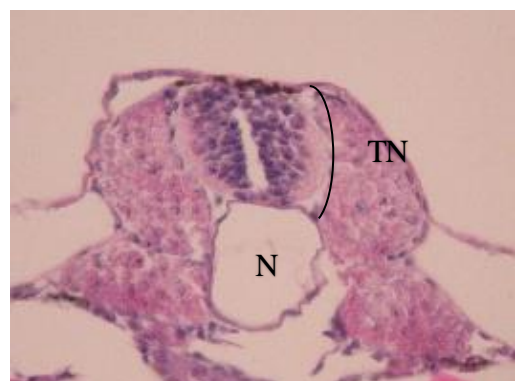
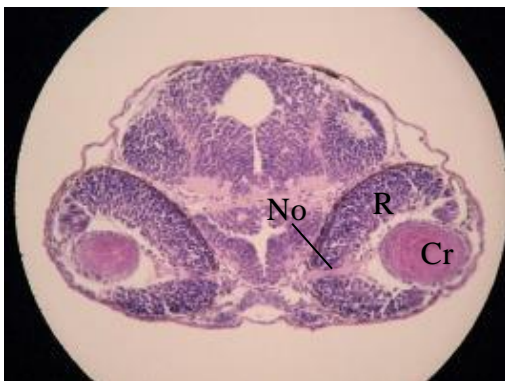


Fig. 37: Cabeza de pez cebra de 72 hpf, H&E/Azul de Alcian, 400X. (Cr) cristalino. (R) retina. (No) nervio óptico. Fig. 38: Tubo neural de pez cebra de 72 hpf, tinción H&E/Azul de Alcian, 400X.

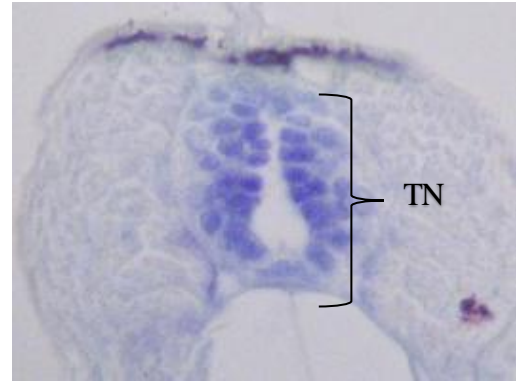
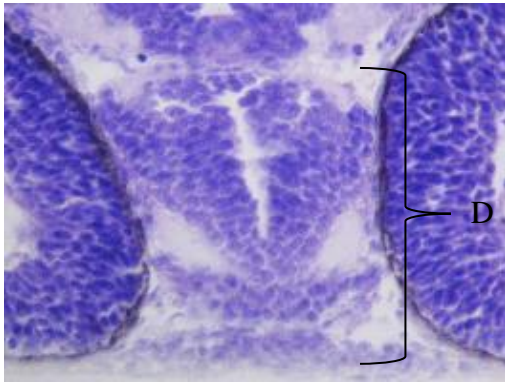


Fig. 39: Diencefalo de pez cebra de 72 hpf, Violeta de Cresilo, 720X. Fig. 40: Tubo neural de pez cebra de 72 hpf, Violeta de Cresilo, 720X.



Fig. 41: Cabeza de pez cebra de 72 hpf, técnica de Llobart, 400X. Fig. 42: Tubo neural de pez cebra de 72 hpf, técnica de Llobart, 400X.

3. 120 horas post fertilización (Grupo 3)

El mesencéfalo y el diencefalo se observan proporcionalmente de menor tamaño en relación a los ojos, y además el segundo presenta una forma más alargada dorsoventralmente. Ya se puede distinguir la formación del tálamo e hipotálamo, principalmente su zona preóptica. También se pueden diferenciar las capas oculares como la capa plexiforme interna, la capa nuclear interna, la capa de células fotorreceptoras y el epitelio pigmentado (Figs. 43 y 45). Del tubo neural comienza a diferenciarse la médula espinal evidenciado en una distribución dorsal de las células de la capa del manto (Figs. 44 y 46). La tinción de Lillie muestra una zona de fuerte coloración oscura a los laterales

del tálamo, mas no es posible afirmar que sean fibras nerviosas (Fig. 47). En el tubo neural la capa endimaria y algunas células dorsales de la capa del manto presentan una mayor coloración que el resto del corte (Fig. 48).

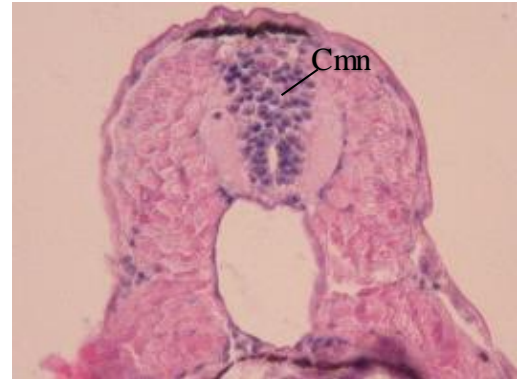


Fig. 43: Cabeza de pez cebra de 120 hpf, H&E/Azul de Alcían, 400X. (T) tálamo. (H) zona preóptica hipotálamo. (Pi) capa plexiforme interna. (Ni) capa nuclear interna. (Cf) capa de células fotorreceptoras. (Ep) epitelio pigmentado. Fig. 44: Tubo neural de pez cebra de 120 hpf, H&E/Azul de Alcían, 400X. (Cmn) capa del manto.

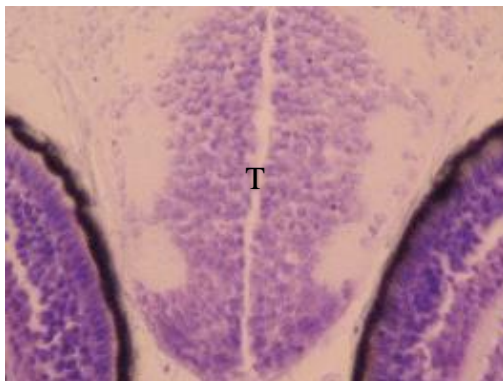


Fig. 45: Tálamo de pez cebra de 120 hpf, Violeta de Cresilo, 720X. Fig. 46: Tubo neural de pez cebra de 120 hpf, Violeta de Cresilo, 720X. (Cmn) capa del manto.

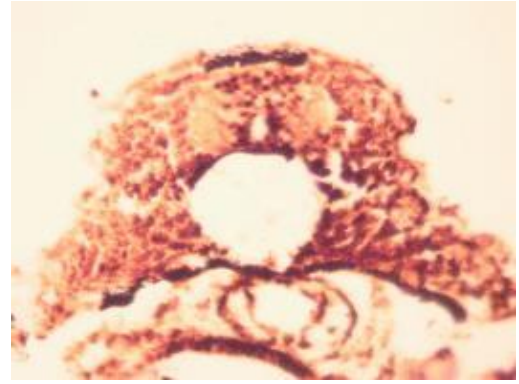
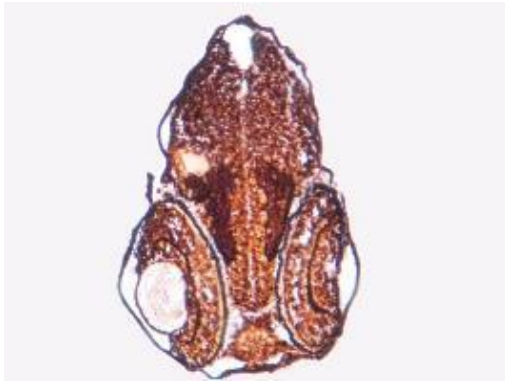


Fig. 47: Cabeza de pez cebra de 120 hpf, técnica de Lilliant, 400X. Fig. 48: Tubo neural de pez cebra de 120 hpf, técnica de Lilliant, 400X.

4. 144 horas post fertilización (Grupo 4)

El mesencéfalo y diencefalo son aún menores en tamaño que el estadio anterior con respecto a los ojos. En la parte dorsal se puede distinguir el tálamo dividido en una porción dorsal y otra ventral, y el hipotálamo (Figs. 49 y 51). El tubo neural presenta la misma organización que el estadio anterior (Figs. 50 y 52). La tinción de Lilliant presentó una coloración poco definida e inespecífica para fibras nerviosas en ambos cortes realizados (Figs. 53 y 54).

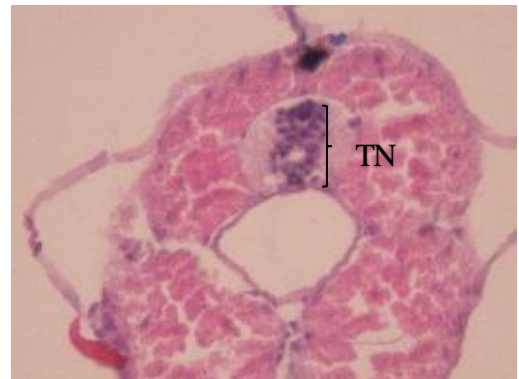


Fig. 49: Cabeza de pez cebra de 144 hpf, H&E/Azul de Alcán, 400X. (Td) tálamo dorsal. (Tv) tálamo ventral. (H) hipotálamo. (Gp) glándula pineal. (Ha) habénula. Fig. 50: Tubo neural de pez cebra de 144 hpf, H&E/Azul de Alcán, 400X.

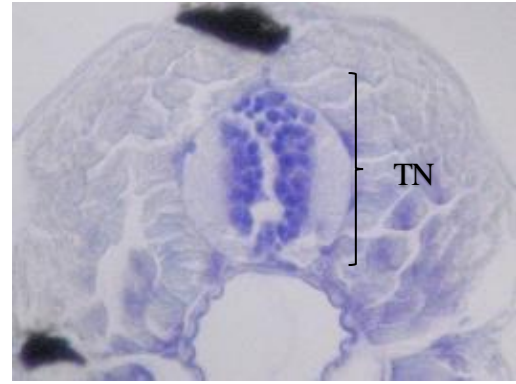
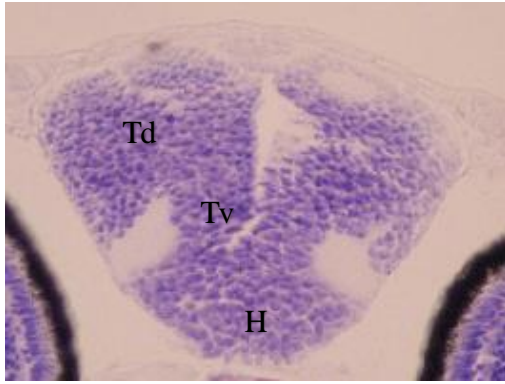


Fig. 51: Tálamo de pez cebra de 144 hpf, Violeta de Cresilo, 720X. Fig. 52. Médula espinal de pez cebra de 144 hpf, Violeta de Cresilo, 720X.



Fig. 53: Cabeza de pez cebra de 144 hpf, técnica de Llombart, 400X. Fig. 54: Médula espinal de pez cebra de 144 hpf, técnica de Llombart, 400X.

5. 160 horas post fertilización

Se observa los ojos prominentes con sus distintas capas, en el diencefalo se encuentra el tálamo e hipotálamo. La morfología celular tanto del mesencefalo como del diencefalo se mantuvo prácticamente igual a la descrita a las 60 horas postfertilización en todos los estadios estudiados. Además se distingue dorsal al tálamo la habénula y la glándula pineal (Figs. 55 y 57). Ya se encuentra diferenciada la médula espinal que se caracteriza por presentar una forma de “Y” de la sustancia gris (Figs. 56 y 58). Con la técnica de Llombart al igual que los estadios anteriores la coloración resultó inespecífica sin permitir la visualización de fibras nerviosas ni sus receptores tanto en encéfalo como médula espinal (Figs. 59 y 60).

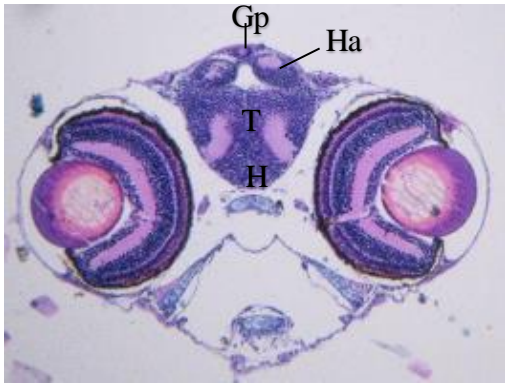


Fig. 55: Cabeza de pez cebra de 160 hpf, H&E/Azul de Alcian, 400X. (T) tálamo. (H) hipotálamo. (Gp) glándula pineal. (Ha) habénula. Fig. 56: Médula espinal de pez cebra de 160 hpf, H&E/Azul de Alcian, 400X.

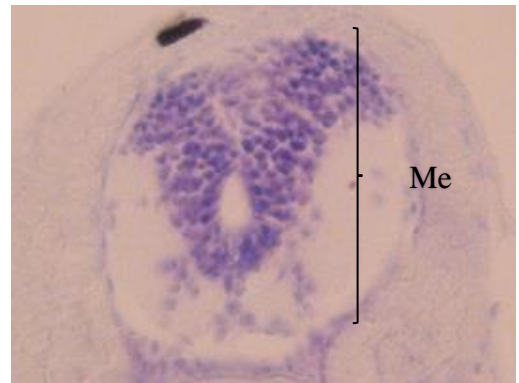
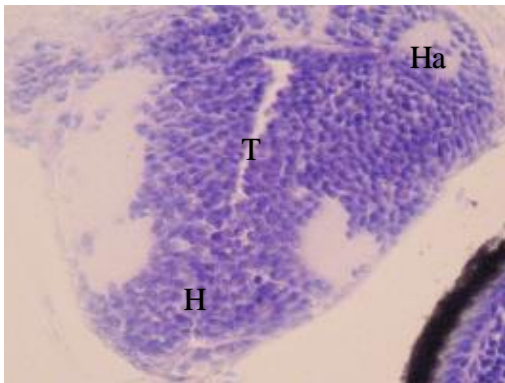


Fig. 57: Tálamo de pez cebra de 160 hpf, Violeta de Cresilo, 720X. Fig. 58: Médula espinal de pez cebra de 160 hpf, Violeta de Cresilo, 720X.

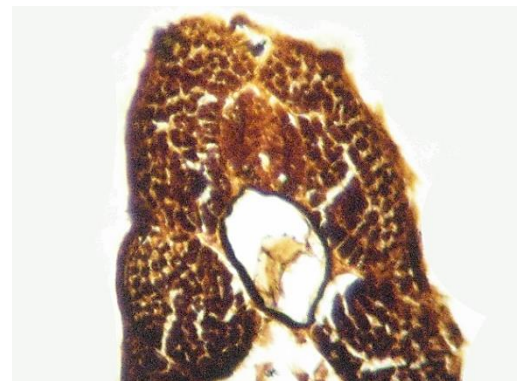
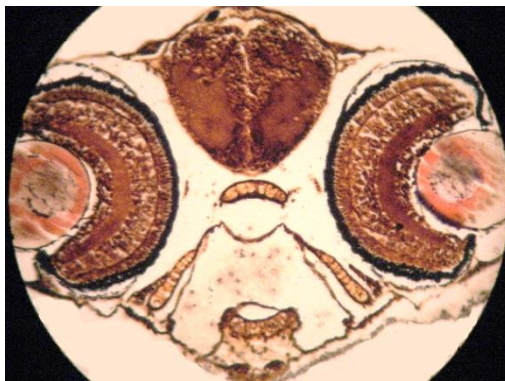


Fig. 59: Cabeza de pez cebra de 160 hpf, técnica de Llobart, 400X. Fig. 60: Médula espinal de pez cebra de 160 hpf, técnica de Llobart, 400X.

Estadística

En relación con el segundo objetivo específico para comparar la dinámica de formación en forma cronológica de las estructuras que participan en la percepción del dolor se cuantificaron el número de neuroblastos presentes en el diencéfalo o tálamo y tubo neural o médula espinal, según corresponda, de 12 ratones *Mus musculus*, de los cuales se obtuvo los siguientes datos:

Tabla 1: Tabla resumen neuroblastos en tálamo de ratón

| DPC | n | \bar{x} | D.E. | E.E. | CV | Mín | Máx |
|------------|----------|-----------------------------|-------------|-------------|-----------|------------|------------|
| 12 | 3 | 43,67 | 7,09 | 4,10 | 16,25 | 36,00 | 50,00 |
| 14 | 3 | 32,00 | 2,65 | 1,53 | 8,27 | 29,00 | 34,00 |
| 17 | 3 | 13,67 | 2,08 | 1,20 | 15,23 | 12,00 | 16,00 |
| 20 | 3 | 5,33 | 2,52 | 1,45 | 47,19 | 3,00 | 8,00 |

Tabla 2: Tabla resumen neuroblastos en médula espinal de ratón

| DPC | n | \bar{x} | D.E. | E.E. | CV | Mín | Máx |
|------------|----------|-----------------------------|-------------|-------------|-----------|------------|------------|
| 12 | 3 | 28,00 | 7,21 | 4,16 | 25,75 | 20,00 | 34,00 |
| 14 | 3 | 9,00 | 1,00 | 0,58 | 11,11 | 8,00 | 10,00 |
| 17 | 3 | 7,00 | 2,65 | 1,53 | 37,80 | 5,00 | 10,00 |
| 20 | 3 | 2,67 | 2,08 | 1,20 | 78,06 | 1,00 | 5,00 |

De igual forma de contabilizaron los neuroblastos en 3 embriones de cada etapa gestacional en peces *Danio rerio*.

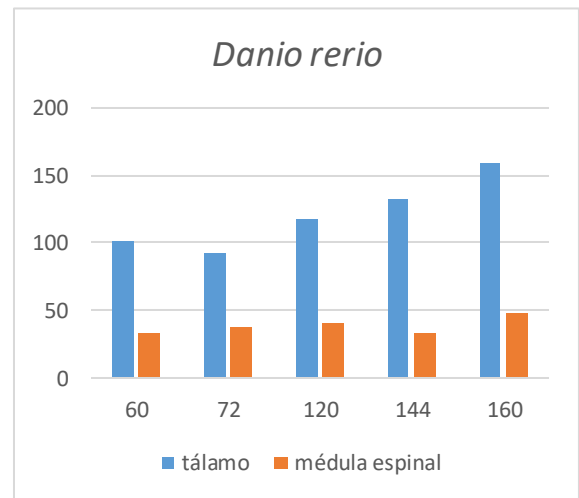
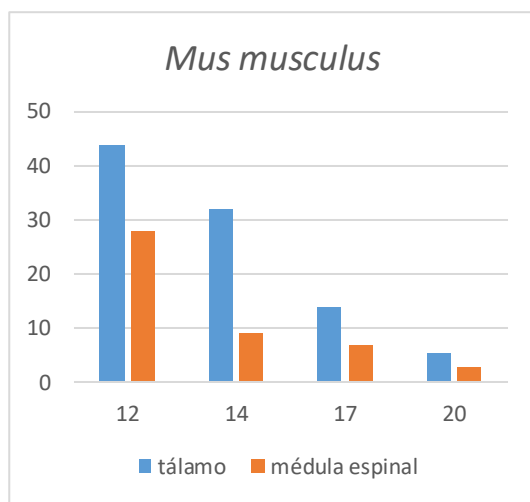
Tabla 3: Tabla resumen neuroblastos en tálamo de pez

| HPF | n | \bar{x} | D.E. | E.E. | CV | Mín. | Máx. |
|------------|----------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| 60 | 6 | 100,67 | 22,51 | 9,19 | 22,36 | 70,00 | 126,00 |
| 72 | 6 | 92,33 | 14,61 | 5,96 | 15,82 | 72,00 | 110,00 |
| 120 | 6 | 117,33 | 16,86 | 6,88 | 14,37 | 96,00 | 142,00 |
| 144 | 6 | 133,00 | 23,18 | 9,46 | 17,43 | 100,00 | 154,00 |
| 160 | 6 | 159,00 | 26,68 | 10,89 | 16,78 | 130,00 | 200,00 |

Tabla 4: Tabla resumen neuroblastos en médula espinal de pez

| HPF | n | \bar{x} | D.E. | E.E. | CV | Mín. | Máx. |
|------------|----------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| 60 | 6 | 33,67 | 5,32 | 2,17 | 15,79 | 27,00 | 40,00 |
| 72 | 6 | 37,50 | 8,04 | 3,28 | 21,45 | 28,00 | 48,00 |
| 120 | 6 | 40,67 | 7,28 | 2,97 | 17,91 | 33,00 | 52,00 |
| 144 | 6 | 33,67 | 5,61 | 2,29 | 16,66 | 29,00 | 44,00 |
| 160 | 6 | 47,67 | 7,00 | 2,86 | 14,70 | 40,00 | 60,00 |

Gráfico 1 y 2: Promedio de neuroblastos contabilizados



Posteriormente para poder realizar una comparación estadística de los distintos estadios se definió un índice talámico y medular para cada individuo, obtenido mediante el cociente entre los neuroblastos y el área en la cual estos se contabilizaron. Se aplicó una prueba de regresión lineal tanto para tálamo como médula espinal de cada especie, utilizando el programa Stata 13.0, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 5: Regresión lineal de la etapa de desarrollo de *Mus musculus* contra índice talámico y medular

| | | | | <i>Número de obs.</i> 12 | |
|-----------------|------------|----|------------|-------------------------------|---------|
| | SC | gl | MS | <i>F(2,9)</i> | 63,20 |
| <i>Modelo</i> | 102,921279 | 2 | 51,4606395 | <i>Prob > F</i> | 0,000 |
| <i>Residual</i> | 7,32872097 | 9 | 0,81430233 | <i>R²</i> | 0,9335 |
| <i>Total</i> | 110,25 | 11 | 10,0227273 | <i>R² Ajustado</i> | 0,9188 |
| | | | | <i>ECM</i> | 0,90239 |

| <i>Dpc</i> | Coef. | Err. Std. | t | P> t | [95% Intervalo de Conf.] | |
|-------------------|------------|-----------|-------|-------|--------------------------|------------|
| <i>Índice tál</i> | -0,0038021 | 0,0006219 | -6,11 | 0,000 | -0,0052089 | -0,0023952 |
| <i>Índice méd</i> | -0,0008693 | 0,0009363 | -0,93 | 0,377 | -0,0029874 | 0,0012488 |
| <i>_cons</i> | 20,19982 | 0,4783029 | 42,23 | 0,000 | 19,11782 | 21,28182 |

El modelo busca estimar la etapa de desarrollo en la que se encuentra el animal estudiado en base al número de neuroblastos que posee en un área determinada. En este caso el índice medular es muy poco significativo, debido a que el valor p es demasiado alto, por lo que la información que entrega no es certera y se retiró del modelo obteniendo la siguiente tabla.

Tabla 6: Regresión lineal de la etapa de desarrollo de *Mus musculus* contra índice talámico

| | | | | <i>Número de obs.</i> 12 | |
|-----------------|------------|----|-------------|-------------------------------|---------|
| | SC | gl | MC | <i>F(1,10)</i> | 127,29 |
| <i>Modelo</i> | 102,219315 | 1 | 102,219315 | <i>Prob > F</i> | 0,0000 |
| <i>Residual</i> | 8,03068513 | 10 | 0,803068513 | <i>R²</i> | 0,9272 |
| <i>Total</i> | 110,25 | 11 | 10,0227273 | <i>R² Ajustado</i> | 0,9199 |
| | | | | <i>ECM</i> | 0,89614 |

| <i>Dpc</i> | Coef. | Std. Err. | t | P> t | [95% Intervalo de Conf.] | |
|-------------------|-----------|-----------|--------|-------|--------------------------|------------|
| <i>Índice tál</i> | -0,004259 | 0,0003775 | -11,28 | 0,000 | -0,0051002 | -0,0034179 |
| <i>_cons</i> | 20,22981 | 0,4719079 | 42,69 | 0,000 | 19,17388 | 21,28574 |

Al retirar el índice medular se comprueba que el índice talámico por si solo es un mejor estimador de la etapa de desarrollo, ya que el valor p es 0 teniendo un efecto negativo, es decir, que a mayor es el índice talámico menor es el desarrollo del individuo.

Gráfico 3: Tendencia lineal índice talámico y medular.

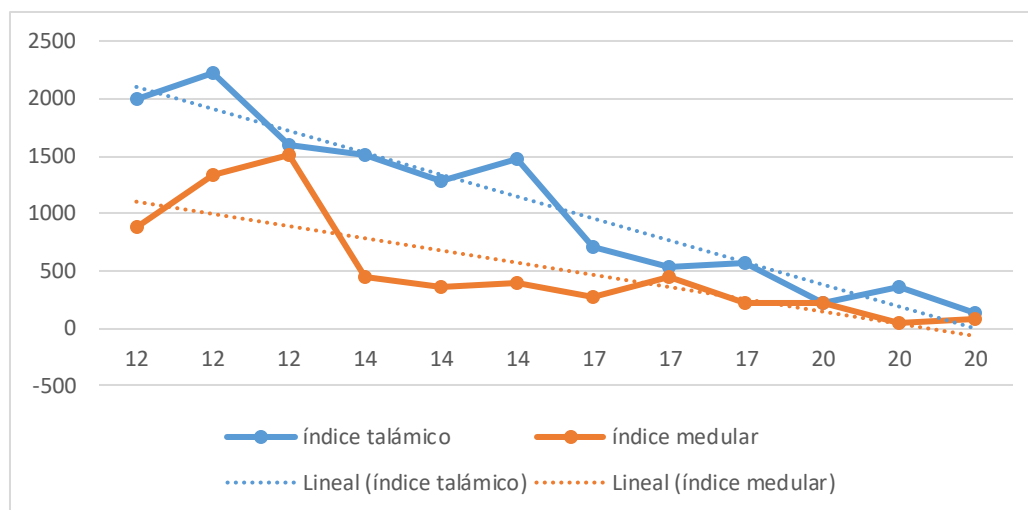


Tabla 7: Regresión lineal de la etapa de desarrollo de *Danio rerio* contra índice talámico y medular

| | SC | gl | MC | <i>Número de obs. 30</i> | | |
|-----------------|-----------|----|------------|-------------------------------|--------|--|
| <i>Modelo</i> | 15659,159 | 2 | 7829,57951 | <i>F(1,27)</i> | 6,93 | |
| <i>Residual</i> | 30497,641 | 27 | 1129,54226 | <i>Prob > F</i> | 0,0037 | |
| <i>Total</i> | 46156,8 | 29 | 1591,61379 | <i>R²</i> | 0,3393 | |
| | | | | <i>R² Ajustado</i> | 0,2903 | |
| | | | | <i>ECM</i> | 33,609 | |

| <i>Hpf</i> | Coef. | Err. Std. | t | P> t | [95% Intervalo de Conf.] | |
|-------------------|------------|-----------|-------|-------|--------------------------|-----------|
| <i>Índice tál</i> | -0,0355856 | 0,0125121 | -2,84 | 0,008 | -0,0612583 | -0,009913 |
| <i>Índice méd</i> | 0,1099427 | 0,0475805 | 2,31 | 0,029 | 0,0123155 | 0,2075698 |
| <i>_cons</i> | 116,425 | 40,16555 | 2,90 | 0,007 | 34,0121 | 198,8379 |

En este caso los valores nos indican que los índices talámico y medular estimados son significativos al 5%, sin embargo debido al ajuste realizado con el modelo ratón se evaluó si la estimación mejoraba al sacar el valor de menor significancia, el índice medular, que se vio en la siguiente tabla.

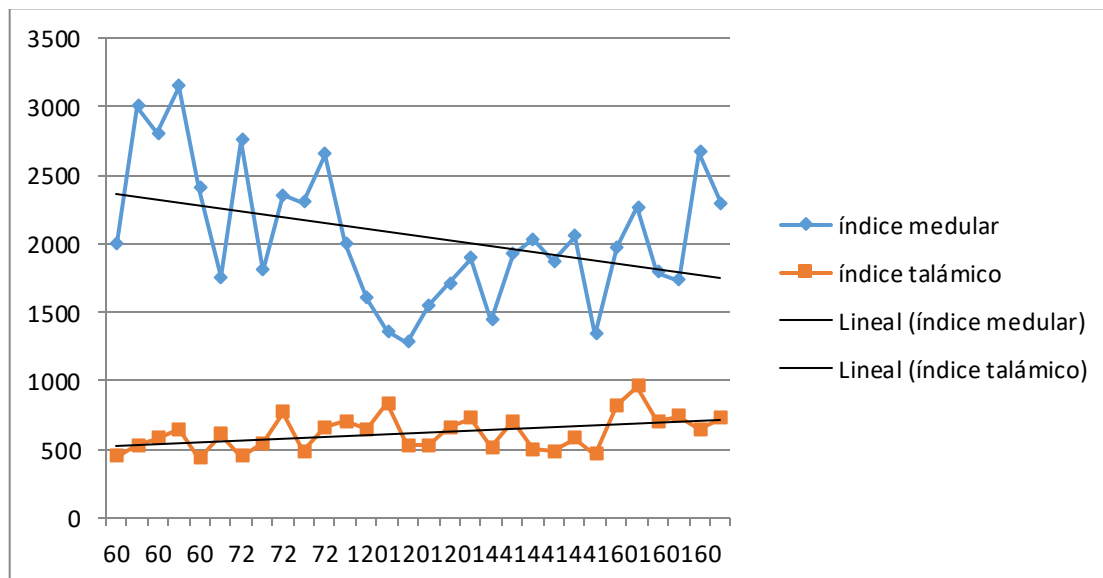
Tabla 8: Regresión lineal de la etapa de desarrollo de *Danio rerio* contra índice talámico

| | SC | gl | MC | Número de obs. 30 | | |
|----------|------------|----|------------|-------------------------|--------|--|
| Modelo | 9628,33477 | 1 | 9628,33477 | $F(1,28)$ | 7,38 | |
| Residual | 36528,4652 | 28 | 1304,58804 | Prob > F | 0,0112 | |
| Total | 46156,8 | 29 | 1591,61379 | R ² | 0,2086 | |
| | | | | R ² Ajustado | 0,1803 | |
| | | | | ECM | 36,119 | |

| Hpf | Coef. | Err. Std. | t | P> t | [95% Intervalo Conf.] | |
|------------|-------------|-----------|-------|-------|-----------------------|------------|
| Índice tal | -0,03651115 | 0,0134398 | -2,72 | 0,011 | -0,0640417 | -0,0089815 |
| _cons | 186,2885 | 28,41554 | 6,56 | 0,000 | 128,0819 | 244,4951 |

Al retirar el índice medular del modelo el valor de “p” aumentó, por lo tanto el modelo de estimación para peces es mejor con ambos índices incluidos, siendo el efecto del índice talámico positivo y el medular negativo.

Grafico 4: Tendencia lineal índice talámico y medular.



DISCUSIÓN:

Una de las mayores dificultades que presentan los investigadores es poder identificar si los animales con los que trabajan están sintiendo dolor, miedo o angustia y la intensidad en la cual la experimentan. Para poder evaluar la percepción sensitiva de los animales los métodos utilizados son indirectos, pero cada vez más se han definido distintas características observables a simple vista que ayudan a identificarlo y calificarlo, el cual varía y presenta signos distintos según cada especie animal. En los ratones, estudios como los realizados por Langford *et al.* (2010) que desarrollaron una escala de dolor en base a las diferentes expresiones faciales que presentan estos roedores, han significado un gran avance en su manejo y bienestar, ya que permite prever, evitar y controlar posibles sufrimientos de esta especie. De igual forma en los peces, Sneddon (2003) evidenció mediante distintas pruebas, comportamientos conductuales y fisiológicos que responden a eventos nocivos y potencialmente dolorosos, como disminución de ingesta de alimento y patrones natatorios entre otros, que han servido de guía para evaluar la sensibilidad en estos animales.

Sin embargo, estos indicadores ya sean expresiones faciales, vocalizaciones, o patrones natatorios han sido descritos para animales adultos. En la etapa fetal o postnatal temprana es aún más complejo identificar la capacidad de percepción de estímulos nocivos, principalmente porque la definición de dolor hace especial distinción a un componente de conciencia que es modificada por factores como la experiencia, elementos sociales y variación individual (Iwama, 2007). De esta forma la presencia de ciertas estructuras anatómicas y la forma en la que están constituidas pueden servir como indicadoras en estadíos de desarrollo temprano de las especies.

El objetivo de este estudio era identificar morfológicamente la formación de las estructuras mencionadas en dos especies ampliamente utilizadas en la investigación de la biología del desarrollo.

En los ratones *Mus musculus* se evidenció la progresión del desarrollo de las estructuras nerviosas. A los 12 días post coito se identificó el diencéfalo con abundante presencia de neuroblastos apolares, que luego a los 14 días comenzaba su diferenciación a tálamo e hipotálamo, junto con el comienzo de la formación de la neocorteza, similar a lo mencionado por Altaba *et al.* (2001). Contrario a lo planteado en la hipótesis a los 17 dpc, las estructuras ya presentaban el desarrollo necesario descrito para percibir estímulos nocivos, se observó el tálamo con ambos lóbulos con sus respectivas acumulaciones neuronales que conforman los distintos núcleos, junto la presencia de la corteza somatosensorial diferenciada considerada indispensable para el reconocimiento de dolor como tal, resultados similares se vio en estudio de Wang *et al.* (2011). El grupo neonato de 20 dpc no presentó diferencias significativas morfológicamente con respecto a los fetos de 17 dpc por lo que es posible inferir que previo al nacimiento, la formación de las estructuras nerviosas ha finalizado, trabajos como el realizado por Martínez *et al.* (2014) muestran resultados similares a la progresión de este estudio.

A los 12 dpc se observó también el tubo neural con sus capas marginal, del manto y ependimaria, junto con las placas del techo y piso ampliamente descritos en trabajos como el de Caspary y Anderson (2003). Sin embargo los resultados muestran un desarrollo neuronal más temprano a nivel medular con respecto al encéfalo, ya que, las agrupaciones neuronales que conforman las capas medulares, específicamente en el asta dorsal se encuentran ampliamente desarrolladas a los 14 dpc presentando muy leve variación con respecto a los 17 dpc, que a diferencia del tálamo a los 14 dpc aún abundan los neuroblastos, esto presenta diferencia con lo descrito por otros autores como Morris *et al.* (2012), que mencionan que el desarrollo es en eje anteroposterior, no obstante siendo los cortes medulares a nivel cervical, cabe la posibilidad de que cortes más caudales presenten un menor desarrollo que coincidiría con lo mencionado por los autores.

A pesar la presencia de algunas fibras nerviosas a los 12 dpc, estas no muestran un conformación que permita conectar diferentes estructuras para poder transmitir impulsos entre ellas, lo que sí es posible observar a los 14 dpc donde desde el tálamo comienzan a emerger fibras hacia el núcleo caudado, sin embargo estas no se conectaban con la corteza

sino hasta los 17 dpc, conformación indispensable para la percepción del dolor, similar a las imágenes realizadas por Martinez *et al.* (2014). Del mismo modo en la médula espinal también fue a los 17 dpc donde se identificaron fibras nerviosas que cruzaban al lado opuesto medular desde el asta dorsal similar a lo revisado en el trabajo de Caspary y Anderson (2003).

No fue posible observar la presencia de receptores libres a los 12 dpc, infiriendo que aún no se han formado. A los 14 dpc ya se evidenciaron unos pocos aumentando en número a mayor días de gestación ubicados en las papilas de la dermis y asociados a vasos sanguíneos como los descrito en el trabajo realizado por Dubin y Patapoutian (2010).

En los peces *Danio rerio* se observó el desarrollo de cinco estadios distintos, que al igual que en el modelo ratón permitió observar la diferenciación del diencéfalo en tálamo y tubo neural a médula espinal. La formación de estas estructuras no presentó grandes contrastes entre las 60 y 72 horas post fertilización en los cuales se destacó la presencia del mesencéfalo y diencéfalo como una agrupación compacta de neuroblastos. De forma similar el tubo neural conformado por células de tamaño uniforme, se pudo distinguir las capas endimaria, marginal y del manto. La conformación de estas estructuras coincide con las descrita en el trabajo de Wilson *et al.* (2002).

A partir de las 120 hpf se observó un cambio en la agrupación celular del diencéfalo evidenciando el comienzo de la diferenciación a tálamo e hipotálamo, que a las 144 hpf presentaba una morfología bastante desarrollada, siendo poco significativas las diferencias morfológicas con los alevines de 160 hpf. Los componentes talámicos son similares a lo presentado por Mueller (2012).

A nivel medular fue posible observar el comienzo de la diferenciación del tubo neural a médula espinal a las 120 hpf con la migración de células hacia dorsal entregando su conformación característica en peces, como mencionan Lewis y Eisen (2003), no obstante a las 160 hpf su desarrollo no estaba completo. También desde las 120 hpf inicia la diferenciación del telencéfalo a palio, que en la teoría se divide lateral, medial, ventral y

dorsal, siendo este último equivalente a la neocorteza (Key, 2015), sin embargo en los estadios observados no fue posible hacer la distinción entre ellos.

Tanto a nivel del encéfalo como médula espinal la diferenciación celular no presentó mayores cambios, ya sea a nivel morfológico o en número, evidenciándose sólo neuroblastos en todos los estadios observados. Esto difiere con el estudio realizado por Kim *et al.* (2008) que indica que dentro de las primeras 48 horas post fertilización ya existe presencia neuronal primaria, cuya morfología tal vez no fue posible visualizar con las tinciones utilizadas en este estudio.

La tinción de Llobart no entregó mayor información, no permitió observar fibras nerviosas ni receptores en ninguno de los estadios observados, que pudieran asociarse con las imágenes presentadas por Schmidt *et al.* (2013) del cerebro de pez cebra adulto, por lo que se infiere que en estas etapas de desarrollo aún no se han formado las conexiones nerviosas ni los receptores periféricos necesarios para la percepción nociceptiva. Sin embargo la forma en la que se estructura su sistema nervioso difiere con la de mamíferos, debido a que carecen de neocorteza y tampoco presentan conexiones talamocorticales (Mueller, 2012), siendo estos argumentos entre otros con los que Rose (2007), afirmó que el estudio realizado por Sneddon (2003), no era concluyente y que los peces no eran capaces de sentir dolor, ni siquiera individuos adultos, sólo nocicepción. No obstante estudios realizados por Panula *et al.* (2010) mostró que la estructura básica del sistema nervioso central en peces contiene los dominios principales encontrados en cerebros de mamíferos y los mismos neurotransmisores como GABA y glutamato, entre otros, siendo válida su comparación (Anexo 1).

Como se mencionó anteriormente, este trabajo busca generar un mayor entendimiento del dolor en estos dos modelos animales a nivel estructural, para además identificar que especie podría considerarse con menor sensibilidad y priorizarla al momento de hacer una selección. Por lo observado en los resultados y comparando con los estudios realizados por distintos autores, el pez cebra no presenta un desarrollo completo en estos estadios por lo que no debiese ser capaz de percibir estímulos nocivos.

A pesar de esto, desde el punto de vista ético, las distintas opiniones en cuanto a la utilización de animales ya sea con fines de investigación u otros, siguen basándose muchas veces en argumentos morales o valóricos por sobre evidencia científica. Carruthers por ejemplo escribió en 1992 la cuestión sobre los animales donde mencionaba que no poseen derechos al no ser considerados seres racionales, marcando una diferencia con humanos no racionales, por lo que infringirles sufrimiento no es moralmente incorrecto. Por el contrario, pensamientos más actuales como los de Francione (2015) que habla de seis principios abolicionistas donde se debe eliminar por completo la utilización de animales sin importar su propósito, considerando cualquier manejo como explotación hacia ellos. En un punto intermedio se encuentra Singer que en 1975 hablo sobre la liberación animal manteniendo su uso pero teniendo en cuenta consideraciones hacia ellos buscando reducir su explotación y mejorar su bienestar.

CONCLUSIÓN

La preocupación por parte de la sociedad en cuanto a la manipulación de animales con fines científicos ha aumentado considerablemente durante los últimos años. A raíz de esto, y junto con la preocupación de los propios investigadores han surgido distintas posturas que discuten desde el punto de vista ético la responsabilidad que recae en el ser humano para velar por el bienestar animal. Para poder adaptar los protocolos y evitar cualquier tipo de sufrimiento es necesario el mayor entendimiento posible sobre su conducta y sensibilidad a estímulos nocivos. Según lo observado en presente trabajo en el caso de los ratones *Mus musculus* las estructuras que participan en la percepción del dolor desde el punto de vista morfológico se encuentran completamente desarrolladas a los 17 días de gestación, contrario a lo planteado en la hipótesis, sin embargo, en los alevines de pez cebra *Danio rerio*, estas estructuras y sus conexiones aún no concluyen en su formación antes de las 160 horas post fertilización. Por lo que se infiere que en la etapas de desarrollo previas, estos modelos animales no presentan más que un proceso nociceptivo, lo que amplía el margen de procedimientos aplicables en estos estadíos. Además al comparar ambas especies, a nivel morfológico el pez cebra se consideró como menos sintiente. Finalmente en las etapas de desarrollo posterior la manipulación de estos animales debe considerar su bienestar y trabajar de forma respetuosa, resguardando infligir miedo, dolor y angustia.

BIBLIOGRAFÍA

ALTABA, A.; GITTON, Y.; DAHMANE, N. 2001. Embryonic Regionalization of the Neocortex. *Mech Dev.* 107:3-11.

ARIAS, J. 2015. Clase Bioética Animal, Legislación Nacional. [diapositivas]. Santiago, Chile. Curso Ética de la Investigación Biomédica, Escuela de Postgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

BORODINSKY, L.; BELGACEM, Y.; SWAPNA, I.; VISINA, O.; BALASHOVA, O.; SEQUERRA, E.; TU, M.; LEVIN, J.; SPENCER, K.; CASTRO, P.; HAMILTON, A.; SHIM, S. 2014. Spatiotemporal Integration of Developmental Cues in Neural Development. *Dev Neurobiol.* 75(4):349-359.

BROM, F. 2002. Science and Society: Different Bioethical Approaches towards Animal Experimentation. Centre for Bioethics and Health Law. Utrecht University. Altex 19.

CARRUTHERS, P. 1992. The animal issue: moral theory in practice. Cambridge University Press. Londres, Inglaterra. 224p.

CASPARY, T.; ANDERSON, K. 2003. Patterning Cell Types in the Dorsal Spinal Cord: What the Mouse Mutants Say. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:289-297.

CRAIG, K.; MOGIL, J. 2010. Coding of Facial Expressions of Pain in the Laboratory Mouse. *Nat Methods.* 7(6):447-452.

DUBIN, A.; PATAPOUTIAN, A. 2010. Nociceptors: The Sensors of the Pain Pathway. *J Clin Invest.* 120(11):3760–3772.

FRANCIONE, G.; CHARLTON, A. 2015. *Animal Right the Abolitionist Approach*. Exempla Press. EE.UU. 157 p.

GALLO, C.; GIMPEL, J.; VILLARROEL, R.; LÓPEZ, C.; MÉNDEZ, G.; SOTOMAYOR, M.; SANTOS, M.; VALENZUELA, F.; MICHAUD, R.; TÉLLEZ, R.; NÚÑEZ, S.; LIRA, E.; WINKLER, M.; BOISIER, M. 2009. Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal. 4to Taller de Bioética. Comité Asesor de Bioética, FONDECYT-CONICYT. pp. 23- 35.

IWAMA, G. 2007. The welfare of fish. *Dis Aquat Org* 75: 155–158.

KEY, B. 2015. Fish do not Feel Pain and its Implications for Understanding Phenomenal Consciousness. *Biol Philos.* 30:149–165.

KIM, H.; SHIN, J.; KIM, S.; POLING, J.; PARK, H.; APPEL, B. 2008. Notch-Regulated Oligodendrocyte Specification From Radial Glia in the Spinal Cord of Zebrafish Embryos. *Dev. Dynam.* 237:2081–2089.

LANGFORD, D.; BAILEY, A.; MONA LISA CHANDA, M.; CLARKE, S.; DRUMMOND, T.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M.; SORGE, R.; WONG, D.; MATSUMIYA, L.; SOTOCINAL, S.; TABAKA, J.; VAN DEN MAAGDENBERG, A.; FERRARI, M.;

LEARY, S.; UNDERWOOD, W.; ANTHONY, R.; CARTNER, S.; COREY, D.; GRANDIN, T.; GREENACRE, C.; GWALTNEY-BRANT, S.; MCCRACKIN, M.; MEYER, R.; MILLER, D.; SHEARER, J.; YANONG, R. 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. American Veterinary Medical Association. pp. 6-17.

LEWIS, K.; EISEN, J. 2003. From Cells to Circuits: Development of the Zebrafish Spinal Cord. *Prog. Neurobiol.* 69:419-449.

LOWERY, C.; HARDMAN, M.; MANNING, N. HALL, R.; ANAND, K. 2007. Neurodevelopmental Changes of Fetal Pain. Elsevier. 275-282.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M.; PACHECO, J.; BORRELL, V.; CANALS, S. 2014. Phenotyping the Central Nervous System of the Embryonic Mouse by Magnetic Resonance Microscopy. 97:95-106.

MORRIS, S.; GREWAL, S.; BARRIOS, F.; PATANKAR, S.; STRAUSS, B.; BUTTERY, L.; ALEXANDER, M.; SHAKESHEFF, K.; ZERNICKA-GOETZ, M. 2012. Dynamics of Anterior-Posterior Axis Formation in the Developing mouse embryo. Nat. Commun. 3:673.

MUELLER, T. 2012. What is the Thalamus in Zebrafish? Front Neurosci. 6:64.

PANULA, P.; CHEN, Y.; PRIYADARSHINI, M.; KUDO, H.; SEMENOVA, S.; SUNDVIK, M.; SALLINEN, V. 2010. The Comparative Neuroanatomy and Neurochemistry of Zebrafish CNS Systems of Relevance to Human Neuropsychiatric Diseases. Neurobiol Dis. 40:46-57.

PERENA, M.; PERENA, M.; RODRIGO-ROYO, M.; ROMERA, E. 2000. Neuroanatomía del dolor. Rev Soc Esp Dolor. 7: Supl. II, 5-10.

RIVERO, O.; PAREDES, R. 2006. Ética en el Ejercicio de la Medicina. Editorial Médica Panamericana. México D.F. pp. 1-7.

RODRÍGUEZ. 2007. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. Acta Bioet. 13(1):25-40.

ROJAS, M.; COLOMBO, 2010. Modelos animales de la biología del desarrollo. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Medicina, Depto. Morfología Comparada. 10 p.

ROSE, J. 2007. Anthropomorphism and ‘mental welfare’ of fishes. *Dis Aquat Org.* 75: 139–154.

SCHMIDT, R.; STRÄHLE, U.; SCHOLPP, S. 2013. Neurogenesis in Zebrafish – From Embryo to Adult. *Neural Dev.* 8:3.

SINGER, P. 1975. *Animal Liberation*. Harper Collins Publishers. Australia. 334 p.

SNEDDON, L. 2003. The Evidence for Pain in Fish: the use of morphine as an analgesic. *J Appl Behav Sci.* 83:153-162.

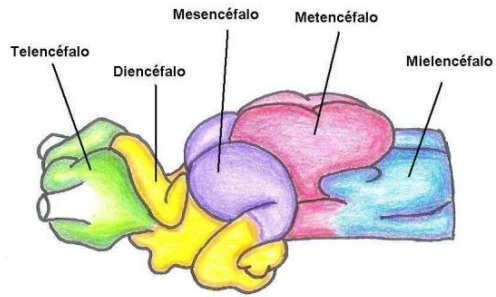
SOTOMAYOR, M. 2014. Clase Investigación humana y animal, normativa nacional e internacional. [diapositivas]. Santiago, Chile. Curso Ética de la Investigación Biomédica, Escuela de Postgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

WANG, L.; BLUSKE, K.; DICKEL, L.; NAKAGAWA, Y. 2011. Basal progenitor cells in the embryonic mouse thalamus - their molecular characterization and the role of neurogenins and Pax6. *Neural Dev.* 6:35.

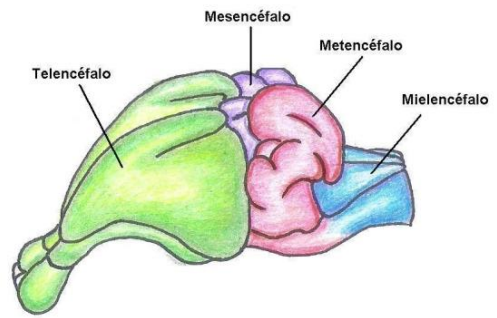
WEBER, E.; OLSSON, A. 2008. Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: An ethological review. *Appl Anim Behav. Sci.* 114:1-22.

WILSON, S.; BRAND, M.; EISEN, J. 2002. Patterning the zebrafish central nervous system. *Probl Cell Differ.* 40:181-215.

Anexo 1: Esquema de vesículas encefálicas y palio cerebral



Danio rerio



Mus musculus

