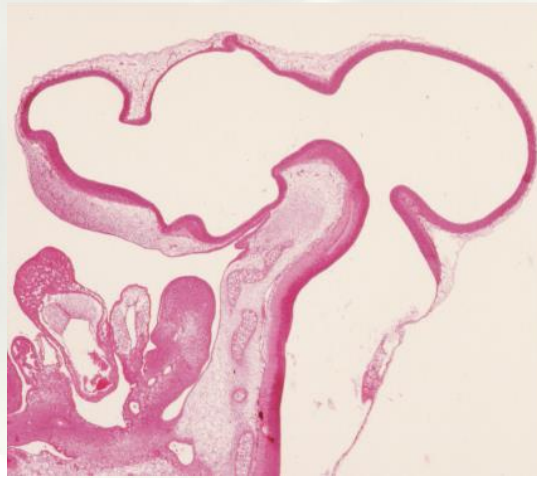


SONIC HEDGEHOG Y COMPORTAMIENTO DE PRECURSORES NEUROEPITELIALES.

**AUTORES: BEATRIZ RECIO MORENO Y ÁLVARO SANTOS GUTIÉRREZ
TUTORES: ÁNGEL GATO Y M^a ISABEL ALONSO**



ÍNDICE:

- Resumen página 3
- Introducción página 4
- Material y Métodos página 7
- Resultados página 11
- Discusión y Conclusiones página 16
- Bibliografía..... página 18



1. RESUMEN:

En los estadios tempranos del desarrollo embrionario, el cerebro tiene dos componentes fundamentales: fluido cerebroespinal embrionario (E-CSF) y precursores neuroepiteliales. En esta investigación nos centraremos en explicar la influencia de un factor de transcripción, sonic hedgehog (SHH), presente en el E-CSF, sobre el comportamiento de los precursores neuroepiteliales.

Empleamos técnicas de Wester-Blot para demostrar la presencia de SHH en el E-CSF y técnicas de cultivo organotípico de neuroepitelio de pollo, combinados con inmunobloque de SHH. La replicación celular lo valoramos por incorporación de BrdU y la neurogénesis por inmunodetección de β -3-Tubulina.

Los resultados obtenidos demuestran que SHH, presente en el E-CSF, juega un papel relevante en la expansión de la población de precursores neuroepiteliales del cerebro embrionario y en menor grado en el proceso de neurogénesis, que por otra parte ve alterada su polarización basal fisiológica.

2. INTRODUCCIÓN:

I) E-CSF regula el comportamiento de precursores neuroepiteliales en el desarrollo cerebral. Papel en la supervivencia, replicación y neurogénesis.

El cerebro embrionario en los primeros estadios del desarrollo tiene dos componentes interdependientes fundamentales: fluido cerebroespinal (CSF) y precursores neuroepiteliales [1].

Estos últimos, al no ser autosuficientes, necesitan la influencia del E-CSF que está en contacto con el extremo apical de los mismos, y contiene factores difusibles que regulan su supervivencia, replicación y diferenciación [1] [2] [3].

El E-CSF se localiza en la parte anterior del tubo neural en la cavidad rodeada por precursores neuroepiteliales, que cambia rápidamente en volumen y morfología. Tanto el neuroepitelio (NE) como la cavidad contribuyen a este crecimiento. La acumulación del fluido por un gradiente osmótico crea una fuerza expansiva contra las paredes de la cavidad, regulando el crecimiento y la neurogénesis. De hecho, existe una relación directa entre la presión dentro de la cavidad y la proliferación de las células neuroepiteliales [4].

Se ha comprobado como los progenitores neurales en el cerebro adulto de mamíferos siguen siendo sensibles a los factores difusibles presentes en el E-CSF. Estos factores específicos pueden ser una herramienta para inducir neuro-regeneración cerebral [1].

II) E-CSF presenta una composición compleja que cambia progresivamente de embrión a adulto.

E-CSF es un fluido complejo que presenta 504 proteínas en el estadio 10'5 HH y 126 son exclusivas de este estadio, entre ellas factores de transcripción, de crecimiento y morfógenos. Uno de ellos es SHH, que es segregado por el IV ventrículo a este E-CSF [5].

La concentración de proteínas del CSF varía del estadio embrionario al adulto. En embriones de pollo entre estadios de desarrollo 18HH-30HH (72-84

horas) [6], existe una mayor concentración de proteínas totales que incrementa constantemente durante este periodo y decrece en estadio fetal [3] [7].

Su identificación es crucial para comprender los procesos moleculares que convierten el neuroectodermo en un cerebro funcional adulto. En ciertas enfermedades neurodegenerativas se ha apreciado un descenso o alteración de estas proteínas.

SHH juega un papel activo en la reparación de los tejidos en las enfermedades cerebrales, siendo un objetivo de nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de tumores cerebrales y enfermedades desmielinizantes. La mejoría clínica y la reducción de la desmielinización impulsado por interferón- β o triyodotironina en varios modelos de roedores con enfermedades desmielinizantes están probablemente relacionadas con una mayor expresión de SHH [8]. Además, el aumento de la activación de la vía de señalización de SHH puede promover el crecimiento de células tumorales [9].

Los aloinjertos de precursores de oligodendrocitos combinado con el tratamiento SHH, mejoran la conducción axonal y la función de la médula espinal [8].

III) SHH.

Los mamíferos presentan 3 genes de la familia Hedgehog (Sonic, Indian y Desert) que intervienen en el desarrollo embrionario, establecimiento y mantenimiento de nichos neurogénicos en el adulto y en la proliferación de precursores neuronales o gliales.

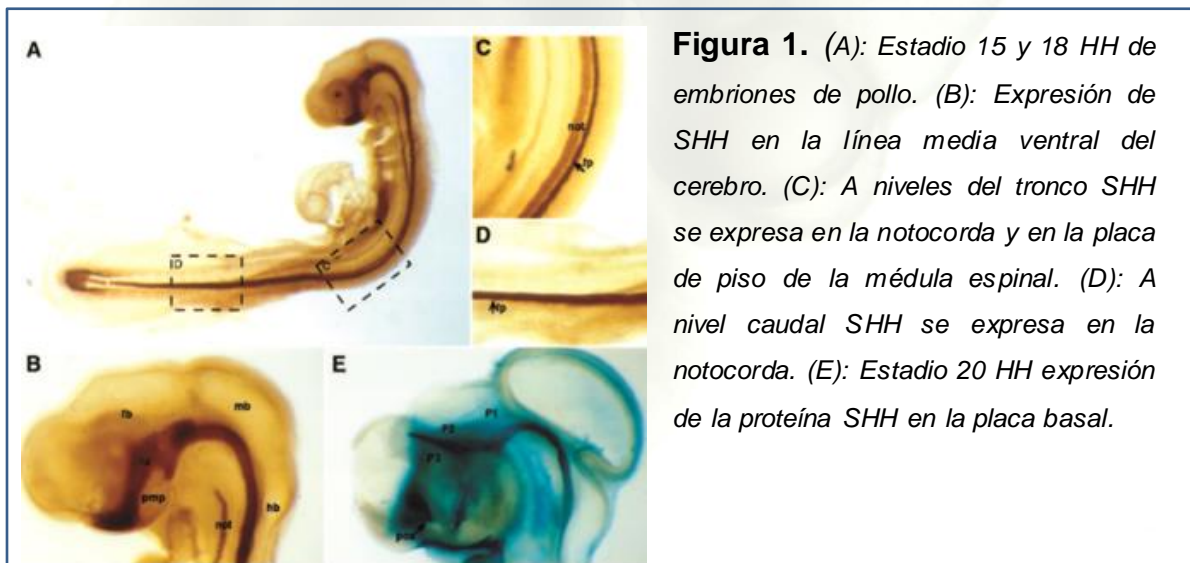
La vía de señalización de hedgehog es esencial en la embriogénesis ya que está implicada en el desarrollo de múltiples órganos, especialmente en SNC. Participa en la proliferación, especificación y orientación axonal en el cerebro anterior, cerebro posterior y la médula espinal. Tiene además un papel mitógeno para los tipos de células progenitoras específicos en el desarrollo neural. [10]

Estas proteínas actúan como morfógenos. Es decir, son moléculas que difunden y establecen un gradiente de concentración que proporciona a las células un valor posicional acorde con su situación en el gradiente. Los

gradientes de este morfógeno dentro del SNC son traducidos por precursores neuroepiteliales para determinar los tipos de neuronas.

El tubo neural está polarizado a lo largo del eje dorso-ventral. En la región dorsal se reciben aferencias de las neuronas sensoriales, mientras que en la región ventral es donde residen las neuronas motoras. La especificación de este eje en el tubo neural es iniciada por SHH, difunde y crea un gradiente de concentración a través del eje dorso-ventral del tubo neural, con niveles máximos a nivel ventral. Además, SHH regula la proliferación y supervivencia celular y el crecimiento del neocortex, cerebelo y tectum [11].

Desde la etapa de gastrulación en embrión de pollo, SHH se expresa en la línea media ventral y se extiende rostral y caudal. Se expresa en la placa precordal, notocorda y placa del suelo donde juega un papel fundamental en la especificidad de los diferentes tipos celulares ventrales. SHH no demarca un tipo celular particular sino más bien una posición [11].



Se ha sugerido que SHH podría ser un componente activo de E-CSF.

PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO:

- Detectar la presencia de SHH en E-CSF de pollo, modelo experimental versátil.
- Comprobar mediante inmunobloqueo si influye en el comportamiento basal de precursores neuroepiteliales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS:

Obtención E-CSF:

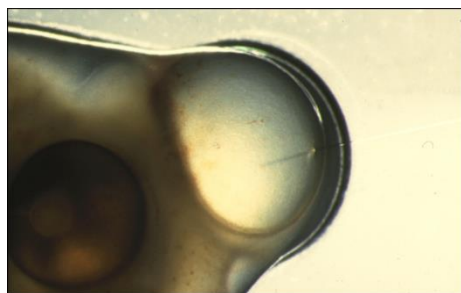


Figura 2. *Obtención de E-CSF de la cavidad mesencefálica mediante microaspiración en embriones de pollo.*

Los huevos de pollo fueron incubados a 38°C para obtener embriones en estadio 25HH (108-120 horas) [6]. Después de liberar los embriones de las membranas extraembrionarias obtenemos CSF de la cavidad mesencefálica mediante microaspiración. Para minimizar la pérdida de proteínas se almacena este CSF a -40°C hasta su posterior uso.

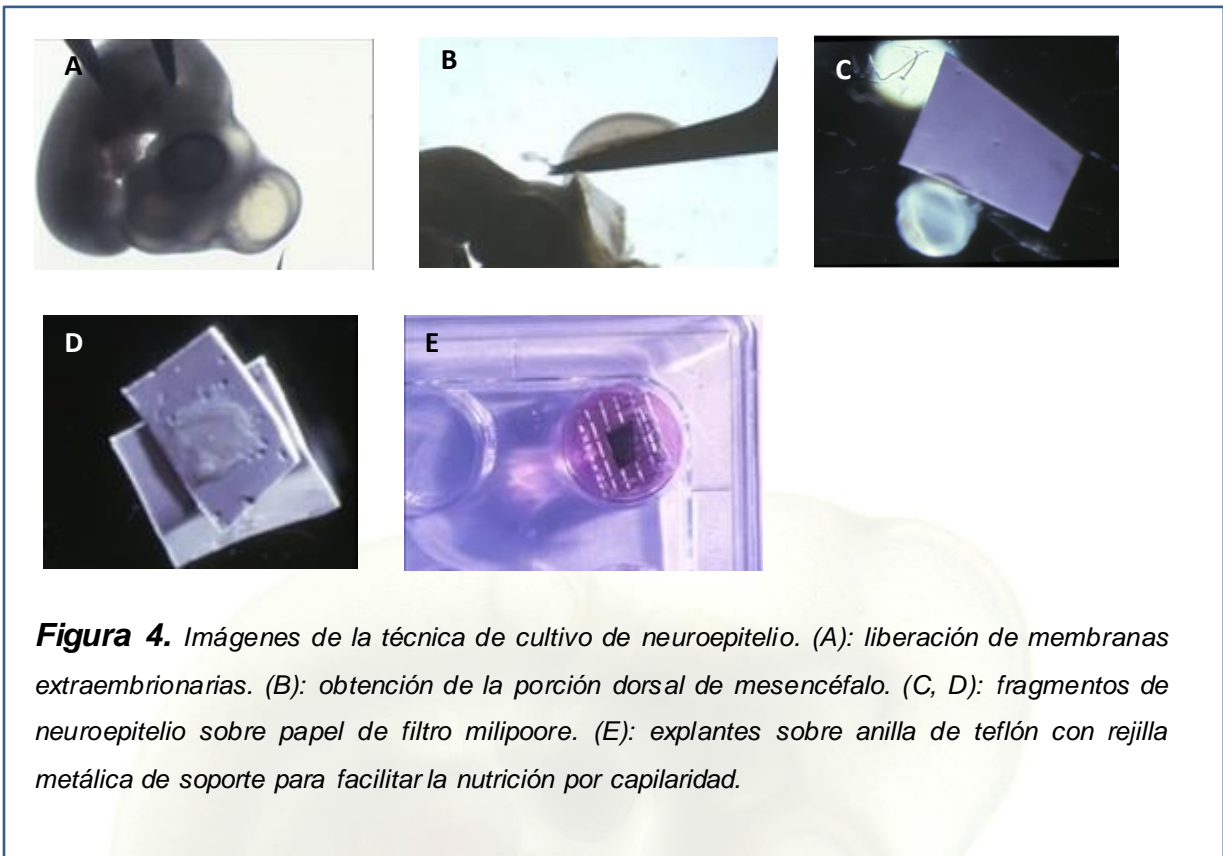
Western-Blot:



Figura 3. *Aparatos de electroforesis y Western-Blot.*

Realizamos un western-blot o inmunoblotting (técnica que emplea anticuerpos para detectar un antígeno de interés dentro de una mezcla compleja de proteínas) del E-CSF extraído y separamos las proteínas mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). A continuación hacemos la transferencia a membrana de nitrocelulosa e inmunodetección de SHH con Ac (Anti SHH, clone 5H4. Cat #MABD175. Lot #QVP1305209).

Cultivo de Neuroepitelio:



Inicialmente extraemos los embriones de pollo en un estadio 20HH [6]. Los liberamos de sus membranas extra-embionarias gracias al uso de una aguja de tungsteno. A continuación, bajo un microscopio binocular, se eliminó el ectodermo de superficie y el mesénquima subyacente a nivel mesencefálico. Obtuvimos la porción dorsal del mesencéfalo ayudándonos de unas microtijeras. Finalmente, realizamos varios lavados de solución salina (Ringer) estéril para trasladar las muestras a una placa de Petri con medio de cultivo DMEM-F12 que contiene altas concentraciones de aminoácidos, glucosa y vitaminas.

A continuación, los fragmentos de neuroepitelio fueron depositados sobre el papel de filtro milipoore con su superficie apical en contacto con el mismo y fueron “cosidos” periféricamente mediante pequeños toques realizados con una aguja de tungsteno como muestra la imagen inferior.

Las piezas así preparadas se depositan sobre una anilla de teflón en la que se coloca una rejilla metálica que sirve de soporte en las placas de cultivo sin que

el explante se hunda en él, esto permite la nutrición de tejido por capilaridad y un adecuado intercambio gaseoso.

Estas placas de cultivo se mantendrán durante 24 horas en un incubador con 98% de humedad relativa a 37'5°C y con un 5% de CO₂ (que corresponde cronológicamente a 23 HH).

De los explantes, monitorizamos diversos parámetros de comportamiento de células madre neuroepiteliales, es decir, la incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU) y β -3Tubulina (inmunomarcaje con Ac), para comprobar la replicación y la diferenciación neuronal en varias series de experimentos.

La incorporación de BrdU en los núcleos de células se realizó mediante la adición de BrdU [anticuerpo monoclonal de ratón IgG, anti-BrdU, clon Bu20a (dilución 1:100, DDKO)] al medio de cultivo a una concentración final de 5 mM durante 1 hora al final del cultivo organotípico. Inmediatamente después de esto, los explantes fueron fijados en Carnoy, se deshidrataron en una serie de alcoholes de graduación creciente y aclarados con xilol para finalmente quedar la muestra incluida en parafina. Después se realizaron cortes transversales seriados del tejido.

Técnicas Inmunohistoquímicas:

Para **detectar la replicación**, las secciones fueron incubadas en una solución que contiene un anticuerpo monoclonal contra BrdU (Dako) a una dilución 1/100 durante 30 min a temperatura ambiente. Para detectar el anticuerpo primario, se utilizó un anticuerpo secundario (Ac 2º: KID Ac 2º biotinilado - Goat anti-mouse, B6398 Sigma, dilución 1:20 -) el sistema avidina-extravidina conjugada con peroxidasa y la tinción se desarrolló con DAB (Tableta de 10 mg de 3'3 diaminobentidinetatethahidrocloridina - DDB, sigma -). Para visualizar y fotografiar los preparativos, se utilizó foto-microscopio Nikon Microphot-FXA. Se realizó un análisis contando el número de núcleos BrdU-positivos de 20 explantes diferentes de cada condición experimental. El promedio de cada estado y el error estándar se representaron en gráficas y se realizó un estudio estadístico (ANOVA).

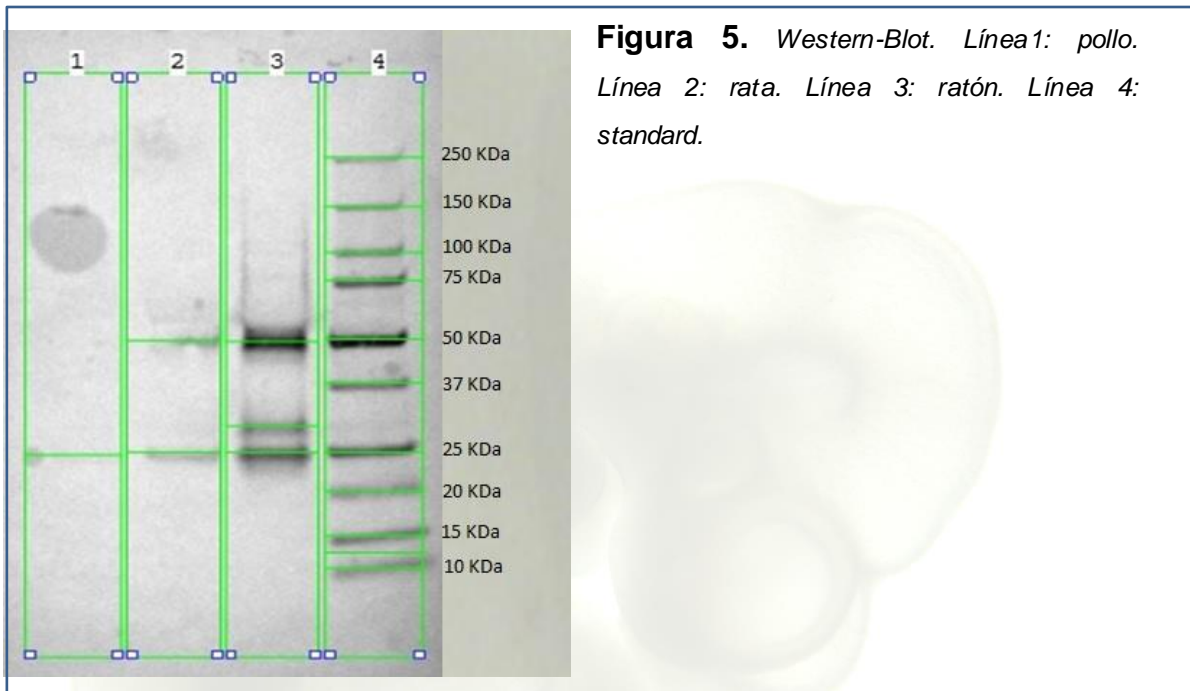
Para **detectar la diferenciación neuronal temprana**, monitorizamos la expresión de β 3-tubulina. Utilizamos un anticuerpo monoclonal anti- β 3-tubulina en 1/500 (BAbCO) y anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse IgG (H+L) dilución 1:1000). Para la visualización y la fotografía de las muestras, se utilizó un microscopio confocal (Zeiss LSM-310). Se realizó un análisis contando el número de células neuroepiteliales con citoplasma inmunoteñido en 15 explantes de cada condición experimental. El promedio de cada condición experimental y el error estándar se representaron en gráficas y se realizó un estudio estadístico (ANOVA).



4. RESULTADOS:

I) WESTERN-BLOT:

Realizamos en primer lugar un Western-Blot o inmunoblotting para demostrar la presencia de SHH en E-CSF en embriones de ratón, rata y pollo en 23 HH [6].

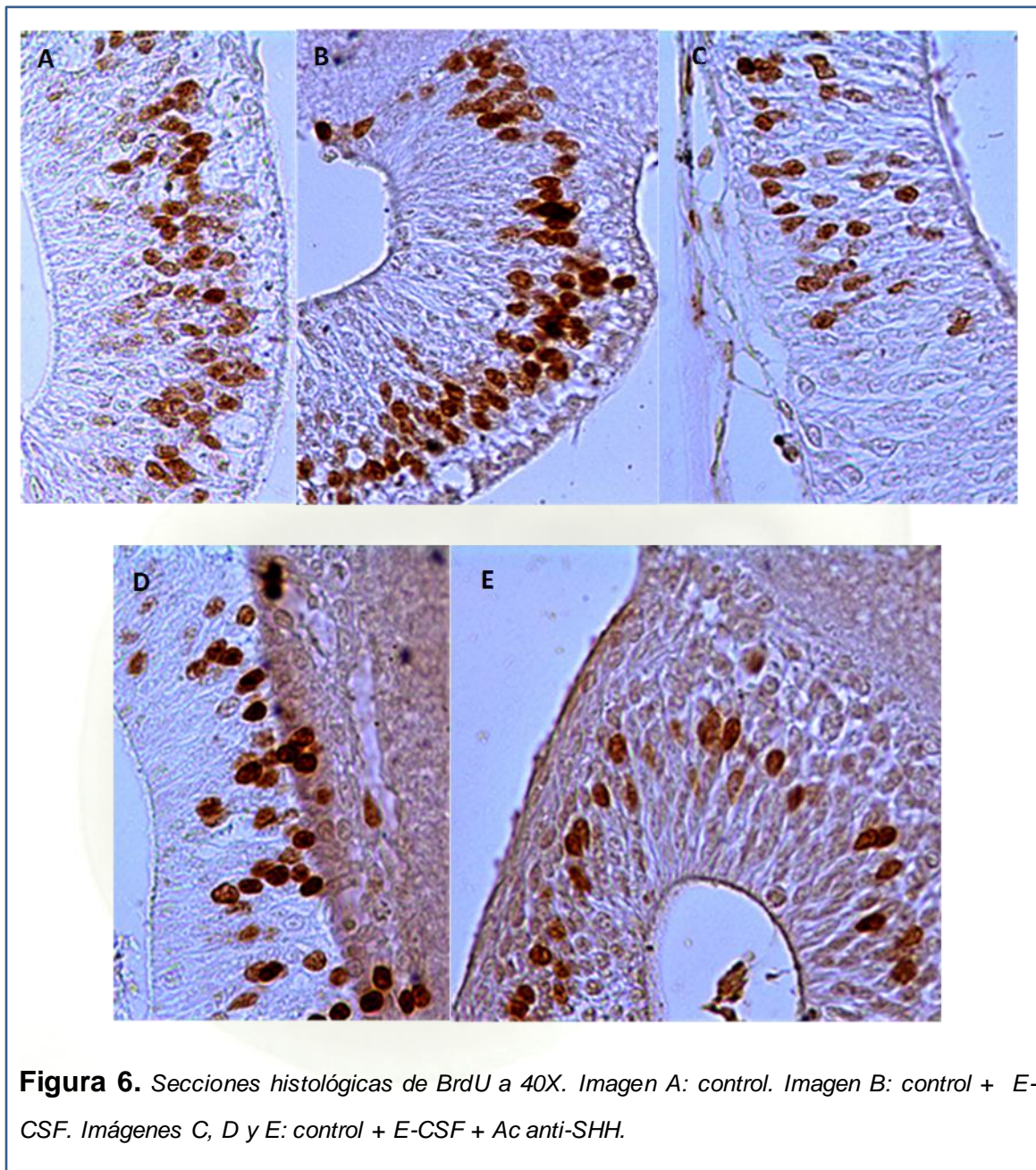


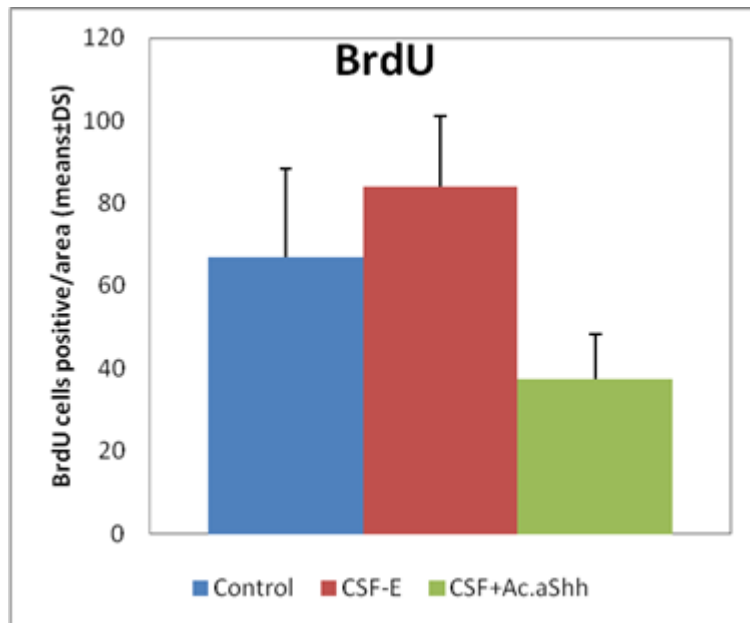
En el inmunomarcaje con Ac se detecta 1 banda de 24.635 KDa en el E-CSF de pollo (línea 1), dos bandas en el E-CSF de rata, una de 25.000 KDa y otra de 49.610 KDa (línea 2) y 3 bandas en el E-CSF de ratón 25.000 KDa, 29.211 KDa y 49.219 KDa (línea 3) en base al estándar, Precision Plus Protein™ Kaleidos cope Standards (BioRad) (línea 4). **Podemos concluir, por tanto que SHH está presente en E-CSF en estadio 23HH.**

Condiciones experimentales:

1. Medio control (medio definido: DMEM-F12 que contiene altas concentraciones de aminoácidos, glucosa y vitaminas).
2. Medio definido + E-CSF 15%
3. Medio definido + E-CSF 15% + Ac anti-SHH

II) REPLICACIÓN: BrdU





BrdU:	Control	E-CSF	E-CSF + Ac anti-SHH
means	66,8	84,04	37,44
SD	21,48	17,14	10,92

Figura7. Representación gráfica de los datos de replicación neuronal. Se muestra el promedio de cada estado y el error estándar. Se realizó un estudio estadísticamente significativo, $p < 0'001$ (ANOVA) y test post hoc-Bonferroni-Holm.

- En medio definido disminuye la replicación un 20.52%.
- Esta caída es recuperada con CSF, el cual da un patrón normal.
- En el inmunobloqueo con Ac anti-SHH muestra una disminución estadísticamente significativa de la replicación, correspondiente en nuestro estudio a un 65.5%.
- Por tanto, estos datos indican que **SHH parece estar implicado en la replicación de precursores neuroepiteliales.**

III) NEUROGÉNESIS: β -3-Tubulina

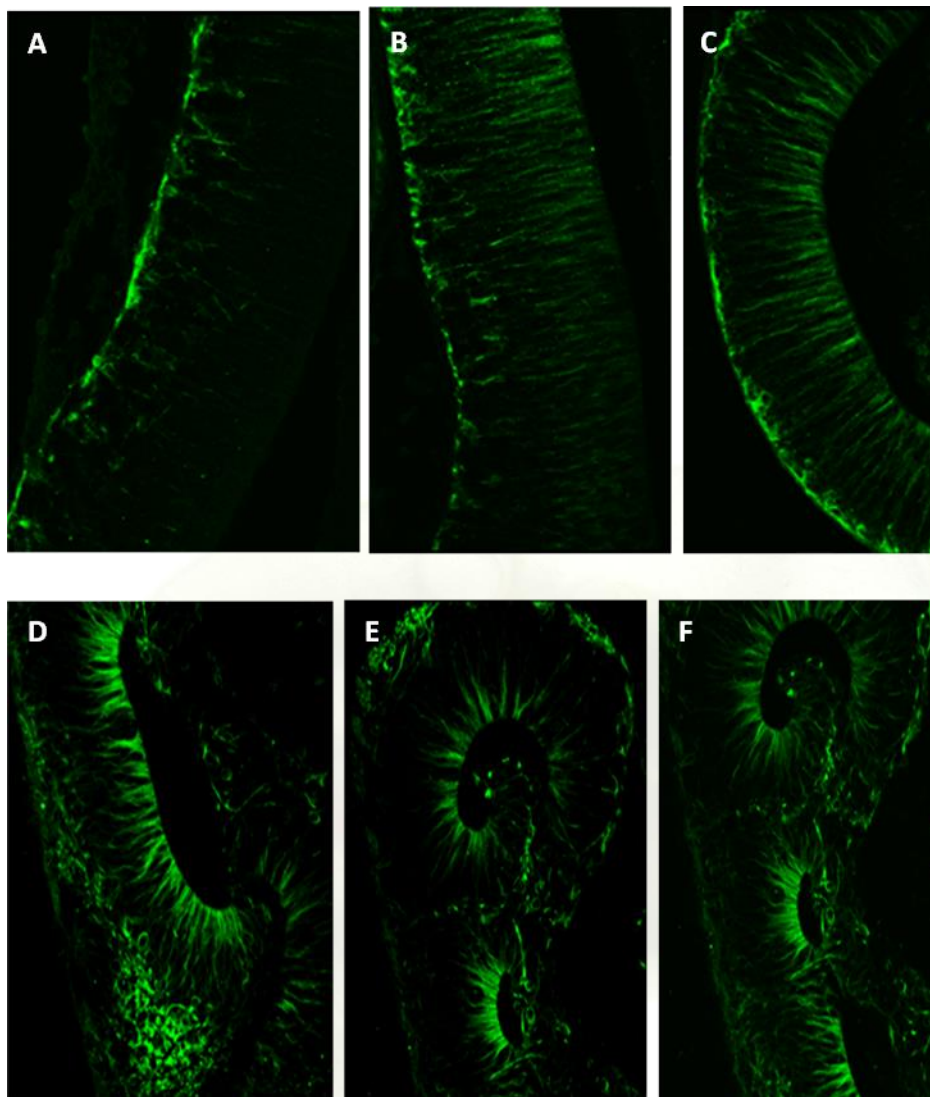
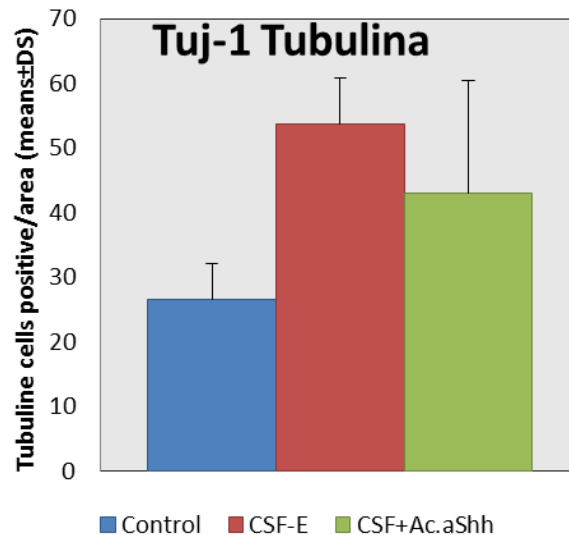


Figura 8. Secciones histológicas de β -3-Tubulina a 40X. Imagen A: control. Imagen B: control + E-CSF. Imágenes C, D, E y F: control + E-CSF + Ac anti-SHH.



B-3-Tubulina:	Control	E-CSF	E-CSF + Ac anti-SHH
Means	26,53	53,67	43,07
SD	5,49	7,23	6,32

Figura 9. Representación gráfica de los datos de diferenciación neuronal. Se muestra el promedio de cada estado y el error estándar. Se realizó un estudio estadísticamente significativo, $p < 0,001$ (ANOVA) y test post hoc-Bonferroni-Holm.

- En medio definido el número de neuronas jóvenes que están en porción basal disminuyen en menor grado que la replicación, aunque también es estadísticamente significativo (descenso del 50.57%).
- En el inmunobloqueo con Ac anti-SHH muestra una disminución estadísticamente significativa de la diferenciación (24%)
- El bloqueo de SHH demuestra la alteración en el patrón de distribución de las neuronas jóvenes y llama la atención su presencia en la porción apical lo cual nunca se había apreciado en los controles.
- Por tanto **SHH parece jugar un papel en lo que se refiere a la diferenciación neuronal más acorde con su localización espacial que con la intensidad de proceso.**

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

Sabiendo que en los estadios iniciales el cerebro embrionario se compone de E-CSF y precursores neuroepiteliales, surge la duda de cómo el primero puede influir sobre el segundo. De este modo se iniciaron estudios para comprobar la composición de E-CSF, evidenciándose cientos de proteínas. Algunas de ellas son factores de transcripción y una en concreto, SHH, con amplia expresión ha demostrado ser un elemento fundamental tanto en el cerebro en desarrollo como en el cerebro adulto.

Su acción ha sido relacionada fundamentalmente con dos procesos: el establecimiento de la identidad posicional (desarrollo de la placa basal motora) y la activación de la replicación celular.

En este estudio aportamos resultados preliminares que demuestran la presencia de SHH en E-CSF en etapas muy tempranas del desarrollo cerebral. Igualmente, nuestros resultados evidencian que se trata de un componente activo del fluido implicado en dos mecanismos básicos de comportamiento de precursores neuroepiteliales como son una implicación directa en la activación de su replicación, es decir, de control de la expansión de la población de precursores y la localización posicional (basal) de las neuronas recién nacidas.

CONCLUSIONES:

- **SHH está presente en el E-CSF de pollo.**
- **El inmunobloqueo de dicho factor de transcripción produce una disminución del 65'5% respecto a los controles en la actividad replicativa. Dicha caída es estadísticamente significativa.**
- **El inmunobloqueo de SHH provoca una disminución concomitante del 20% en la neurogénesis respecto a los controles. Así mismo se observa una llamativa alteración en la disposición de las nuevas neuronas que la mayoría se encuentran ahora apicalmente.**

- **E-CSF contiene el factor de transcripción SHH que juega un papel relevante en la expansión de la población de precursores neuroepiteliales del cerebro embrionario de pollo y en menor grado en el proceso de neurogénesis que por otra parte ve alterada su polarización basal fisiológica.**



6. BIBLIOGRAFÍA:

- [1] Gato A., Alonso M. I., Martin C., Carnicero E., Moro J. A., De la Mano A., et al. Embryonic cerebrospinal fluid in brain development: neural progenitor control. *Croat. Med. J.* 2014; 55; 299–305.
- [2] Gato A, Moro JA, Alonso MI, Bueno D, De La Mano A, Martín C. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005; 284: 475-484.
- [3] Parada, C., A. Gato, M. Aparicio, and D. Bueno. Proteome analysis of chick embryonic cerebrospinal fluid. *Proteomics.* 2006. 6:312–320.
- [4] Gato A, Desmond ME. Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histogenesis. *Dev Biol.* (2009); 327:263-272.
- [5] Kevin F. Chau, Mark W. Springel, Kevin G. Broadbelt, Hanno Steen, Anthony S. LaMantia, MariaK Lehtinen. Progressive differentiation and instructive capacities of amniotic fluid and cerebrospinal fluid proteomes following neural tube closure. *Dev cell* (2015); 35, 789-802.
- [6] Hamburger V, Hamilton HL. A serie of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* (1951); 88: 49-92.
- [7] Gato A, Martin P, Alonso MI, Martin C, Pulgar MA, Moro JA. Analysis of cerebro-spinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2004; 301A:280-9.
- [8] Traiffort E, Angot E, Ruat M .Sonic hedgehog signaling in the mammalian brain. *Journal of Neurochemistry.* 2010. 113: 576–590.
- [9] Alvarez-Buylla, A., and Ihrie, R. A. (2014). Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain. *Semin. Cell Dev. Biol.* 33, 105–111.

[10]Ishibashi M, Saitsu H, Komada M, Shiota K: Signaling cascade coordinating growth of dorsal and ventral tissues of the vertebrate brain, with special reference to the involvement of Sonic Hedgehog signaling. *Anat Sci Int* 2005; 80: 30–36.

[11] Elisa Martí, Ritsuko Takada, David A. Bumcrot, Hiroshi Sasaki and Andrew P. McMahon. Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *The Company of Biologists Limited* (1995) 121, 2537-2547.

