



**REGULACIÓN DE LA
REPLICACIÓN DE LOS
PRECURSORES
NEUROEPITELIALES POR EL
FLUIDO CEREBROESPINAL
EMBRIONARIO. PAPEL DEL
WNT1.**

**REGULATION OF
NEUROEPITHELIAL
PRECURSOR REPLICATION BY
EMBRYONIC CEREBROSPINAL
FLUID. ROLE OF WNT1.**

Candidato: Jaime Cabrera Rodríguez

Tutores: Ángel Gato Casado y M^a Isabel Alonso Revuelta

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| DESARROLLO TEMPRANO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL | 2 |
| <i>Neurulación</i> | 2 |
| <i>Diferenciación del tubo neural</i> | 3 |
| <i>Vesiculación cerebral</i> | 3 |
| NEUROEPITELIO | 4 |
| <i>Factores mitogénicos y neurogénicos</i> | 4 |
| FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO (CSFE) | 5 |
| <i>Composición del CSFe</i> | 5 |
| WNT-1 | 6 |
| <i>Ruta canónica Wnt/β-catenina</i> | 6 |
| <i>Ruta no canónica de Wnt</i> | 7 |
| HIPÓTESIS | 9 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 9 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 10 |
| OBTENCIÓN DE LÍQUIDO CEREBROESPINAL (CSF) | 10 |
| CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DEL NEUROEPITELIO | 10 |
| INMUNODETECCIÓN DE BRDU Y DE β3-TUBULINA | 11 |
| INMUNOLocalización de TOTAL-FAKs Y DE LAMININA | 12 |
| RESULTADOS | 13 |
| WNT1, PRESENTE EN EL CSFE, ESTÁ INVOLUCRADO EN LA REGULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS PRECURSORAS DEL NEUROEPITELIO | 13 |
| IMPLICACIÓN DE WNT1 EN LA POLARIDAD DE LAS CÉLULAS NEUROEPITELIALES | 17 |
| DISCUSIÓN | 19 |
| ACTUACIÓN DE WNT1 COMO CONTROLADOR DE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR ...19 | |
| WNT1 TIENE UN PAPEL RELEVANTE EN LA POLARIZACIÓN CELULAR | 20 |
| CONCLUSIÓN | 22 |
| BIBLIOGRAFÍA | 23 |

RESUMEN

En las etapas más tempranas del desarrollo embrionario, las células neuroepiteliales experimentan potentes procesos de proliferación y diferenciación celular. La proteína Wnt1 parece estar involucrada en la regulación de estos procesos por varias vías de señalización, a partir de las cuales también estaría implicada en la polarización celular.

En este trabajo, hemos intentado probar el papel específico que presenta el Wnt1 contenido en el fluido cerebroespinal embrionario (CSFe) en el control de la mitosis y la neurogénesis en embriones de pollo (HH19-21). Así, observamos una acción inhibitoria de este sobre las células precursoras del neuroepitelio en cultivos organotípicos del mismo, tanto en la proliferación como en la diferenciación, siendo lo observado con respecto a la proliferación celular opuesto a lo demostrado por otros autores. Además, mediante estudios con quinasas de adhesión focal y laminina, pudimos percatarnos de una cierta relevancia de Wnt1 en la identidad posicional de las células neuroepiteliales, que, aún siendo no del todo clara, todo apunta a que Wnt1 sí que actúa sobre este proceso si lo contrastamos con los demostrado en otros estudios.

Considerando estos resultados, concluimos que la diversidad de las ramas en las rutas de señalización de Wnt, puede tener algo que ver con las diferencias existentes con respecto a lo observado por otros autores en el control de la proliferación, pareciendo ser de mayor relevancia el papel de Wnt1 en la diferenciación. Asimismo, en relación con las mismas rutas que afectan a los dos procesos anteriores, se puede también sospechar la importancia de Wnt1 sobre la identidad posicional.

Palabras clave: WNT1; Fluido cerebroespinal; Neuroepitelio; Desarrollo embrionario temprano; Embrión de pollo; Proliferación celular; Diferenciación celular.

ABSTRACT

At the earliest stages of embryonic development, neuroepithelial cells undergo powerful processes of cellular proliferation and differentiation. Wnt 1 is a protein that seems to be involved in the regulation of these processes by several signalling pathways, from which it would also be involved in cellular polarisation.

In this essay, we have attempted to test the specific role of Wnt1 contained in embryonic cerebrospinal fluid (CSFe) in the control of mitosis and neurogenesis in chick embryos (HH19-21). Thus, we observed an inhibitory action on neuroepithelial precursor cells in neuroepithelium organotypic cultures, both in proliferation and differentiation; the observations regarding cellular proliferation are the opposite of what has been shown by other authors. Furthermore, through studies with focal adhesion kinases and laminin, we were able to identify a certain relevance of Wnt1 in the positional identity of neuroepithelial cells, which, although not entirely clear suggests that Wnt1 does act on this process when contrasted with results of other studies.

In view of these findings, we conclude that the diversity of branches in the Wnt signalling pathways may have something to do with the differences observed by other authors in the control of proliferation, with the role of Wnt in differentiation appearing to be more relevant. In addition, the importance of Wnt1 on positional identity can also be related with of the same pathways that affect the two previous processes.

Keywords: WNT1; Cerebrospinal fluid; Neuroepithelium; Early embryonic development; Chick embryos; Cellular proliferation; Cellular differentiation.

INTRODUCCIÓN

Desarrollo temprano del sistema nervioso central

En las fases más tempranas del desarrollo se produce el origen ontogénico del sistema nervioso central, en el momento en el que la notocorda induce el engrosamiento de la parte central del ectodermo, conocido como placa neural, esta estructura va a verse afectada por diversos procesos transformantes conocidos como neurulación, formándose así el tubo neural, a partir del cual se originarán el encéfalo y la médula espinal.

Neurulación

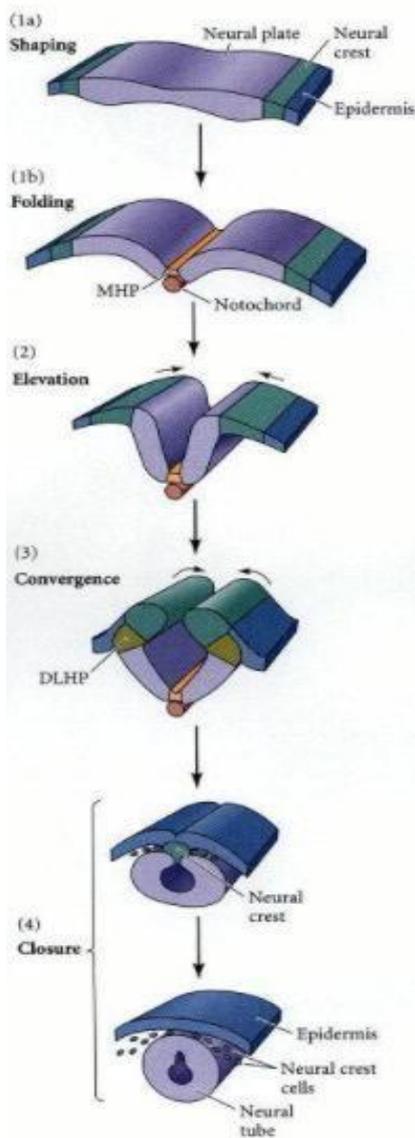


Figura 1. Formación del tubo neural (Gilbert, 2000).

La neurulación es el proceso a través del cual la placa neural se va transformando de una estructura plana o bidimensional a una estructura tubular tridimensional de morfología más compleja. Todo esto se ve condicionado por la existencia de una compleja serie de procesos morfogénéticos en el neuroepitelio, una única capa pseudoestratificada de células precursoras que rodean la cavidad en la que se encuentra encerrado el fluido cerebroespinal (CSFe).

Este proceso se divide en neurulación primaria, prácticamente idéntica entre anfibios, reptiles, aves y mamíferos, y neurulación secundaria. La neurulación primaria comienza con la formación de la placa neural; debido a cambios en la expresión de moléculas de adhesión celular se produce la migración del núcleo de las células al extremo basal, haciendo que estas proliferen y dando lugar a los denominados pliegues neurales. Dichos pliegues se elevan, apareciendo lo que se conoce como surco neural, y se van aproximando hasta que sus respectivos bordes se fusionan y, por consiguiente, también el ectodermo de superficie, permitiendo la formación del tubo neural, el cual se va cerrando en sentido craneal y caudal. Los extremos abiertos del tubo neural es lo que se conoce como neuroporos anterior y posterior, una vez se cierran estos, el tubo neural se separa del ectodermo superficial y se convierte en un cilindro cerrado, iniciándose la neurulación secundaria en el extremo posterior, la cual, al contrario que la primaria, es variable entre especies (Fig. 1) y se forma como una barra compacta que se va a ir cavitando hasta llegar al tubo neural secundario. (Bayona, 2012; Gilbert, 2000; Rodríguez et al., 2015).

Diferenciación del tubo neural

Dentro del desarrollo del tubo neural, el gradiente de crecimiento cefalocaudal es el fenómeno más notorio, experimentándose la encefalización, es decir, una rápida expansión del extremo cefálico embrionario que da lugar a la formación de las vesículas encefálicas, diferenciando y regionalizando el tubo neural. Todo esto es debido gracias a la acción de los genes homeóticos que son responsables de activar cascadas de genes, mediante la codificación de factores de transcripción, que regulan la diferenciación cefalocaudal y la segmentación del sistema nervioso (Rodríguez et al., 2015; Wolpert et al., 2010).

Vesiculación cerebral

Así, la diferenciación y regionalización del tubo neural origina tres vesículas encefálicas: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. El tubo neural, compuesto por las partes anteriormente descritas, adquiere una forma vesicular, conteniendo en su interior el fluido cerebroespinal embrionario (CSFe).

Según va avanzado el desarrollo embrionario, el prosencéfalo se dividirá conformando el diencefalo y el telencefalo, siendo los precursores del tálamo e hipotálamo y los hemisferios cerebrales, respectivamente; por otro lado, el rombencéfalo originará el metencefalo y el mielocéfalo; mientras que, el mesencéfalo no se subdividirá en ninguna vesícula secundaria, formando finalmente el acueducto cerebral (Fig. 2).

Durante la diferenciación morfológica del tubo neural, el neuroepitelio experimenta un proceso de proliferación celular, mediante el que crece y se expande, siendo el CSFe de relevante importancia en esta expansión, debido a la presión hidrostática positiva que crea desde el interior (Gato y Desmond, 2009; Gato et al., 2020).

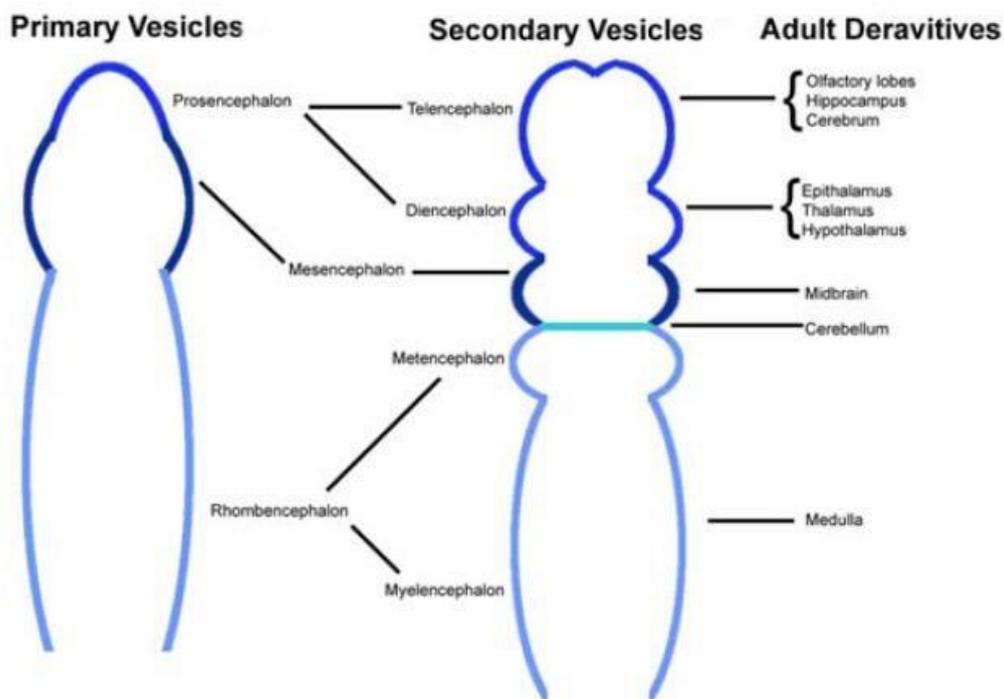


Figura 2. Esquema en el que se muestran las vesículas cerebrales y sus correspondientes derivados en el estado adulto. Se diferencia el rombencéfalo de color azul claro, el mesencéfalo de color azul oscuro y el prosencéfalo de color azul intermedio (Gato y Desmond, 2009).

Neuroepitelio

La parte central de nuestro estudio es esta capa única de células epiteliales (precursores neuroepiteliales) que conforma la estructura del SNC en las etapas embrionarias tempranas.

Las células neuroepiteliales son las que conforman el neuroepitelio, células progenitoras tipo que tienen la capacidad de autorenovación y multipotencialidad. Como ya hemos mencionado al principio, estas células se disponen como un epitelio pseudoestratificado monocapa, con sus núcleos celulares dispuestos a diferentes alturas, dando la sensación de ser un epitelio estratificado; este fenómeno es debido al movimiento nuclear hacia la zona apical de las células a medida que avanza el ciclo celular, lo que nos da un ligera idea de la gran actividad mitótica que tiene lugar en estas células; esto es conocido como *Migración Nuclear Intercinética* (Fig. 3). Este ciclo mitótico se repite de forma constante, hasta llegado un punto en el que la célula precursora comienza el proceso de diferenciación, en sentido tanto neuronal como glial, debido a gradientes de ciertas proteínas como es el caso de Notch1 (Laguesse et al., 2014; Spear y Erickson, 2012).

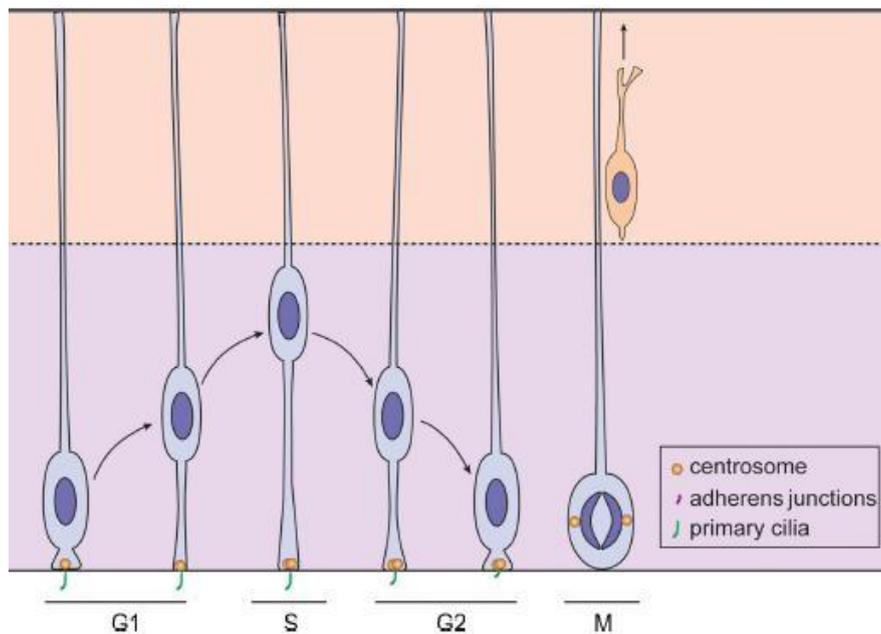


Figura 3. Migración nuclear intercínica. Los núcleos de las células se mueven en la zona apical y basal del neuroepitelio durante el ciclo celular. En la fase S se observa una disposición basal, que va avanzando hacia una posición apical en la fase G2 del ciclo y alcanza totalmente dicha posición en la fase M. Una vez producida la mitosis, el núcleo se va translocando de la posición apical a la basal durante la fase G1, hasta llegar a dicha posición en la fase S (Laguesse et al., 2014).

Factores mitogénicos y neurogénicos

Las células precursoras neuroepiteliales presentan una identidad posicional en el tubo neural dependiente de las interacciones con los morfógenos secretados por los tejidos contiguos y presentes en el CSFe. A lo largo del eje anteroposterior, la identidad posicional de las células es dada por Fgf y Wnt; por otro lado, en el eje dorsoventral, esta se ve delimitada por el antagonismo de BMP/TGF β y Shh.

Estos morfógenos ejercen también la función de mitógenos que estimulan la proliferación de las células sobre las que actúan; un ejemplo es el caso de Wnt, cuya señal desde la placa del techo del tubo neural promueve la autorenovación, deteniéndose la mitosis si se produce un aumento en la distancia con respecto a la fuente de la señal de Wnt (Megason y McMahon, 2002; Panchision y McKay, 2002).

Otro punto a tener en cuenta es el control de la neurogénesis, donde juega un papel muy importante otro morfógeno presente en el CSFe como es el ácido retinoico, el cual, mediante la acción sinérgica con FGF-2 inducen a la neurogénesis primaria en las células neuroepiteliales en el mesencéfalo (Alonso et al., 2011).

Fluido cerebroespinal embrionario (CSFe)

En los últimos años se ha consolidado aún más la importancia que tiene el CSFe en el desarrollo cerebral temprano, sobre todo en el estudio de embriones de pollo y de ratón. El control y la regulación del comportamiento de las células neuroepiteliales depende de la composición del fluido que se encuentra en el interior de las vesículas encefálicas y de la presión positiva ejercida por este en el neuroepitelio. Este CSFe es secretado por las propias células neuroepiteliales, ya que en el estado embrionario temprano no puede ser producido por el plexo coroideo como en el cerebro adulto, debido a su incompleto desarrollo funcional en esta etapa (Gato et al., 2020).

Uno de sus principales papeles es el de ejercer presión positiva en las paredes del neuroepitelio, dando lugar a una fuerza expansiva gracias a la cual se genera en parte a morfogénesis de las paredes neuroepiteliales; esta presión se piensa que es debido a las propiedades osmóticas especiales de los proteoglicanos presentes en el CSFe, causando la retención de agua en las cavidades mesencefálicas y generando, por consiguiente, la susodicha presión cefálica hidrostática del interior (Bueno et al., 2020).

Además de en la morfogénesis, el CSFe también es relevante en la regulación de la supervivencia, proliferación y neurogénesis de las células precursoras del neuroepitelio, siendo las moléculas presentes en este fluido imprescindibles para poder activar estos procesos. Un claro ejemplo es el bloqueo del FGF2 del CSFe que reduce en gran medida la proliferación celular y la diferenciación (Martín et al., 2006). Estas mismas moléculas presentes en el CSFe son capaces de colaborar junto con el istmo (centro organizador cerebral), en el establecimiento del patrón de expresión génico del neuroepitelio (Bueno et al., 2020).

Composición del CSFe

Actualmente se sabe que el CSF presenta 30 veces más concentración de proteína durante el desarrollo embrionario que en el desarrollo adulto, la concentración proteica tras el nacimiento disminuye significativamente alcanzado en muy poco tiempo las cantidades presentes en el CSF adulto. La gran mayoría de la concentración de proteínas, un 50%, durante el desarrollo embrionario temprano, son alfa-fetoproteína y albúmina (Gato et al., 2014).

Esta concentración proteica se ha estudiado en diferentes especies y se ha podido comprobar que hay diferencias filogenéticas que pueden ser relevantes en la maduración del CSF para cada especie. Si se compara la composición proteica del CSFe de pollo y de ratón, se puede observar un patrón común de morfógenos que, aun siendo un factor conservado, presenta bastantes diferencias al comparar el proteoma de ambas especies, lo que nos lleva a pensar que estas diferencias se correlacionan con las consecuentes variaciones filogenéticas en el desarrollo embrionario. Por lo tanto, parece ser que el CSFe está compuesto por moléculas de un alto valor biológico con grandes implicaciones en el desarrollo cerebral (Bueno et al., 2020; Gato et al., 2014).

WNT-1

Wingless (Wnt) es un morfógeno, molécula que, a partir de centros señalizadores, difunde y establece un gradiente de concentración a través de un campo morfogénico. Hay 19 genes Wnt, entre los que se encuentra Wnt1. La vía de Wnt es muy importante en el desarrollo embrionario, teniendo efectos sobre la proliferación, la polaridad, la migración y la especificación del destino celular (Galli et al., 2008; Ille y Sommer, 2005).

Wnt1 se expresa por primera vez en el epitelio de la placa neural en las primeras etapas del desarrollo embrionario, después, en la etapa del tubo neural y es expresado en la línea media dorsal de la médula espinal, el mesencéfalo y parte del diencefalo. Es conocido por jugar un papel importante en el desarrollo de gran cantidad de regiones cerebrales, sobre todo del cerebro medio y del cerebro posterior, y como regulador de la proliferación de precursores neurales (Alrefaei et al., 2020; Navarro-Garberi et al., 2016).

Panhuisen et al. (2004) ya probaron que la inactivación del gen de Wnt1 resulta en la desaparición completa de la región posterior-medial del cerebro, acompañado con una pérdida en la expresión de *En1* y *Fgf8*, genes también involucrados en el desarrollo de estas regiones. Además, los mismos autores también demostraron como la pérdida de expresión de Wnt1 da lugar a un aumento en la proliferación de los precursores neurales. Este control de la proliferación celular en el desarrollo embrionario por parte de Wnt1 es llevado a cabo gracias a la ruta de señalización canónica Wnt/ β -catenina.

Ruta canónica Wnt/ β -catenina

Los receptores de las proteínas Wnt son los llamados *Frizzled* (Fzd), las interacciones Wnt-Fzd, junto a la unión a LRP5/6 (low-density lipoprotein-receptor-related proteins 5 & 6) dan lugar a la activación de rutas intracelulares que provocan la acumulación de la β -catenina, debido a la inhibición de su degradación. Al haber ausencia de la señal de Wnt, la β -catenina se acopla al complejo Axin/GSK3 β (3 β -Glucógeno sintasa quinasa) y se fosforila para su posterior eliminación por la vía de la ubiquitina-proteosoma; así, lo que hace el complejo LRP-Wnt-Fzd es inhibir el complejo Axin/GSK3 β mediante la activación de la proteína *Dishevelled* (DVL) (Fig. 4) (Cheng et al., 2003).

La β -catenina, ahora libre y en gran cantidad en el citoplasma, tal y como se muestra en el esquema de la figura 4, se desplaza hacia el núcleo y se une a factores de transcripción TVF/LEF y al coactivador CBP o al coactivador p300 (CREB binding protein), dando lugar la expresión *downstream* de una serie de genes que, según se ha demostrado, tienen una acción inhibitoria frente a la diferenciación y proliferación celular, respectivamente (Teo y Kahn, 2010).

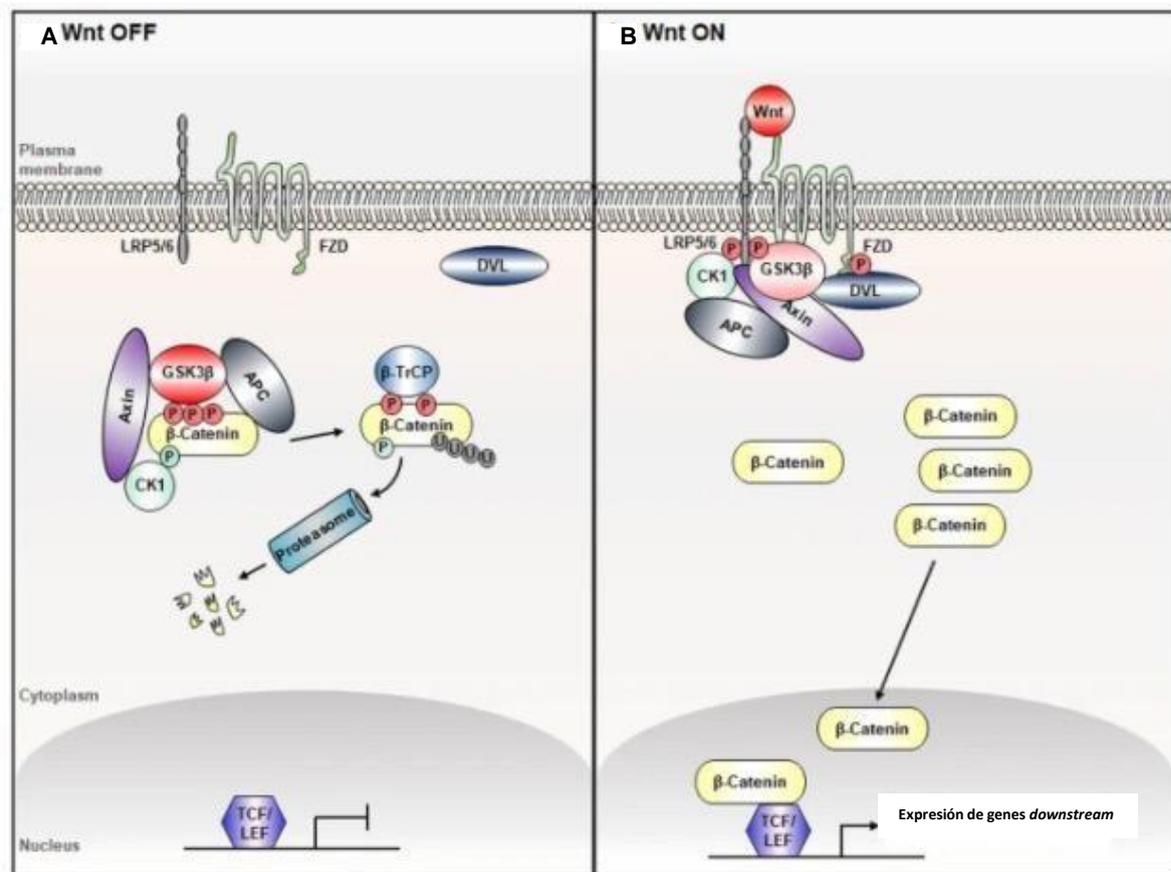


Figura 4. Ruta Wnt/ β -catenina. (A) Wnt no forma el complejo LRP-Wnt-Fzd, por lo que no se activa DVL y no se inhibe el complejo Axin-GSK3 β , el cual fosforila la β -catenina, haciendo que esta se degrade por la vía de la ubiquitina-proteosoma. (B) Wnt forma el complejo LRP-Wnt-Fzd, uniéndose a este la DVL que se activa por fosforilación e inhibe el complejo Axin-GSK3 β , la β -catenina se acumula en el citoplasma y entrar al núcleo, uniéndose al factor de transcripción TCF/LEF y permitiendo la expresión de genes de inhibición de la proliferación y diferenciación celular (Jeong et al., 2018).

Ruta no canónica de Wnt

La ruta no canónica de Wnt se relaciona, generalmente, con importantes movimientos y migraciones celulares implicadas en la extensión anteroposterior del eje corporal.

Esta ruta de señalización se puede diferenciar en 2 ramas: la ruta *Planar Cell Polarity* (PCP) (Fig. 5A) y la ruta Wnt/ Ca^{2+} (Fig. 5B). Las células neuroepiteliales están caracterizadas por una polaridad apico-basal, están polarizadas a lo largo de la capa epitelial del neuroepitelio.

La ruta PCP está relacionada con el control de la orientación estructural de los tejidos epiteliales mediante su acción sobre la asimetría celular; además, actúa sobre la morfología y la migración de las células mesodérmicas en la gastrulación. Al darse la unión de Wnt con el receptor Fzd, se induce la formación del complejo DVL-Daam1 que, a su vez, activa la GTPasa Rho; también se produce la activación de Rac, para lo que no hace falta el complejo DVL-Daam1, solamente la activación de DVL. La señalización resultante de Rho y Rac da lugar a la remodelación de la actina, conectado con el proceso de polarización y de motilidad celular.

La segunda de estas rutas, la vía Wnt/Ca²⁺, se basa en la activación de la fosfolipasa C (PLC) mediante la formación del complejo Wnt-Fzd que activa proteínas G para este cometido, dando lugar a un aumento en los niveles de Ca²⁺ citoplasmáticos, lo que induce a la activación de proteínas dependientes de calcio como la PKC y la CaMK2. Esta última proteína, se ha demostrado que activa una serie de factores de transcripción (NFAT, TAK1 y NLK) que disminuyen la concentración de GMPc intracelular, oponiéndose a la ruta Wnt/β-catenina. Esta ruta está implicada en la regulación de la adhesión celular y del reordenamiento citoesquelético, estando involucrada en el patrón dorsoventral durante el desarrollo embrionario (Teo y Kahn, 2010).

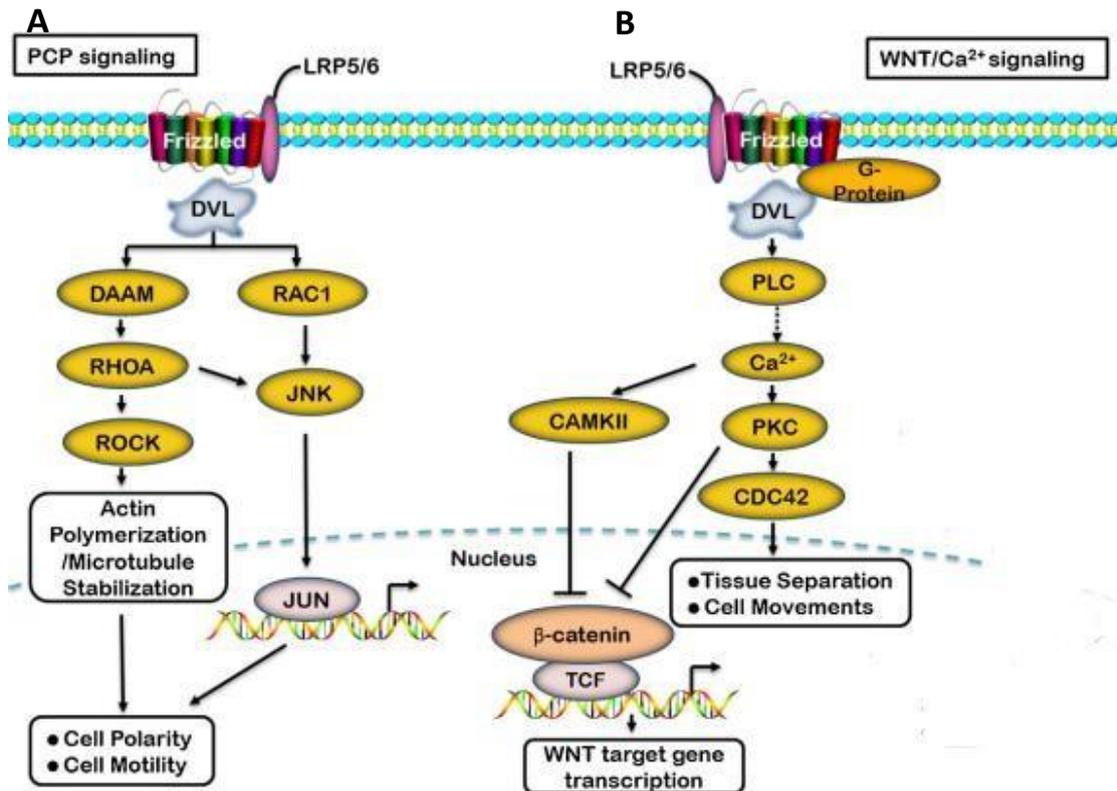


Figura 5. Ruta no canónica de Wnt. (A) Esquema de la ruta PCP (*Planar Cell Polarity*). La unión de Wnt con Fzd activa DVL, esta puede formar complejo con Daam1, induciendo a la activación de la GTPasa Rho, o no formarlo, activando la GTPasa Rac; la activación de estas GTPasas da lugar a una cascada de señalización que finaliza con la polimerización de actina, estrechamente relacionado con la polaridad y movilidad celular. (B) Esquema de la ruta Wnt/Ca²⁺. Se produce la activación de DVL por proteínas G activadas por el complejo Wnt-Fzd, esto activa la PLC que permite la liberación del ión calcio a interior celular, esto activa la PKC y la CaMK2; la CaMK2 resulta en la inhibición de la ruta Wnt/β-catenina, la PKC media el movimiento celular y la separación de tejidos. (Xiao et al., 2017).

Hipótesis

El fluido cerebroespinal embrionario (CSFe) ejerce parte de su acción sobre la regulación de la dinámica celular sobre las células precursoras del neuroepitelio mediado por la proteína Wnt1.

Objetivos específicos

- 1- Preparación de cultivos organotípicos de neuroepitelio embrionario con adición de CSFe (HH23), así como de explantes de neuroepitelio de embriones de pollo en estadio HH19-21, mediante el empleo de técnicas de microcirugía y microaspiración.
- 2- Análisis de la implicación de la proteína Wnt1 contenida en el fluido cerebroespinal embrionario sobre la regulación de la proliferación y diferenciación de las células neuroepiteliales a partir de la inmunosupresión de la misma en los mencionados cultivos organotípicos.
- 3- Estudiar la relación que existe entre la proteína Wnt1 presente en el fluido cerebroespinal embrionario y el control de la identidad posicional de las células neuroepiteliales mediante el inmunobloqueo de la actividad de Wnt1 en los cultivos organotípicos anteriormente descritos.

Se llevarán a cabo marcajes de BrdU e inmunohistoquímica de β 3-tubulina para poder diferenciar si la replicación celular y la neurogénesis en el neuroepitelio embrionario son independientes de la acción de Wnt1.

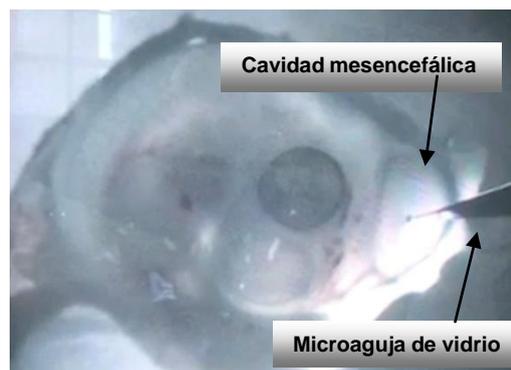
Por último, la inmunodetección de quinasas de adhesión focal y de laminina nos permitirá establecer la existencia algún tipo de conexión entre Wnt1 y el proceso de identidad posicional de las células neuroepiteliales embrionarias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de líquido cerebrospinal (CSF)

Los huevos de pollo embrionados se incubaron a 38°C en una atmósfera humidificada hasta alcanzar el estadio embrionario HH 23 (Hamburguer y Hamilton, 1951). Tras la incubación se extrae el embrión y se retiran las membranas extraembrionarias con el objetivo de poder obtener el CSF, para lo cual se lava el embrión en una solución salina estéril y se coloca en una placa de Petri, donde se aspira el líquido circundante, evitando así la contaminación del CSF.

Una vez colocado en la placa de Petri, empleamos una microaguja de vidrio, de 30 μm de diámetro en la punta, conectada a un microinyector mediante el cual se aspirará el CSF de la cavidad mesencefálica (Fig. 6). Así, se va obteniendo lentamente el CSF con cuidado de no entrar en contacto con la pared neuroepitelial, evitando la contaminación de la muestra con células neuroepiteliales.



Este procedimiento se realizó con un total de 30 embriones de pollo.

Figura 6. Extracción de CSF en embrión de pollo HH19-21.

Cultivos organotípicos del neuroepitelio

Para poder llevar a cabo este tipo de cultivo, en primer lugar, se debe retirar las membranas extraembrionarias del embrión, tal y como se realiza en el procedimiento anterior; además, con una aguja de tungsteno retiramos el ectodermo y el mesodermo que recubren la vesícula mesencefálica. Para terminar con la extracción del neuroepitelio, se corta con unas microtijeras el techo mesencefálico del neuroepitelio.

El tejido obtenido se pasa por un lavado abundante en un medio sin suero y es colocado en pequeños trozos de papeles porosos Millipore (tamaño de poro: 0,8 μm) con la superficie apical en contacto con el papel. Mediante pequeños toques con la aguja de tungsteno, se fija la periferia del tejido al papel millipore, evitando así que se despegue.

Hecho esto, el neuroepitelio fijado al papel millipore es transferido a un cultivo en medio libre de suero (DMEM + F12) suplementado con 1% de ácido ascórbico durante 24 horas a 37,5 °C, 5% de CO₂ y 98% de humedad.

A estos cultivos se les añadieron, además, componentes diferentes para la realización de nuestro experimento: (1) 2 placas de 3 pocillos cada una a las que se incorporó 15 μL del CSF extraído en el apartado anterior, siendo estas el control negativo (Fig. 7A); (2) otras 2 placas de 3 pocillos cada una a las que también se incorporaron 15 μL se introdujo CSF y 2 μL de anticuerpo frente a Wnt1 diluido 1:100 (anticuerpo monoclonal de ratón Millipore®, IgG) (Fig. 7B). Cabe mencionar que la función de este anticuerpo es la de bloquear la actividad biológica de la molécula a la cual reconocen.

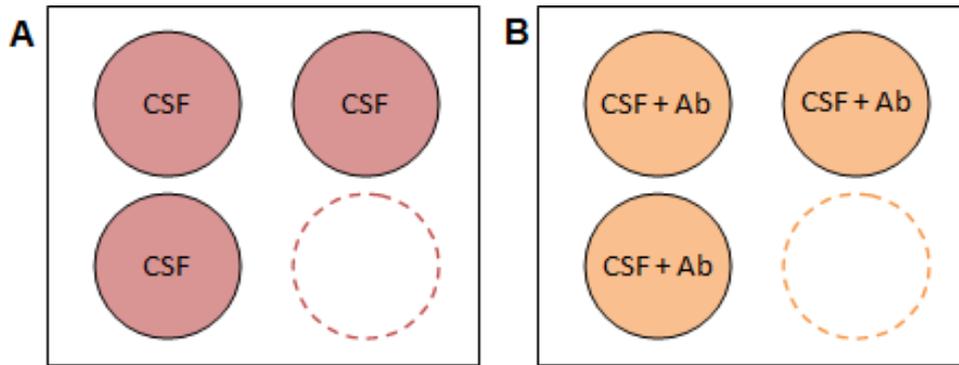


Figura 7. Esquema de las condiciones experimentales por placa de cultivo empleada. (a) Plantilla correspondiente a la condición control; 2 placas de cultivo en las que sólo se ha añadido 15 μ L de CSF; 3 pocillos ocupados y 1 libre. (b) Plantilla correspondiente a la condición experimental; 2 placas de cultivo en las que se ha añadido 15 μ L de CSF y 2 μ L de anticuerpo anti-Wnt1 (1:100); 3 pocillos ocupados y 1 libre.

Immunodetección de BrdU y de β 3-tubulina

Durante el cultivo se añade BrdU al medio de cultivo para favorecer su incorporación al núcleo de las células neuroepiteliales que están en fase de replicación. Así, se añaden 10 μ L de una solución de este componente a concentración 5 μ M y se deja durante 1 hora. La incorporación de la BrdU a los núcleos en división, permite saber, posteriormente, qué células madre del tejido están proliferando. Finalizado el cultivo, los explantes se fijan en Carnoy, se deshidratan en una serie creciente de alcoholes, se pasan por xileno y se incluyen en parafina. Para poder revelar los resultados, se obtienen secciones transversales de 8 μ m que son desparafinadas y pasadas por xilol, para luego ser rehidratadas por pases en alcoholes de concentración decreciente; tras esto se realiza un proceso estándar de inmunocitoquímica anti-BrdU para proceder a su detección en las células. Las muestras fueron incubadas con un anticuerpo primario frente a BrdU (anticuerpo monoclonal de ratón DAKO), diluido 1:100 en buffer Tris, overnight a 4°C en cámara húmeda; para detectar el anticuerpo primario se empleó el sistema avidina-extravidina conjugado con peroxidasa y un anticuerpo secundario frente al primero (anticuerpo de conejo anti-ratón SIGMA, 1:20 en Tris), durante 30 minutos; el revelado se llevó a cabo mediante la utilización de DAB (Diaminobenzidina). Con el objetivo de observar mejor las muestras, se procede después de la tinción en DAB a la inmersión de estas en hematoxilina de Harris (3-4 minutos). Para la observación de los resultados obtenidos realizamos fotos al microscopio óptico de las secciones utilizando el objetivo de x40, procesándose mediante el software Leica Applications Suite V3.3.0, y realizamos el conteo de los núcleos BrdU-positivos. Se obtuvo la media de conteo para cada condición y se determinó la significatividad mediante la prueba de *t* de Student para dos muestras independientes.

En segundo lugar, lo que hicimos fue detectar la diferenciación neuronal de las células neuroepiteliales mediante la expresión de β 3-tubulina. Los explantes mesencefálicos fueron procesados de la misma manera que la descrita en el procedimiento anterior para su correspondiente estudio histológico. Las secciones histológicas, tras su rehidratación, fueron bloqueadas en PBS/BSA al 1% durante 20 minutos y posteriormente se incubaron overnight en cámara húmeda a 4°C con un anticuerpo primario frente a β 3-tubulina (anticuerpo monoclonal de conejo SIGMA, 1:60 en PBS). Después de varios lavados se procede a la incubación con un anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugado con FITC SIGMA, 1:1000 en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Al igual que antes, se realiza una contratinción para facilitar la visualización de los resultados, esta vez empleando

ioduro de propidio (10 μ L, 1mg/mL) durante 30 segundos, lo cual tiñe los núcleos con fluorescencia roja. Una vez hecho esto se montan las muestras en medio acuoso. Para la valoración de los resultados, utilizamos imágenes x40 de las secciones, obtenidas mediante microscopia láser confocal y sacadas a través del programa Leica TCS SPE, en las que realizamos el conteo de las células β 3-tubulina-positivas, es decir, aquellas que muestran el núcleo rodeado de un citoplasma con marcaje positivo. Al igual que en el experimento anterior, se realizó el conteo para cada condición y se determinó la significatividad estadística mediante la prueba de *t* de Student para dos muestras independientes.

Inmunolocalización de Total-FAKs y de laminina

Las kinasas de adhesión focal o FAKs son proteínas kinasas que forman, en condiciones de control, un complejo focal en la zona apical del neuroepitelio y se autofosforilan en respuesta a señales internas. Las lamininas son una familia de glicoproteínas de la matriz extracelular, en condiciones control se expresan en posición basal en el neuroepitelio. Por lo tanto, en estos experimentos lo que pretendemos observar es la diferencia de expresión posicional, si la hubiese, de las FAKs y de la laminina entre la condición control y la condición experimental (bloqueo de Wnt1), como método de valoración del estado de polarización del neuroepitelio.

Para el estudio histológico de los explantes celulares se hizo el mismo procesamiento que en los experimentos anteriores y las secciones.

Para la inmunolocalización de las FAKs, las secciones histológicas se desparafinan, después se rehidratan y por último se bloquean en PBS + leche al 2% durante 20 minutos. Después del bloqueo las muestras fueron tratadas con EDTA 1mM + 500 μ L de Tween-20 durante 20 minutos en microondas. Una vez realizado el tratamiento con EDTA, procedemos a la incubación de las muestras en un anticuerpo primario anti-total FAKs (anticuerpo policlonal en conejo, 1:200 en PBS) en cámara húmeda a 4°C overnight. Tras varios lavados en PBS, se incuban las muestras durante 1 hora en un anticuerpo secundario conjugado (anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón) con Alexa 488. Al igual que en la inmunohistoquímica con β 3-tubulina, utilizamos el ioduro de propidio como método de contrateñimiento, también 10 μ L (1mg/mL) durante 30 segundos. Una vez montadas las muestras, las imágenes de fluorescencia se obtuvieron mediante un microscopio láser confocal, con el objetivo x40, a través del programa Leica TCS SPE.

En segundo lugar, tenemos la inmunolocalización de laminina. Una vez obtenidos los cortes transversales de las muestras de neuroepitelio, se someten a desparafinación y rehidratación. Se lava en abundancia con PBS/Tween-20 (0,05%) y se deja incubando con el anticuerpo primario anti-laminina (anticuerpo policlonal de conejo L9393-SIGMA, 1:20 en PBS/Tween-20 al 0,05%) durante toda la noche en cámara húmeda. Una vez realizada la incubación, se lava de nuevo en PBS/Tween-20 al 0,05% y, esta vez, se incuba con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo con Alexa 488 (1:150 en PBS/Tween-20 al 0,05%) durante 2 horas en cámara húmeda. Realizamos una contrateñimiento en ioduro de propidio (se añaden 10 μ L a la cubeta, 0,5mg/mL) y montamos las muestras. Como antes, obtenemos imágenes de fluorescencia a través de un microscopio láser confocal mediante el objetivo x40.

RESULTADOS

Wnt1, presente en el CSFe, está involucrado en la regulación del comportamiento de las células precursoras del neuroepitelio

Para comprobar la actividad de Wnt1 sobre la dinámica celular en el neuroepitelio embrionario, lo que hicimos fue llevar a cabo 2 experimentos en los que se controlaba la replicación celular y la neurogénesis en ese tejido.

Como ya hemos descrito anteriormente, empleamos 2 condiciones de cultivo diferentes para la elaboración de los cultivos organotípicos de neuroepitelio (Fig. 8). Como control positivo utilizamos neuroepitelio cultivado con CSFe y medio DMEM+F12 (Fig. 8A). Para probar como actúa Wnt1 en la regulación del comportamiento de las células precursoras neuroepiteliales, cultivamos los explantes de neuroepitelio con CSFe y medio DMEM+F12 y añadimos un anticuerpo monoclonal frente a Wnt1 (Fig. 8B).

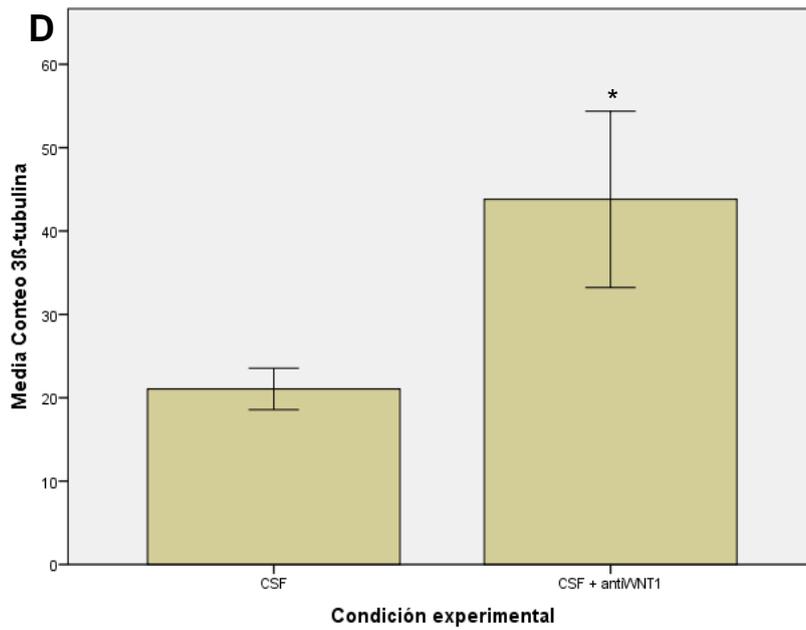
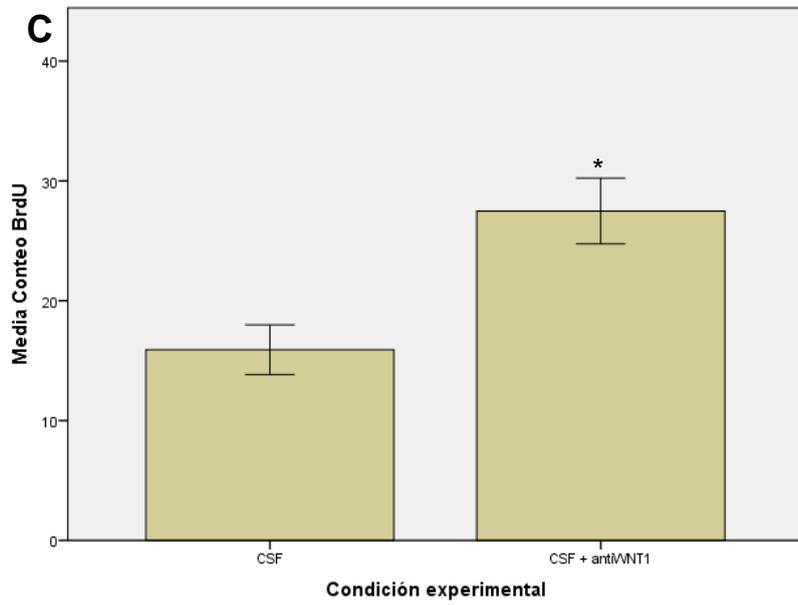
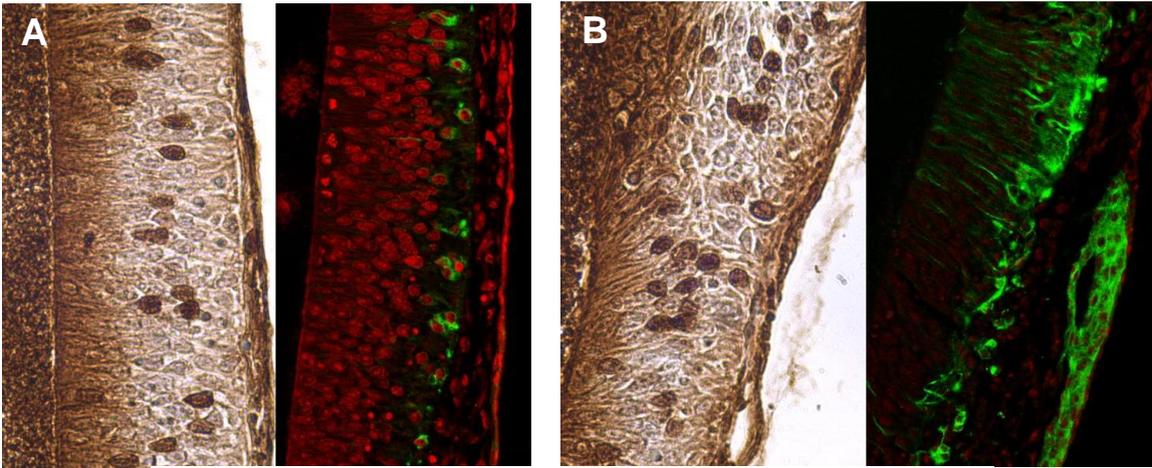
Lo que observamos, tanto en la incorporación de BrdU como en la inmunohistoquímica de β 3-tubulina, fue un aumento de la proliferación y diferenciación celular, en aproximadamente un 75% y 100% respectivamente en comparación al control; cabe destacar que, a pesar del aparente incremento de neuronas recién nacidas en los cultivos tratados con bloqueo de Wnt1, no parece que se ve alterado el patrón espacial de distribución de las mismas. Para comprobar que hay diferencias significativas con respecto al control, realizamos un análisis estadístico *t* de Student para dos muestras independientes, observando que las diferencias observadas en la dinámica celular neuroepitelial si que son significativas (*p* valor < 0,05) (Tablas 1, 2, 3 y 4); esto también se muestra en los gráficos de barras (Fig 8C y D), dónde se observa como en cada una de las condiciones experimentales, tanto en la expresión de BrdU como en la inmunohistoquímica de β 3-tubulina, las barras de error de las medias de conteo no solapan entre sí, un indicativo adicional de diferencia significativa.

El incremento de la replicación y diferenciación neurogénica mediante el bloqueo de la actividad biológica del Wnt1 presente en el CSFe de pollo nos sugiere que, en condiciones normales, presenta un papel relevante en el control de estos procesos como regulador represor.

Figura 8. Análisis de la proliferación y diferenciación de las células neuroepiteliales en cortes transversales de neuroepitelio embrionario de pollo HH19-21. La inmunodetección de BrdU se lleva a cabo mediante la adición de 10 μ L de BrdU 5 μ M al medio de cultivo de las células neuroepiteliales, una vez finaliza el cultivo y se fijan, deshidratan e incluyen las muestras, se obtienen secciones transversales de 8 μ m, las cuales son sometidas a una inmunocitoquímica anti-BrdU para su localización en las células, esta técnica radica en el empleo de dos anticuerpos, uno primario anti-BrdU y otro secundario frente al primero conjugado con peroxidasa, y en la revelación con diaminobenzidina (DAB); además, las muestras fueron teñidas con hematoxilina Harris; esto nos permite visualizar la replicación de las células madre, los núcleos en mitosis se encuentran teñidos de marrón debido al anteriormente mencionado DAB. Por otro lado, la inmunodetección de β 3-tubulina se basa en, tras el cultivo de los explantes y el procesamiento de las secciones histológicas, la incubación de las células neuroepiteliales con un anticuerpo primario anti- β 3-tubulina y posterior incubación con un anticuerpo secundario conjugado con FITC SIGMA frente al primario; se realiza una contratinción en yoduro de propidio (10 μ L, 1mg/mL); así, se nos muestra la diferenciación celular temprana, las células positivas aparecen con el núcleo en rojo (debido a la contratinción) rodeado del citoplasma marcado con fluorescencia (debido a la acción del FITC SIGMA). (A) Explantes cultivados en DMEM+F12 con suplemento de CSFe. (B) Explantes cultivados en DMEM+F12 con suplemento de CSFe e inmunodeprimido con un anticuerpo anti-Wnt1. Cuantificación de la inmunodetección de BrdU (C) y de β 3-tubulina (D), se muestra el error estándar y un asterisco (*) que hace referencia a los valores que presentan diferencia significativa con respecto al control.

DMEM F12 + CSFe (control)

DMEM F12 + CSFe + Ab anti-Wnt1



Barras de error: 95% CI

| | | BrdU | | |
|----------|----|-------------|-------------|----------|
| | | WNT1 | CSF | |
| Wnt1.1-4 | | 25 | 12 | Csf.1-43 |
| | | 35 | 18 | |
| | | 36 | 16 | |
| | | 21 | 24 | |
| | | 23 | 12 | |
| | | 32 | 16 | |
| Wnt1.1-5 | | 30 | 14 | |
| | | 40 | 13 | |
| | | 33 | 16 | |
| | | 51 | 4 | |
| | | 37 | 10 | |
| | | 39 | 22 | |
| Wnt1.2-6 | | 22 | 19 | Csf.1-44 |
| | | 37 | 19 | |
| | | 29 | 18 | |
| | | 31 | 16 | |
| | | 23 | 15 | |
| | | 20 | 8 | |
| Wnt1.2-7 | | 34 | 17 | Csf.2 |
| | | 22 | 25 | Csf.3 |
| | | 24 | 19 | Csf.5-3 |
| | | 21 | 17 | |
| | | 25 | 16 | |
| | | 21 | | |
| | 27 | | | |
| Wnt1.4-7 | | 21 | | |
| | | 19 | | |
| Wnt1.5-4 | | 22 | | |
| Wnt1.5-6 | | 23 | | |
| | | 19 | | |
| | | 22 | | |
| | | 23 | | |
| Wnt1.5-8 | | 19 | | |
| | | 22 | | |
| | | 23 | | |
| | | 20 | | |
| | | 27,5 | 15,9 | |

Tabla 1. Recopilación de datos tras el conteo de células que presentan inclusión de BrdU, es decir, que se han replicado, pudiendo diferenciarlas del resto gracias a su tinción de color marrón debido al DAB, tal y como ya se ha explicado. Cada una de las muestras sobre las que se ha realizado el conteo están nombradas según su condición experimental ("Wnt1" para aquellas tratadas con anticuerpo anti-Wnt1 y "Csf" para las muestras control) y numeradas en base al explante de neuroepitelio y la preparación dentro de ese explante de la que proceden.

Prueba t de Student para dos muestras independientes con respecto a la inmunodetección de BrdU

| | WNT1 | CSF |
|-------------------------------------|-----------------|-------|
| Media | 27,48 | 15,91 |
| Varianza | 59,88 | 23,08 |
| Observaciones | 33 | 23 |
| Varianza agrupada | 44,89 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 54 | |
| Estadístico t | 6,35 | |
| P(T<=t) una cola | 2,26E-08 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1,67 | |
| P(T<=t) dos colas | 4,52E-08 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,005 | |

Tabla 2. Análisis estadístico por medio de la prueba t de Student para dos muestras independientes realizado para observar si hay o no diferencias significativas entre las medias de conteo en la condición control y la condición experimental anti-Wnt1 en la inmunodetección de BrdU y, por consiguiente, en la replicación celular. Se observa que sale un p valor menor de 0'05, lo que nos indica que si hay diferencias significativas.

p<0,05 **Diferencias significativas**

| | | bTubulina | | | | |
|-----------|--|--------------|--------------|----------|--|--|
| | | WNT1 | CSF | | | |
| Wnt1.11-2 | | 90 | 24 | Csf.1-48 | | |
| | | 57 | 24 | | | |
| | | 44 | 21 | | | |
| Wnt1.11-9 | | 69 | 30 | Csf.1-49 | | |
| | | 61 | 13 | | | |
| | | 53 | 15 | | | |
| Wnt1.14 | | 43 | 16 | Csf.2-21 | | |
| | | 40 | 14 | | | |
| | | 29 | 28 | | | |
| | | 28 | 26 | | | |
| | | 34 | 24 | | | |
| Wnt1.14-5 | | 27 | 22 | | | |
| | | 35 | 23 | | | |
| | | 27 | 24 | | | |
| | | 20 | 14 | | | |
| | | | 21 | | | |
| | | | 19 | | | |
| | | | 21 | | | |
| | | 43,80 | 21,06 | | | |

Tabla 3. Recopilación de datos tras el conteo de la inmunodetección de β 3-tubulina, es decir, de células que han empezado a diferenciarse, pudiendo distinguirlas del resto gracias al tono verde fluorescente de su citoplasma, tal y como ya se ha explicado. Cada una de las muestras sobre las que se ha realizado el conteo están nombradas según su condición experimental ("Wnt1" para aquellas tratadas con anticuerpo anti-Wnt1 y "Csf" para las muestras control) y numeradas en base al explante de neuroepitelio y la preparación dentro de ese explante de la que proceden.

Prueba *t* de Student para dos muestras independientes con respecto a la inmunodetección de β 3-tubulina

| | <u>WNT1</u> | <u>CSF</u> |
|---------------------------------------|-----------------------------------|------------|
| Media | 43,80 | 21,05 |
| Varianza | 365,17 | 24,88 |
| Observaciones | 15 | 18 |
| Varianza agrupada | 178,56 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 31 | |
| Estadístico <i>t</i> | 4,87 | |
| P(T<=t) una cola | 1,56E-05 | |
| Valor crítico de <i>t</i> (una cola) | 1,69 | |
| P(T<=t) dos colas | 3,13E-05 | |
| Valor crítico de <i>t</i> (dos colas) | 2,04 | |
| p<0,05 | Diferencias significativas | |

Tabla 4. Análisis estadístico por medio de la prueba *t* de Student para dos muestras independientes realizado para observar si hay o no diferencias significativas entre las medias de conteo en la condición control y la condición experimental anti-Wnt1 en la inmunodetección de β 3-tubulina y, por consiguiente, en la diferenciación celular. Se observa que sale un *p* valor menor de 0'05, lo que nos indica que si hay diferencias significativas.

Implicación de Wnt1 en la polaridad de las células neuroepiteliales

Con la finalidad de comprobar que implicaciones tiene Wnt1 en la regulación de la identidad posicional de las células neuroepiteliales, planteamos 2 experimentos en los cuales analizamos la expresión de las FAKs y la laminina en el neuroepitelio embrionario, teniendo en cuenta que lo normal es que las FAKs estén localizadas en la zona apical del neuroepitelio y la laminina en la zona basal.

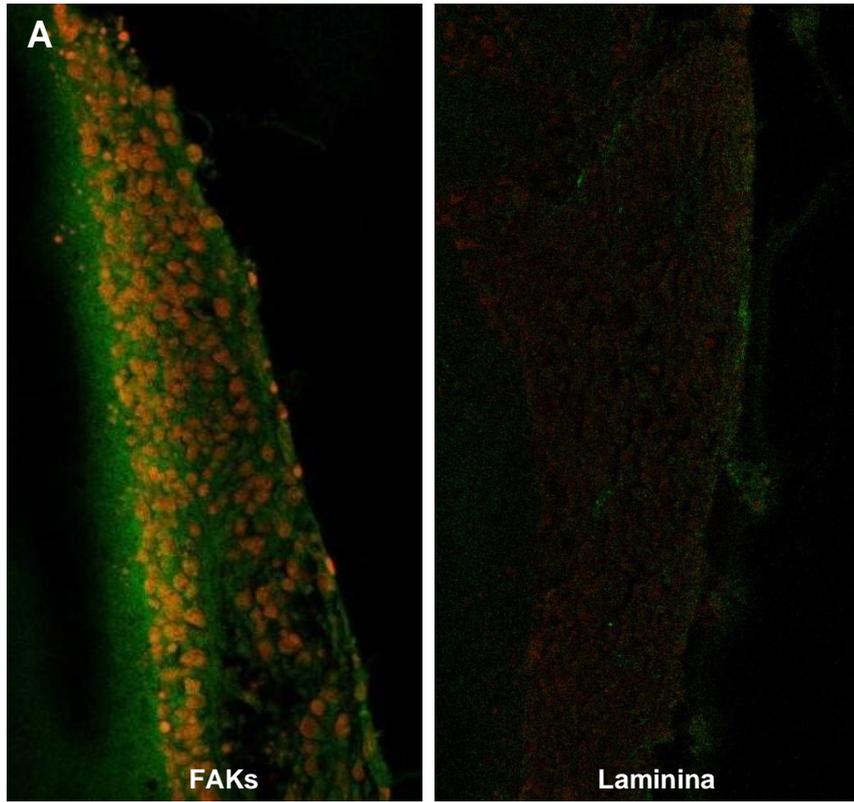
Tal y como hemos especificado, empleamos 2 cultivos organotípicos de neuroepitelio diferentes (Fig. 9): el control positivo con medio DMEM + F12 y suplementado con CSFE (Fig. 9A) y la condición experimental con las mismas características pero que, a mayores, presenta bloqueo de la actividad de Wnt1 por la adición de anticuerpo monoclonal anti-Wnt1 (Fig. 9B).

Nuestros resultados revelan que no hay diferencias en la expresión de laminina en los explantes tratados con anticuerpo antiWnt-1 con respecto al control; en ambas condiciones la laminina se expresa en la zona basal, como es normal.

Si que parece que hay diferencias entre ambas condiciones experimentales en la expresión de las Total-FAKs. Lo normal es que su expresión se localice predominantemente en la zona apical, tal y como vemos en el control. En cambio, observamos cómo, tras el bloqueo de Wnt1, parece haber un cambio en la expresión de las FAKs, localizándose predominantemente en la zona basal y con mucha menor intensidad.

Estos datos nos indican que podría llegar a existir cierta implicación del Wnt1 incluido en el CSFE en la regulación de la identidad posicional de las células neuroepiteliales.

DMEM F12 + CSFe (Control)



DMEM F12 + CSFe + Ab anti-Wnt1

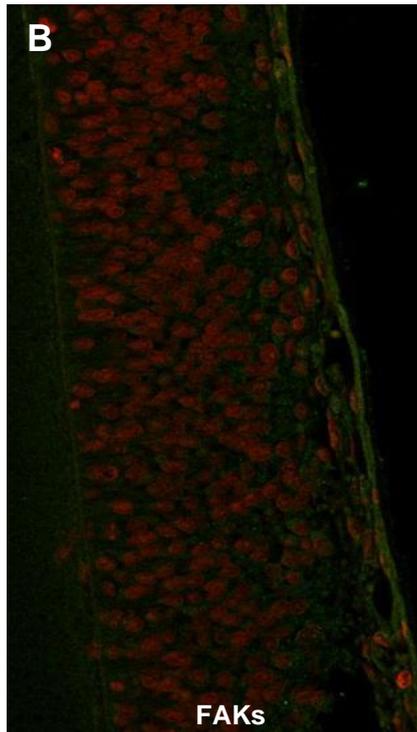




Figura 9. Análisis de la identidad posicional de las células neuroepiteliales en cortes transversales de neuroepitelio embrionario de pollo HH19-21. La inmunodetección de FAKs y laminina nos es útil para localizar su expresión a lo largo del neuroepitelio embrionario, estando relacionada esta expresión con la fluorescencia visualizada al microscopio. (A) Explantes cultivados en DMEM+F12 con suplemento de CSFe; a la izquierda la inmunodetección de FAKs, a la derecha la inmunodetección de laminina. (B) Explantes cultivados en DMEM+F12 con suplemento de CSFe e inmunodeprimido con un anticuerpo anti-Wnt1; a la izquierda la inmunodetección de FAKs, a la derecha la inmunodetección de laminina.

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio, por lo tanto, demuestran lo siguiente:

1. El Wnt1 presente en el CSFe está directamente relacionado con la replicación celular y la neurogénesis en las células neuroepiteliales, actuando represor, moderando ambos procesos
2. La polaridad celular en el neuroepitelio podría depender, al menos en parte, de la actividad del Wnt1 contenido en el CSFe.

Actuación de Wnt1 como controlador de la proliferación y diferenciación celular

Nuestros resultados revelan que la inmunosupresión de la actividad biológica de Wnt1 en el CSFe genera un aumento significativo de la replicación celular y de la neurogénesis en comparación con una actividad biológica normal detectada en los controles. Estos resultados nos sugieren que Wnt1 juega un papel inhibitorio sobre la proliferación celular y la neurogénesis en el neuroepitelio.

Cheng et al (2003) demostraron en cultivos de células endoteliales, de acuerdo con nuestros resultados, que la presencia de Wnt1 inhibía la proliferación celular de dichas células. Se ha observado también un aumento en la actividad mitótica de células precursoras ante la ausencia de Wnt (Malhotra y Kincade, 2009). Teo y Kahn (2010) también corroboran el efecto inhibitorio de Wnt1 sobre la proliferación celular, no obstante, estos últimos autores también mencionan un cambio en la vía canónica Wnt/ β -catenina que produciría el efecto contrario, un aumento en la proliferación celular debido a la señalización con Wnt1. En relación con este último estudio, existen experimentos realizados por diferentes autores en donde la sobreexpresión de Wnt1 da lugar a un aumento de la proliferación celular; Panhuysen et al (2004) observaron que al generar mutantes con sobreexpresión de Wnt1, se aumentaba la proliferación celular en las zonas ventriculares embrionarias, lo que se puede contrastar con lo observado por Kierulf-Vieira et al (2016) donde mediante el uso de SFRP1, un inhibidor de Wnt, consiguen una disminución de la proliferación celular en cultivos con células de glioblastoma.

No se sabe muy bien aún el por qué de estas diferencias, pero una explicación podría ser el hecho de que la señalización de Wnt regule tanto la proliferación como la diferenciación celular, esta teoría muestra que habría un cambio en los coactivadores de la β -catenina que se acumula en el citoplasma y que va al núcleo celular a causa de la actividad de Wnt1, pudiendo ser CBP o p300, cuando la β -catenina se encuentra unida a CBP existiría un aumento de la proliferación celular y no habría diferenciación, en el momento del cambio con p300 se produciría lo contrario, este cambio de CBP a p300 supondría el primer paso para el comienzo de la diferenciación y el cese de la proliferación celular (Rieger et al., 2016; Teo y Kahn, 2010). Se ha sugerido la existencia de un tipo de modelo en el cual, por la vía CBP/ β -catenina, se expresen ciertos tipos de genes que dan lugar a una retroalimentación negativa, produciéndose la inhibición de la misma proliferación generada por esta vía; aun así, el mecanismo que más se ha establecido, por el cual se pueda generar este cambio, es el de la fosforilación de p300 por parte de la PKC activada por la ruta no canónica de Wnt,

haciendo que este coactivador presente una mayor afinidad por la β -catenina, así, como ya se ha visto, el bloqueo de la Ser89, a través de la cual se produce la fosforilación de p300, resulta en una disminución de la afinidad de p300 por la β -catenina (Miyabayashi et al., 2007; Teo y Kahn, 2010). También se han observado diferencias a lo largo del neuroepitelio con respecto a la función de Wnt en la proliferación celular, observándose como al sobreexpresar Wnt se induce la expansión de la zona ventral y no de la zona dorsal del tejido (Ille et al., 2007; Megason y McMahon, 2002), esto nos indica que puede que la respuesta a la señalización de Wnt/ β -catenina sea diferente en función de las células neuroepiteliales afectadas, lo que contrasta con nuestros datos, ya que nuestro estudio se centra en la zona dorsal del cerebro medio.

Parece ser que, aun teniendo un papel importante sobre la proliferación celular, el principal papel de Wnt1 es el de controlar la diferenciación celular. Megason y McMahon (2002) demostraron que la expresión de Wnt1 hacía que se viese reducido el número de neuronas diferenciadas durante el desarrollo embrionario. Especificando aún más dentro de la ruta, se ha observado como la introducción constante de β -catenina reduce en gran medida la diferenciación neuronal, no sólo en células neuroepiteliales, sino también en células precursoras hematopoyéticas (Baba et al., 2005). Pero centrándonos en el desarrollo embrionario, se ha podido comprobar cómo incrementando la ruta canónica de Wnt/ β -catenina, en concreto la unión de esta a su factor de transcripción (TCF) se produce una reducción en la tasa de precursores neurales que son capaces de diferenciarse a neuronas; además, utilizando un antagonista de este factor de transcripción se logró corregir esta deficiencia en la diferenciación (Teo et al., 2005). Nuestros estudios demuestran que el bloqueo de la actividad de Wnt1 en el CSFe incrementa tanto la replicación como la neurogénesis, lo cual es compatible con la teoría de la mitosis terminal en la que ambos procesos son interdependientes y están encadenados.

Wnt1 tiene un papel relevante en la polarización celular

A pesar de que no visualizamos cambios en la disposición de las neuronas recién formadas ni en la expresión de laminina, en nuestro estudio, sí que pudimos observar diferencias en la expresión de las FAKs cuando Wnt1 se encontraba bloqueado, lo que apunta a que esta proteína presenta cierta relevancia en la identidad posicional de las células.

En embriones de *Xenopus* se ha demostrado como, mediante vías no canónicas, Wnt es capaz de inducir la migración celular polarizada durante el proceso de gastrulación, esto es debido a su receptor Rho, presente en la ruta Wnt/PCP; también se ha visto en embriones de pez cebra que las células del mesodermo que presentaban mutaciones en este receptor para Wnt, migraban más despacio que en los controles (Hikasa et al., 2002; Marlow et al., 2002). Esta ruta parece estar implicada en la correcta polarización de la división celular. Mutantes en DLV, proteína clave de esta ruta, dan lugar a una división aleatoria de las células, sin control posicional, generando una incorrecta elongación del tejido dorsal neuroepitelial; no sólo eso, sino que a nivel de pérdida de función del mismo Wnt, también produce alteraciones en la polaridad de mitosis (Gong et al., 2004). Aunque esta no es la única ruta por la que se podría ver afectada la identidad posicional de las células del neuroepitelio.

La ruta no canónica de Wnt calciodependiente también parece ser importante, más específicamente la proteína CaMK2 de la ruta, ya que sobreexpresiones de esta proteína resultan en cambios en el destino celular neuroepitelial dorsal con respecto a una expresión normal de esta (Kühl et al., 2000). En el trabajo de Westfall et al. (2003) la pérdida de función de Wnt provoca hiperdorsalización en el embrión, la ausencia de Wnt produce una disminución del flujo de calcio que, posteriormente, solucionan de forma parcial mediante la adición de CaMK2 en su forma activa. No obstante, nuestros resultados sobre la influencia de Wnt1 en la polarización apico-basal del neuroepitelio son circunstanciales y requieren de estudios complementarios.

CONCLUSIÓN

Mediante este trabajo se ha podido comprobar el papel relevante de Wnt1 en el desarrollo del neuropitelio embrionario principalmente en la proliferación, diferenciación y parcialmente en la polarización celular, observando cómo esta proteína es capaz de regular la dinámica celular neuroepitelial mediante diferentes vías, las cuales, a su vez, presentan gran cantidad de ramas que incluso difieren entre ellas.

En nuestro caso Wnt1 ha resultado ser un inhibidor de la proliferación, pero otros autores aseguran que Wnt actúa promoviendo la proliferación celular; parece ser que todo depende de la zona en la que actúe esta proteína y de la ruta de señalización que se lleve a cabo. Para este estudio, lo que realizamos fue un bloqueo de Wnt1 mediante inmunosupresión, aunque la mayoría de autores realizan una inhibición de la ruta de señalización o, directamente, miden el papel de Wnt por sobreexpresión de este; es posible que al bloquear Wnt1, no se active ninguna de las rutas antes mencionadas y que, por lo tanto, no haya regulación de ningún tipo, produciéndose por ende tanto el aumento de la proliferación, ya que no se da la ruta p300/ β -catenina, como el de la diferenciación; tampoco se forma el complejo CBP/ β -catenina, directamente Wnt-1 no se une a sus receptores y la β -catenina se degrada en el citoplasma.

La polarización celular parece ser parcialmente dependiente de Wnt1, ya sea por la ruta PCP o por la ruta Wnt/ Ca^{2+} . La ruta no canónica Wnt/ Ca^{2+} , aparte de ser importante en el cambio de coactivador que se une a la β -catenina mediante la activación de PKC, parece ser fundamental también en la polaridad celular, al activarse CaMK2, por lo que podría ser un futuro objetivo de investigación importante para conocer mejor el papel de Wnt1 en el desarrollo embrionario.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso MI, Martín C, Carnicero E, Bueno D, Gato A. "Cerebrospinal Fluid Control of Neurogenesis Induced by Retinoic Acid During Early Brain Development". *Developmental Dynamics*. 2011; 240: 1650-1659.
- Alrefaei AF, Münsterberg AE, Wheeler GN. "FZD10 regulates cell proliferation and mediates Wnt1 induced neurogenesis in the developing spinal cord". *PLoS ONE*. 2020; 15(6): e0219721.
- Baba Y, Garrett KP, Kincade PW. "Constitutively active β -catenin confers multi-lineage differentiation potential on lymphoid and myeloid progenitors". *Immunity*. 2005; 23(6): 599-609.
- Bayona F. "Desarrollo embrionario del sistema nervioso central y órganos de los sentidos: revisión. / Embryonic Central Nervous System and Sense Organ Development: Review" *Universitas Odontologia*. 2012; 31(66): 125-132.
- Bueno D, Parvas M, Nabiuni M, Miyan J. "Embryonic cerebrospinal fluid formation and regulation". *Semin Cell Dev Biol*. 2020; 102: 3-12.
- Cheng CW, Smith SK, Charnock-Jones S. "Wnt-1 signaling inhibits human umbilical vein endothelial cell proliferation and alters cell morphology". *Experimental Cell Research*. 2003; 291: 415-425.
- Galli L, Santana F, Apollon C, Szabo LA, Ngo K, Burrus LW. "Direct visualization of the Wntless-induced redistribution of WNT1 in developing chick embryos". *Developmental Biology*. 2018; 439(2): 53-64.
- Gato A, Alonso MI, Lamus F, Miyan J. "Neurogenesis: A process ontogenically linked to brain cavities and their content, CSF" *Semin Cell Dev Biol*. 2020; 102: 21-27.
- Gato A, Alonso MI, Martín C, Carnicero E, Moro JA, De la Mano A, Fernández JMF, Lamus F, Desmond ME. "Embryonic cerebrospinal fluid in brain development: neural progenitor control". *Croat Med J*. 2014; 55(4): 299-305.
- Gato A, Desmond ME. "Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histiogenesis". *Developmental Biology*. 2009; 327: 263-272.
- Gilbert FS. *Developmental Biology, 6th edition*. Sunderland: Sinauer Associates; 2000.
- Gong Y, Mo C, Fraser SE. "Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation" *Nature*. 2004; 430 (7000): 689-693.
- Hamburguer V, Hamilton HL. "A series of normal stages in the development of the chick embryo" *Journal of Morphology*. 1951; 88(1): 49-92.
- Hikasa H, Shibata M, Hiratani I, Taira M. "The Xenopus receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signalling" *Development*. 2002; 129(22): 5227-39.
- Ille F, Atanasoski S, Falk S, Ittner LM, Märki D, Büchmann-Moller S, Wurdak H, Suter U, Taketo MM, Sommer L. "Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord". *Developmental Biology*. 2007; 304: 394-408.
- Ille F, Sommer L. "Wnt signaling: multiple functions in neural development" *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005; 62: 1100-1108.
- Jeong WJ, Ro EJ, Choi KY. "Interaction between Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of β -catenin and RAS by targeting the Wnt/ β -catenin pathway". *NPJ Precis Oncol*. 2018; 2(1): 5.
- Kierulf-Vieira KS, Sandberg CJ, Grieg Z, Günther CC, Langmoen IA, Vik-Mo EO. "Wnt inhibition is dysregulated in gliomas and its re-establishment inhibits proliferation and tumor sphere formation". *Experimental Cell Research*. 2016; 340: 53-61.

- Kühl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT. "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*". *J Biol Chem*. 2000; 275: 12701-12711.
- Laguesse S, Peyre E, Nguyen L. "Progenitor genealogy in the developing cerebral cortex". *Cell Tissue Res*. 2015; 359(1): 17-32.
- Malhotra S, Kincade PW. "Wnt-Related Molecules and Signaling Pathway Equilibrium in Hematopoiesis". *Cell Stem Cell*. 2009; 4(1): 27-36
- Marlow F, Topczewski J, Sepich D, Solnica-Krezel L. "Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements". *Curr. Biol*. 2002; 12: 876-884.
- Megason SG, McMahon AP. "A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS". *Development*. 2002; 129(9): 2087-2098.
- Miyabayashi T, Teo JL, Yamamoto M, McMillan M, Nguyen C, Kahn M. "Wnt/ β -catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(13): 5668-5673.
- Navarro-Garberí M, Bueno C, Martínez S. "Wnt1 signal determines the patterning of the diencephalic dorso-ventral axis". *Brain Struct Funct*. 2016; 221(7): 3693-3708.
- Panchision DM, McKay RDG. "The control of neural stem cells by morphogenic signals". *Curr Opin Genet Dev*. 2002; 12(4): 478-487.
- Panhuysen M, Vogt Weisenhorn DM, Blanquet V, Brodski C, Heinzmann U, Beisker W, Wurst W. "Effects of Wnt1 signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region". *MCN*. 2004; 26(1): 101-111.
- Rieger ME, Zhou B, Solomon N, Sunohara M, Li C, Nguyen C, Liu Y, Pan J, Minoo P, Crandall ED, Brody SL, Kahn M, Borok Z. "p300/ β -catenin Interactions Regulate Adult Progenitor Cell Differentiation Downstream of Wnt5a/Protein Kinase C (PKC)". *J Biol Chem*. 2016; 291(12): 6569-6582.
- Rodríguez A, Domínguez S, Cantín M, Rojas M. "Embriología del Sistema Nervioso". *Int. J. Med. Surg. Sci*. 2015; 2(1): 385-400.
- Spear PC, Erickson CA. "Apical movement during Interkinetic Nuclear Migration is a Two-Step Process". *Dev Biol*. 2012; 370(1): 33-41.
- Teo JL, Kahn M. "The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators". *Adv Drug Deliv Rev*. 2010; 62(12): 1149-1155.
- Teo JL, Ma H, Nguyen C, Lam C, Kahn M. "Specific inhibition of CBP/ β -catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by a presenilin-1 mutation". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2005; 102(34): 12171-12176.
- Westfall TA, Brimeyer R, Twedt J, Gladon J, Olberding A, Furutani-Seiki M, Slusarski DC. "Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/ β -catenin activity" *J. Cell. Bio*. 2003; 162: 889-898.
- Wolpert L, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E, Robertson E, Smith J. *Principles of Development, 4th edition*. Oxford: Oxford University Press; 2010.
- Xiao Q, Chen Z, Jin X, Mao R, Chen Z. "The many postures of non canonical Wnt signaling in development and diseases". *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 93: 359-369.