



Universidad de Valladolid

Departamento de Anatomía y Radiología

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Investigación Biomédica

Estudio de la influencia del Shh en la polarización
apico- basal del neuroepitelio cerebral.

Autor: Mónica Macías Panedas

Tutor/es: M^a Isabel Alonso Revuelta y Ángel Gato Casado

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
DESARROLLO TEMPRANO DEL CEREBRO EMBRIONARIO: TUBO NEURAL, VESICULACIÓN.	4
COMPOSICIÓN DEL TUBO NEURAL.....	5
<i>Pared neuroepitelial</i>	5
<i>E-CSF</i>	6
PROTEÍNA SONIC HEDGEHOG, SHH	7
<i>Vía de señalización</i>	8
OBJETIVOS.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
EXTRACCIÓN CSF-E	11
CULTIVO DE NEUROEPITELIO (CNE) DE EMBRIONES DE POLLO	11
TINCIÓN CON HEMATOXILINA/EOSINA	13
TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS	14
<i>Bromodeoxiuridina (BdrU)</i>	14
<i>β-tubulina</i>	15
<i>Laminina</i>	15
<i>Total-FAKs</i>	16
VISUALIZACIÓN	16
RESULTADOS	17
DIVISIÓN CELULAR	17
DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	19
POLARIZACIÓN APICO-BASAL.....	21
<i>Inmunocitoquímica anti-laminina</i>	21
<i>Inmunocitoquímica anti-total-FAKs</i>	22
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIÓN	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26

RESUMEN

El desarrollo temprano del cerebro embrionario se basa en la formación del tubo neural (TN) cuyo extremo cefálico crece diferencialmente, generando diferentes cavidades que conformarán las regiones básicas del cerebro adulto. Este TN está formado por una pared neuroepitelial (precursores neurales) que envuelve una cavidad que contiene el fluido cerebro-espinal embrionario (CSF-E). En diversos estudios se ha determinado la dependencia de las diferentes moléculas que componen el CSF-E, en el normal desarrollo del sistema nervioso.

En esta etapa del desarrollo la regulación de la polarización en todos los ejes del espacio, juega un papel clave en el desarrollo del cerebro embrionario. Esta regulación de la polaridad depende en gran medida de la existencia de centros polarizadores en la propia pared neuroepitelial entre los que destaca el istmo mesencéfalo-rombencefálico, que ejerce su acción mediante la creación de gradientes de moléculas solubles, como la proteína Sonic Hedgehog (su presencia en el CSF ha sido demostrada experimentalmente por este laboratorio, mediante Western Blot).

En este trabajo se pretende determinar, mediante cultivos organotípicos in vitro de explantes mesencefálicos de neuroepitelio y su correspondiente valoración inmunocitoquímica, el comportamiento de los precursores neuroepiteliales, en cuanto a replicación y neurogénesis (dos procesos que muestran una clara polarización apico-basal), tratando de determinar en qué medida el Shh influye en la regulación y localización de los mismos.

ABSTRACT

Early embryonic brain development is based on the formation of the neural tube (NT) whose cephalic end grows differentially, generating different cavities that will form the basic regions of the adult brain. This NT is formed by a neuroepithelial wall (neural precursors) that surrounds a cavity containing the embryonic cerebrospinal fluid (E-CSF). Several studies have determined the dependence of the different molecules that compose the CSF-E on the normal development of the nervous system.

At this stage of development, the regulation of polarization in all axes of space plays a key role in the development of the embryonic brain. This polarization regulation depends to a great extent on the existence of polarizing centers in the neuroepithelial wall itself, among which the mesencephalic-rombencephalic isthmus stands out, which exerts its action through the creation of gradients of soluble molecules, such as the Sonic Hedgehog protein (its presence in the CSF has been demonstrated experimentally by this laboratory, by means of Western Blot).

In this work we intend to determine, by means of in vitro organotypic cultures of mesencephalic neuroepithelial explants and their corresponding immunohistochemical assessment, the behavior of neuroepithelial precursors, in terms of replication and neurogenesis (two processes that show a clear apico-basal polarization), trying to determine to what extent Shh influences their regulation and localization.

INTRODUCCIÓN

Desarrollo temprano del cerebro embrionario: Tubo neural, vesiculación.

El desarrollo del sistema nervioso, tras la gastrulación, es posible gracias a una serie de procesos morfogénéticos producidos de forma más o menos secuencial en el tiempo, que se inician con la formación de la placa neural (inicio de la neurulación), seguido de la formación del tubo neural que se completa al cerrarse los neuroporos craneal y caudal (*figura 1A*). A continuación, las células de las crestas neurales migran para dar origen a los diversos constituyentes del sistema nervioso periférico y se invaginan las diferentes placodas para formar los ganglios sensitivos de la cabeza. Simultáneamente, se desarrollan las vesículas encefálicas, de las cuales van a derivar todos los constituyentes del encéfalo (*figura 1B*). En el periodo fetal, el sistema nervioso incrementa su tamaño de manera significativa y gracias a diversos mecanismos de proliferación celular, migración celular; agregaciones celulares, diferenciación celular (tanto neuronal, como glial), establecimiento de conexiones, apoptosis y desarrollo progresivo de patrones, consolida su organización funcional definitiva, lo cual culminará con la formación de un sistema nervioso completo.

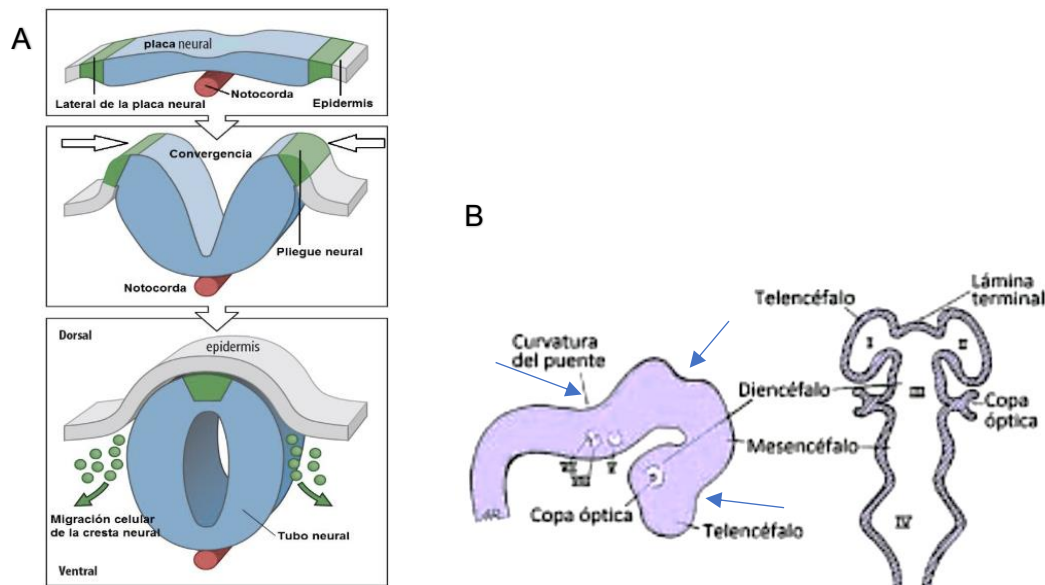


Figura 1- (A) Neurulación primaria, formación del tubo neural y posterior migración de las células de la cresta neural, (B) Vesiculación del tubo neural¹

Las alteraciones de los mecanismos implicados en estos procesos iniciales del desarrollo del SNC conducen a la aparición de malformaciones congénitas, conocidas como defectos del cierre del tubo neural (DNT). Con manifestaciones y tipos de lesión muy diversas, dependiendo del lugar en que se produzca, siendo los más graves los defectos craneales, pues en la mayoría de ellos, está implicado el tejido neural, como son la anencefalia o el encefalocele. En cambio, entre los defectos del cierre caudales,

¹ Rodríguez, A. R.; Domínguez, S.; Cantín, M. & Rojas, M. (2015). *Embriología del Sistema Nervioso*. Int. J. Med. Surg. Sci., 2(1):385-400.

Dra. Paloma Rohlfs Domínguez (2016). *Desarrollo del sistema nervioso humano. Perspectiva general del estadio prenatal hasta 2013*. Revista Internacional de Psicología Vol.15 No.1, ISSN 1818-1023

el más común es la llamada espina bífida oculta, presente hasta en un sexto de la población general, cursando en la mayoría de casos de manera asintomática.

Composición del Tubo neural

Pared neuroepitelial

Como ya hemos indicado, inicialmente, el cerebro embrionario está formado por un tubo formado por una monocapa de neuroepitelio que presenta una cavidad central llena de líquido, el fluido cerebroespinal embrionario (CSF-E). Este neuroepitelio tiene un elevado índice de replicación, donde la fase S ocurre cuando el núcleo está próximo a la región basal. A continuación, la mitosis ocurre hacia el polo luminal y después, regresará de nuevo a posiciones basales para dividirse. Este tránsito nuclear es conocido como “migración nuclear intercinética”, generando que estos núcleos se encuentren a distintos niveles del neuroepitelio, dando la imagen de un epitelio pseudoestratificado (*figura 2A*).

Tras un número determinado de ciclos mitóticos, la célula sufre una diferenciación (por división asimétrica), bien hacia células de estirpe neuronal (*figura 2B*), o bien hacia células gliales y, al mismo tiempo, un proceso de migración. Estas oleadas migratorias terminan formando núcleos de materia gris o la capa cortical del encéfalo.

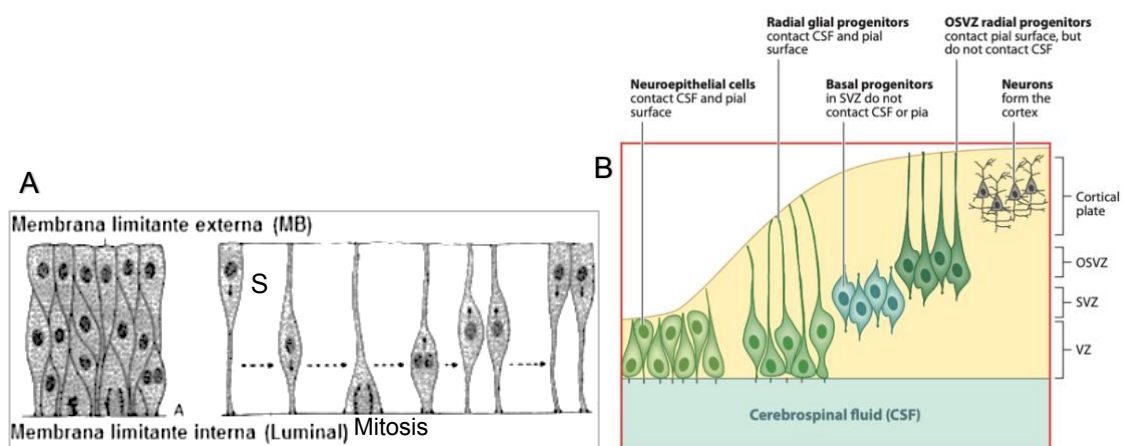


Figura 2- (A) Migración nuclear intercinética durante el ciclo celular, causando la apariencia de un epitelio pseudoestratificado, (B) Diferenciación de los precursores neuronales. ²

Esta neurogénesis tiene lugar mediante la diferenciación de las células precursoras neurales, gracias a la presencia en este líquido (CSF-E) de señales neurogénicas capaces de controlar el comportamiento de estas células, induciendo la proliferación de los precursores y la diferenciación neuronal. Cada periodo vital en la interacción CSF-Neurogénesis³ (embrionario, fetal y adulto) tiene características específicas en cuanto a la síntesis y composición del CSF, y a la localización, extensión y actividad neurogénica del nicho neurogénico. Sin embargo, la interacción del CSF con el nicho neurogénico es un factor común en todas.

² Maria K. Lehtinen and Christopher A. Walsh (2011). *Neurogenesis at the Brain–Cerebrospinal Fluid Interface*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27:653–79.

³Gato A, Alonso M.I., Lamus F. and Miyan J. (2020). *Neurogenesis: A process ontogenically linked to brain cavities and their T content, CSF*. Development Biology, 102:21-27.

Por lo tanto, el crecimiento, la morfogénesis y la histogénesis del cerebro embrionario ocurre gracias a la actuación de forma integrada tanto del neuroepitelio como del E-CSF. El fluido, aparte de contener los factores ya comentados, genera presión sobre el neuroepitelio, promoviendo su rápida expansión, lo cual juega también un papel clave en el desarrollo y morfogénesis temprana del cerebro. En conclusión, el neuroepitelio crece rápidamente por proliferación celular y, al mismo tiempo, el ventrículo se expande debido al gradiente osmótico que se genera gracias al transporte activo de Na^+ a través del neuroepitelio y la secreción (o transporte) de proteínas y proteoglicanos, llevando a la acumulación de fluido dentro de una cavidad cerebral sellada (*figura 3*).

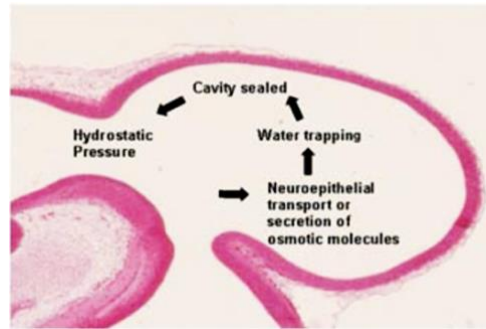


Figura 3-Esquema sobre el efecto osmótico generado por el E-CSF en el mesencéfalo⁴

E-CSF

La composición del E-CSF es sumamente compleja, y a pesar del actual desconocimiento de la presencia y función de muchas de las moléculas presentes en él, se conocen muchos factores contenidos en el fluido que promueven la supervivencia, la proliferación y la neurogénesis de las células neuroepiteliales⁵. Estos factores son secretados por el propio neuroepitelio, pero también pueden provenir de otras estructuras cercanas y generalmente ejercen su función a través de la activación de receptores específicos para determinadas moléculas.

La formación de las neuronas mesencefálicas y el destino de las células a lo largo del eje dorsoventral y anteroposterior del tubo neural, está dirigida por señales difusas procedentes de la notocorda, la placa del suelo y el organizador ístmico⁶. Se considera que la proteína Sonic Hedgehog, **Shh** (secretado por la notocorda y por la placa del suelo), y el factor de crecimiento de fibroblastos 2, **Fgf2** (secretado por el istmo), son moléculas clave implicadas en el desarrollo de las neuronas del cerebro. Además, se han identificado otras moléculas necesarias para la diferenciación de estas células, como miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta, **TGF- β** . Estas moléculas solubles en el CSF-E ejercen su función mediante la creación de gradientes, algunos ejemplos de las más estudiadas, aparte de las mencionadas, son Wnt-1, Fgf-8 y el ácido retinoico.

⁴ A. Gato and Mary E. Desmond (2009). *Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent*. Development Biology, 327:263-272.

⁵ A. Gato, J.A. Moro, M.I. Alonso, D. Bueno, A. le la Mano, and C. Martin (2005). Embryonic Cerebrospinal Fluid Regulates Neuroepithelial Survival, Proliferation, and Neurogenesis in Chick Embryos. Wiley InterScience, 284A:475-484.

⁶ Eleni Roussa and Kerstin Kriegelstein (2004). Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: focus on SHH, FGF8, and TGF- β . Cell Tissue Re., 318(1):23-33.

Gracias al estudio de cultivos de células neuroepiteliales en explantes mesencefálicos, se sabe que el neuroepitelio in vitro (solo con medio, en ausencia de E-CSF) no es capaz de promover las funciones que hemos destacado antes. Esta información muestra que las moléculas presentes en el E-CSF están involucradas en la regulación de la actuación de las células neuroepiteliales, apoyando la hipótesis de que este fluido juega un papel clave en el desarrollo embrionario del SNC.

Teniendo en cuenta todo lo mencionado, el estudio de esta interacción CSF-neuroepitelio, nos permitirá una mayor comprensión de la formación y el reemplazo de las neuronas, así como su papel potencial para el desarrollo de terapias de enfermedades neurodegenerativas o lesiones cerebrales.

Proteína Sonic hedgehog, Shh

Los miembros de la familia Hedgehog son mediadores clave de muchos procesos fundamentales en el desarrollo embrionario, actuando como proteínas de señalización intercelular. Sus actividades son fundamentales para el crecimiento, la formación de patrones y la morfogénesis de muchas regiones diferentes.

Concretamente, Sonic Hedgehog es la molécula responsable de la inducción y el mantenimiento de las estructuras del tubo neural ventral. Como ya hemos indicado, Shh se produce primero por la notocorda, induciendo la formación del tubo neural y posteriormente su expresión es inducida en la placa neural. Gracias a diversos experimentos de ganancia y pérdida de función se ha demostrado que la señalización medial del tubo neural está regulada por esta proteína. De hecho, el análisis de ratones KO para el gen del Shh ha demostrado que es esencial en la especificación de la placa neural medial y el patrón neural longitudinal de todo el SNC.⁷

Para explicar como el Shh puede influir en esta polarizador dorso-ventral del esbozo neural, debemos introducir la función de los genes Pax. Los miembros de la familia de genes de la caja emparejada (Pax) se expresan en regiones discretas del sistema nervioso central en desarrollo, lo que sugiere un papel en el patrón neural. La inducción de la formación del tubo neural se debe, entre otras cosas, a la inhibición de la expresión de Pax-3 y Pax-7 permitiendo su plegamiento. Además, cuando el tubo neural se cierra, los transcritos de los genes Pax-3 y Pax-6, se restringen dorsoventralmente en el neuroepitelio mitótico indiferenciado. Los rápidos cambios en la expresión génica de Pax que se producen en las células progenitoras neurales sugieren que estos cambios son un efecto temprano generado desde la notocorda en el establecimiento del patrón dorso-ventral de la médula espinal.⁸

⁷ C. Vieira, A. Pombero, R. García-Lopez, L. Gimeno, D. Echevarria and S. Martínez (2010). *Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers*. Int. J. Dev. Biol. 54: 7-20.

⁸M. D. Goulding, A. Lumsden and P. Gruss (1993). *Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord*. Development, 117(3):1001-16.

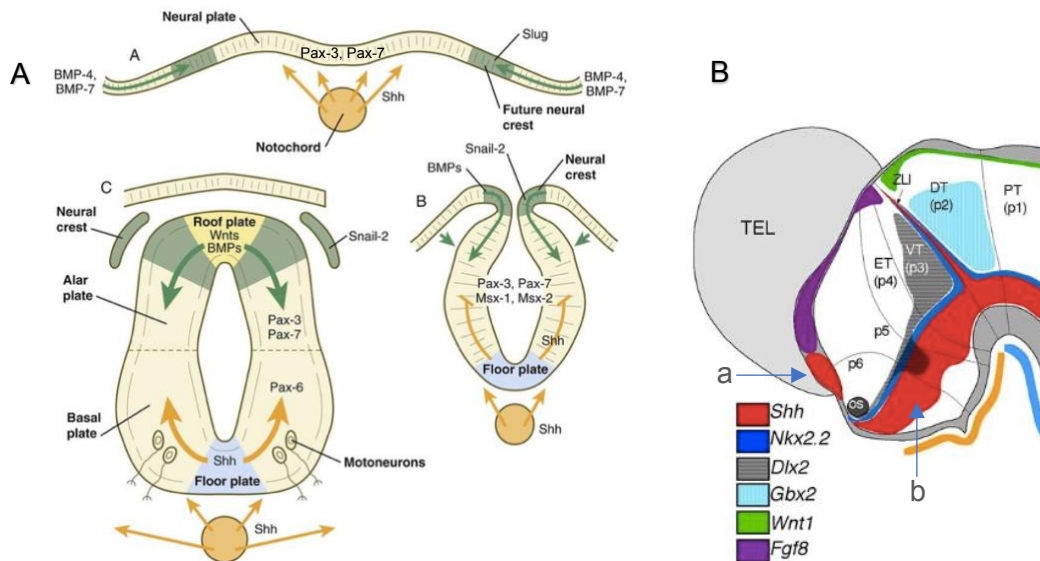


Figura 4- (A) Actuación del Shh sobre la inhibición de la expresión del gen Pax, desencadenando en la formación del TN, (B) Localización de la expresión de diversas proteínas en el TN, (a)Cresta neural anterior, (b) Zona limitante.⁹

El Shh es uno de los factores secretados por la notocorda que influye en la inhibición de los genes Pax-3 y Pax-7 en la placa neural. Esto genera la ventralización de la placa neural, formando la placa del suelo del suelo que a su vez expresa Shh. Mientras tanto, en los pliegues neurales, se expresan los genes BMP que permiten el cierre del TN y la formación de la placa del techo (figura 4A).

Por otro parte, la función del Shh no se restringe a la formación del TN. Como podemos ver en la figura 4B, en el desarrollo cerebral Shh se expresa en la cresta neural anterior, (junto con FGF-8), organizando la formación del telencéfalo, partes del diencefalo, el área olfatoria y la hipófisis. También se expresará en la zona limitante, estableciendo el límite entre el tálamo dorsal y ventral.

Vía de señalización

El Shh es un morfógeno, cuya vía de señalización desempeña funciones esenciales durante el desarrollo embrionario, contribuyendo a la proliferación y diferenciación celular, pero también en la regulación de algunas células madre en el organismo adulto.

La proteína Shh se escinde proteolíticamente, generando una proteína N-terminal que regula la señalización y una proteína C-terminal que posee actividad proteasa. La N-Shh además sufre la adición de un cofactor para aumentar su efectividad, la molécula esterol delta 7-reductasa. En la superficie celular, generalmente hay dos receptores; uno de mucha afinidad y otro de menor afinidad, el receptor de alta afinidad es patched (Ptc), receptor acoplado a proteínas G. Tras la activación de la cascada de señalización, en el interior celular, los factores de transcripción con dedos de zinc, proteínas de la familia Ci/Gli, son los encargados del último paso conocido de la vía de transducción de señales del Shh (figura 5).

⁹ Bruce M. Carlson, *Human Embryology & Developmental Biology*, 4th edition. Mosby, Elsevier, 2009.

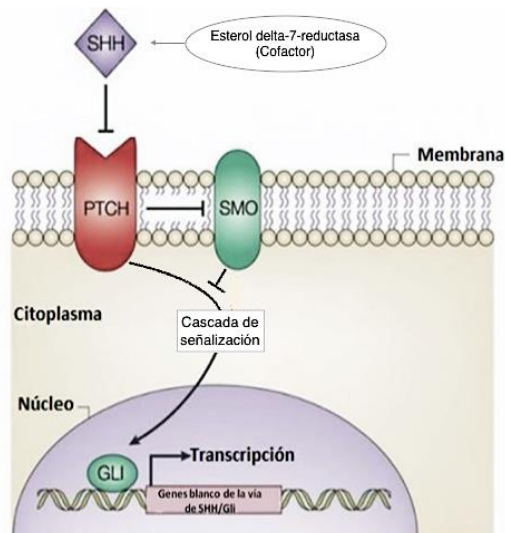


Figura 5- Vía de señalización de la proteína Shh¹⁰

Un efecto combinado de la activación de Gli2 y la represión de Gli3 por Shh en diferentes áreas del tubo neural determina la actividad regional de la señal Shh en el patrón neural y el crecimiento. Además, se han identificado diversos reguladores de la vía, que se encuentran en la superficie celular y reaccionan ante la presencia de Shh, uno de ellos es la proteína Smo, que de manera normal inhibiría esta ruta, pero al producirse la unión de Shh a Ptc impide dicha inhibición.

Por todos estos motivos, un defecto en la vía de Shh puede generar enfermedades neurodegenerativas, como es el caso de la ELA¹¹. A pesar de que en esta enfermedad los niveles de Shh en el CSF de controles normales y pacientes con ELA no presentan diferencias entre sí, la actividad biológica de Shh no se encuentra estimulada en el grupo de ELA, lo que sugiere la presencia de un inhibidor de la señalización de Shh en las muestras de CSF de ELA, dos inhibidores identificados son IL-1 β y TNF- α , cuyos niveles están significativamente elevados en el CSF de los pacientes. En conjunto, se demuestra que la señalización de Shh está comprometida en los pacientes con ELA.

Otro ejemplo que muestra la importancia del Shh se encuentra al evaluar los niveles de proteína Shh en el CSF de pacientes con lesiones cerebrales traumáticas (TBI)¹², donde se observa una reducción de esta proteína en comparación con los pacientes de control. Además, ha sido demostrado experimentalmente que la estimulación de la señalización de Shh con el agonista Smoothened (SAG) aumenta la proliferación de células que expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), generando una mayor recuperación de la función motora, mientras que la ciclopamina (inhibidor de la señalización de Shh) conduce a una reducción.

¹⁰ Natalie Andrea Espinoza Giacomozzi (2012). *Neogenina-1 actúa como un blanco transcripcional directo de la vía Sonic Hedgehog / Gli en línea celular de neuroblastoma humano*. Universidad de Chile, departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

¹¹ Drannik A, Martin J, Peterson R, Ma X, Jiang F, Turnbull J (2017). Cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis inhibits sonic hedgehog function. *PLoS One*, 12(2).

¹² Imagen adaptada; Ashley K. Pringle et al (2021). *Sonic Hedgehog Signaling Promotes Peri-Lesion Cell Proliferation and Functional Improvement after Cortical Contusion Injury*. *Neurotrauma Reports* 22;2(1):27-38

Objetivos

Considerando la información bibliográfica recopilada en este trabajo:

- La proteína Shh es un conocido **polarizador** dorsoventral del esbozo neural.
- La función del Shh no se restringe a la formación del TN, participa en la organización de la formación del telencéfalo, partes del diencéfalo, el área olfatoria y la hipófisis.

Tras un Western Blot que ha confirmado la presencia de Shh en el CSF-E y en consecuencia, el contacto de esta proteína con el polo apical de los precursores neuronales, se planteo que Shh estuviera involucrado en la interacción CSFE-neuroepitelio, ejerciendo un efecto polarizador apico-basal de las células precursoras neuroepiteliales, es decir, la molécula Shh podría ser una molécula polarizadora en diversos sentidos. Lo cual podría explicar su implicación en la organización de tan elevado número de estructuras cerebrales.

Para estudiar esta hipótesis, en este trabajo se han realizado estudios de proliferación y diferenciación neuronal (procesos que presentan una clara polarización apico-basal) en explantes mesencefálicos en presencia y ausencia de Shh, junto con el estudio de la distribución de moléculas conocidas como referencias de polarización histológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos a realizar, como ya se ha indicado en la introducción, constarán de un cultivo organoespecífico de explantes mesencefálicos embrionarios de pollo en diferentes condiciones experimentales. Seguido del procesamiento de las muestras obtenidas y su análisis mediante técnicas inmunocitoquímicas.

Extracción CSF-E¹³

Materiales:

- Incubadora de huevos calibrada a 37–39 °C.
- 60 embriones de pollo E 23 HH
- Aguja de tungsteno
- Capilares de borosilicato (1.5 mm O.D. x 0.86 mm I.D. from Harvard Apparatus)
- Extractor vertical de micropipetas (Narishige pullerPB7).
- Esmeril giratorio
- Dispositivo de microaspiración (PLI-100 pico-injector, Harvard Appa- 51 ratus) bajo el control de un micromanipulador (Leica 52 Micromanipulator).

Protocolo:

Se utiliza la técnica de microaspiración para extraer el CSF-E del mesencéfalo. El primer paso es la preparación de las micropipetas a partir de capilares de vidrio de borosilicato, en un aparato que posee una resistencia eléctrica que calienta el vidrio y unas pesas que traccionan del mismo y los estiran. Mediante el biselado de la punta de la micropipeta con un esmeril giratorio, se pueden obtener los diámetros de punta necesarios para la extracción, entre 80-100 µm. Por otro lado, se extraen los embriones de pollo que se encuentren en estadio adecuado (23 H.H.) y se liberan de las membranas extraembrionarias, con ayuda de una aguja de tungsteno y bajo microscopio binocular.

El fluido cerebroespinal embrionario (CSF-E) se obtiene por microaspiración a nivel de la cavidad del mesencéfalo. Para ello se conecta la micropipeta al microinyector creando una presión negativa. La cantidad obtenida en cada microinyección es mínima (5-10 µl), por esto para conseguir un volumen suficiente para su análisis es necesario recolectar CSF-E de varios embriones del mismo estadio.

Cultivo de neuroepitelio (CNE) de embriones de pollo¹³

Materiales:

- Embriones de pollo E 19-21 H
- Aguja de tungsteno y microtijeras, para la manipulación de los embriones.
- Solución salina estéril, Ringer (NaCl 7.2 g, CaCl₂ anhidro 0.17 g o 65 CaCl₂·2H₂O 0.23 g, KCl 0.37 g, enrasado hasta 1L con agua desionizada)
- Medio de cultivo: DMEM+F12 + ácido ascórbico.
- CSF-E de los embriones de pollo.

¹³ Teresa Caprile, Francisco Lamus, María Isabel Alonso, Hernán Montecinos, and Angel Gato (2019). *Functional Analyses of Embryonic Cerebrospinal Fluid Proteins*. Proteins.Cerebrospinal Fluid (CSF) Proteomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 2044: 51-60

- Anticuerpo inmunobloqueo Shh: Monoclonal mouse anti-Shh, Millipore, #MABD175
- Membrana de nitrocelulosa (filter type 0.0.8 μm AABP from 54 Millipore).
- Anillas de teflón de 2 mm grosor y 15 mm de diámetro.
- Placas de cultivo in vitro de cuatro pocillos de 15 mm de diámetro (NUNC).
- Bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma)
- Carnoy (60:30:10, etanol/formaldehído/ácido acético).
- Alcoholes de diferentes graduaciones y xilol, para la deshidratación y aclarado de las muestras.
- Parafina para la inclusión de las muestras (Paraplast)
- Microtomo (MICROM HM 330)

Protocolo:

Se han utilizado embriones de pollo E 19-21 H para el cultivo. En la figura 6 se encuentran recogidos todos los pasos a seguir. (A) Se extraen los embriones y se liberan de las membranas extraembrionarias, con ayuda de una aguja de tungsteno (bajo microscopio binocular). (B-D) Con unas microtijeras se corta la porción dorsal del mesencéfalo y tras repetidos lavados con Ringer se le traslada a una placa de Petri con medio de cultivo. (E-F) Los fragmentos de neuroepitelio se depositan sobre el papel de filtro millipore (previamente hervidos durante 30 minutos para eliminar el exceso de colorante), con su superficie apical en contacto con el mismo y son “cosidos” periféricamente a él mediante pequeños toques realizados con una aguja de tungsteno. (G-H) Las piezas así preparadas se depositan sobre una anilla de teflón en la que se coloca una rejilla metálica que sirve de soporte, esto sirve para que el explante no se hunda en él, permitiendo la nutrición del tejido por capilaridad y un adecuado intercambio gaseoso, imitando las condiciones en las que se encontraría el neuroepitelio con la zona apical en contacto con el CSF-E.

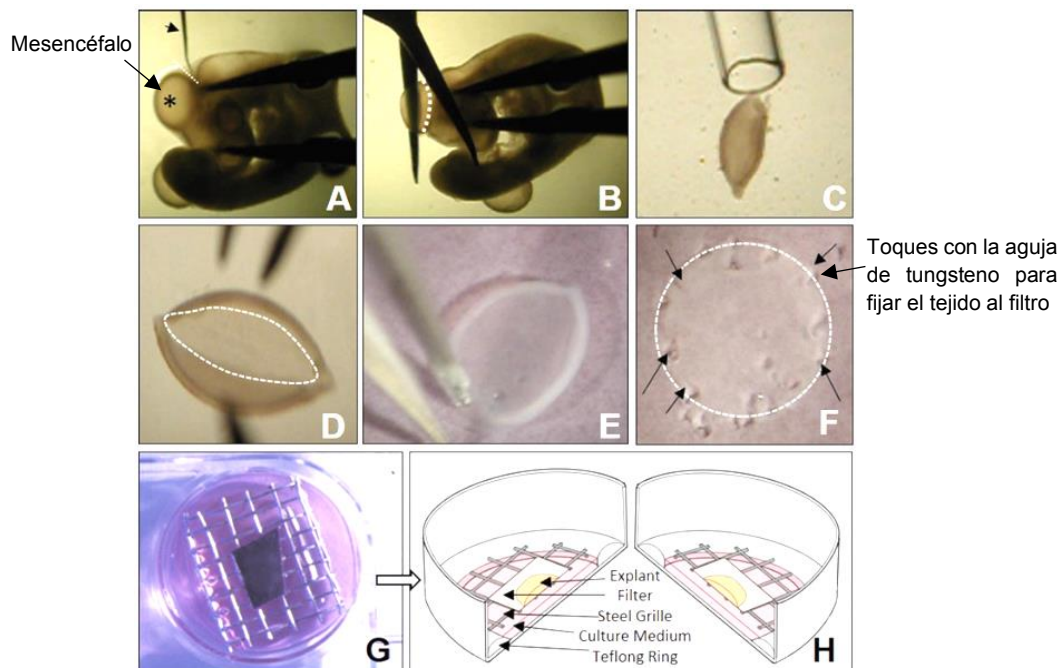


Figura 6-Representación de los pasos a seguir para la elaboración de cultivos organoespecíficos de neuroepitelio cerebral a partir de explantes mesencefálicos de embriones de pollo¹³

El diseño experimental consta de dos cultivos en condiciones diferentes, como control se han utilizado 6 explantes de neuroepitelio cultivados con CSF-E, por otro lado se realizó un inmunobloqueo de la proteína SHH presente en el CSF-E, utilizando 6 explantes de neuroepitelio cultivados con CSF-E junto con un anticuerpo monoclonal específico para Shh. Para realizar estas condiciones todos los pocillos deben contener 250 μ L de medio+15 μ L de E-CSF previamente extraído, además en aquellos que se requiera el inmunobloqueo del SHH se añade 2 μ L de una mezcla formada por 1 μ L de anti-SHH y 100 μ L de medio.

Las placas de cultivo se mantuvieron 24 horas en un incubador con un 98% de humedad relativa a 37,5°C y con 5% de CO₂. Tras 24 horas de cultivo y una hora antes de la finalización del cultivo se añade 10 μ l por pocillo de BrdU, molécula que se incorpora a las células que se encuentren en fase S y permitirá su posterior observación. Transcurrido el tiempo se realiza el procesamiento de las muestras:

- I. Fijación en Carnoy, durante 20 min,
- II. Deshidratación de las muestras, utilizando alcoholes de 96°-100°-100° (10 minutos cada pase).
- III. Aclarado con un pase de rápido en Xilol.
- IV. Inclusión en parafina durante 15-20 minutos.

A continuación, se hacen bloques de parafina con cada una de las 12 muestras para poder realizar cortes histológicos de 8 micras de grosor, utilizando un micrótopo, para su posterior estudio por inmunocitoquímica.

Tinción con hematoxilina/eosina

Materiales:

- Alcoholes de diferentes graduaciones y xilol. Al principio del procedimiento para la desparafinación y rehidratación de la muestra, y al final para su deshidratación y aclarado.
- Solución de Papanicolaou 1a solución de hematoxilina según Harris, 1L, Merck KGaA, cód; 1.09253.1000
- Eosina Amarillenta (C.I. 45380), PanReact AppliChem, cód; 251299
- Medio de montaje EuKitt
- Cubre-objetos, Menzel-Glaser

Protocolo:

Tras la desparafinación (dos pases de xilol, 10 minutos cada uno) y la rehidratación de las muestras (dos pases de alcohol 100%, 7' cada uno, pase por agua corriente y por agua destilada, 5' cada uno). Se sumergen las muestras en hematoxilina, previamente filtrada, durante 1 minuto, en función de la tinción que adquiera el tejido. Lavado en agua corriente para el viraje seguido de un lavado en agua destilada. Sumergir en eosina, también filtrada, durante 10 segundos y un lavado rápido en agua destilada. Deshidratación (alcohol 80%, 96% y 2 de 100%, 5 minutos cada pase), aclaramiento (2 pases de xilol, 10 minutos cada uno)y montaje.

Técnicas Inmunocitoquímicas

*Bromodeoxiuridina (BdrU)*¹⁴

Materiales:

- Alcoholes de diferentes graduaciones y xilol.
- Anticuerpo primario: Monoclonal mouse anti-BdrU, Dako, #M0744
- Anticuerpo secundario: Mouse Extravidin Peroxidase Staining Kit, antibody produced in goat.
- HCl 2M (HCl fumante 14mL, enrasar hasta 200mL con agua destilada)
- Buffer Tris (0,605g Tris, 8g NaCl, HCl 1N hasta pH=7,3 y enrasar hasta 1L con agua destilada)
- Ácido bórico 0,1M (a pH 8,5-10)
- Peroxidasa extravidina, Sigma
- Solución de Papanicolaou 1a solución de hematoxilina según Harris, 1L, Merck KGaA, cód; 1.09253.1000
- 3,3'-Diaminobencidina tetra-hidrocloruro (DAB). En 15mL agua destilada se disuelve un comprimido DAB (Sigma, 10mg por comprimido), se filtra los residuos y se añade 15µL de peróxido de hidrógeno.
- Medio de montaje EuKitt
- Cubre-objetos, Menzel-Glaser

Protocolo:

Se realiza de igual manera la desparafinación y la rehidratación. Para permitir la tinción de los núcleos, se desnaturaliza el DNA con HCl a 37°, durante 1 hora. Lavado en agua destilada y tres lavados en Buffer Tris de 5 minutos cada uno. El ácido se neutraliza con "ácido bórico" (pH 8,5-10). Lavado en agua destilada y tres lavados en Buffer Tris de 5 minutos cada uno.

Se añade el anticuerpo primario con una dilución 1:100 en Buffer Tris, dejar *o/n* (over/night) en cámara húmeda a 4°. Tras tres lavados en Buffer Tris de 5 minutos cada uno, se añade el anticuerpo secundario con una dilución 1:20 en Buffer Tris, dejar 30 minutos en cámara húmeda a 4°.

Después de otros tres lavados en Buffer Tris de 5 minutos cada uno, se añade extravidina para amplificar la señal (peroxidasa con alta especificidad por la avidina), con una dilución 1:20. 3x5' lavados en Buffer Tris y teñimos con DAB, sumergir hasta observar la coloración marrón. Lavado en agua destilada para eliminar el exceso de DAB y se realiza una contratinción con hematoxilina previamente filtrada, sumergiéndolo durante 3-4 segundos. A continuación se realiza un lavado en agua corriente para el viraje de la hematoxilina durante 15 minutos. Ya con las muestras teñidas, se finaliza con la deshidratación (alcohol 80%, 96% y 2 de 100%, 5 minutos cada pase), aclaramiento (2 pases de xilol, 10 minutos cada uno) y montaje.

¹⁴ José Francisco Lamus Molina (2016). *El Fgf2 como regulador de la actividad mitogénica de precursores neurales en el nicho celular del cerebro embrionario de ratón*. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid, Departamento de Anatomía y Radiología.

β -tubulina¹⁴

Materiales:

- Alcoholes de diferentes graduaciones y xilol.
- Anticuerpo primario: anti- β -III tubulina, producido en conejo, Sigma #T220
- Anticuerpo secundario: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen #A11034
- PBS/BSA 1% (pH neutro)
- Yoduro de propidio 1.0mg/mL en agua, Molecular Probes
- Kit para montajes acuosos, Fluoromount
- Cubre-objetos, Menzel-Glaser

Protocolo:

Desparafinación y rehidratación. Se realiza un lavado en PBS/BSA durante 20 minutos. Se añade el anticuerpo primario, con una dilución 1:60 en PBS y se deja o/n en cámara húmeda a 4°. Pasado el tiempo se realizan tres lavados en PBS/BSA 1% de 5 minutos cada uno. Se añade el anticuerpo secundario con una dilución 1:1000 en PBS y se deja 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras dos lavados en agua destilada de 5 minutos cada uno, se pasa a la contratinción con yoduro de propidio (añadir 10 μ L a la cubeta, dilución 0,05 μ g/mL), sumergiéndolo 2-3 veces. Aclarar en agua destilada y montaje acuoso.

Laminina¹⁵

Materiales:

- Alcoholes de diferentes graduaciones y xilol.
- Anticuerpo primario: anti-laminina, producido en conejo, Sigma L9393
- Anticuerpo secundario: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen #A11034
- PBS/Tween 20 al 0,05% (1,5mL de Tween al 10% en 300mL de PBS)
- Yoduro de propidio 1.0mg/mL en agua, Molecular Probes
- Kit para montajes acuosos, Fluoromount
- Cubre-objetos, Menzel-Glaser

Protocolo:

Desparafinación y rehidratación. Tres lavados en PBS/Tween 20 de 5 minutos cada uno. Añadir el anticuerpo primario con una dilución 1:20 en PBS/Tween 20. Dejar o/n en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tres lavados en PBS/Tween 20 de 5 minutos cada uno. Añadir el anticuerpo secundario una dilución 1:150 en PBS/Tween 20. Dejar 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Dos lavados en agua destilada de 5 minutos cada uno. Contratinción con yoduro de propidio (añadir 10 μ L a la cubeta, dilución 0,05 μ g/mL), sumergiéndolo 2-3 veces. Aclarar en agua destilada y montaje acuoso.

¹⁵Mamatha Damodarasamy, Robert B. Vernon, Jasmine L. Pathan, C. Dirk Keene, Anthony J. Day, William A. Banks, and May J. Reed (2020). *The microvascular extracellular matrix in brains with Alzheimer's disease neuropathologic change (ADNC) and cerebral amyloid angiopathy (CAA)*. Fluids Barriers CNS., 17: 60

Total-FAKs¹⁶

Materiales:

- Alcoholes de diferentes graduaciones y xilol.
- Anticuerpo primario: anti-FAKs antibody, cell signaling rabbit #3285
- Anticuerpo secundario: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen #A11034
- EDTA 1mM en 500 µL de Tween 20
- PBS/BSA 1%
- Yoduro de propidio 1.0mg/mL en agua, Molecular Probes
- Kit para montajes acuosos, Fluoromount
- Cubre-objetos, Menzel-Glaser

Protocolo:

Desparafinación y rehidratación. Lavado en PBS+leche de 20 minutos. Digestión con EDTA/Tween 20, en microondas durante 20 minutos (a mínima potencia para evitar que hierva). Tres lavados en PBS 1x de 5 minutos cada uno. Añadir el anticuerpo primario con una dilución 1:200 en PBS. Dejar o/n en cámara humera a 4°. Tres lavados en PBS 1x de 5 minutos cada uno. Añadir el anticuerpo secundario con una dilución 1:200 en PBS durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Lavado en agua destilada. Contratación con yoduro de propidio (añadir 10µL a la cubeta, dilución 0,05µg/mL), sumergiéndolo 2-3 veces. Aclarar en agua destilada y montaje acuoso.

Visualización

La visualización de los resultados obtenidos mediante estas técnicas se realizó de la siguiente manera:

- Las muestras teñidas con hematoxilina-eosina, junto con las teñidas con DAB (inmunocitoquímica anti-BrdU) fueron fotografiadas con un microscopio Nikon Microphot-FXA, y procesadas con el software Leica Applications Suite V3.3.0.
- Las técnicas de inmunofluorescencia, es decir, anti-β-tubulina, anti-laminina y anti-Faks, se visualizaron gracias al fotografiado de las muestras por microscopía láser confocal (Programa Leica TCS SPE).

Las imágenes cuyo análisis posterior se basará en la cuantificación del número de núcleos que presentan marcaje (anti-BrdU y anti-β-tubulina), se fotografiaron a aumento de 40x, zoom 1.0.

¹⁶Mary E. Desmond, Janice E. Knepper, Angela J. DiBenedetto, Elizabeth Malaugh, Sagrario Callejo, Raquel Carretero, Maria-Isabel Alonso, Angel Gato (2014). *Focal adhesion kinase as a mechanotransducer during rapid brain growth of the chick embryo*. Int. J. Dev Biol, 58(1):35-43.

Rebecca E. Schweppe, Anna A. Kerege, Jena D. French, Vibha Sharma, Rachel L. Grzywa and Bryan R. Haugen (2009). *Inhibition of Src with AZD0530 Reveals the Src-Focal Adhesion Kinase Complex as a Novel Therapeutic Target in Papillary and Anaplastic Thyroid Cancer*. J. Clin. Endocrinol Metab,94(6): 2199–2203.

RESULTADOS

División celular

Para el estudio de proliferación se utilizó bromodeoxiuridina (BrdU). Esta molécula es un análogo de la timidina, la cual se incorpora selectivamente al DNA celular que se encuentra en la fase S del ciclo, por lo tanto, inmunodetectando el BrdU incorporado se puede identificar las células en fase de proliferación celular.

El diaminobenzidina (DAB) es un cromógeno que al reaccionar con la extravidina, una enzima peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario, presenta una intensa tinción marrón, gracias a la cual pueden ser contabilizados los núcleos en fase S mediante la visualización por microscopio óptico.¹⁷

En las siguientes imágenes (*figura 7*) podemos ver dos ejemplos de los resultados obtenidos mediante esta técnica para ambas condiciones, siendo evidente el aparente aumento del número de núcleos en división en ausencia de Shh. Tras el conteo de los núcleos de las muestras obtenidas se realizó un análisis estadístico (tabla 1) para comparar las medias obtenidas en ambas condiciones.

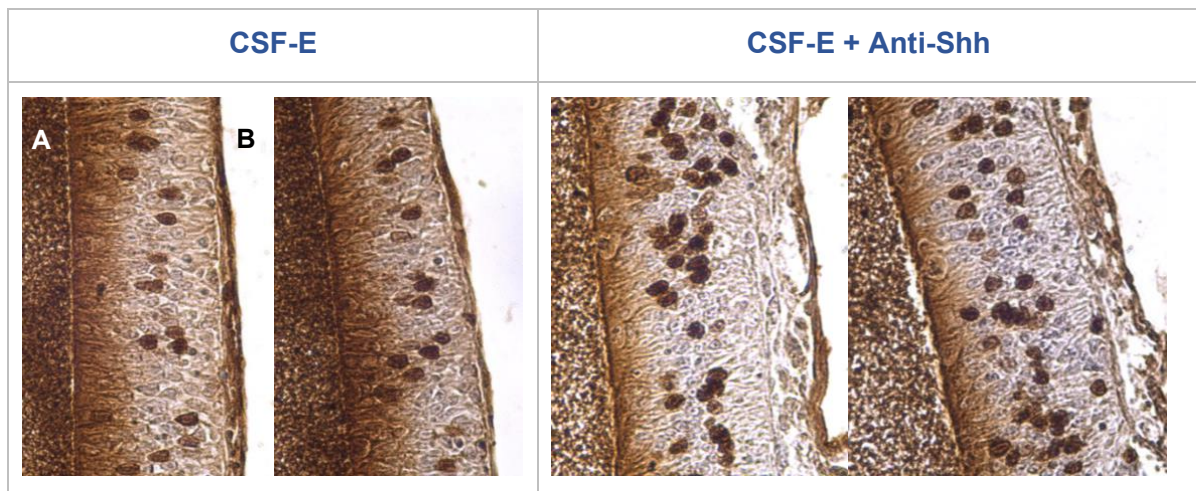


Figura 7- Inmunocitoquímica anti-BrdU en condiciones control (CSF-E) y en condiciones de inmunobloqueo (CSF-E+anti-Shh). En la primera imagen se encuentra señalado el polo apical (A) y el polo basal (B), el resto de imágenes de la figura se encuentran en la misma disposición.

Se realizó el conteo de los núcleos de las muestras obtenidas, clasificándolos en función de la región del neuroepitelio en el que se encuentran (apical-central-basal). Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico, por un lado para comparar las medias obtenidas en ambas condiciones, y por otro lado, para determinar si hay diferencias significativas en el número de núcleos presentes en la región basal frente a la apical.

¹⁷ Genarina Escovar V., Henry Hanssen V., Gonzalo Uribe Botero (1982). *Técnicas de inmunoperoxidasa en la detección de marcadores tumorales y antígenos virales*. Biomédica, Vol. 2, No. 3.

Comparación de la proliferación en ambas condiciones

En primer lugar se realizó un gráfico de cajas y bigotes para visualizar los datos y un análisis estadístico (tabla 1) para comparar el valor medio de los núcleos en división en ambas condiciones.

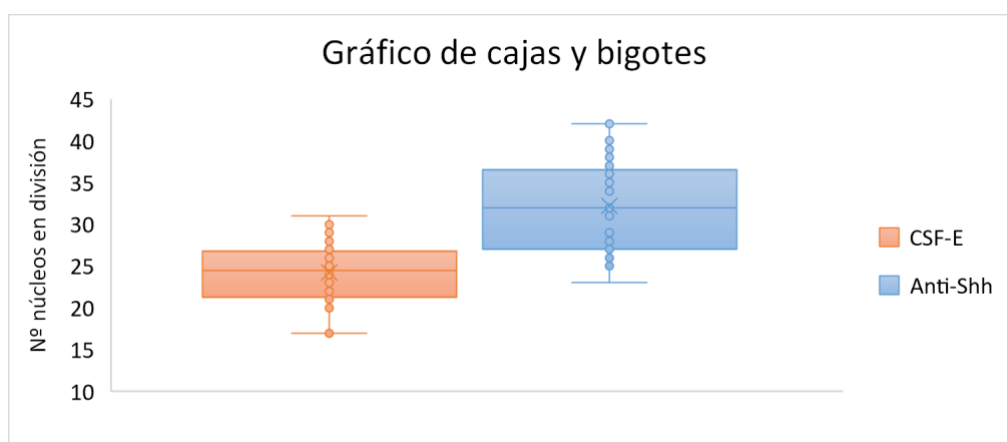


Gráfico 1-Gráfico de cajas y bigotes del número de núcleos en fase S en cada condición

	<i>CSF-E</i>	<i>Anti-Shh</i>
Media	24,250	32,182
Varianza	14,370	29,778
Observaciones	24	33
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	55	
Estadístico t	-6,474	
P(T<=t) una cola	1,37E-08	
Valor crítico de t (una cola)	1,673	
P(T<=t) dos colas	2,73E-08	
Valor crítico de t (dos colas)	2,004	

Tabla 1-Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales. Comparación del promedio del número de núcleos en división entre ambas condiciones.

En la tabla podemos ver las medias obtenidas para cada condición y el número de observaciones realizadas, obteniendo un p valor inferior al nivel de significancia ($\alpha=0,05$). Esto indica que se rechaza H_0 , por lo que se puede decir con un nivel de probabilidad del 95% que hay diferencias significativas entre el número de núcleos en división entre ambas condiciones, siendo el cultivo con inmunobloqueo del Shh el que mayor número de núcleos en división presenta, con un incremento porcentual del 32,7%.

Comparación entre la región basal y la región apical

Para ver si hay diferencias significativas entre la presencia de núcleos en división en el polo basal y el apical, hacemos un análisis de medias en cada condición por separado.

	CSF-E		Anti-Shh	
	<i>Apical</i>	<i>Basal</i>	<i>Apical</i>	<i>Basal</i>
Media	2,583	4,583	1,409	2,030
Varianza	2,254	3,645	1,682	1,655
Observaciones	24	24	22	33
Varianza agrupada	2,949		1,666	
Diferencia hipotética de las medias	0		0	
Grados de libertad	46		53	
Estadístico t	-4,034		-1,749	
P(T<=t) una cola	1,02E-04		0,043	
Valor crítico de t (una cola)	1,679		1,674	
P(T<=t) dos colas	2,05E-04		0,086	
Valor crítico de t (dos colas)	2,013		2,006	

Tabla 2-Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales. Comparación del promedio del número de núcleos en división entre la región basal y apical, para ambas condiciones

Teniendo en cuenta que $\alpha=0,05$, se observa que en el caso del neuroepitelio control $\alpha > p$ valor, por lo tanto se puede decir con un nivel de probabilidad del 95% que hay diferencias significativas entre el número de núcleos en división en el polo apical y el polo basal, siendo el polo basal el que presenta una mayor presencia de núcleos marcados, con un incremento porcentual del 77,4%. En el caso del inmunobloqueo p valor $> \alpha$, es decir, no hay diferencias significativas entre las medias de ambas poblaciones.

Diferenciación celular

La diferenciación de los precursores neurales presentes en el neuroepitelio hacia neuronas se estudia con β -tubulina, este es un marcador de diferenciación neuronal temprana. Aquellos núcleos que presenten fluorescencia verde se deberá a la unión del anticuerpo a este neurofilamento, gracias a lo cual pudieron ser contabilizados mediante la visualización por microscopio láser confocal.

En las siguientes imágenes (*figura 8*) podemos ver dos ejemplos de los resultados obtenidos mediante esta técnica para ambas condiciones, con y sin la contratinción de yoduro de propidio (fluorescencia roja), la cual nos permite ver los límites del tejido.

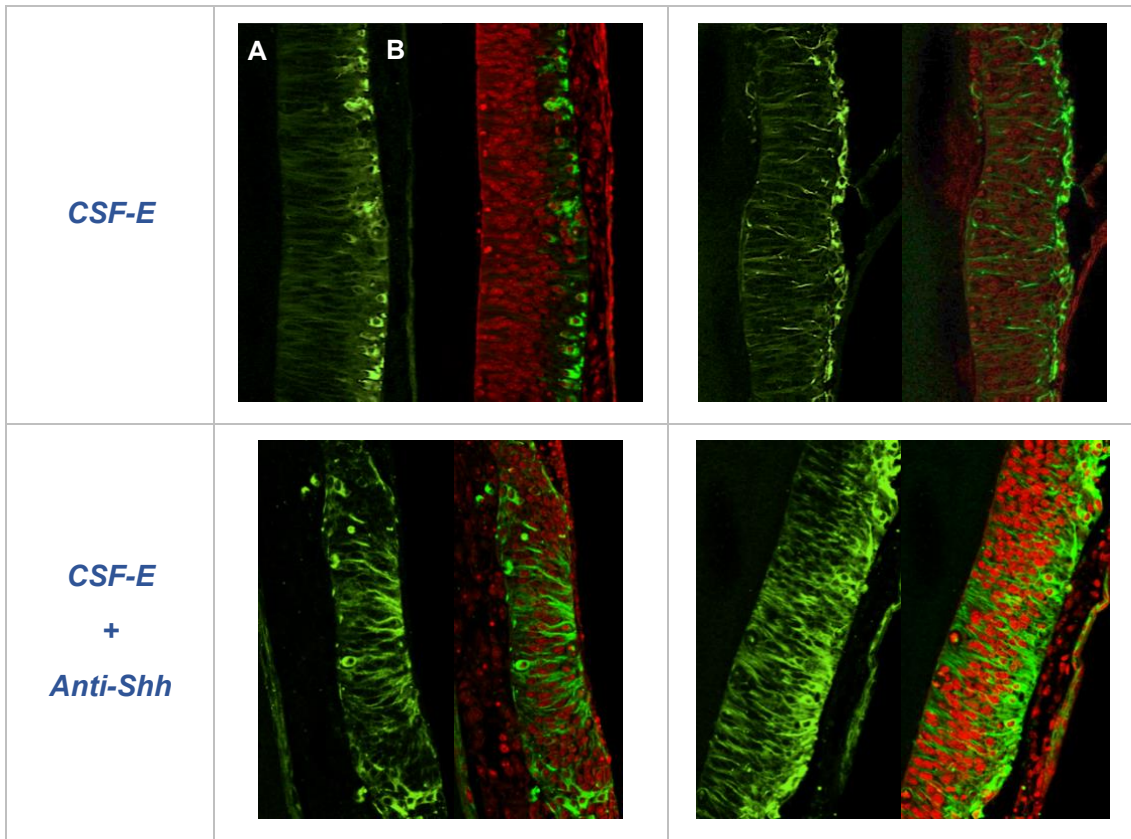


Figura 8- Inmunocitoquímica anti- β -tubulina en condiciones control (CSF-E) y en condiciones de inmunobloqueo (CSF-E+anti-Shh).

Lo primero que observamos es una clara diferencia en el patrón de la disposición de las neuronas en el tejido, encontrándose en el control exclusivamente en la porción basal, mientras que al bloquear Shh se dispersan por todo el neuroepitelio.

Tras el conteo de las células positivas de las muestras obtenidas se realizó un gráfico de cajas y bigotes para visualizar los datos y un análisis estadístico (*tabla 3*) para comparar las medias obtenidas en ambas condiciones.

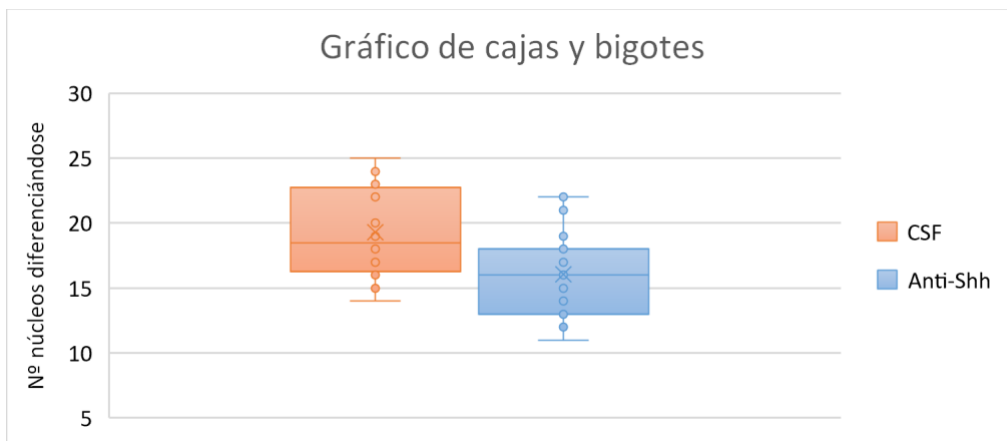


Gráfico 2- Gráfico de cajas y bigotes del número de núcleos en diferenciación neuronal temprana

	<i>CSF-E</i>	<i>anti-Shh</i>
Media	19,292	16,043
Varianza	11,172	9,225
Observaciones	24	23
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	45	
Estadístico t	3,489	
P(T<=t) una cola	0,001	
Valor crítico de t (una cola)	1,679	
P(T<=t) dos colas	0,001	
Valor crítico de t (dos colas)	2,014	

Tabla 3-Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales. Comparación del promedio del número de núcleos que presentar diferenciación temprana.

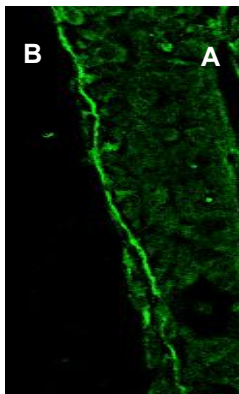
En la tabla podemos ver las medias obtenidas para cada condición y el número de observaciones realizadas, obteniendo un p valor inferior al nivel de significancia ($\alpha=0,05$). Esto indica que se rechaza H_0 , por lo que se puede decir con un nivel de probabilidad del 95% que hay diferencias significativas entre el número de núcleos que se están diferenciando hacia neuronas entre ambas condiciones, siendo el cultivo con inmunobloqueo del Shh el que menor número de diferenciación neuronal presenta, con un descenso porcentual del 16,8%.

Polarización apico-basal

Tanto la laminina como las Faks, son proteínas que se expresan en los polos basal/apical, respectivamente, del neuroepitelio en condiciones normales, con reflejo de la polarización apico-basal del mismo. Por lo que, con este estudio pretendemos determinar si en ausencia del Shh se genera algún cambio en la expresión de estas proteínas, es decir, comprobar si ha cambiado la polarización del neuroepitelio.

Inmunocitoquímica anti-laminina

Una de las señales externas conocidas que guía la polarización neuronal es la laminina, esta proteína es una de las que componen la lámina basal del neuroepitelio.¹⁸



En esta imagen de cultivo de neuroepitelio en condiciones control (*figura 9*) se observa el marcaje de la laminina se visualiza como una línea continua de fluorescencia verde en el polo basal del tejido.

Figura 9-Inmunocitoquímica anti-laminina en condiciones control (CSF-E)

¹⁸Camila Davison (2014). *Análisis estructural de la cilia primaria durante la diferenciación neuronal en la retina de pez zebra (Danio rerio)*. Universidad de la República, Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión.

En las siguientes imágenes (*figura 10*) del neuroepitelio en ausencia de Shh, podemos ver como la laminina se encuentra infiltrada en el interior del tejido, en vez de expresarse exclusivamente en la membrana basal. Esto nos muestra cualitativamente un cambio en la polarización a causa de la inhibición de esta proteína.

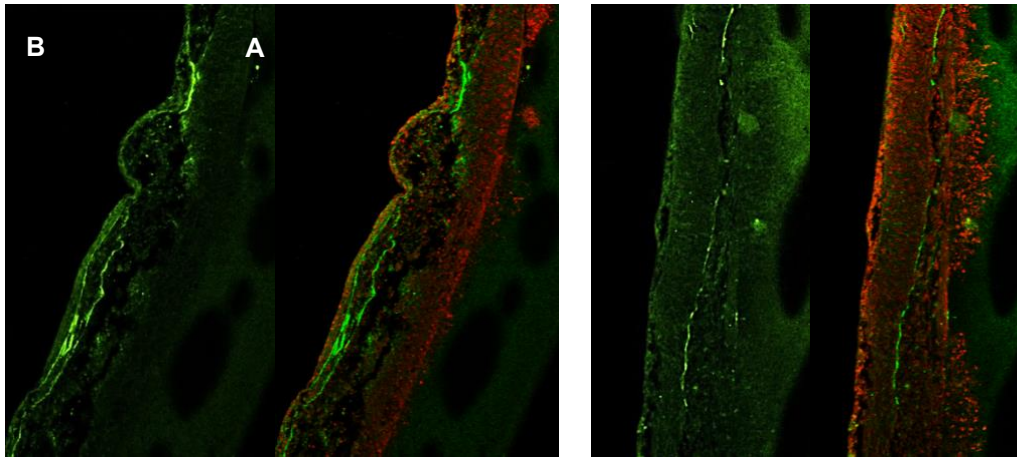


Figura 10- Inmunocitoquímica anti-laminina en condiciones de inmunobloqueo (CSF-E+anti-Shh)

Inmunocitoquímica anti-total-FAKs

Se ¹realizaron inmunocitoquímicas de Faks con diversos anticuerpos (fosfo-faks tyr861 y total-faks). Sin embargo, no pudo observarse ningún cambio relevante entre los controles y el inmunobloqueo, como puede observarse en las imágenes inferiores (*figura 11*), donde vemos la fluorescencia referente a las Faks en los polos apical y basal (mayoritariamente en el basal). Por lo tanto, a priori, se podría decir que la presencia o ausencia de Shh no influye en la expresión de esta proteína en el neuroepitelio

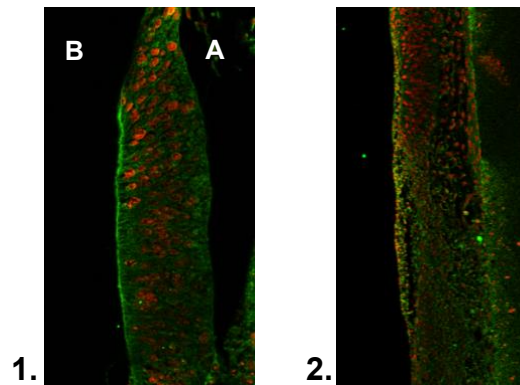


Figura 11- Inmunocitoquímica anti-total-Faks.

(A) Condiciones control, CSF-E (B) Condiciones inmunobloqueo, CSF-E + Anti-Shh

DISCUSIÓN

En el estudio de la proliferación se ha podido determinar un aumento del número de divisiones del 32,7% en ausencia del Shh, lo que podría indicar que esta proteína actúa como un regulador negativo de la proliferación del neuroepitelio, de forma que disminuye su actividad y se desreprime alguna molécula de carácter mitogénico presente en el CSF-E que aumente el nivel de divisiones.

Por otro lado, en esta misma inmunocitoquímica se ha podido determinar la relación del número de núcleos entre el polo basal y el apical. Los resultados obtenidos muestran que en condiciones normales la fase S ocurre hacia la porción basal del neuroepitelio, lo esperado tal y como se ha descrito en el apartado de introducción. Sin embargo, cuando Shh está bloqueado no hay diferencias significativas entre el número de núcleos en ambos polos, esto muestra un cambio en la localización de las células en las distintas fases del ciclo celular, es decir, un cambio en la migración nuclear intercinética. Esta aparente falta de distinción entre ambos extremos muestra una alteración en la polarización de la proliferación del neuroepitelio.

En el estudio de la diferenciación neural, se ha determinado que el número de núcleos que se están diferenciando a neuroblastos es inferior en el cultivo con inmunobloqueo del Shh. Sin embargo, la disminución es solo del 16,8%, no es una disminución muy significativa. A pesar de esta aparente diferencia en cuanto al número de núcleos, lo más interesante de estas inmunocitoquímica es el cambio en la distribución de las neuronas en el tejido. En las siguiente imagen (*figura 12*) podemos ver como en el cultivo control con CSF-E, los núcleos neuronales se encuentran exclusivamente en el polo basal, y las prolongaciones de las mismas se encuentran hacia el polo apical. Esta polarización es necesaria para la posterior migración de las neuronas y la formación de los ganglios periféricos y cerebrales. Sin embargo, en los cultivos con el inmunobloqueo se observa claramente una dispersión por todo el neuroepitelio de los núcleos neuronales y sus prolongaciones, indicando una pérdida en la orientación de la migración basal de los precursores neuroepiteliales.

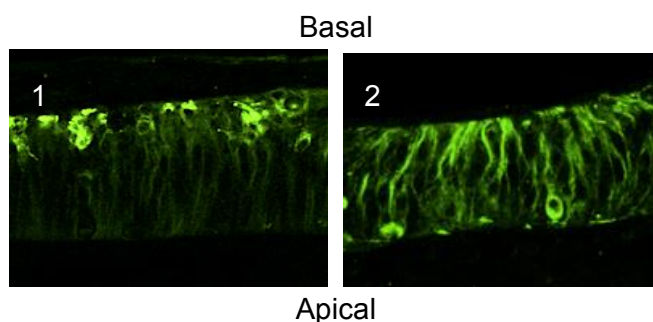


Figura 12- Inmunocitoquímica anti- β -tubulina (1) en condiciones control (CSF-E) y (2) en condiciones de inmunobloqueo (CSF-E+anti-Shh). Comparación visual de los patrones de neurogénesis en el neuroepitelio.

En el estudio de la laminina, en la mayoría de los cortes se ha podido apreciar marcaje en otras zonas que no es la lámina basal. Esto nos muestra cualitativamente, la posible existencia de un cambio en la polarización de la neurogénesis a causa de la inhibición de esta proteína.

Vemos que este cambio de polarización, no solo afecta a la organización de las células neuroepiteliales, tanto en la proliferación, como en la neurogénesis, sino que también altera la expresión de otras proteínas polarizadoras como el caso de la laminina. En la búsqueda bibliográfica realizada, hay estudios que determinan que los neuroblastos en contacto con la laminina, determinan el punto a partir del cual emerge el axón¹⁸. Por lo que, un defecto en la proteína Shh, y genera una gran alteración en los patrones de neurogénesis, y muy posiblemente altera la formación de las neuronas y el destino de las células a lo largo del eje dorsoventral y anteroposterior del tubo neural, es decir, afectando el desarrollo normal del SN.

Estos resultados en su conjunto sugieren que Shh es una molécula con actividad polarizadora múltiple, por un lado, establece el eje dorso-ventral del cerebro embrionario y, por el otro, colabora de forma importante en la polarización ápico-basal del neuroepitelio cerebral.

Por lo tanto, el estudio de las diversas proteínas y/o moléculas que tengan interacción con Shh puede aportar una idea más concreta de su mecanismo de acción en el desarrollo del cerebro embrionario. Haciendo una búsqueda bioinformática, utilizando la herramienta STRING (Protein-Protein Interaction Networks, Functional Enrichment Analysis), encontramos diversas proteínas con las que se predicen interacciones teóricas, algunas de las cuales ya han sido comentadas. Esta información puede ser relevante para futuros estudios sobre Shh.

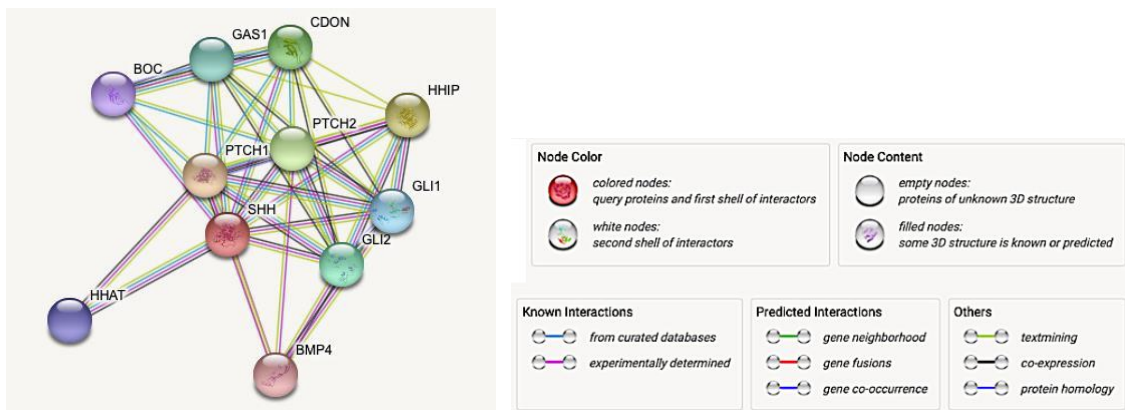


Figura 13- Redes de interacción proteína-proteína. Interacciones teóricas y experimentales del Shh¹⁹

¹⁹ Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2019). *STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets*. Nucleic Acids Res, 47:D607-613.

CONCLUSIÓN

En resumen, con los resultados obtenidos mediante el conteo nuclear podemos concluir que la ausencia de Shh genera un aumento de la proliferación y un aparente descenso de la diferenciación. Generalmente estos dos procesos están directamente relacionados, pero en este caso, considerando la alteración de la polarización del neuroepitelio, lo más probable es que los precursores neurales tengan la capacidad de replicarse, sin embargo, no son capaces de alcanzar la zona donde se produce la diferenciación hacia neuroblastos, debido a la falta de señales guía (Shh y laminina).

Hay que tener en cuenta, que este es un estudio preliminar sobre la influencia del Shh en el neuroepitelio cerebral, habría que realizar experimentos más focalizados hacia la función específica del Shh en la proliferación y diferenciación de los precursores neurales, junto con el tratamiento de un mayor número de muestras. A pesar de eso, los datos obtenidos junto con la bibliografía, refleja una clara alteración la localización de la neurogénesis, es decir, un cambio en la polarización apico-basal del neuroepitelio. Por lo tanto, sabiendo que el Shh es una conocida proteína polarizadora del plano dorso-ventral, esta podría ser una molécula polarizadora en diversos sentidos.

Para finalizar, en este trabajo se puede apreciar la complejidad del tema en cuestión y las grandes implicaciones que puede tener el estudio de los mecanismos de los diferentes factores presentes en el fluido cerebroespinal embrionario. Shh, es imprescindible para el correcto desarrollo del cerebro embrionario y la estimulación de las proteínas encargadas de la correcta síntesis del tejido cerebral, puede desencadenar en futuras terapias contra enfermedades neurodegenerativas, focalizadas hacia la génesis de nuevas neuronas (y el resto de linajes neurales) a partir de las células madre adultas presentes en el nicho neurogénico. Sin embargo, queda un largo camino considerando la gran cantidad de proteínas presentes en el E-CSF, cuyas funciones probablemente sean imprescindibles para alcanzar la meta propuesta, además del desconocimiento de muchos mecanismos en los que se encuentran involucradas incluso las moléculas más estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez, A. R.; Domínguez, S.; Cantín, M. & Rojas, M. (2015). *Embriología del Sistema Nervioso*. Int. J. Med. Surg. Sci., 2(1):385-400.
Dra. Paloma Rohlf Domínguez (2016). *Desarrollo del sistema nervioso humano. Perspectiva general del estadio prenatal hasta 2013*. Revista Internacional de Psicología Vol.15 No.1, ISSN 1818-1023
2. Maria K. Lehtinen and Christopher A. Walsh (2011). *Neurogenesis at the Brain–Cerebrospinal Fluid Interface*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27:653–79.
3. Gato A, Alonso M.I., Lamus F. and Miyan J. (2020). *Neurogenesis: A process ontogenically linked to brain cavities and their T content, CSF*. Development Biology, 102:21-27.
4. Gato and Mary E. Desmond (2009). *Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent*. Development Biology, 327:263-272.
5. Gato, J.A. Moro, M.I. Alonso, D. Bueno, A. le la Mano, and C. Martin (2005). *Embryonic Cerebrospinal Fluid Regulates Neuroepithelial Survival, Proliferation, and Neurogenesis in Chick Embryos*. Wiley InterScience, 284A:475–484.
6. Eleni Roussa and Kerstin Krieglstein (2004). *Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: focus on SHH, FGF8, and TGF-β*. Cell Tissue Re., 318(1):23-33.
7. Vieira, A. Pombero, R. García–Lopez, L. Gimeno, D. Echevarria and S. Martínez (2010). *Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers*. Int. J. Dev. Biol. 54: 7-20.
8. M. D. Goulding, A. Lumsden and P. Gruss (1993). *Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord*. Development, 117(3):1001-16.
9. Bruce M. Carlson, *Human Embryology & Developmental Biology*, 4th edition. Mosby, Elsevier, 2009
10. Natalie Andrea Espinoza Giacomozzi (2012). *Neogenina-1 actúa como un blanco transcripcional directo de la vía Sonic Hedgehog / Gli en línea celular de neuroblastoma humano*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
11. Drannik A, Martin J, Peterson R, Ma X, Jiang F, Turnbull J (2017). *Cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis inhibits sonic hedgehog function*. PLoS One, 12(2).
12. Ashley K. Pringle et al (2021). *Sonic Hedgehog Signaling Promotes Peri-Lesion Cell Proliferation and Functional Improvement after Cortical Contusion Injury*. Neurotrauma Reports 22;2(1):27-38
13. Teresa Caprile, Francisco Lamus, María Isabel Alonso, Hernán Montecinos, and Angel Gato (2019). *Functional Analyses of Embryonic Cerebrospinal Fluid Proteins*. Proteins.Cerebrospinal Fluid (CSF) Proteomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 2044: 51-60

14. José Francisco Lamus Molina (2016). *El Fgf2 como regulador de la actividad mitogénica de precursores neurales en el nicho celular del cerebro embrionario de ratón*. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid, Departamento de Anatomía y Radiología
15. Mamatha Damodarasamy, Robert B. Vernon, Jasmine L. Pathan, C. Dirk Keene, Anthony J. Day, William A. Banks, and May J. Reed (2020). *The microvascular extracellular matrix in brains with Alzheimer's disease neuropathologic change (ADNC) and cerebral amyloid angiopathy (CAA)*. *Fluids Barriers CNS.*, 17: 60
16. Mary E. Desmond, Janice E. Knepper, Angela J. DiBenedetto, Elizabeth Malaugh, Sagrario Callejo, Raquel Carretero, Maria-Isabel Alonso, Angel Gato (2014). *Focal adhesion kinase as a mechanotransducer during rapid brain growth of the chick embryo*. *Int. J. Dev Biol*, 58(1):35-43.

Rebecca E. Schweppe, Anna A. Kerege, Jena D. French, Vibha Sharma, Rachel L. Grzywa and Bryan R. Haugen (2009). *Inhibition of Src with AZD0530 Reveals the Src-Focal Adhesion Kinase Complex as a Novel Therapeutic Target in Papillary and Anaplastic Thyroid Cancer*. *J. Clin. Endocrinol Metab*, 94(6): 2199–2203.
17. Genarina Escovar V., Henry Hanssen V., Gonzalo Urlbe Botero (1982). *Técnicas de inmuno-peroxidasa en la detección de marcadores tumorales y antígenos virales*. *Biomédica*, Vol. 2, No. 3.
18. Camila Davison (2014). *Análisis estructural de la cilia primaria durante la diferenciación neuronal en la retina de pez zebra (Danio rerio)*. Universidad de la República, Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión.
19. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2019). *STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets*. *Nucleic Acids Res*, 47:D607-613.