

UCH - FC
BioTecnología
Z 392
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE SONIC HEDGEHOG (SHH)
REGULA LA ELONGACIÓN NEURÍTICA EN NEURONAS
HIPOCAMPALES A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DEL
CITOESQUELETO DE ACTINA”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de
Ingeniera en Biotecnología Molecular

GABRIELA CAROLINA ZAVALA VIVAR

Directora de Seminario de Título: Dra. Verónica Palma Alvarado
Co- Director de Seminario de Título: Dr. Christian González-Billault

Diciembre, 2013

Santiago – Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la señorita

GABRIELA CAROLINA ZAVALA VIVAR

“LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE SONIC HEDGEHOG (SHH) REGULA LA ELONGACIÓN NEURÍTICA EN NEURONAS HIPOCAMPALES A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título profesional de Ingeniero En Biotecnología Molecular

Dra. Verónica Palma Alvarado
Directora Seminario de Título

Dr. Christian Gonzalez-Billault
Co-Director

Comisión de Evaluación

Presidente Comisión

Magdalena Samuza

Evaluador

Claudia Stange



Santiago de Chile, 5 de Diciembre de 2013



ii) Autobiografía

Nací en Santiago de Chile el año 1983, llegué a una familia con perro (You Patolín) y un hermano y mi papá y mamá.



Estudí en Pudahuel, luego en Estación Central, donde terminé el colegio. La biología siempre fue lo mío y no sé de dónde saqué la palabra “investigación” pero eso era lo que me gustaba.

El 2002 entré a la U, siempre con ganas de entrar a Biotecnología, pero no me alcanzaba con mi puntaje así que entré a Bachillerato donde conocí a los primeros grandes amigos de mi vida. Se suponía que en “Bachi” además tendría tiempo suficiente para decidirme por Biotecnología u otra carrera, pero algo extraño pasó. Se dieron un sinfín de confusiones, casi estudié Ingeniería plan común, casi Bioquímica, quería Biotecnología pero en ese momento no me acordé, así que no sé cómo llegué a Kinesiología. Así no más!

Estuve en la facultad de medicina por un año, me iba bien, hice grandes amigos, pero la duda reapareció y antes de fin de año me acordé que lo mío era la investigación y solicité traslado a Biotec...recuerdo el día que me dijeron que sí, era verano, y me dio pena porque dejaba a mis amigos y había que empezar todo de nuevo.

Ya en Biotec aparecieron otros grandes amigos, mucho estudio y mucha risa. Creo que ya todos mis amigos se titularon, yo me demoré un poquito más por varios motivos (“los motivos no son muchos”), pero acá estoy, poniendo la cara y buscando mi título para ser también colega de mis amigos.

Ahora estoy terminando el pregrado y el doctorado y se siente muy bien...

iii) Agradecimientos

Como toda hazaña (para mí esto lo es) hubo mucha gente a mi lado a la que debo agradecer, por su compañía, consejos, apoyo y amistad.

Para empezar, a mi familia que me aguantaron el cambio de carrera y mis estudios toda la noche, mi pega de fin de semana y mi cada vez más escaso tiempo. A mi mamá que me hacía pantrucas cuando me quedaba a trabajar en la casa, a mi papá que me apoyó en el cambio de carrera, al Tola que fue quien me mencionó Ing. en Biotec primera vez y a la Kikita, mi máxima regalona, la niña más grande de todas. A mi abuelita Lucha, que ya no está, pero siempre me pasaba mis luquitas para que no me faltara. A mis tíos, siempre apoyándome en los estudios y a mi primita que siempre ha sido una hermana.

A los amigos de la U, grandes todos...desde Bachi, donde nacieron las Supernova y "Gremio", de esto ya van más de 10 años de amistad y mucho más. Hemos crecido y madurado (un poco) con gremio. A mis amiguis biotecs, los sardinas, sí, OK, andábamos juntos para todas partes: la Sonita, la Bea, el Andy, el Mati, José, la Valecita, la Pame y la más linda de todas, mi pequeña Chica. A toda la gente que me ha enseñado cosas. La Lore (mi compañera favorita Lorelia...te quiero Lore) que me enseñó a hacer mi primer PCR, a Daniel Bórquez que me enseñó a hacer cultivos, a la Cristi que me enseñó lo que necesité en el lab, siempre con la mejor voluntad, a Pablo Lois, con la mejor de las disposiciones y buena voluntad! A Lorena Saragoni por toda su buena onda y ayudarme con el confocal. A mis amiguis del lab con los que he compartido, la Cata, la Sandrilla y la Pauli, que ha sido un tremendo apoyo en los momentos bueno y los no tan buenos.

A mi Diego que me instó a terminar esta tesis y me ayudó y me dio ánimos cuando el cansancio me dominaba. Gracias por tu compañía mi lindo.

Y a Verónica Palma, que me aguantó hacer esta tesis fuera de todo tiempo y plazo y sacrificando tiempo de mi doctorado y que junto a Christian González-Billaud se dieron el tiempo de corregir y revisar este seminario, y finalmente, han permitido que me titule.

Mis más sinceras gracias.



iv) Índice de contenidos

i) Informe de aprobación de Seminario de Título.....	i
ii) Autobiografía.....	ii
iii) Agradecimientos.....	iii
iv) Índice de contenidos.....	v
v) Lista de tablas.....	viii
vi) Lista de figuras.....	ix
vii) Lista de abreviaturas.....	xi
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Sonic hedgehog (Shh).....	3
Vía de señalización Shh canónica.....	3
Vía de señalización Shh no canónica.....	6
Shh participa en guía axonal mediante la vía no canónica.....	7
El citoesqueleto es la base del crecimiento neurítico y axonal.....	10
GTPasas monoméricas RhoA, Rac1 y Cdc42 regulan la elongación axonal.....	11
Shh y el citoesqueleto de actina.....	14
Neuronas hipocampales, un modelo para estudiar el citoesqueleto y el desarrollo neurítico y axonal.....	15
Shh en el hipocampo.....	16
Hipótesis.....	19
Objetivo general:.....	19

Objetivos específicos:	19
Materiales y Métodos:	20
Materiales.	20
Soluciones y buffers.....	21
Métodos.....	24
Cultivo de neuronas hipocampales de rata.....	24
Cultivo de progenitores cerebelares (GNP).....	25
Tratamiento de placas con PLL	25
Tratamientos farmacológicos.....	26
Experimento de inhibición mediante el uso del anticuerpo 5E1	26
Tratamientos de incorporación de BrdU e inmunofluorescencia anti- BrdU	26
Extracción de RNA.....	27
PCR	27
Extracción de proteínas.	27
Cuantificación de proteínas	28
SDS-PAGE	28
Western blot.....	29
Ensayo de determinación de actividad de RhoGTPasas (G-ELISA).....	29
Fijación de cultivos neuronales.....	30
Inmunofluorescencia.....	30
Inmunofluorescencia por microscopía confocal (IMC).....	31
Análisis de fotos.....	31
Análisis estadístico	32
Resultados.	34
Establecimiento de cultivos hipocampales.	34

Expresión de los componentes de la vía de señalización Shh en neuronas hipocampales embrionarias <i>in vitro</i>	35
Manipulación farmacológica de la vía y sus consecuencias en la elongación neurítica.	37
La modulación de la vía Shh no cambia el carácter neuronal de las células tratadas.	44
La inhibición de la señalización de Shh induce crecimiento neurítico en etapas tempranas del desarrollo de polaridad.....	48
La estimulación de la vía de Shh induce un aumento en la actividad de RhoA	51
Discusión.....	53
Conclusiones.....	62
Proyecciones.....	63
Presentaciones en Congresos.....	63
Bibliografía	64

v) Lista de tablas

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en WB e inmunofluorescencia.

Tabla 2. Listado de partidores usados en este trabajo.

Tabla 3. Agonistas y antagonistas utilizados

Tabla 4. GTPasas monoméricas y su efecto sobre el citoesqueleto de actina.

vi) Lista de figuras

1. Representación esquemática de la vía de señalización canónica de Shh
2. Representación esquemática de la vía de señalización no canónica de Shh
3. Ciclo de activación/inactivación de las GTPasas monoméricas
4. Esquema del desarrollo *in vitro* de neuronas hipocampales embrionarias de rata
5. Esquema experimental del cultivo hipocampal
6. Análisis de LNP usando NeuriteTracer
7. Obtención de cultivos de neuronas hipocampales embrionarias
8. Neuronas hipocampales embrionarias expresan los componentes de la vía Shh
9. La modulación farmacológica de la vía Shh genera alteraciones en la Etapa 4 del desarrollo neuronal *in vitro*
10. La modulación farmacológica de la vía Shh genera alteraciones del desarrollo neuronal *in vitro*
11. Neuronas hipocampales mantienen su identidad neuronal luego del tratamiento con Pur
12. El fenotipo esférico obtenido por el tratamiento con Pur no se explica por proliferación de cultivos de neuronas hipocampales
13. El tratamiento de 72 horas con Pur no induce muerte celular por apoptosis
14. La modulación de la vía Shh por Pur altera la maduración neuronal
15. La expresión y distribución de tubulina-tyr y tubulina-acet no se ven alteradas en el tratamiento con Cyc
16. La inhibición de Shh genera mayor longitud neurítica a las 36 horas
17. La inhibición de la vía de Shh induce un aumento en la fosforilación de LIMK1 y Cofilina

18. La activación de la vía Shh induce la activación de RhoA
19. Modelo propuesto

vii) Lista de abreviaturas

BSA: albúmina de suero bovino

DNAC: ácido desoxinucleico complementario

Cyc: ciclopamina

DMSO: dimetil sulfóxido

E16.5: día 16.5 del desarrollo embrionario

E18.5: día 18.5 del desarrollo embrionario

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GNP: progenitores cerebelares granulares

GPI: glucosilfosfatidilinositol (*glycosylphosphatidylinositol*)

HCl: ácido clorhídrico

HEPES: Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico

HS: suero de caballo

IMC: inmunofluorescencia evaluada por microscopía confocal

kDa: kilodalton

LNP: longitud neurítica promedio

L15: medio Leibovitz

M: molar

mM: milimolar

mA: mili Amperio

mg: miligramos

mm: milímetro

NaCl: cloruro de sodio

NaF: fluoruro de sodio

nM: nanomolar

nm: nanómetros

µg: microgramo

µL: microlitro

µM: micromolar

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PFA: paraformaldehído

pH: potencial de hidrógeno

PLL: poli-L-lisina

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Pur: purmorfamina

PVDF: fluoruro de polivinilideno

RNA_m: ácido rinonucleico mensajero

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SDS: docecil sulfafo de sodio

Shh: Sonic hedgehog

TBST: tampon tris salino con Tritón X-100

T.A: temperatura ambiente

T_m: temperatura de fusión (*melting temperature*)

rpm: revoluciones por minuto

RT: transcriptasa reversa

URL: unidades relativas de luminiscencia

WB: Western blot

Resumen

La vía de señalización de Shh regula importantes eventos moleculares en el sistema nervioso central a través de la transcripción de genes efectores. Sin embargo, algunas funciones parecen ser independientes de la transcripción génica como ocurre con la guía axonal. Estos eventos se han agrupado recientemente como señalización Shh no canónica. Durante su proceso de diferenciación, una neurona genera dendritas y un axón para conectarse con otras neuronas u órganos. Para que se produzcan estas conexiones, las neuritas (axones y dendritas) deben reconocer señales químicas en el ambiente y responden a ellas, elongándose o retrayéndose para establecer dicho contacto. Hay evidencias que Shh podría inducir estos cambios en eventos de guía axonal, pero los mecanismos no han sido del todo descritos. En este seminario de título se propone evaluar si la modulación de la vía Shh tiene efectos sobre el desarrollo neurítico a través de la regulación del citoesqueleto y si esto es mediado por las GTPasas monoméricas RhoA y Rac1. Para ello utilizamos como modelo de estudio, cultivos de neuronas hipocampales embrionarias de rata, sistema muy usado para describir el proceso de elongación neurítica y evaluar cambios a nivel de citoesqueleto *in vitro*. Se usaron agonistas y antagonistas de la vía Shh y se evaluó el efecto sobre la morfología neuronal durante su desarrollo *in vitro* y sobre la actividad de RhoA y Rac1. Los resultados indican que Shh induce la activación de RhoA en neuronas hipocampales provocando una inhibición del desarrollo neurítico. Asimismo, el uso del inhibidor farmacológico Cyc genera un ligero retraso en el desarrollo axonal, lo que coincide con una activación de las proteínas efectoras de Rac1, LIMK1 y cofilina.

Abstract

Shh pathway regulates important cellular and molecular events in central nervous system through the transcription of effector genes. However, some of its functions seem to be transcription-independent as the case of axon guidance. This kind of events are grouped as non-canonical Shh pathway. During their differentiation, a neuron generates dendrites and an axon to connect to other neurons or organs. To produce these connections, neurites (axons and dendrites) must recognize chemical signals in the environment and respond to them, elongating or retracting to establish such contact. There is evidence that Shh might induce these changes in axonal guidance events, but the mechanisms have not been fully described. In this seminar we want to assess whether modulating the pathway has effects on neurite development through the regulation of the cytoskeleton and whether they are mediated by RhoA and Rac1 small GTPases. As a study model, we use cultures of embryonic rat hippocampal neurons, a system widely used to describe the process of neurite elongation and to evaluate the level of cytoskeletal changes *in vitro*. Shh pathway agonists and antagonists were used and the effect on neuronal morphology during development *in vitro* and on the activity of RhoA and Rac1 was assessed. Our results indicate that Shh induces the activation of RhoA in hippocampal neurons resulting in inhibition of neurite outgrowth. Also, the use of the pharmacological inhibitor Cyc generates a slight delay in axonal development, which is consistent with an activation of the Rac1 effector proteins LIMK1 and cofilin.

Introducción.

Sonic hedgehog (Shh)

Shh cumple un papel fundamental durante el desarrollo embrionario y en la mantención de la homeostasis en el organismo adulto. Participa en el *patterning* o formación de patrones celulares en el eje ántero-posterior de las extremidades, durante el desarrollo del tracto gastrointestinal, sistema vascular y otros. Asimismo, cumple un papel clave durante el desarrollo del sistema nervioso central al inducir la determinación de destinos celulares ventrales durante el desarrollo de la médula espinal (Ingham & McMahon, 2001) y actuar como un mitógeno sobre las células troncales embrionarias y adultas del sistema nervioso central (Palma y col., 2005; Fuccillo y col., 2006, Briscoe & Thérond, 2013).

Shh es una glicoproteína que es sintetizada como un pre-péptido de 45 kDa. Dentro de la vía secretoria, Shh se procesa auto-catalíticamente y sufre una doble modificación post-traducciona. Para generar la forma madura con actividad biológica, de 19kDa, en el extremo amino-terminal se agrega un ácido palmítico y en su extremo carboxilo-terminal, un grupo colesterol. Shh es secretado en su forma activa y puede permanecer unido a la membrana de la célula que lo produce o bien, puede difundir para actuar sobre otras células de forma paracrina (Ingham, 2001; Hui & Angers, 2011).

Vía de señalización Shh canónica.

La señalización de la vía está mediada por la función de dos receptores: Patched 1 (Ptch1) y Smoothened (Smo) y por los factores de transcripción Gli1, Gli2 y Gli3. En ausencia de ligando, la vía permanece inactiva, ya que Ptch1 inhibe la señalización intracelular mediada por Smo, pero en presencia de Shh, éste se une a su receptor

Ptch1, quien deja de inhibir a Smo. Una vez activado Smo, se gatilla la transducción de la señal a nivel citoplasmático, lo que permite la generación de formas activadoras de los factores de transcripción Gli (específicamente, Gli2 y en menor medida Gli3), y la posterior transcripción de genes blancos, tales como *Gli1* y *Ptch1*, entre otros, siendo Gli1 otro efector positivo de la vía (Ruiz i Altaba y col., 2002; Hui & Angers, 2011) (Figura 1).

La señalización de esta vía se complejiza con la participación de otros co-receptores. *Cdon/Cdo* (*cell adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes*), *Boc* (*Brother of Cdon*) y *Gas1* (*growth arrest specific gene 1*), como moduladores positivos y *Hhip* (*Hh-interacting protein 1*), con efecto negativo. *Cdo* y *Boc* son glicoproteínas de membrana que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y poseen un dominio de unión a Shh. Ambos pueden heterodimerizar y sumar a *Ptch1* como tercer participante, favoreciendo la afinidad por el ligando. Dentro de este trío, tanto *Cdo* y *Boc* pueden ser reemplazados por un tercer co-receptor, *Gas1* proteína anclada a la membrana mediante un tallo GPI que también une a Shh (Sánchez-Arrones y col., 2012).

Hhip también es una glicoproteína anclada a la membrana y es un gen regulado positivamente por la vía. Tendría un efecto similar al de *Ptch1* al unir Shh, pero impide la señalización y regula negativamente a la vía (Jeong y col., 2005; Holtz y col., 2013).

La vía de Shh puede manipularse farmacológicamente. Para inhibir la vía se usa principalmente Ciclopamina (*Cyc*), alcaloide que se une a Smo y actúa como antagonista de la vía y 5E1, anticuerpo monoclonal que se une a Shh e impide su unión a *Ptch1*. Como agonista se ha utilizado Purmorfarmina (*Pur*), purina que también se une a Smo pero actúa como agonista, activando la vía tal como lo hace el uso de

se une a Smo pero actúa como agonista, activando la vía tal como lo hace el uso de Shh recombinante (Dahmane & Ruiz i Altaba, 1999; Stanton & Peng, 2010; Carney & Ingham, 2013).

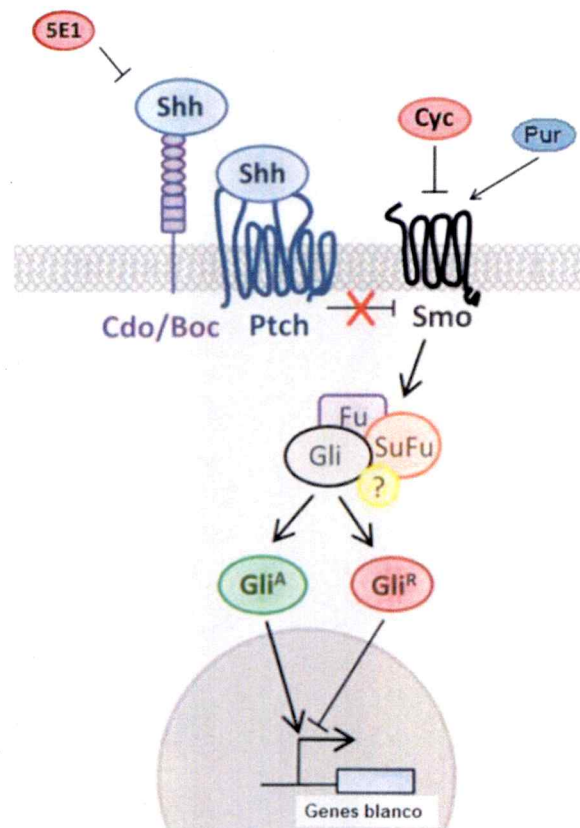


Figura 1. Representación esquemática de la vía de señalización canónica de Shh. En ausencia de ligando, Ptch1 inhibe la activación del co-receptor Smo, esto se traduce en un enriquecimiento de formas represoras de los factores Gli en el citoplasma (Gli^R), los que actúan como represores de la transcripción. Cuando Shh se une a su co-receptor Ptch1, Smo se activa y transduce la señal hacia el citoplasma, donde mediante una compleja cascada de fosforilaciones mediadas por Fu, SUFU y otras, los factores Gli sufren un corte proteolítico parcial que genera formas activadoras (Gli^A) que se trasladan al núcleo y permiten la transcripción de genes blancos. Shh puede unirse a otros co-receptores (Cdo/Boc) pero aun se

desconocen los efectos intracelulares que se pueden gatillar. (Modificado de Sánchez-Camacho & Bovolenta, 2009).

Vía de señalización Shh no canónica

Existen evidencias que indican que la señalización no canónica puede ocurrir a través de Ptch1, Smo y otros co-receptores, siendo sensible a Cyc y Pur, pero a diferencia de la señalización canónica, la transducción de la señal no genera formas activadoras de los factores Gli, sino que se transduce a nivel de membrana, a través de Smo, que se comporta como receptor asociado a proteína G (Riobo y col., 2006a). Estas respuestas se caracterizan por ser rápidas, es decir, luego del estímulo de Shh las células responden dentro de minutos, no horas, como supone la transcripción de nuevos genes (Bijlsma y col. 2007, Sánchez-Camacho & Bovolenta, 2009). Esta vía no canónica implica la transducción de la señal mediante la activación de vías de señalización como PI3K/Akt (Kanda y col., 2003), cAMP/PKA (Sheng y col., 2006), ERK1/2/PKC- δ (Riobo y col. 2006b) en células endoteliales y RhoA/ROCK (Chinchilla y col., 2010; Renault y col., 2010, Polizio y col., 2011) en células endoteliales y fibroblastos (Figura 2).

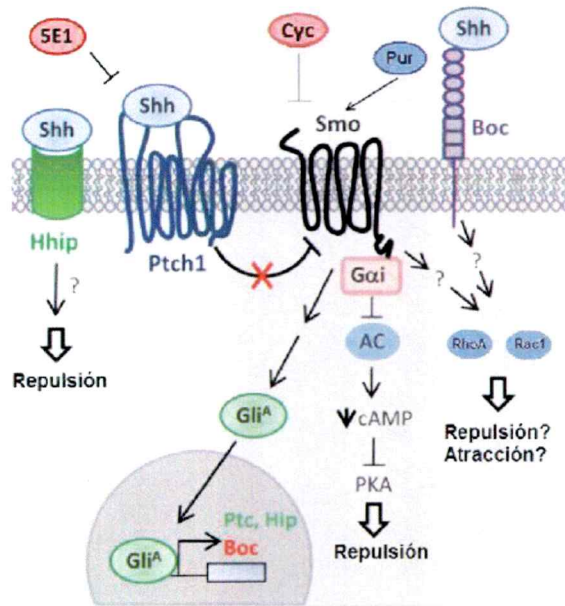


Figura 2. Representación esquemática de la vía de señalización no canónica de Shh. En la señalización no-canónica también están involucrados Ptch1 y Smo, pero las respuestas generadas dependen de los factores Gli, sino que se generan a nivel de membrana y son independientes de transcripción. Smo es un receptor asociado a proteínas G, específicamente de la subfamilia G_i ($G_{\alpha i}$ en el ejemplo). Smo gatilla las respuestas a corto plazo, como por ejemplo, incrementos en los niveles de calcio y aquellas relacionadas con cambios en el citoesqueleto de actina. Se han descrito otros co-receptores para Shh que pueden mediar efectos no canónicos, como Hhip y Boc (Modificado de Sánchez-Camacho & Bovolenta, 2009).

Shh participa en guía axonal mediante la vía no canónica

Las primeras descripciones provienen de evidencias que demuestran que Shh está involucrado en la guía axonal que ocurre durante la formación del quiasma óptico y en la migración de axones comisurales en la médula espinal (Charron y col., 2003).

Durante la formación del nervio óptico, los axones de las neuronas retinoganglionares (NRG) migran a través del diencéfalo para llegar al tectum óptico. En

mamíferos, la mayoría de estas fibras continúa ipsilateral hasta el colículo superior, pero un alto porcentaje se decusa y llega hasta el colículo contralateral. Shh se expresa en este contexto celular. Existen dos fuentes del morfógeno: las mismas NRG y el quiasma óptico, y ambas jugarían papeles distintos. El Shh producido por las NRG, induce la elongación axonal y su direccionalidad. Por el contrario, el Shh presente en el quiasma induce la repulsión de los axones y su consecuente cruce por el quiasma (Trousse y col., 2001; Sánchez-Camacho & Bovolenta, 2009). Este efecto dual depende de la concentración de Shh, que promueve o inhibe el crecimiento axonal.

El cruce de axones de forma ipsi o contralateral estaría también coordinado por la señalización de otra familia de factores de guía axonal. Las ephrinas son proteínas transmembrana que se expresan durante el desarrollo del sistema nervioso central y son reconocidas como ligandos del receptor de ephrinas, Eph. Existen complejos de ephrinas-Eph del tipo A o B, los primeros están asociados a la membrana mediante tallo GPI, mientras que las del tipo B poseen un segmento transmembrana (Rodger y col., 2012). En el quiasma de mamíferos, se expresa ephrin-B el cual interactúa con EphB1 que es expresada por una fracción de los axones de las NRG, esta interacción induce la repulsión de estos axones en la línea media del quiasma lo que tiene como consecuencia que los axones no crucen y sigan el tracto ipsilateral hacia el tectum óptico (Williams y col., 2003).

Los efectos quimiorrepelentes en axones de NRG han sido adjudicados a la señalización de la proteína quinasa Ca ($\text{PKC}\alpha$) y la quinasa unida a integrina ILK (*integrin-linked kinase*). En presencia de Shh, aumentan los niveles de Ca^{2+} quien activa a $\text{PKC}\alpha$ e ILK en los conos de crecimiento. $\text{PKC}\alpha$ fosforila ILK en treonina-173 y -181. La inhibición de $\text{PKC}\alpha$ induce el colapso del cono de crecimiento y genera una respuesta repulsiva (Guo y col., 2012).

El efecto quimioattractante no ha sido del todo aclarado, pero se sabe que bajos niveles de Shh resultan atractivos para NRG. Neuronas en cultivo desafiadas a migrar en respuesta a Shh, prefieren hacerlo sobre una superficie con bajas concentraciones de Shh. En el mismo estudio, se vio que altas concentraciones de Shh tenía efectos negativos sobre el crecimiento neurítico (Kolpak y col., 2005).

El efecto dual de Shh también ocurre en la guía de axones comisurales en la médula espinal, los que migran desde dorsal a ventral en respuesta a la atracción que ejerce Netrina-1 (Kennedy y col., 1994). Pero en mutantes de Netrina 1, aún ocurre migración axonal, lo que se atribuyó al efecto de Shh (Charron y col., 2003). Shh no induce el crecimiento del axón, pero sí su atracción hacia la línea media ventral, donde los axones cruzan hacia el lado contrario. La ausencia de Shh o de Smo, impiden este proceso y se observa que los axones se detienen en este punto (Charron y col., 2003). Adicionalmente, se ha descrito que Shh participa en la guía de estos axones una vez que han cruzado la línea media, esta vez a lo largo del eje longitudinal, pero el efecto sobre el cono axonal es repelente. Se ha propuesto que este efecto diferencial se debe al uso de co-receptores adicionales negativos como transductores de la señal, como lo es Hhip. Los niveles de Hhip aumentan al momento en que los axones doblan hacia el eje longitudinal, pero el mecanismo involucrado aún no ha sido dilucidado (Bourikas y col., 2005).

Los efectos quimioattractantes de Shh en axones comisurales ocurren mediante la activación de la familia de quinasas Src (SFKs: Src y Fyn) en forma dependiente de Smo y Boc en el cono de crecimiento. En presencia de una gradiente de Shh, Src y Fyn son fosforiladas y se distribuyen simétricamente en el cono de crecimiento de los axones comisurales. Esta respuesta es localizada y polarizada, lo que induce un

cambio de dirección del axón ya que las quinasas de la familia SFK modulan el citoesqueleto y la dinámica de filopodios (Yam y col., 2009).

Los efectos de Shh sobre la migración durante el desarrollo del sistema nervioso central también se observan en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio de ratón (mDN: *midbrain dopaminergic neurons*); Shh ejerce un efecto quimioattractante *in vitro* e *in vivo* durante el desarrollo (días embrionarios E12.5 y E15.5). Las mDN expresan Ptch1 y Smo, pero no expresan los factores Gli 1, 2 y 3 lo que apoya una acción de la vía Shh no canónica, independiente de la transcripción de nuevos genes, respecto del crecimiento axonal (Hammond y col., 2009).

En el sistema nervioso periférico, se ha descrito que Shh potencia la señalización de RAR β 2 (*retinoic acid receptor β 2*) durante el desarrollo neurítico en los ganglios de la raíz dorsal (So y col., 2006).

Así, los eventos mediados por Shh pueden ser agrupados en dos grupos: aquellos mediados por la vía canónica, y aquellos independientes de transcripción génica, asociados a la vía no canónica (Figuras 2).

Los antecedentes expuestos hacen suponer que los efectos inducidos por Shh sobre la extensión neurítica ocurren por activación de la vía no canónica, lo que implica que ocurran modificaciones en las extensiones celulares y en el axón, respondiendo a los estímulos y/o señales químicas en tiempos cortos.

El citoesqueleto es la base del crecimiento neurítico y axonal

El citoesqueleto de actina y de microtúbulos subyace a la dinámica del desarrollo neuronal y del crecimiento axonal. La elongación de neuritas depende de cambios dinámicos en el citoesqueleto de actina como la formación de filopodios y lamelipodios. El desarrollo de un axón comienza cuando una de las neuritas menores de una neurona inmadura comienza a elongarse a una tasa mayor que las otras; a medida que

continúa este crecimiento, se diferencia morfológica y bioquímicamente de las otras neuritas, convirtiéndose en un axón prospectivo. Este evento se corresponde con la generación de la "polaridad neuronal", es decir, es el paso de un estado de simetría no polarizado (neuritas de igual longitud) a un estado polarizado en que la asimetría está dada por la generación de esta estructura especializada diferente de las demás, el axón. (Arimura & Kaibuchi 2007).

In vivo, el axón debe lograr la conectividad con otra neurona u órgano, para lo cual debe orientarse y dirigirse hacia su objetivo. Así, el axón desarrolla una estructura especializada en el extremo distal, que le permite responder a los distintos estímulos del medio y lograr la conectividad correcta, estructura denominada cono de crecimiento (revisado en González-Billault y col., 2012).

El cono de crecimiento constituye el frente de avance del axón, ya que posee receptores que reconocen las señales químicas del ambiente para que el axón avance o sea repelido, las señales químicas son traducidas y generan modificaciones en el citoesqueleto del cono. Estas respuestas están mediadas principalmente por el citoesqueleto de actina, que es modulado por las proteínas de la familia Rho GTPasas, pertenecientes a la superfamilia de proteínas Ras (Jaffe & Hall, 2005).

GTPasas monoméricas RhoA, Rac1 y Cdc42 regulan la elongación axonal

Las proteínas Rho son GTPasas monoméricas y actúan como un interruptor molecular, ya que ciclan entre un estado activo (unido a GTP) y un estado inactivo (unido a GDP) (Figura 3). La transición entre ambos estados es controlada por un conjunto de proteínas accesorias que permiten el intercambio de GDP por GTP (GEFs: *guanine nucleotide exchange factor*), otras que estimulan la actividad GTPásica intrínseca de las Rho y promueven la inactivación de ellas (GAPs: *GTPase activating proteins*) y un grupo que mantiene el estado inactivado ya que bloquearían la

activación espontánea (GDIs: *guanine nucleotide dissociation inhibitors*). Se encuentran en todos los eucariontes y en mamíferos se encuentran 22 genes que codifican para estas proteínas, siendo las más estudiadas RhoA, Rac1 y Cdc42 (Govek y col., 2005). Estas proteínas están involucrados en una amplia variedad de funciones celulares que dependen de la dinámica del citoesqueleto, tales como la polaridad celular, tráfico vesicular y el ciclo celular (Luo, 2000).

En neuronas, la actividad de RhoA se correlaciona con la retracción del cono de crecimiento, su activación (RhoA-GTP) le permite interactuar con proteínas efectoras, como ROCK (RhoA quinasa) que a su vez fosforila a otras proteínas que influyen directamente en el estado de la actina. Uno de los blancos de ROCK es MYPT1 (*myosin phosphatase target subunit 1*), subunidad de PP1 (*protein phosphatase 1*) fosfatasa de la miosina. Cuando MYPT1 es fosforilada por ROCK, ésta se activa y desfosforila a su vez a la cadena liviana de la miosina MLP (*myosin light chain*), proteína que en estado desfosforilado se inactiva e induce la retracción del axón y el colapso del cono de crecimiento (Ito y col., 2004; Birukova y col., 2006).

La activación de Rac1 y Cdc42 induce la formación de lamelipodios y filópodos, respectivamente, ambas constituyen estructuras ricas en filamentos de actina y permiten la elongación, al contrario de lo observado en las funciones de RhoA. LIMK1 es una proteína efectora de Rac1 y fosforila a Cofilina (Yang y col., 1998), ésta corta a los filamentos de actina y genera sitios de polimerización para que éstos se elonguen (Jaffe & Hall, 2005). La fosforilación de cofilina disminuye el *turn-over* de actina por lo cual se favorece la formación de lamelipodios (revisado en González-Billautl y col., 2012).

Tabla 4. GTPasas monoméricas y su efecto sobre el citoesqueleto de actina

Miembro de la familia Rho	Efecto sobre el citoesqueleto de actina	Efecto sobre la elongación neurítica	Proteínas efectoras
RhoA	Formación de fibras de estrés	Retracción	ROCK
Rac1	Formación de lamelipodios	Elongación	PAK1
Cdc42	Formación de filopodios	Elongación	PAK1 y PAK3

Los efectos opuestos que tienen RhoA y Rac1/Cdc42 también son explicados con la inhibición mutua que ocurre entre ellas (revisado en González-Billault y col., 2012). La participación en conjunto de estas GTPasas y la dinámica de lamelipodios, filopodios y fibras de estrés, causan la elongación o retracción neta. En este contexto, se propuso un modelo matemático que busca explicar la conversación entre estas 3 proteínas y sus proteínas reguladoras GEF. Asumiendo los efectos descritos en la Tabla 4 se determina que la actividad basal de estas proteínas está en constante oscilación y bajo un cierto umbral de actividad, el efecto neto sobre el citoesqueleto es cero elongación, pero sobre ciertos niveles de actividad, ocurre una oscilación del efecto neto que conllevan a la formación de extensiones citoplasmáticas (Sakumura y col., 2005).

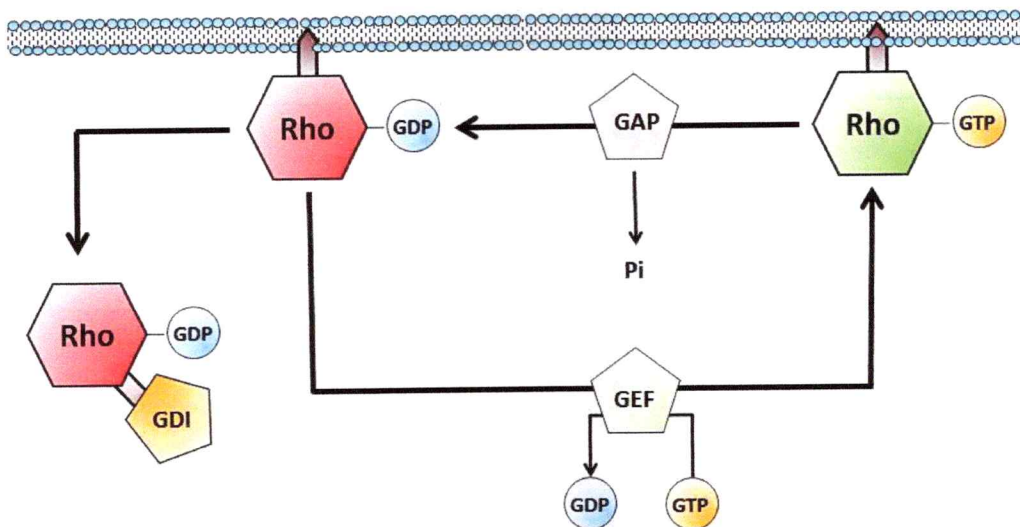


Figura 3. Ciclo de activación/inactivación de las GTPasas monoméricas. Una GTPasa monomérica está activa cuando está unida a GTP, en este estado puede unirse específicamente a proteínas efectoras, las que no reconocen la forma unida GDP. En el caso de RhoA y Rac1, las proteínas efectoras actúan directamente sobre el citoesqueleto de actina. La actividad GTPásica intrínseca de estas proteínas es baja, por lo que requieren de proteínas auxiliares que potencien su actividad intrínseca (GAP). En el estado inactivo, las proteínas Rho pueden asociarse a membranas mediante un extremo lipídico que es reconocido por las proteínas GDI, interacción que las mantiene inactivas. Finalmente, para que la proteína Rho pueda activarse nuevamente, debe intercambiar el grupo GDP por GTP, para lo cual otra proteína accesoria (GEF) participa y realiza este intercambio.

Shh y el citoesqueleto de actina

Son escasos los antecedentes que indican que Shh actúa sobre el citoesqueleto de actina. En células endoteliales humanas, Shh induce la activación de RhoA (Chinchilla y col., 2010; Renault y col., 2010) y en fibroblastos embrionarios de ratón se ha propuesto que induce la activación tanto de RhoA como de Rac1 (Polizio y col., 2011).

En este contexto, se ha descrito que durante la formación de espinas dendríticas en neuronas hipocampales, el dominio intracelular de Smo interactúa con Tiam-1, una GEF de Rac1, lo que impediría la activación de Rac1. El modelo que plantean es que en ausencia de Shh, Tiam-1 interactúa con Smo y esto impediría la activación de Rac1, pero en presencia de Shh, Tiam-1 dejaría su interacción con Smo y quedaría libre de activar a Rac1 (Sasaki y col., 2010). Sin embargo, no hay mayores antecedentes que den cuenta de un posible efecto de Shh sobre el citoesqueleto.

Neuronas hipocampales, un modelo para estudiar el citoesqueleto y el desarrollo neurítico y axonal

El cultivo de neuronas hipocampales constituye un modelo *in vitro* para estudiar la dinámica del citoesqueleto durante la elongación neurítica y axonal. (Banker & Cowan, 1977). Es un modelo ampliamente caracterizado e imita *in vitro* el desarrollo que ocurre *in vivo*, por lo que permite estudiar el proceso de maduración y polarización neuronal. La diferenciación neuronal en este modelo ocurre de forma estereotipada, y se han descrito cinco estadios en este proceso (Figura 4). Cuando las células son sembradas generan lamelipodios y algunos filopodios de pequeño tamaño (Estadio 1). Luego, se generan extensiones citoplasmáticas pequeñas que corresponden a neuritas menores, de longitudes similares (Estadio 2), una de estas neuritas menores crece más que las otras y se convierte en un axón prospectivo (Estadio 3). Posteriormente a la maduración del axón, las neuritas menores se desarrollan como dendritas (Estadio 4) y finalmente, aparecen en las dendritas estructuras especializadas en la transmisión sináptica, las espinas dendríticas (Estadio 5) (Arimura & Kaibuchi, 2007).

La gran conservación y sincronización de las células en el cultivo permite evaluar alteraciones que pueden ocurrir en respuesta a la intervención del investigador usando

diversos estímulos, lo que facilita el estudio de diversos factores de crecimiento o inhibidores sobre el proceso de maduración neuronal.

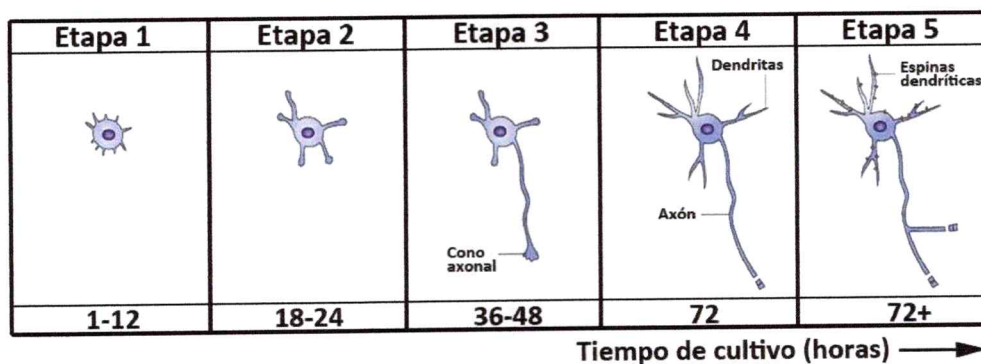


Figura 4. Esquema del desarrollo *in vitro* de neuronas hipocampales embrionarias de rata. Se han descrito 5 etapas que en este proceso: cuando las células son sembradas generan lamelipodios y algunos filopodios de pequeño tamaño (Etapa1, 1-12 horas post-siembrada), las pequeñas extensiones generan conos de crecimiento en los extremos y crecen como neuritas inmaduras de tamaño similar (Etapa 2: 18-24 horas), una de las neuritas se alarga más que las otras y genera un axón prospectivo (Etapa 3: 36-48 horas), se define el axón y las neuritas menores se desarrollan como dendritas (Etapa 4: 72 horas), finalmente, se generan espinas dendríticas y se alcanza la madurez neuronal (Etapa 5: más de 72 horas) (Modificado de Arimura, N. & Kaibushi, K., 2007).

Shh en el hipocampo

Las bases de datos públicas, como Allen Brain Atlas (www.brain-map.org), indican que tanto durante el desarrollo embrionario como en estadios post-natales los componentes de esta vía de señalización se expresan en el hipocampo de ratón. En rata también se describen los componentes de la vía en el adulto (Traiffort y col., 1998). Sin embargo, las publicaciones se relacionan principalmente con animales

adultos y analizan el efecto canónico que tiene Shh sobre la proliferación de células madre en el giro dentado (Sims y col., 2009; Breuning y col., 2008).

Se ha estudiado la distribución de los receptores Ptch1 y Smo en neuronas hipocampales embrionarias y se describe que estos receptores se distribuyen principalmente en las neuritas y en el cono de crecimiento, específicamente, en neuronas en estadio 2-3, de acuerdo a lo mostrado en la Figura 4. Ptch1 se expresa en las regiones distales de neuritas y Smo en el tallo de estas extensiones. En neuronas maduras, esta distribución cambia ya que los co-receptores se encuentran en las neuritas maduras y espinas dendríticas (Petralia y col., 2011).

En un estudio sobre el efecto de la vía de Shh en la función sináptica en el hipocampo se observó que la estimulación de la vía favorece la formación de terminales presinápticas y potencia la excitabilidad neuronal y la liberación de neurotransmisores (Mitchell, 2012).

Con los antecedentes planteados y considerando que los componentes de la vía de Shh se expresan en el hipocampo, nos preguntamos si la vía de señalización de Shh puede modular de manera no canónica el crecimiento neurítico y axonal en neuronas hipocampales a través de la modulación de la actividad de las GTPasas monoméricas de la familia Rho, RhoA y Rac1.

Para responder a esta pregunta se estudiará el efecto de la inhibición (Cyc) o activación (Pur) de la vía Shh sobre el proceso de neuritogénesis y el establecimiento de la polaridad, con un principal interés en las alteraciones que se generen a nivel de citoesqueleto de actina. Para ello se evaluará el fenotipo neuronal bajo estos tratamientos por microscopía confocal y se analizará el efecto sobre el citoesqueleto del actina, analizando la actividad de RhoA y Rac1 así como de proteínas efectoras

que reportan la actividad de las GTPasas monoméricas ya mencionadas, como son LIMK1 y Cofilina.

Hipótesis

Shh modula la extensión neurítica en neuronas hipocampales embrionarias *in vitro* a través de su efecto sobre el citoesqueleto de actina, al modular la actividad de la GTPasa monomérica RhoA y de las proteínas efectoras de Rac1, LIMK1 y Cofilina.

Objetivo general:

Evaluar el papel de la vía de señalización de Shh sobre el proceso de neuritogénesis en neuronas hipocampales embrionarias de rata *in vitro*.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de la pérdida y ganancia de función de la vía Shh sobre el proceso de neuritogénesis de neuronas hipocampales embrionarias *in vitro*.
2. Evaluar el efecto de la pérdida y ganancia de función de la Shh sobre la actividad de RhoA y sobre las proteínas efectoras Rac1, LIMK1 y Cofilina en neuronas hipocampales embrionarias *in vitro*.

Materiales y Métodos:

Materiales.

- Los reactivos de cultivo: medio Neurobasal, N2, B27, glutamina, piruvato, medio L15, antibiótico penicilina/estreptomicina, son de Invitrogen (Estados Unidos).
- Desoxinucleótidos, β -mercaptoetanol, mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico son de Invitrogen (Estados Unidos).
- Medio de montaje FluorSave y Pur son de Calbiochem (Alemania).
- Cyc es de Infinity Pharmaceuticals Inc. (Estados Unidos).
- Shh recombinante es de R&D (Estados Unidos).
- Suero de caballo (HS) es de Hyclone (Estados Unidos).
- Los solventes de grado técnico (etanol y metanol) son de TCL (Chile) y los de grado molecular (etanol absoluto, cloroformo, metanol, alcohol isopropílico, ácido, acético) y Rojo ponceau son de Merck (Alemania).
- Las sales Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KCl, SDS, EDTA, PFA, acrilamida/bisacrilamida, los solventes HCl, NaOH, TEMED, los detergentes Triton X-100 y Tween-20 y BSA (albúmina de suero bovino) son de Winkler Ltda. (Chile).
- El material de cultivo es de Corning (Estados Unidos).
- El reactivo luminol (Pierce ECL) es de Thermos (Estados Unidos).
- RNAsolv es de Omega Bio-tek (Estados Unidos).
- Agarosa es de LONZA (Estados Unidos).
- El DMSO, PLL, sacarosa, Coomassie Blue G son de Sigma-Aldrich Inc. (Estados Unidos).
- El kit G-ELISA es de Cytoskeleton (Estados Unidos).

- La DNA polimerasa GoTaq es que Promega (Estados Unidos) y la transcriptasa reversa RevertAid es de Fermentas (Estados Unidos).
- El anticuerpo monoclonal 5E1 proviene del Hybridoma Bank (Iowa, Estados Unidos).
- Los anticuerpos utilizados se detallan en la **Tabla 1**.

Soluciones y buffers.

Buffer de carga 6x: tris-HCL 0,2 5M (pH= 6,8), SDS 8%, glicerol 40%, Bromofenol 0,2%, β -mercaptoetanol 20%.

Buffer de corrida: tris-HCL 0,025 M (pH= 8,3), glicina 0,192 M, SDS 0,1%.

Buffer de lisis de proteínas: HEPES 200 μ M, NaCl 150 μ M, NaF 100 μ M, ácido okadaico 1 μ M, EDTA 5 μ M, Triton-X100 1%, más cóctel de inhibidores de proteasas (PMSF 10 mg/ml, Aprotinina 10 mg/ml, Pepstatina 1 mg/ml, Leupeptina 10 mg/ml).

Buffer de transferencia: tris-HCL 0,025 M (pH= 8,3), glicina 0,192 M, SDS 0,1%, metanol 20%.

L15: medio Leibovitz

Medio de mantención neuronal: medio Neurobasal suplementado con N2 (100X), B27 (50X), glutamina (100X), piruvato (100X), antibiótico penicilina/estreptomicina (100X).

Medio de siembra neuronal: medio Neurobasal suplementado con suero de caballo (HS) (10%), glutamina (100X), piruvato (100X), antibiótico penicilina/estreptomicina (100X).

PBS 1X: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM. Na_2HPO_4 4,3 mM. KH_2PO_4 1,47 mM (pH= 7.4)

PBS-TX100 0,01%: TX100 al 0,01% en PBS 1X.

PBS-BSA 5%: BSA al 5% en PBS 1X.

PBS-BSA 1%: BSA al 1% en PBS 1X.

Rojo ponceau 0,1%: ácido acético 5%, rojo ponceau 0,1%, agua destilada.

TBS 10X: NaCl 1,4 M, KCl 26 mM, tris 246 mM.

TBST-0,1%: tween-10 al 0,1% en TBS 1X.

Solución Bradford: Coomassie blue G 0,5 mg/mL, metanol 25%, H₃PO₄.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en WB e inmunofluorescencia.

Anticuerpo 1°	Reactivo a	Marca
BrdU	Ratón	Dako M0744
Caspasa-3	Conejo	Cell Signalling 96615
Cofilina	Ratón	Sigma Aldrich Inc. C8736
P-cofilina	Ratón	Regalo de J. Bamberg, USA
LIMK1	Cabra	Santa Cruz sc-8387
P-LIMK1	Conejo	Cell Signaling 3841
βIII-tubulina	Ratón	Promega G7121
Tubulina tirosinada	Ratón	Sigma Aldrich Inc T9028
Tubulina acetilada	Ratón	Sigma Aldrich Inc T6793
NeuN	Ratón	Chemicon MAB377
Anticuerpo 2°		
Alexa 488	Ratón	Promega
Alexa 547	Ratón	Promega
DyLigth 488	Ratón	Jackson InmunoResearch
Conjugado a peroxidasa	Ratón	Jackson InmunoResearch
Conjugado a peroxidasa	Conejo	Jackson InmunoResearch
Conjugado a peroxidasa	Cabra	Jackson InmunoResearch
Otras tinciones		
Faloidina		Molecular Probes
TO-PRO3		Invitrogen

Tabla 2. Listado de partidores usados en este trabajo.

Gen	Partidor sentido	Partidor anti-sentido	Tm (°C)	N° pb
<i>Gli1</i>	GCTGCCTATAGCCAGT GTC	GAAGCAGGTGCAAAGCC AG	55	488
<i>Ptch1</i>	CAACGGCCTACGAGAC ACCT	GACCCTGCAAGCATCAG TCA	55	495
<i>Shh</i>	TCTGTGATGAACCAGT GGCC	GCCACGGAGTTCTCTGC TTT	55	242
<i>Smo</i>	GTGGCTTCTAGTGCTG ACGCC	TGCCGTACAACCTCCAGTG ACG	55	596
<i>Hprt</i>	CCTGCTGGATTACATTA AAGCACTG	GTCAAGGGCATATCCAAC AACAAAC	55	370

Tabla 3. Agonistas y antagonistas utilizados.

Tratamiento	Concentración stock	Concentración uso
Ciclopamina	10 mM	10 µM
Purformamina	10 mM	10 µM
Shh-N	100 µg/ml	3,3 µg/ml
5E1	31 mg/ml	5 mg/ml

Métodos

Cultivo de neuronas hipocampales de rata

Para obtener neuronas hipocampales embrionarias se usaron embriones de rata (Sprague Dawley) al día 18.5 de desarrollo embrionario. Se realiza el protocolo de disección descrito por Dotti (Dotti y col., 1998 con modificaciones; Kaech & Banker, 2006): la madre es anestesiada con éter por 5 minutos, luego de lo cual es sacrificada mediante dislocación cervical. Luego, se limpia la superficie abdominal con abundante etanol al 70% y se disecciona la piel y músculos subyacentes, lo que expone a los embriones, éstos se extraen y se mantienen en PBS 1X estéril. Luego, en campana de flujo laminar, los embriones son decapitados y se extraen los cerebros, los que se mantienen en medio L15. Bajo la lupa, se expone la superficie interna de los hemisferios cerebrales y se extraen los hipocampos, que son mantenidos en L15 hasta su procesamiento. Luego de reunir los hipocampos de todos los embriones, son digeridos en tripsina 0.05% por 20 minutos a 37°C (agitando suavemente cada 5 min), transcurrido este tiempo, la tripsina es inactivada usando medio de siembra y luego son disgregados con pipeta pasteur. Posteriormente, las células vivas son contadas y se evalúa viabilidad por el método de exclusión de Azul de Tripán. Las células son sembradas en medio de siembra en placas previamente tratadas con PLL. Luego de 1 hora, se reemplaza el medio de siembra por medio de mantención y se considera este punto como tiempo= 0.

Para inmunofluorescencia, las células son sembradas sobre cubreobjetos de 12 mm en placas de 24 pocillos (a una densidad de 20.000 células/pocillo) y para extracción de proteínas, las células son sembradas en placas de 6 pocillos (900.000 células/pocillo).

Los cultivos se mantienen por 18, 24, 48 y 72 horas en cultivo en incubadora a 37°C con inyección de 5% de CO₂.

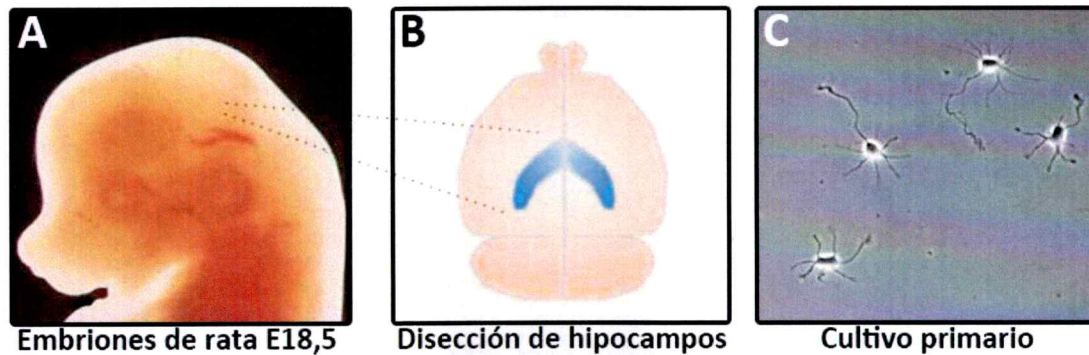


Figura 5. Esquema experimental del cultivo hipocampal. A. Los cultivos hipocampales se obtienen desde ratas en el día 18.5 de desarrollo embrionario. B. Representación esquemática de la localización del hipocampo (en azul) en una visión dorsal del cerebro. C. Imagen representativa de un cultivo de neuronas hipocampales (Modificado de Kaech & Banker, 2006).

Cultivo de progenitores cerebelares (GNP)

El cultivo se realizó según lo descrito en Wechsler-Reya & Scott (1999). Brevemente, se utilizaron animales recién nacidos, (entre 3-6 días post-nacimiento) de la cepa Balb/c. Mediante disección, se extraen los cerebelos y se digieren en papaína (10 U/ml) y DNasa (250 U/ml) por 30 minutos a 37°C. Luego el tejido es disgregado y es sembrado sobre placas pretratadas con PLL (100 µg/ml).

Tratamiento de placas con PLL

Para placas de 6 pocillos, se agrega 1 mL de PLL (1 mg/ml) y se distribuye por toda la superficie y para placas de 24 pocillos, se debe poner un cubreobjeto de 12 mm estéril en cada pocillo y se agregan 100 µL de PLL sobre cada uno de ellos, cuidando que quede cubierta toda la superficie. Para ambos casos, las placas se mantienen en incubadora a 37°C toda la noche. Luego de este tiempo, la PLL es retirada y las placas

son lavadas con agua estéril, se realizan 5 lavados de 20 min cada uno a T.A. Posteriormente, las placas regresan a la incubadora por 30 min para secar cualquier remanente de agua.

Tratamientos farmacológicos

Se utilizaron 2 estrategias para los tratamientos farmacológicos: tiempos cortos y tiempos largos. Para lo primero, las células fueron tratadas con Pur por 15 minutos al final del cultivo. Para tratamientos largos, Cyc, Pur, Shh y 5E1 fueron usados desde tiempo= 0 hasta los tiempos indicados (18, 24, 36, 48 y 72 horas). Luego de los tiempos descritos, las células fueron fijadas para realizar inmunofluorescencia o fueron lisadas con buffer de lisis para obtener extractos de proteínas o con RNASolv para obtener RNA.

Experimento de inhibición mediante el uso del anticuerpo 5E1

En tiempo= 0, se agrega 5E1 (5 mg/ml) en medio de mantención usando como control el anticuerpo denaturado (expuesto a 95°C por 10 min) y Cyc. Luego de 36 horas, las células son fijadas para realizar inmunofluorescencia contra β 3-tubulina y tinción nuclear con TO-PRO3 para posteriormente cuantificar la LNP.

Tratamientos de incorporación de BrdU e inmunofluorescencia anti- BrdU

En neuronas hipocampales se realizó un pulso de BrdU en las últimas 6 horas de cultivo en presencia o ausencia de tratamientos farmacológicos. En GNP el pulso fue de 3 horas. En ambos casos se usó BrdU 10 μ g/ml. Luego del pulso, las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas en PFA 4% para continuar con el proceso de inmunofluorescencia anti- BrdU. Se permeabilizaron en PBS-Tritón X-100 al 0.1% (PBT) durante 5 minutos y se trataron con HCL 2N durante 30 minutos a 37°C para permitir la penetración del anticuerpo a las zonas en que se integró el BrdU. Este

tratamiento se inactiva con tratamiento con Borax 0.1M pH 8.5 durante 10 minutos. Luego de este paso, se sigue el protocolo para inmunofluorescencia descrito en breve.

Extracción de RNA

Se extrae RNA desde cerebelo e hipocampo de ratón en E16.5 (periodo de desarrollo equivalente al periodo E18.5 de rata), se usa tejido de ratón pues los partidores con los que se cuenta son específicos para éste y no para rata. Se usa cerebelo como control positivo ya que la vía de Shh está activa en esta región (Wechsler-Reya & Scott 1999).

El tejido obtenido se procesa con RNASolv y se disgrega con una pipeta de tuberculina hasta que se obtiene una solución homogénea. Luego se sigue el protocolo estándar para la extracción de RNA por RNASolv.

Luego de la obtención del RNA, éste se cuantifica en espectrofotómetro y se realiza transcripción reversa (RT) a partir de 1 µg para la obtención de DNAC usando la enzima RevertAid. Para asegurarnos que las muestras no estaban contaminadas con DNA genómico, se realizó como control la reacción sin la enzima transcriptasa reversa (RT-).

PCR

Se usa DNAC obtenido de cerebelo e hipocampo para evaluar la expresión de los componentes de la vía Shh. En la Tabla 2 se detallan los partidores, la Tm y los tamaños de los amplicones utilizados. Todo se realizó amplificando hasta 30 ciclos.

Extracción de proteínas

Transcurridos 36 ó 72 horas de tratamiento, las placas son sacadas desde el incubador, se elimina el medio de cultivo y se les agrega PBS 1X frío, inmediatamente las placas son puestas sobre hielo y se realiza la extracción de forma rápida y siempre

en frío. Previo a este paso, se ha preparado el buffer de lisis y también se mantiene en hielo.

Se elimina el PBS 1X de las placas teniendo cuidado de no dejar remanentes, y se agregan 60 μ L de buffer de lisis a placa de 6 pocillos o 300 μ L a una placa de 100 mm. Se incuba por 10 min en hielo y luego se reúne todo el lisado usando un raspador y se recupera en un tubo de 1,5 mL. El lisado es centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4°C, luego se recupera el sobrenadante y se elimina el pellet. El sobrenadante es alícuotado y es almacenado a -80°C. Una de estas alícuotas se utiliza para cuantificar proteínas.

Para ensayos G-ELISA, las proteínas se usan inmediatamente después de su extracción o son congeladas en nitrógeno líquido antes de su almacenamiento a -80°C.

Cuantificación de proteínas

Los extractos de proteínas se cuantifican utilizando el método de Bradford, usando BSA como proteína estándar para la curva de calibración. Se mide una absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Sunrise™, Tecan).

Luego de cuantificarse, se calculan 50 μ g de proteínas para cargar por cada pocillo en SDS-PAGE, este volumen se mezcla con buffer de carga 6X y se incuba por 10 min a 95°C.

SDS-PAGE

Las proteínas son analizadas mediante SDS-PAGE; para proteínas de tamaño entre 10 y 50 kDa, se usa un gel separador a una concentración de 15% y para proteínas de mayor tamaño, se usan un gel separador al 12%. Posteriormente, las proteínas son transferidas a membranas de PVDF con tamaño de poro de 0,2 ó 0,4 μ m, según el tamaño de proteína a analizar (para proteínas menores a 50 kDa y mayores de 50 kDa, respectivamente), la transferencia se realiza por 1,5 horas a 4°C a 250 mA.

Transcurrido este periodo, se confirma la transferencia de las proteínas usando una solución de Rojo ponceau al 0,1%.

Western blot

Las membranas son bloqueadas en leche libre de grasas al 5% en TBST-0,1% por 1 hora a T.A. Luego se incuba cada anticuerpo a la concentración indicada en la Tabla 1, en leche 5%, toda la noche a 4°C, en agitación constante. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavan con TBST-0,1% 3 veces por 10 min a T.A., a continuación se incuban con el anticuerpo secundario asociado a peroxidasa (indicados en la Tabla 1) en leche, por 1 hora a T.A.

Para revelar se usa la solución luminol, sustrato para la enzima peroxidasa que está coplada al anticuerpo secundario. Se incuba la membrana por 5 min y se revela, exponiendo películas sensibles a la luz, sobre las membranas.

Ensayo de determinación de actividad de RhoGTPasas (G-ELISA)

Las proteínas son extraídas de la misma forma descrita previamente, sólo difiere el método de congelamiento. En este caso, al obtener los extractos, éstos son congelados rápidamente en nitrógeno líquido y luego son almacenados a -80°C.

Antes de comenzar a usar este kit, los componentes deben mantenerse a T.A. por 30 min, pero los extractos de proteínas sólo se descongelan al momento de usarlos. Los pocillos de la placa de ELISA son tratados con el anticuerpo correspondiente (anti RhoA-GTP), luego de lavar el exceso, se aplican los extractos de proteínas con una concentración aproximada de 70 µg/pocillo y se incuban en agitación constante por 45 min a 4°C. Posteriormente, se realizan 3 lavados con la solución de lavado *Wash buffer* del kit. A continuación se incuba el anticuerpo 2° correspondiente y se revela la señal con el reactivo sustrato de la enzima peroxidasa. La intensidad de la señal se mide en un lector de fluorescencia (Sinergy 2™, Biotek) a 440 nm utilizando el programa Gen5.

Fijación de cultivos neuronales

Luego de transcurridos los tiempos indicados, las células previamente sembradas en cubreobjetos se extraen desde la incubadora y se elimina el medio de cultivo para ser lavadas con PBS 1X tibio, este lavado se realiza a 37°C por 5 min. Luego, se quita el PBS 1X y se reemplaza con una mezcla de PFA y sacarosa, ambos al 4%, utilizando un volumen suficiente para cubrir toda la superficie de la placa. La fijación se mantiene por 30 min a 37°C. Transcurrido el tiempo indicado, se elimina la solución de fijación y se hacen 3 lavados de 5 min con PBS 1X. Desde este momento, los cubreobjetos pueden ser utilizados para realizar la inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia

Todos los pasos relatados a continuación se realizan a T.A a no ser que sea especificado. Luego que las células fijadas sobre los cubreobjetos son permeabilizadas con PBS-TX100 0,01% por 5 min, se realizan 3 lavados con PBS 1X. Para bloquear, las células se incuban 1 hora en PBS-BSA 5%, a continuación, se incuban con el anticuerpo 1° (detallados en Tabla 1) en PBS-BSA 1% toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados de 5 min con PBS 1x, se incuban con el anticuerpo 2° (Tabla 1), con TO-PRO3 (para marcar los núcleos celulares) y faloidina (para marcar filamentos de actina) en PBS-BSA 1%, por 1 hora a T.A y en oscuridad. Posteriormente, se realizan 3 lavados de 5 min con PBS 1x, y 1 lavado con agua destilada.

Para montar los cubreobjetos, se usan 10 µL del medio de montaje *FluorSave*, éste se aplica sobre un portaobjetos y sobre esta gota se deposita el cubreobjeto invertido. Este montaje se deja secar toda la noche a T.A y en oscuridad, luego se mantienen a 4°C hasta ser vistas en microscopio confocal.

Inmunofluorescencia por microscopía confocal (IMC)

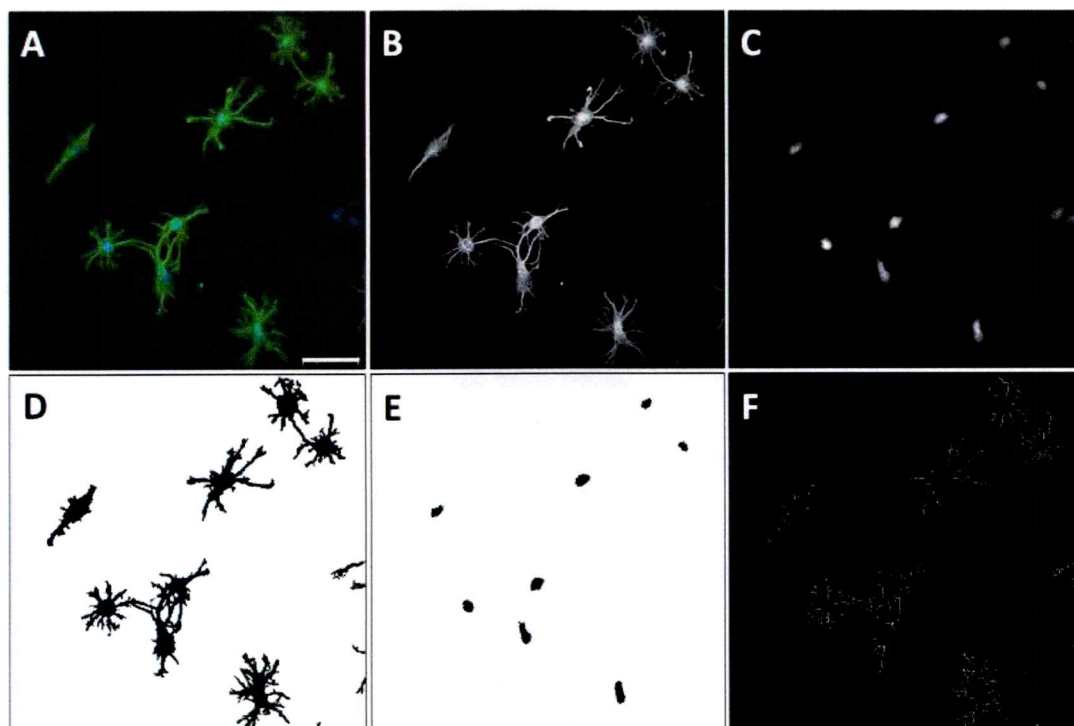
La IMC de los cultivos previamente tratados, son analizadas utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM 510 y son analizadas usando el programa LSM Image Browser. Se siembran 3 cubreobjetos por condición y se sacan 10-12 fotos de cada cubreobjetos en aumento 40X, lo que completa entre 30-36 fotos por condición. En promedio, por foto se capturan 5 células, lo que hace un total de 150-180 células por condición.

Análisis de fotos

En análisis de longitud axonal y de área de conos de crecimiento fue realizado con el programa LSM Image Browser.

Para analizar la longitud de cada neurita se usa una aplicación del programa ImageJ, Neurite Tracer (NT), esta aplicación ha sido desarrollada con el fin de medir la longitud de neuritas a partir de un conjunto de células en muchas fotos, ya que hacerlo manualmente consume mucho tiempo (Pool y col., 2008).

Para que NT analice un set de fotografías, éstas deben ser separadas manualmente en canales independientes, por ejemplo, para una foto "Control 1" tiene 2 canales distintos: "Control 1_verde", canal verde, que muestra la marca de β III-tubulina que corresponde a las neuritas y "Control 1_azul", canal azul, que muestra los núcleos celulares. El programa toma la foto "Control 1_verde" y transforma la silueta de cada neurita en un esqueleto (Figura 6); en paralelo, le resta la silueta de los núcleos "restando" la foto "Control 1_azul" a la foto "Control 1_verde". Luego mide la longitud de todas las neuritas de una foto y otorga el número total de núcleos, con esta información se puede obtener un promedio de longitud neurítica promedio (LNP) por cada fotografía.



G

Identidad	Longitud	n° de núcleos
b3tub 1.tif	8452.651	8

Figura 6. Análisis de LNP usando NeuriteTracer. A. La foto se obtiene en dos canales, un canal que muestre las neuritas (verde) y un canal que muestre los núcleos neuronales (azul). Luego que los canales son separados manualmente, el programa los toma y convierte en escala de grises (B y C, neuritas y núcleos, respectivamente). Luego el programa invierte las fotos de las neuritas (D) y de los somas (E). Posteriormente, el programa “resta” los núcleos a la foto B y genera una fotografía final que sólo contiene el esqueleto de todas las neuritas (F), esto lo cuantifica y entrega como información la longitud de todas las neuritas de una fotografía, junto con el número de núcleos (G). Con esta información se puede obtener un promedio de longitud neurítica por cada fotografía (Barra= 50 μ m).

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron utilizando como mínimo un n= 3 de muestras distintas correspondientes a cultivos independientes. Se utilizó test de Student, Anova

de una vía o Anova de 2 vías según se indica. Empleando un 95% de confianza, $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

Resultados

Establecimiento de cultivos hipocampales.

Para determinar la función de la vía de Shh sobre la neuritogénesis en neuronas hipocampales embrionarias, se generaron cultivos provenientes de embriones de rata en E18.5. Los cultivos se mantuvieron hasta las 72 horas y se observaron las etapas de desarrollo 2, 3 y 4. Para evaluar la morfología, utilizamos un anticuerpo anti β 3-tubulina, isoforma de tubulina específica de neuronas y faloidina para visualizar actina polimerizada, en tanto TO-PRO3 se usó para marcar el núcleo celular. Como el componente del citoesqueleto que decora los conos de crecimiento axonal y de neuritas menores es la actina, la faloidina nos permitirá identificar el contorno celular.

Una vez que las células son sembradas, la dinámica del citoesqueleto lleva a la generación de extensiones citoplasmática ricas en filopodios y lamelipodios (Etapa 1, no mostrado) que finalmente generarán neuritas, todas de similar longitud o simétricas (Etapa 2, Figura 7.A). Luego de 48 horas de cultivo, podemos observar que una de las neuritas comienza a crecer a una tasa neta mayor que el resto de las neuritas, rompiendo la simetría y generando un axón prospectivo (etapa 2, Figura 7.B). Finalmente, a las 72 horas de cultivo, las neuronas se han polarizado, ya que se ha determinado un axón el cual se diferencia del compartimento somato-dendrítico (Etapa 2, Figura 7.C). Los cambios morfológicos antes descritos fueron acompañados de la cuantificación de la longitud neurítica total por campo de observación mediante la herramienta NT, lo que nos indica un crecimiento constante de las extensiones neuríticas durante el periodo observado (etapa 2, Figura 7.D).

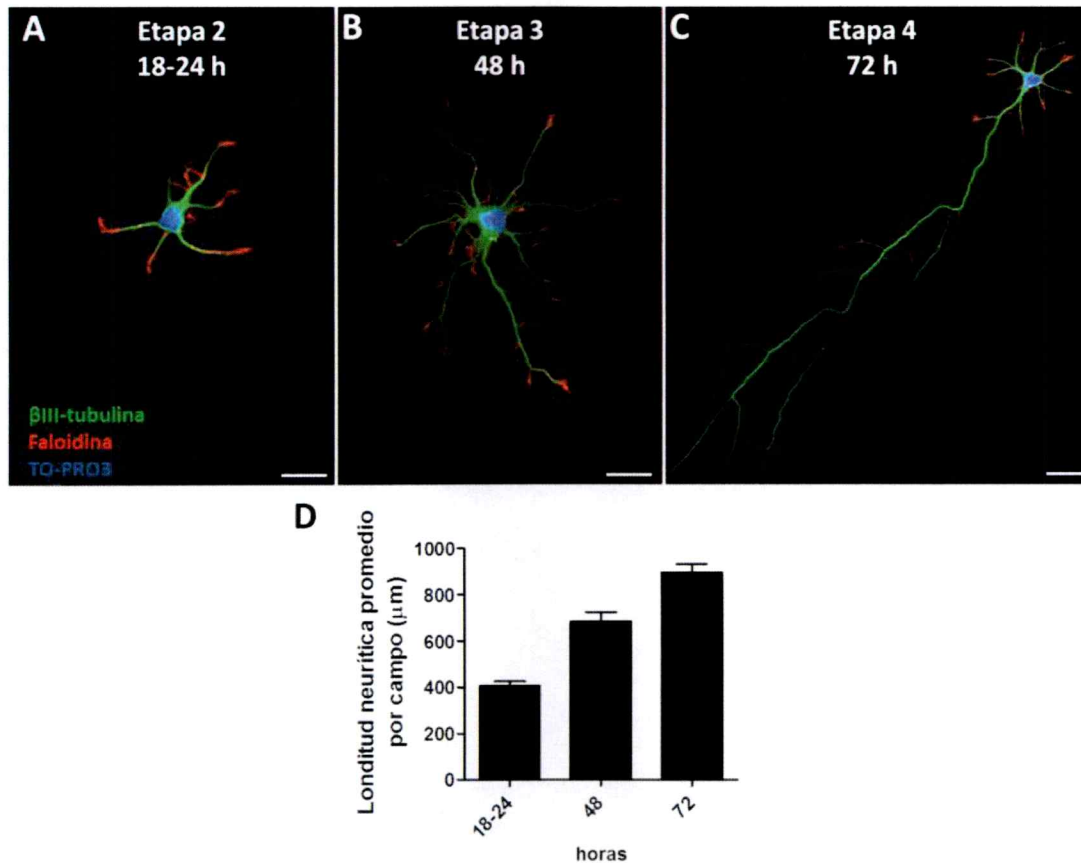


Figura 7. Obtención de cultivos de neuronas hipocampales embrionarias. A Entre las 18-24 horas de cultivo, las neuronas extienden neuritas de similar longitud. B. Una de las neuritas comienza a alargarse respecto de las vecinas y aparece un axón prospectivo. C. A las 72 horas, se define un axón, con una longitud mayor a 100 μ m. D. Cuantificación de la longitud neurítica promedio por campo observado de 3 cultivos independientes. Barra de tamaño= 20 μ m.

Expresión de los componentes de la vía de señalización Shh en neuronas hipocampales embrionarias in vitro.

Antes de evaluar las funciones descritas de la vía de Shh en neuronas hipocampales, primero determinamos que esta población celular expresa los componentes. Según datos compilados en bases de datos (Allen Brain Atlas), tanto

Ptch1 como *Shh* se expresan en el hipocampo en ratón, lo que nos permite especular que los componentes de la vía *Shh* sí se expresan en rata. La estrategia fue detectar la expresión de *Ptch1*, *Smo*, *Shh* y *Gli1* mediante RT-PCR. Sin embargo, los partidores con los que contamos fueron diseñados con especificidad para amplificar los genes de ratón y no los de rata. Por lo cual decidimos establecer un cultivo de neuronas hipocampales de ratón en E16.5, un estadio equivalente a E18.5 en rata y extrajimos RNA para sintetizar DNAc.

Se evaluó la expresión de los genes *Shh*, *Ptch1*, *Smo* y *Gli1* por RT-PCR en ratón usando como control interno la amplificación del gen *Hprt* (Figura 8). Usamos cDNA de cerebelo de ratones recién nacidos como control positivo. Las neuronas hipocampales expresan el mRNA de *Shh* y los receptores, por lo que los resultados sugieren que podrían responder a la vía de modo que lo siguiente fue evaluar los efectos que la modulación farmacológica de *Shh* puede ejercer sobre la morfología neuronal.

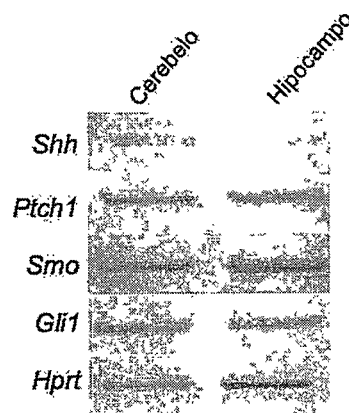


Figura 8. Neuronas hipocampales embrionarias expresan los componentes de la vía *Shh*.

Se analizó el DNAc de ratón mediante RT-PCR en estadio embrionario E16.5 equivalente a E18.5 de rata y se determinó que expresan *Shh*, ambos receptores *Ptch1* y *Smo* y el efector principal *Gli1*.

Manipulación farmacológica de la vía y sus consecuencias en la elongación neurítica.

Para analizar el efecto de la modulación de la vía sobre la neuritogénesis, las células fueron tratadas con Cyc (10 μ M) o Shh (3,3 μ g/ml) por 72 horas, para luego evaluar los efectos sobre su morfología mediante IMC de β 3-tubulina, faloidina y TO-PRO3. Se elige este periodo pues es en esta etapa en que las neuronas presentan una morfología polarizada *in vitro* (Etapa 4) tal como se muestra en las Figuras 4 y 7. Las neuronas control mostraron tener una morfología acorde a lo descrito en la Figura 4: células polarizadas que han desarrollado un axón de 150 μ m en promedio, muchas veces ramificado (Figura 9.A) y un cono de crecimiento pequeño (Figura 9.A'). Luego del tratamiento con Cyc, observamos que las neuronas poseían un axón de menor longitud que la condición control (Figura 9.B) y un cono de crecimiento de un área mayor comparado con el control, éstos se caracterizaron por ser extendidos y amplios, y presentar una fuerte marca para faloidina (Figura 9.B'). En la condición en que se trató con Shh recombinante, observamos 2 poblaciones, la primera estaba compuesta por células muy elongadas, con un axón desarrollado, ramificado y cono de crecimiento mínimo (Figura 9.C, 9.C'), con un promedio similar al control (no se determinó significancia estadística al comparar los datos del control con los datos de neuronas polarizadas del tratamiento con Shh). La segunda subpoblación estaba formada por células no polarizadas con ausencia de un axón y con neuritas menores o ausentes (Figura 9.D), y cuando comparamos estos datos respecto de la situación control, vimos una diferencia significativa en la longitud axonal entre las neuronas control y aquellas neuronas no polarizadas en respuesta al tratamiento con Shh. Para confirmar nuestra observación inicial, cuantificamos la longitud axonal (Figura 9.E) y el área de los conos de crecimiento (Figura 9.F) en las tres condiciones experimentales. Observamos que

Cyc indujo un retraso en el desarrollo axonal, lo que estuvo acompañado de una mayor área del cono de crecimiento, respecto del control (longitud axonal: Cyc: $80 \pm 32 \mu\text{m}$ vs Control: $152 \pm 59 \mu\text{m}$; área del cono de crecimiento: Cyc: $228 \mu\text{m}^2 \pm 360$ vs Control: $81 \pm 172 \mu\text{m}^2$). Por el contrario, Shh favoreció el crecimiento axonal (Shh: $233 \pm 36 \mu\text{m}$ vs Control: 152 ± 59), lo que fue acompañado de un cono de crecimiento mínimo ($42 \pm 22 \mu\text{m}^2$). Notablemente, observamos una subpoblación de neuronas no polarizadas con una longitud promedio de $45 \pm 21 \mu\text{m}$ (los valores se expresan como promedio \pm SD, pero en la Figura 9 se grafican como promedio \pm SEM). Estos resultados sugieren que la vía de Shh puede modificar la elongación axonal luego de 72 horas de tratamiento.

Considerando los resultados obtenidos, quisimos analizar el proceso en detalle y determinar en qué etapa del desarrollo de neuronas hipocampales actúa Shh.

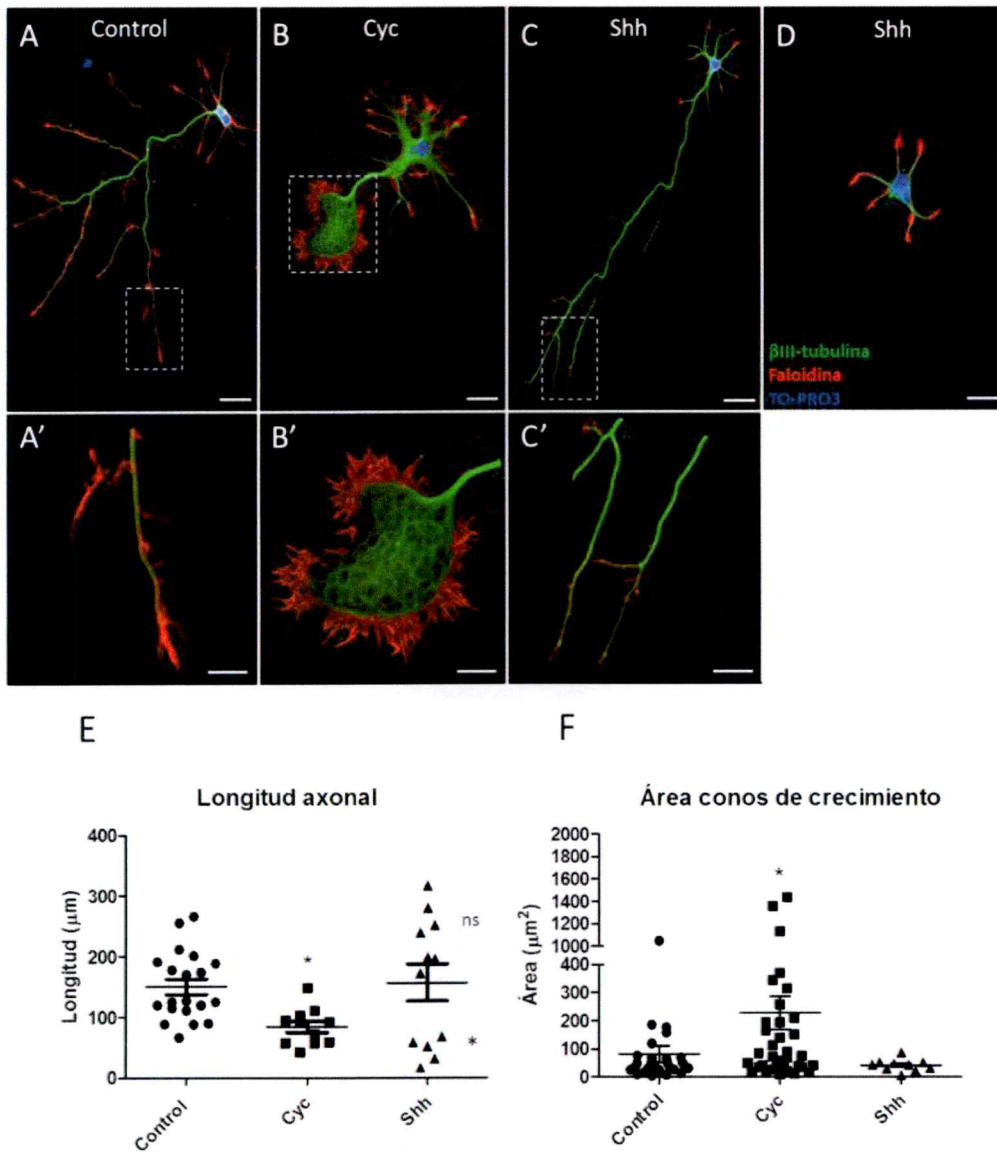


Figura 9. La modulación farmacológica de la vía Shh genera alteraciones en la Etapa 4 del desarrollo neuronal in vitro. Se muestran neuronas hipocampales de rata luego de 72 horas de tratamiento. A. Condición control. B. Cyc. C y D. Shh. El cono de crecimiento se destaca en recuadros discontinuos y se muestra un detalle en A', B', C'. Cuantificación de la longitud axonal (E) y área de conos de crecimiento (F) usando el programa LSM Image Browser. Datos graficados como promedio \pm SEM. Anova de una vía *P < 0,05 (Barra de tamaño: 20= μm).

Subdividimos la ventana temporal de nuestro estudio y observamos la morfología celular por IMC a las 18, 24, 48 y 72 horas calculando la LNP en cada condición. Además, reemplazamos el uso de Shh por Pur, un agonista de la vía ampliamente usado para determinar si utilizando esta droga los resultados eran similares en comparación al uso de Shh recombinante (Figura 10).

En la condición control se observa el desarrollo estereotipado descrito (Figura 4), con un incremento constante en la LNP durante las 72 horas analizadas, con un desarrollo axonal hacia las 48 horas de cultivo y un establecimiento de la polaridad a las 72 horas. En presencia de Cyc, vemos algo similar ya que vemos existe un incremento en la LNP, pero menor a la observada en la condición control entre las 48 y 72 horas de tratamiento, consistente con el retraso mostrado en la Figura 9.B.

Con respecto a lo observado en respuesta al tratamiento con Pur, vemos un retraso significativo en el desarrollo de neuritas desde las 18 horas. Algunas de ellas se mantienen totalmente simétricas, esféricas y carentes de neuritas mientras que otras generan extensiones de escasa longitud comparado con el control (Figura 10. B), lo que es similar a los efectos observados en una subpoblación en el tratamiento con ligando Shh. Estos resultados indican que la estimulación de la vía a nivel de Smo genera células simétricas, con un importante retraso en su desarrollo neurítico durante todo el periodo analizado. Se hace notar que es la estimulación de la vía a través de Smo (Pur) y no de Ptch1 (Shh) la que genera estas alteraciones morfológicas.

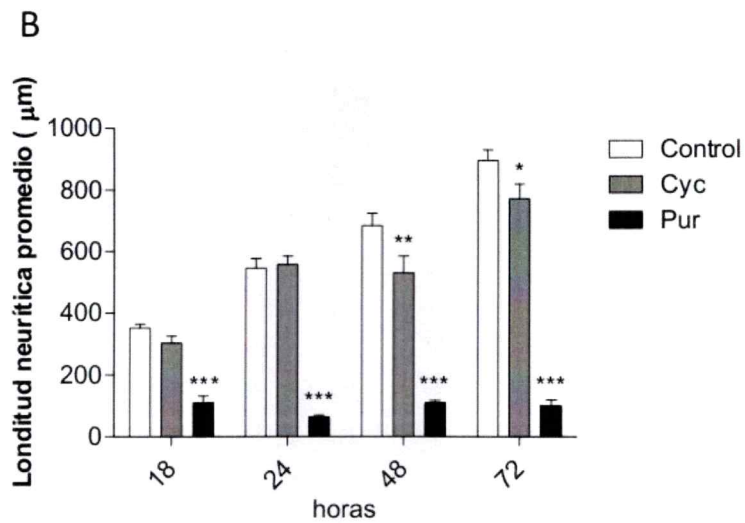
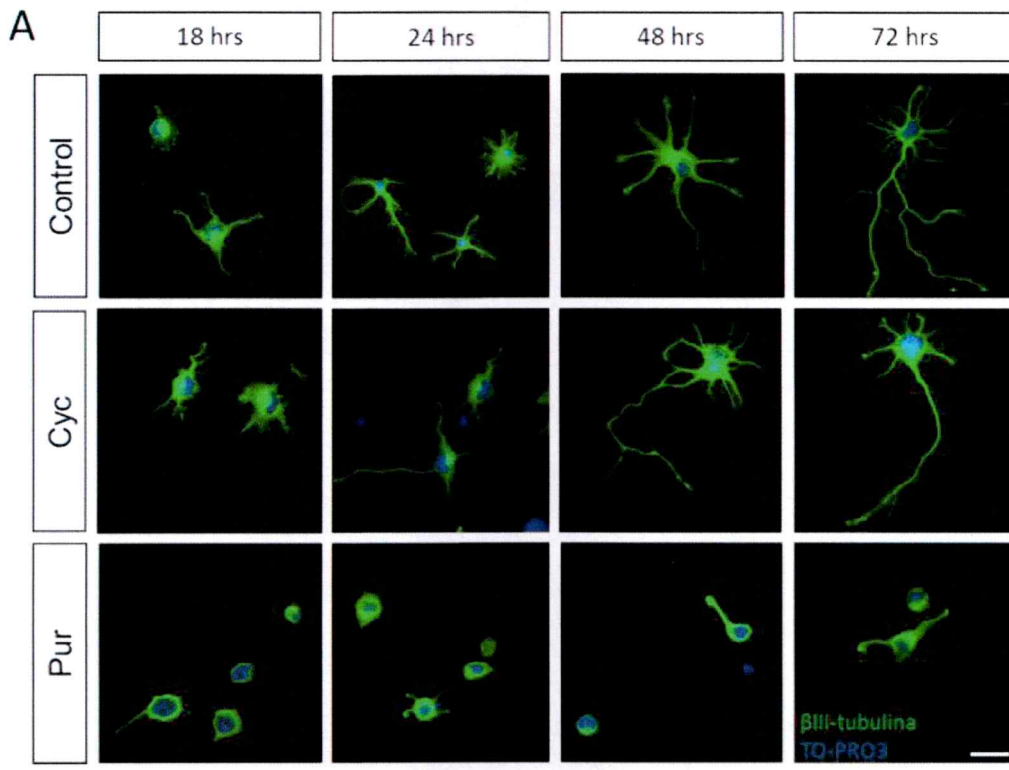


Figura 10. La modulación farmacológica de la vía Shh genera alteraciones del desarrollo neuronal in vitro. A. Morfología neuronal luego de 18, 24, 48 y 72 horas de cultivo y de tratamiento continuo con Cyc o Pur. B. Cuantificación de la longitud neurítica total promedio. Anova 2-vías * $P < 0,05$ (Barra de tamaño: 20 μm).

Como posible explicación al fenotipo observado, postulamos que quizás el cultivo generado en respuesta a activación con el agonista estaba enriquecido en progenitores neuronales y no neuronas, por lo cual utilizamos un segundo marcador de linaje neuronal maduro, NeuN. Observamos que las células tratadas por 36 horas fueron positivas para este marcador (Figura 11).

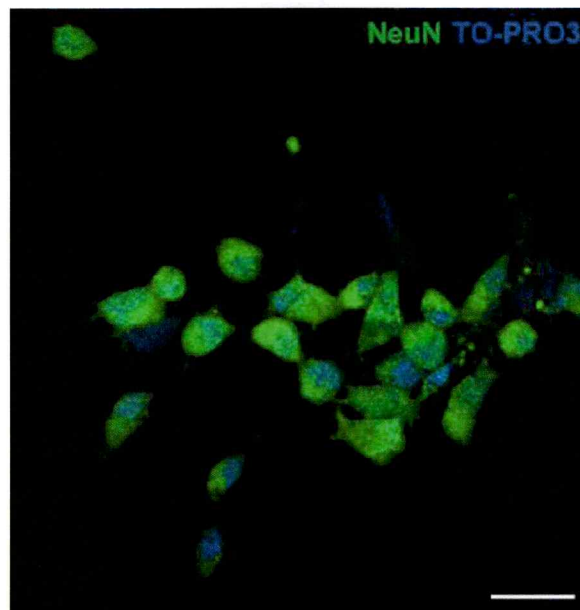


Figura 11. Neuronas hipocámpales mantienen su identidad neuronal luego del tratamiento con Pur. NeuN da cuenta del linaje neural del cultivo hipocámpal utilizado. (Barra de tamaño: 50 μm).

Al aislar neuronas hipocámpales en E18, obtenemos una población de neuronas que estaban polarizadas in situ, pero con el protocolo de cultivo primario las células pierden esta conformación y adquieren una forma esférica que se romperá durante el acontecer del cultivo y la consecución de la polaridad. Pero esta morfología resultante esférica nos llevó a pensar que este cultivo podría estar enriquecido en progenitores

neurales en mitosis. Como Shh es un conocido mitógeno en el sistema nervioso central, pensamos que la estimulación constante de la vía Shh podría estar manteniendo a esta población en un estado con capacidad proliferativa y comprometida con el linaje neural. Con el objetivo de testear esta hipótesis realizamos un pulso de BrdU de 6 horas y una posterior IMC para evaluar la integración de BrdU durante la fase S de la mitosis. Sólo obtuvimos una marca positiva para BrdU en pocas células, que además, notablemente se encontraban formando dobletes, típicas figuras mitóticas. Además, estas células BrdU⁺ eran positivas también para β 3-tubulina, indicativo que estas células son de linaje neuronal. Como esta situación se observó esporádicamente, estos datos indican que la proliferación no es la causa del fenotipo esférico observado (Figura 12).

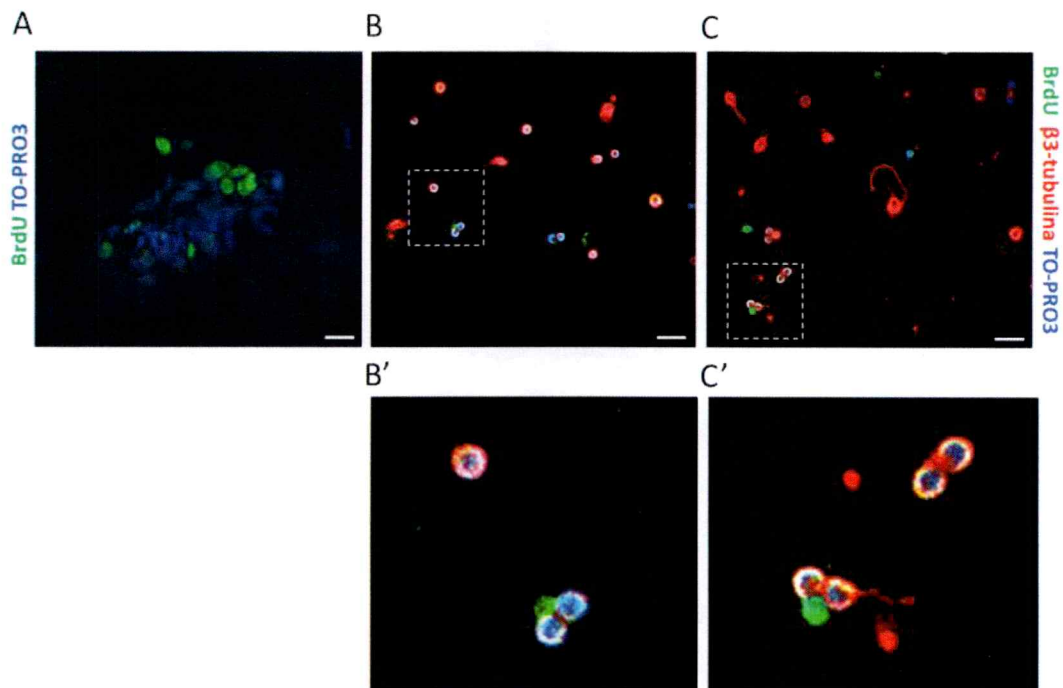


Figura 12. El fenotipo esférico obtenido por el tratamiento con Pur no se explica por proliferación de cultivos de neuronas hipocámpales. A. Como control positivo de un linaje neural proliferativo, se realizó un pulso de BrdU en progenitores granulares cerebelares (GNP) de ratones con 3-4 días de vida. B y C. Se detectó incorporación de BrdU sólo en algunas neuronas hipocámpales. B' y C', Zoom óptico de B y C. (Barra de tamaño= 20 μm).

La modulación de la vía Shh no cambia el carácter neuronal de las células tratadas.

El fenotipo observado en respuesta a Pur es muy llamativo y nos llevó a preguntarnos si estas células podrían estar sufriendo cambios más allá de lo morfológico en respuesta al tratamiento. En primer lugar quisimos evaluar si estas células permanecían vivas luego del tratamiento, para lo cual realizamos IMC contra caspasa-3 clivada, cuya marca es indicativa de un proceso apoptótico activo. Luego de 72 horas en presencia de Pur observamos escasas células positivas para caspasa-3

clivada similar a la situación control (Figura 13) en todos los campos observados, lo que sugiere que el tratamiento con Pur no induce apoptosis.

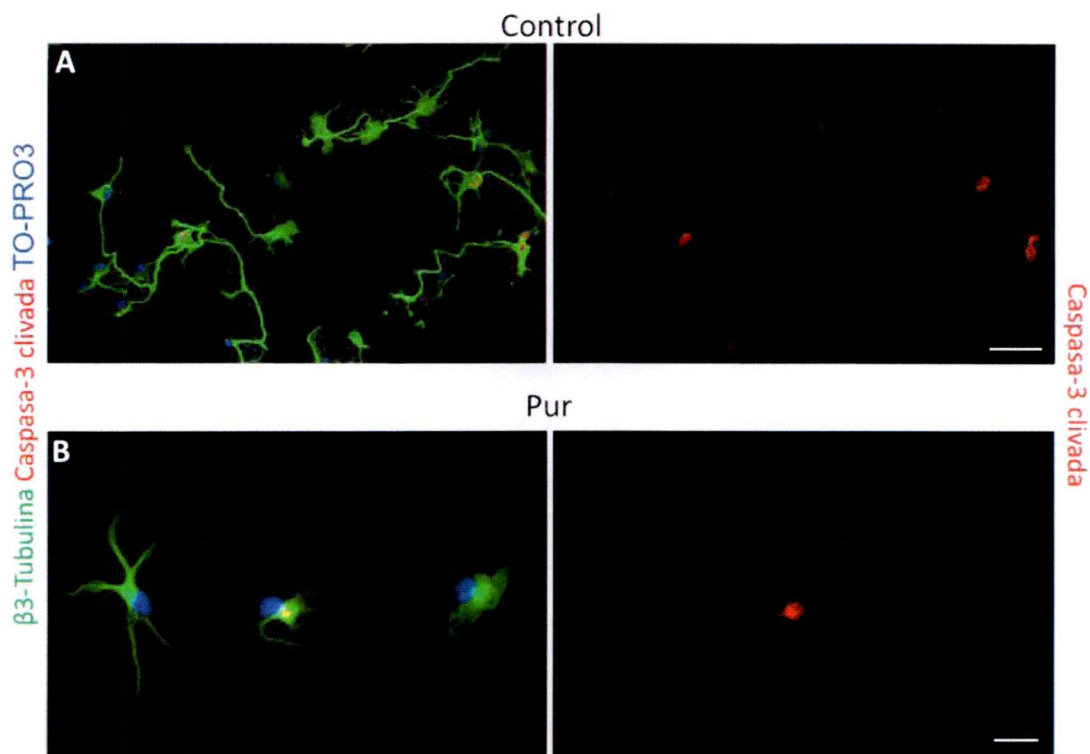


Figura 13. El tratamiento de 72 horas con Pur no induce muerte celular por apoptosis. IMC contra β -tubulina y caspasa-3 clivada indica que las células mantienen su carácter neuronal (β -tubulina positivas) y no están sufriendo eventos apoptóticos. A. Control. B. Pur. (Barra de tamaño= 20 μ m).

A continuación quisimos establecer si el fenotipo observado con Pur daba cuenta de un estadio intermedio inmaduro durante el desarrollo estereotipado ya descrito, por lo cual realizamos IMC analizando los marcadores MAP2 y tau1, que marcan el compartimento somato-dendrítico y el axón, respectivamente. A su vez evaluamos como afecta el tratamiento con Cyc a la maduración neuronal. En las 3 condiciones experimentales existe marca de estas proteínas, pero en la condición Pur no ocurre

segregación de la marca entre los distintos compartimentos porque éstos no existen, lo que es consistente con la ausencia de polaridad en las neuronas tratadas con Pur (Figura 14).

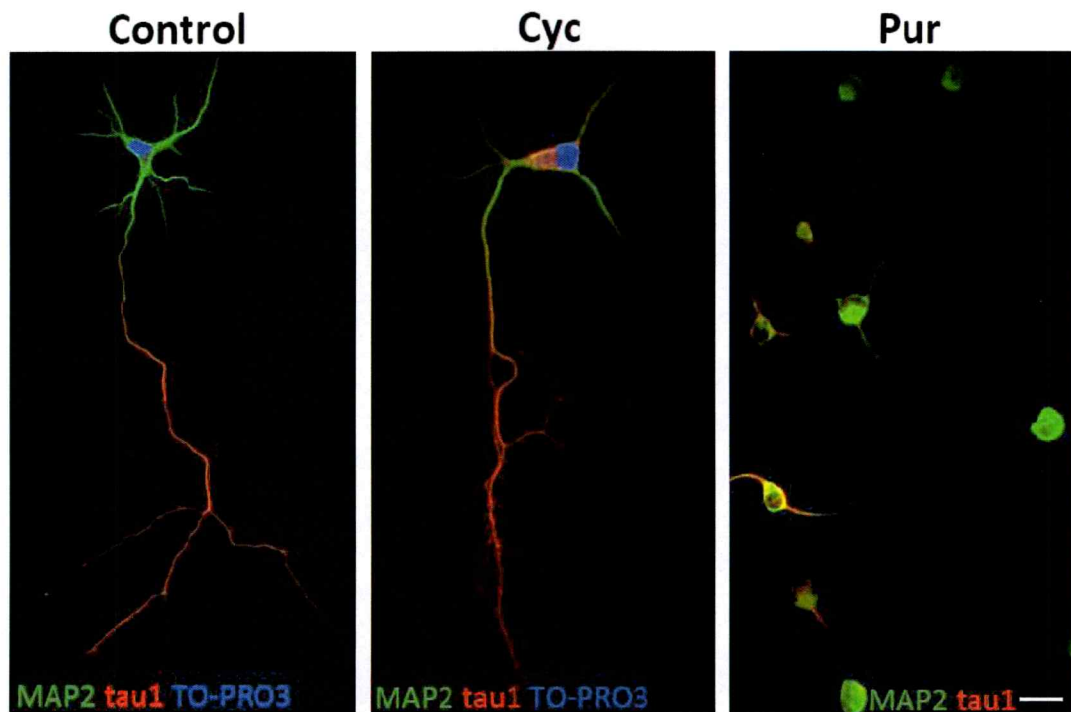


Figura 14. La modulación de la vía Shh por Pur altera la maduración neuronal. Luego de 72 horas de cultivo las células se han polarizado, lo que puede expresarse mediante la marca de MAP2 y tau1, que marcan el compartimento somato-dendrítico y el axón, respectivamente. A. Control. B. Cyc. C. Pur. (Barra de tamaño= 20 μm).

Incluso en el tratamiento con Cyc observamos esta doble marca MAP2/tau1, lo cual nos indica que el retraso en el crecimiento es sólo parcial. Para apoyar esta idea, realizamos IMC contra tubulina tiosinada (tubulina-tyr) y tubulina acetilada (tub-acet), ambas modificaciones están relacionadas con la estabilidad de microtúbulos,

estabilidad que antecede a la especificación axonal (Fukushima y col., 2009) y no observamos diferencias entre Cyc y el control lo que nos confirmó el retraso en el crecimiento y no alteraciones en la maduración (Figura 15).

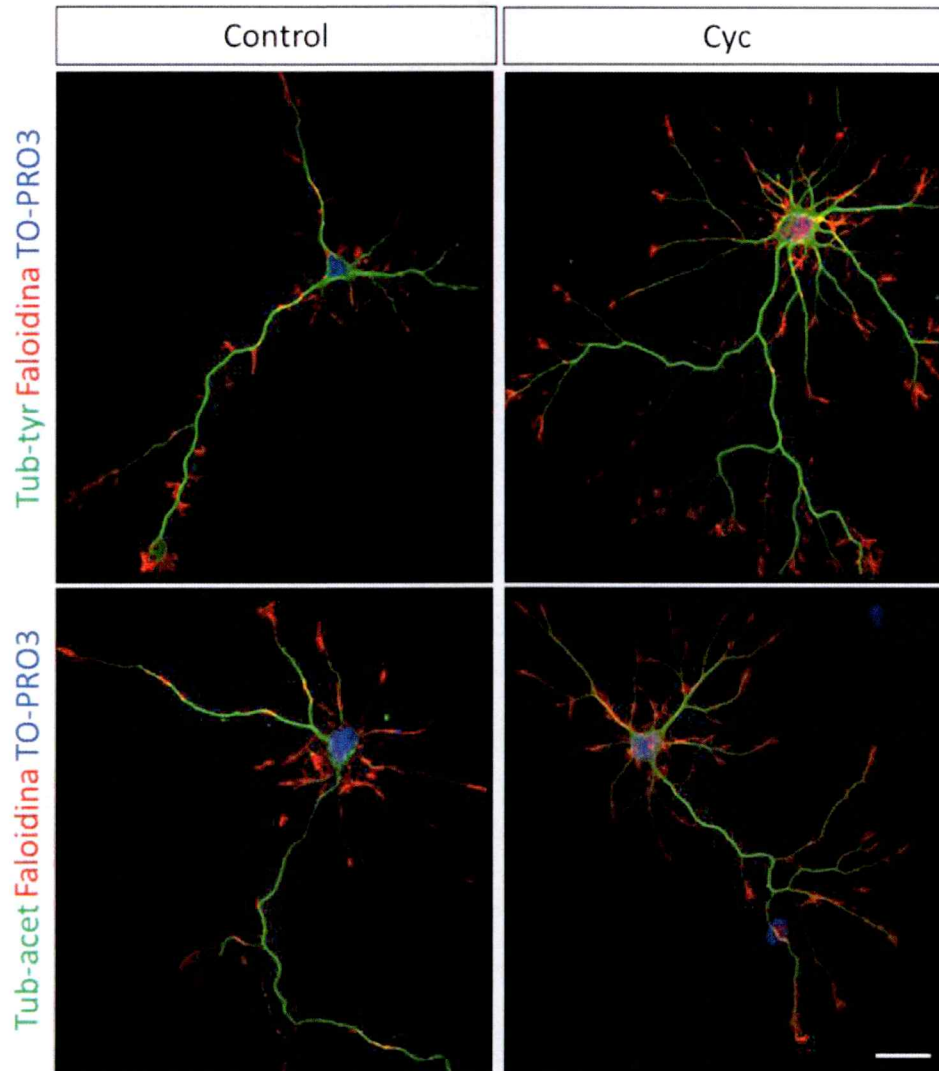


Figura 15. La expresión y distribución de tubulina-tyr y tubulina-acet no se ven alteradas en el tratamiento con Cyc. Se evaluó la distribución de estas modificaciones en la tubulina en respuesta al tratamiento con Cyc. Barra de tamaño= 50 μ m.

Estos resultados nos permiten concluir que la función de la señalización Shh en neuronas hipocampales no se relaciona con el proceso de diferenciación neuronal, sino que con la elongación de neuritas, con un efecto principal sobre los cambios en la elongación del axón.

La inhibición de la señalización de Shh induce crecimiento neurítico en etapas tempranas del desarrollo de polaridad.

Ya hemos definido que la modulación de la vía no induce muerte celular, proliferación ni altera la maduración celular, por lo tanto, nuestros resultados nos sugieren que los efectos observados sobre la morfología neuronal se deben a efectos sobre el citoesqueleto y por consecuencia, posiblemente sobre aquellas proteínas que regulan la dinámica de los filamentos de actina y tubulina: las GTPasas monoméricas RhoA y Rac1.

Para evaluar esta hipótesis quisimos analizar el estado de las GTPasas, en primer lugar, en respuesta a Cyc. Como establecimos que los efectos sobre la morfología ocurren desde las 48 horas, nos quisimos adelantar a este punto y realizamos el tratamiento hasta las 36 horas de cultivo para asegurarnos que Cyc estaba ejerciendo su efecto. Notoriamente, observamos que Cyc a las 36 horas genera una mayor longitud neurítica (Figura 11.A, B y E). Quisimos establecer si este efecto es específico de Cyc en cuanto a su inhibición de la acción de Smo, por lo cual utilizamos el anticuerpo monoclonal 5E1 que se une a Shh e impide su unión a Ptch1 (Figura 16). De acuerdo a lo observado con Cyc, también en respuesta al tratamiento con 5E1 obtuvimos alargamiento neurítico (Figura 16. C y E). Estos resultados contrastan notablemente con lo observado desde las 48 horas (Figura 10). Es decir, hasta las 36 horas, la inhibición de la vía Shh genera un alargamiento neurítico, pero luego de 48 horas, esta respuesta se invierte y se generan neuronas de menor desarrollo neurítico.

Tal extensión neurítica estaría de acuerdo con la actividad de Rac1 ya que en su forma activa (Rac1-GTP) estimula la polimerización de filamentos de actina que se estructuran formando lamelipodios.

Estas observaciones nos llevaron a pensar que la señalización de Shh en neuronas hipocampales es dinámica, ya que según la escala temporal su modulación tiene efectos positivos (alargue) o negativos (acortamiento) en la elongación neurítica. Sin embargo, dada la duración del tratamiento empleado no podemos discriminar si los efectos observados se deben a la señalización Shh canónica o no canónica.

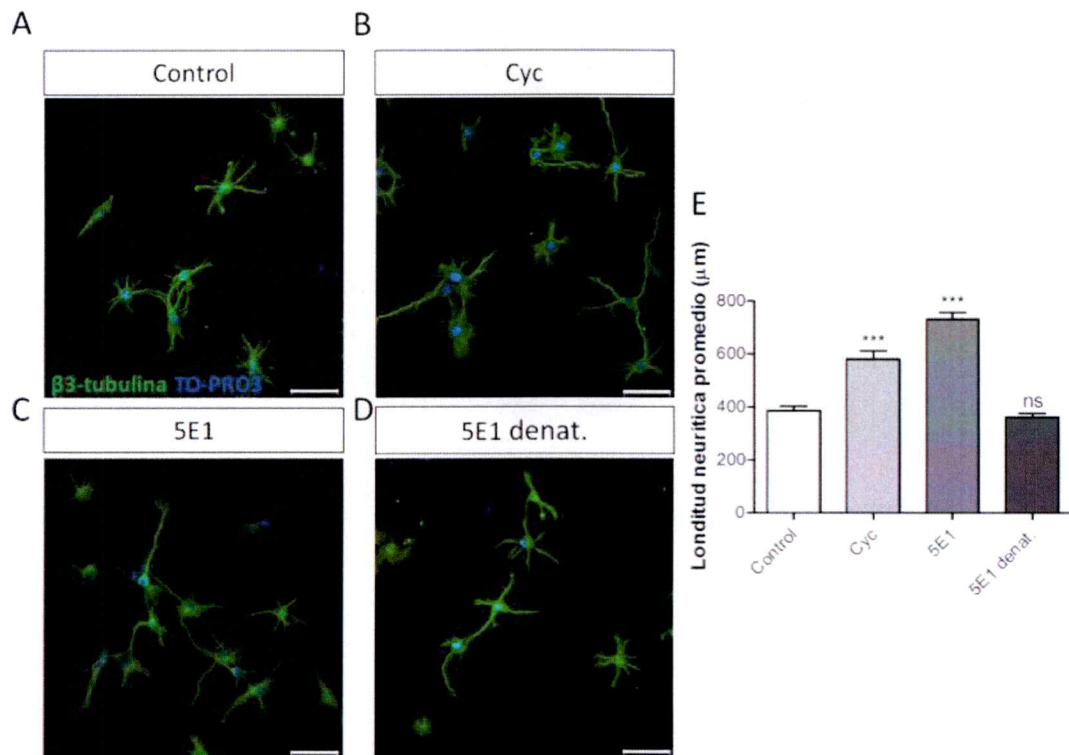


Figura 16. La inhibición de Shh genera mayor longitud neurítica a las 36 horas. Desarrollo neurítico a las 36 horas de cultivo en condición: A. Control. B. Cyc, C. 5E1. D. 5E1 denaturado, control del anticuerpo nativo. E. Cuantificación de la longitud neurítica promedio en las condiciones indicadas. Anova 1-vía * $P < 0,05$. (Barra de tamaño: 20 μ m).

Para estudiar si Cyc está induciendo una activación de Rac1, estudiamos 2 proteínas blanco de la actividad de esta GTPasa: LIMK1 y Cofilina. La activación de Rac1 genera a su vez la activación de PAK1, quinasa que fosforila a otros sustratos que actuarán sobre los filamentos de actina, uno de ellos corresponde a LIMK1. Se observó un aumento en la fosforilación tanto de LIMK1 (Figura 17.A) como de Cofilina, blanco de P-LIMK1 (Figura 17.b) luego de 36 horas de tratamiento, lo que confirma la actividad de Rac1.

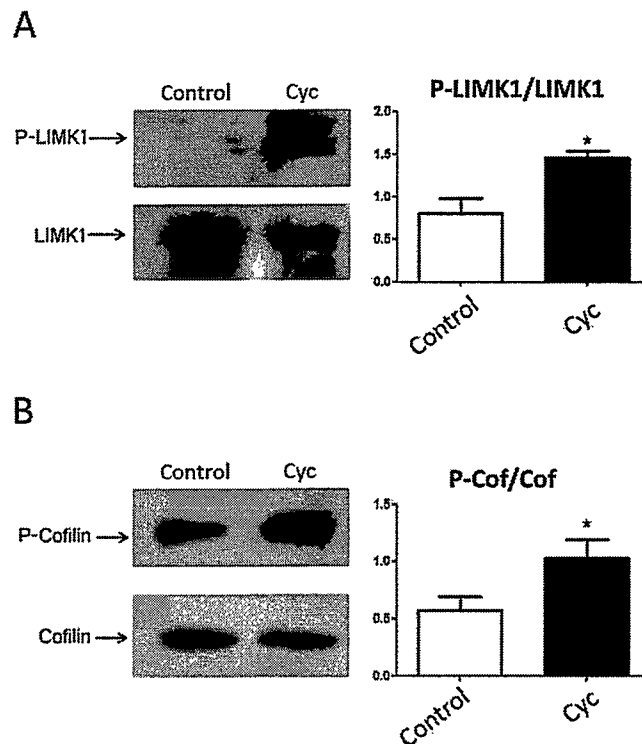


Figura 17. La inhibición de la vía de Shh induce un aumento en la fosforilación de LIMK1 y Cofilina. A. Luego de 36 horas en presencia de Cyc se determinó por Western blot que los niveles de P-LIMK1 (activa) aumentaron respecto de la forma sin fosforilar (inactiva). B. Se observó similar aumento para Cofilina. (Test de Student * $p < 0,05$). Resultado realizado en cooperación de David Villarroel y Daniel Bórquez.

La estimulación de la vía de Shh induce un aumento en la actividad de RhoA.

Si Cyc induce un aumento en la actividad de Rac1, supusimos que Pur podría tener el efecto contrario, es decir, activar a RhoA, GTPasa monomérica antagonista de los efectos de Rac1. En primer lugar evaluamos la expresión de RhoA en nuestros cultivos y observamos que RhoA se distribuye en todo el citoplasma neuronal (Figura 18 A y B). En consecuencia, este resultado no nos permite evaluar los efectos de Pur sobre la actividad de RhoA por IMC, por lo cual decidimos determinar los niveles de RhoA-GTP, es decir, la forma activa de esta GTPasa. Como el fenotipo se mantuvo durante las 72 horas analizadas, quisimos realizar el tratamiento a un tiempo cercano al final del cultivo para permitir el mayor crecimiento neurítico, por escaso que éste fuese. Para esto, realizamos un tratamiento con Pur sólo por 15 minutos luego de 72 horas de cultivo. De acuerdo a lo esperado, el tratamiento con Pur indujo un aumento en la actividad de RhoA (RhoA-GTP) (Figura 18.C) respecto del control y la condición con Cyc, lo cual nos confirma la modulación de esta GTPasa por Pur. Importantemente, dado el rango temporal utilizado, podemos afirmar que ocurre por vía no canónica.

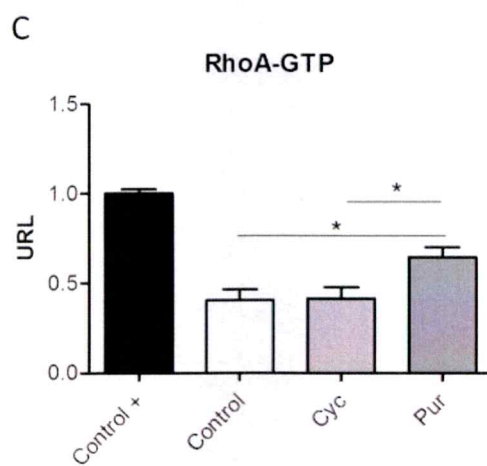
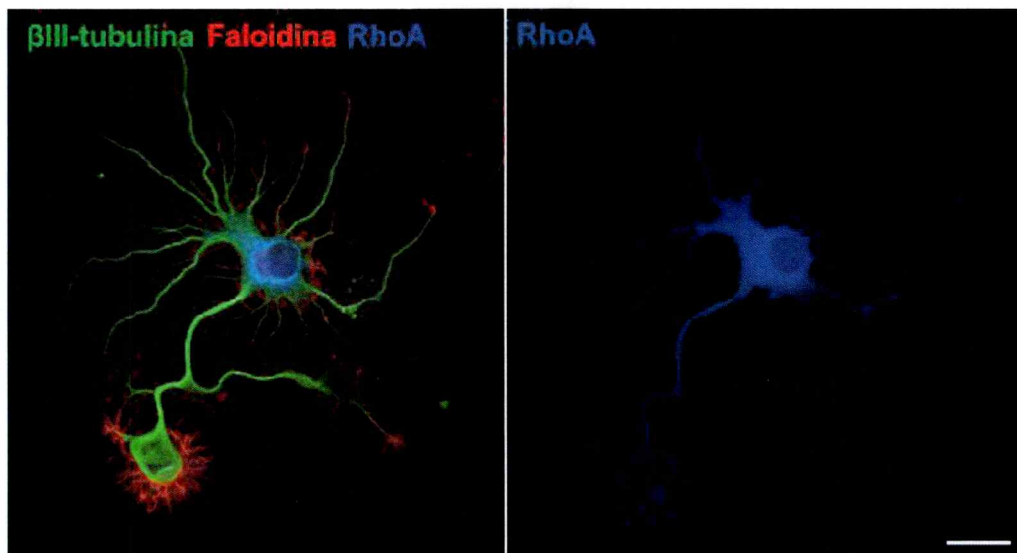


Figura 18. La activación de la vía Shh induce la activación de RhoA. A y B. RhoA se distribuye a lo largo de toda la neurona, específicamente en sitios de alta actividad de actina (faloidina). C. Determinación de la actividad de RhoA evaluada mediante G-ELISA que mide los niveles de RhoA-GTP, la forma activa de ésta. El control positivo corresponde a RhoA-GTP componente del kit. Test de Student * $p < 0,05$.

Estos resultados sugieren que la vía de Shh modularía la dinámica del citoesqueleto a través de su efecto sobre la actividad de las GTPasas Rac1 y RhoA.

Discusión

Las funciones que ejerce la vía de Shh durante el desarrollo se han descrito desde el año 1980 en base a los estudios realizados en *Drosophila melanogaster* (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980). Desde ese entonces se han analizado con detalle los mecanismos a través de los cuales Shh induce la expresión de genes relacionados con la morfogénesis y mitosis (Fuccillo y col., 2006). En este contexto, ya en el año 2003 se describió como función adicional y novedosa, el papel de Shh en la migración de axones comisurales en la médula espinal en el sistema nervioso central (Charron y col., 2003). Sin embargo, estas observaciones no siempre estuvieron acompañadas de una explicación mecanística, ya que la migración axonal es un proceso dinámico que ocurre a nivel de cono axonal, que muchas veces puede encontrarse lejos del soma, por lo cual se asume que este frente de avance está respondiendo de forma rápida y dinámica a las pistas químicas que entrega el ambiente, independiente de la transcripción inmediata de nuevos genes y las funciones descritas para Shh hasta ese entonces que hacían referencia a los genes blancos de Shh regulados por los factores de transcripción Gli1, Gli2 y Gli3. Hoy en día se sabe que muchos tipos de células responden a Shh en un modo independiente de Gli. Ejemplos de la señalización Shh "no canónica" son la migración de fibroblastos, la tubulogénesis de células endoteliales, y el crecimiento del cono axonal, todos los cuales están comandados por cambios en el citoesqueleto (Kanda y col., 2003, Sheng y col., 2006, Riobo y col., 2006b, Chinchilla y col., 2010; Renault y col., 2010, Polizio y col., 2011).

Un modelo ampliamente utilizado en el estudio del desarrollo neurítico y axonal corresponde al cultivo de neuronas hipocampales embrionarias de rata. Siguiendo los protocolos descritos obtuvimos cultivos enriquecidos en neuronas (Figura 7) ya que la disección se realiza en el día E18.5, punto climax de la neurogénesis en rata. Posteriormente, este proceso declina y se hace más relevante el proceso de gliogénesis (Sauvageot & Stiles, 2002).

Una vez que las neuronas son sembradas, comienza una alta actividad del citoesqueleto que genera filopodios y lamelipodios, formaciones de actina, que luego a su vez generarán extensiones menores denominadas neuritas conformándose un estado simétrico en que todas las prolongaciones poseen similar longitud. Durante el desarrollo de polaridad, la actividad del citoesqueleto se hace más dinámica y una de estas neuritas acelera su crecimiento respecto de sus vecinas y genera un axón prospectivo, el cual, mediante un cono de crecimiento detectará las señales químicas del ambiente para crecer o retraerse (González-Billault y col., 2011). En los cultivos *in vitro* no ocurren gradientes extracelulares por lo cual los axones crecen hacia donde detectan distintos factores de crecimiento secretados por las mismas neuronas, relacionados con el avance axonal, tales como: ácido retinoico, NGF, BDNF, etc, (Zafra, 1992; Fragoso y col., 2012). Finalmente, a las 72 horas de cultivo podemos observar la generación de una neurona polarizada en la cual podemos reconocer los dos compartimentos básicos de una neurona piramidal: un compartimento somato-dendrítico y un axón. Cabe destacar que en los cultivos utilizados en este trabajo no fue posible evaluar dentritogénesis ni espinogénesis, ya que estos eventos ocurren posteriormente al tiempo de cultivo realizado.

Pudimos observar el desarrollo neuronal desde el momento de la siembra, hasta las 72 horas de cultivo (Figura 7) y la cuantificación de la LNP muestra que el crecimiento

es constante en el tiempo (Figura 7. B). Para estudiar la señalización de Shh en neuronas de rata, nos apoyamos en la literatura para establecer que los componentes de la vía se expresan en nuestros cultivos (Traiffort y col. 1998). Pero de igual forma quisimos caracterizarlo y pudimos demostrar que los RNAm del ligando Shh, los receptores Ptch1 y Smo, y el factor de transcripción Gli1 se expresan en neuronas hipocampales murinas en E16.5 (Figura 8), observación que extrapolamos a los cultivos de rata. Utilizamos como control positivo tejido cerebelar postnatal ya que sabemos que la vía se encuentra activa en cerebelo (Dahmane & Ruiz i Altaba, 1999).

A continuación quisimos evaluar los efectos sobre la morfología neuronal de modular la vía, utilizando Cyc y Shh. El uso de β 3-tubulina y faloidina nos permitió evaluar dichos cambios. Luego de 72 horas de tratamiento observamos cambios en ambas situaciones experimentales. Al inhibir la vía, se generaron neuronas de menor longitud axonal y con conos de crecimiento de amplia extensión, lo que nos sugiere que las neuronas se encontraban en un crecimiento dinámico, pero atrasado respecto del control. Por el contrario, el uso de Shh recombinante indujo la extensión axonal a niveles mayores que el control. Ambas evidencias nos hacen pensar que la vía de Shh modula el crecimiento de neuritas, incluso del axón, y por eso, su inhibición genera neuronas más cortas, respecto del control, pero como las mismas células pueden secretar neurotrofinas (Sánchez-Camacho y col., 2005), presumimos que esta disminución en la longitud axonal fue menor respecto de la situación control. En el medio de cultivo de mantención no debiesen existir neurotrofinas exógenas, ya que los suplementos utilizados sólo contienen insulina, transferrina, progesterona, putrescina, selenito (suplemento N2, *data sheet*) y sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, biotina, L-carnitina, transferrina, G-galactosa, vitamina E, superóxido dismutada, entre otros (suplemento B27, Brewer y col. 1997). Sin embargo, estos cultivos pueden

producir de forma paracrina BDNF y NT3, factores que han sido asociados con el crecimiento de neuritas (Park & Poo, 2013).

En el tratamiento por 72 horas con Shh, observamos un fenotipo neuronal distinto al presente en la condición control, pues observamos en una población celular un retraso en el desarrollo neurítico, lo que generó neuronas no polarizadas (Figura 9.D). Esto nos hace pensar que el cultivo neuronal está compuesto por una población heterogénea con respecto al desarrollo de polaridad. Por una parte, existen células que pueden responder a la vía favoreciendo el crecimiento, mientras que otras responden de forma contraria. Esto podría explicarse por una respuesta diferencial, dada por la presencia de proteínas accesorias que modulan la respuesta a Shh; por ejemplo, los co-receptores Cdon y Boc presentes en la membrana que favorecen la unión de Shh a la superficie celular, favoreciendo su interacción con Ptch1 y la señalización río abajo.

Asimismo, el tamaño y la forma de los conos de crecimiento observados en respuesta a la inhibición de la vía dan cuenta de la dinámica en que se encuentra esta célula en crecimiento, ya que si lo comparamos con las células en Etapa 4, el tamaño de los conos de crecimiento es considerablemente menor y con menor número de formaciones de actina, tales como filopodios y lamelipodios (Figura 9.B).

Estos efectos fueron observados al finalizar el cultivo, pero no sabemos en qué momento del desarrollo *in vitro* comenzaron a ocurrir. En otra serie de experimentos, observamos que hasta las 24 horas de cultivo en presencia de Cyc, las neuronas crecieron a una tasa similar al control, pero posteriormente comenzó a ocurrir un retraso en el crecimiento evaluado a las 48 y 72 horas de cultivo. Una posibilidad es que hasta este punto la vía no esté actuando y que al encenderse la señalización ésta se haga sensible a Cyc. Otra posibilidad es que luego de la siembra, las mismas neuronas estén secretando Shh pero a bajos niveles y que luego de 48 horas los

niveles hayan llegado a un umbral en que comiezan a señalizar y se hace sensible a la presencia de Cyc. Durante el periodo de cultivo, el medio no se reemplaza, lo que apoya esta idea.

Como Cyc actúa a nivel de Smo y la literatura indica que los efectos en la guía axonal ocurren a través de este receptor, decidimos que para la mejor comprensión de los fenómenos observados, una opción era usar como agonista Pur en lugar de Shh recombinante, ya que al igual que Cyc actúa a nivel de Smo. La presencia de Pur en el cultivo tuvo claros efectos desde el inicio, ya que las células permanecieron en un estado simétrico y arrestado con escaso desarrollo neurítico y nula presencia axonal. Lo que se asemeja a uno de los fenotipos observados en respuesta a Shh (Figura 9. D), pero lo hace aún más penetrante ya que un gran porcentaje de las células permanecieron esféricas y sin desarrollar una neurita.

Para explicarnos la morfología esférica, pensamos que el tratamiento con Pur podría haber sido nocivo para la viabilidad celular y que indujese muerte celular, por lo cual evaluamos esta posibilidad mediante IMC contra caspasa-3 clivada y si bien, observamos marca menor en algunas células tanto en condición control como en respuesta a Pur, pero creemos que esta activación de Shh no induce muerte ya que las células en el control muestran una morfología normal. La activación de caspasa-3 en linajes neurales no sólo ha sido relacionada con muerte celular, sino que también con procesos de diferenciación. En neuroesferas generadas a partir de células troncales neurales del cuerpo estriado de ratón se observó que la inhibición de la actividad de caspasa-3 clivada altera y retrasa el proceso de diferenciación, ya que la inhibición de dicha actividad mantiene la expresión de Nestina, relacionada con la mantención del estado indiferenciado y que disminuye a medida que acontece la diferenciación (Fernando y col., 2005). A su vez no se ve un aumento en la expresión de β 3-tubulina,

la cual debiese aumentar durante la diferenciación. Además, la inhibición de la actividad de caspasa-3 reduce dramáticamente la extensión de neuritas durante la neurogenesis. Los autores proponen que estas funciones podrían deberse a la regulación que ejercería caspasa-3 sobre proteínas quinasas involucradas en la diferenciación celular (Fernando y col., 2005). Por lo cual, la detección de caspasa-3 clivada en un pequeño porcentaje de neuronas hipocampales, no sólo podría relacionarse con muerte por apoptosis, sino que también a procesos de diferenciación celular.

También nos planteamos la posibilidad que nuestros cultivos tuviesen un componente glial como contaminación, la cual podría estar respondiendo a Pur y que diese cuenta de este fenotipo, por lo cual utilizamos un marcador de linaje neuronal, NeuN, el cual nos indicó que nuestros cultivos eran de hecho neuronales y no de otro linaje. NeuN es una proteína de unión a DNA específica de neuronas y se distribuye en el núcleo, la zona peri-nuclear y en extensiones neuríticas proximales (Mullen y col., 1992).

Dado que la vía de Shh es un conocido mitógeno que actúa sobre progenitores neurales (Fuccillo y col., 2006, Breunig y col., 2008) y en el hipocampo existen progenitores neurales, nos preguntamos si en nuestro cultivo estaban presentes estos progenitores y que en respuesta al tratamiento estuviesen proliferando. La caza de la marca de BrdU nos mostró que en algunas casos existe marca positiva, y no en todos los experimentos realizados, por lo cual creemos que sí es probable la presencia de progenitores proliferativos, aunque en una mínima proporción, por lo cual esto no da cuenta del total de células esféricas observadas y refuerza la idea que nuestro cultivo está compuesto de neuronas post-mitóticas y que la forma esférica puede estar explicada por la despolarización que sufren las células durante el momento del

aislamiento y que al ser sembradas y recuperan esta asimetría, se hacen sensibles a la presencia de Pur.

Por último, quisimos examinar si los efectos se debían a cambios en la maduración neuronal, lo cual quedó descartado al evaluar la marca de MAP2/tau1 y la marca de tubulina-tyr y acetilada, ya que no observamos alteraciones en estas condiciones.

De acuerdo con nuestra hipótesis, la modulación del citoesqueleto puede explicar las observaciones realizadas. De acuerdo a la literatura, Shh puede modular la actividad de las GTPasas monoméricas RhoA y Rac1 en modelos celulares no neurales a través de la vía no canónica (Chinchilla y col., 2010; Renault y col., 2010; Polizio y col., 2011).

Para evaluar esta hipótesis, utilizamos protocolos distintos para disectar el efecto de la pérdida y de la ganancia de función en la vía Shh. En primer lugar, evaluamos el efecto de Cyc. De acuerdo a la Figura 10, Cyc tiene efectos en el crecimiento a partir de las 48 horas, entonces una explicación para lo observado es que los efectos ocurren entre 24 y 48 horas de cultivo, por lo cual estudiamos en detalle qué pasaba con la vía a las 36 horas de cultivo. Tanto Cyc como 5E1 promueven el crecimiento neurítico, lo que puede deberse al hecho de que apagan el efecto inhibitor del crecimiento que tiene Shh o Pur en esta población celular. Lo más llamativo es que este crecimiento estuvo acorde con la fosforilación de LIMK1, blanco de Rac1. P-LIMK1 a su vez fosforila a cofilina, que en su versión fosforilada favorece la polimerización de actina. Sin embargo, también se ha descrito la fosforilación de LIMK1 por acción de RhoA (Bravo-Cordero y col. 2013), lo cual dificulta el análisis, pero al parecer, luego de 36 horas de inhibición de la vía, LIMK1 y su fosforilación promueven la dinámica del citoesqueleto Sin embargo, los experimentos realizados no permiten aseverar que estos efectos fueron dependientes de la vía no canónica, ya que también

puede ser ambas ocurriendo simultáneamente, sin embargo no hay antecedentes que permitan especular que ambos mecanismos de la señalización están ocurriendo en el mismo tipo celular. Por otro lado, no se puede descartar que este efecto sea de Cdc42, otra GTPasa ya que también se ha descrito que activa a PAK1, quinasa ejecutora de la actividad de Rac1.

Cofilina es fosforilada en serina 3 (Ser3), pero fosforilaciones en otras posiciones indican la existencia de una regulación adicional. PKC α la fosforila en Ser23 y Ser24 y SCR lo hace en Tyr68, ésta última puede inducir la degradación proteosomal de cofilina (Bravo-Cordero y col. 2013).

El efecto de la activación de la vía debería ser contrario al de Cyc, con una activación de RhoA y sus proteínas blanco. Como el efecto de Pur se observó durante toda la ventana temporal analizada, decidimos esperar hasta el fin del cultivo para realizar los estímulos. La determinación de RhoA-GTP demostró que Pur sí induce una activación de esta quinasa luego de 15 minutos de tratamiento lo que nos dice que estos efectos fueron no canónicos y estuvieron acorde a lo observado en cultivo. Cyc no generó una disminución en los niveles de RhoA respecto del control, lo que puede significar que ambas GTPasas se encuentran en actividad dinámica en este tipo celular en respuesta a las distintas vías de señalización activas y que la presencia de Cyc o Pur inclinan el equilibrio hacia a uno u otro lado.

A tener en cuenta, no fue estudiada la expresión de co-receptores que puedan modular la vía de Shh, como Cdo, Boc, Gas e Hhip, pero no descartamos que puedan expresarse en el hipocampo y que participen de la respuesta a Shh. Por ejemplo, la presencia de Hhip podría dar cuenta de los efectos sobre RhoA y la consecuente retracción neurítica, ya que este co-receptor actuaría acorde a lo que ocurre en los

axones comisurales, donde la expresión de Hhip induce la repulsión de ellos en el eje longitudinal (Bourikas y col., 2005).

Estos resultados nos indican que durante el proceso de recuperación de la polaridad que ocurre al sembrar las neuronas, la presencia de Pur interrumpe este proceso generando células de morfología esférica, regulando positivamente la actividad de RhoA. Esto es concordante con los efectos observados en presencia de Cyc que nos indican que la inhibición de la vía de Shh activa a Rac1, con efectos contrarios a los de RhoA.

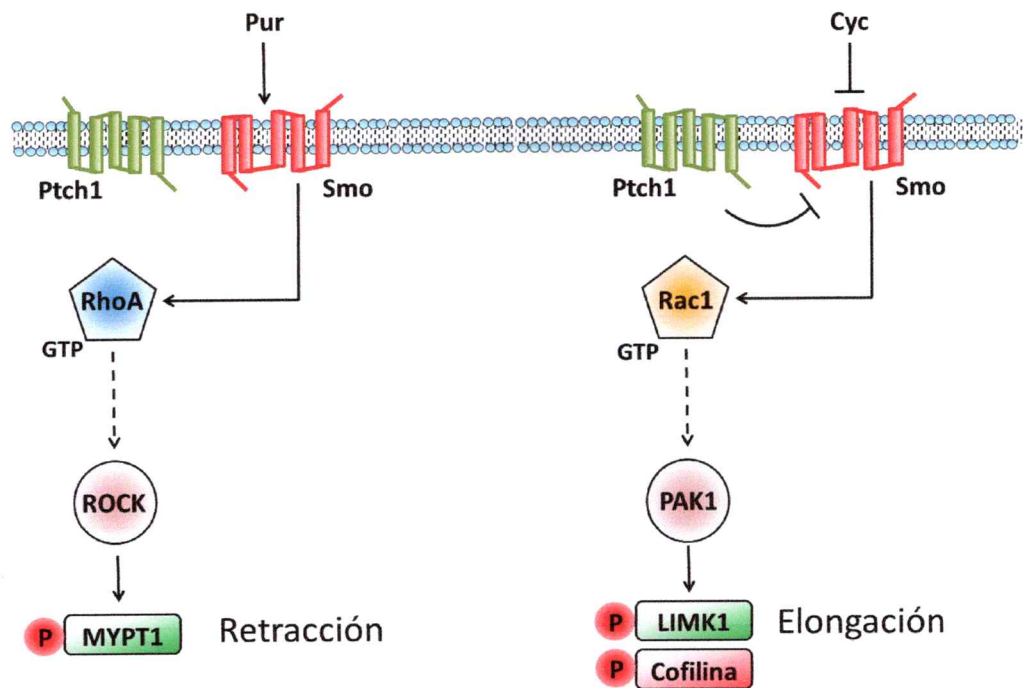


Figura 19. Modelo propuesto. Nuestros resultados sugieren que la actividad de la vía de Shh modula la actividad de las GTPasas monoméricas RhoA y Rac1. Los experimentos de pulldown indican que el uso de Pur genera la activación de RhoA que por consecuencia activaría a ROCK quien fosforila a MYPT1, quien induce el colapso

de la neurita a través de su efecto sobre MCP. La inactivación de la vía por Cyc activaría la vía opuesta ya que observamos la fosforilación en LIMK1 y cofilina, indicativas de la actividad de Rac1 y por consecuencia, la elongación neurítica (Figura 19).

Conclusiones

1. Los componentes de la vía Shh se expresan en neuronas hipocampales de ratón.
2. La vía de Shh es fundamental para la neuritogénesis en neuronas hipocampales embrionarias ya que la estimulación de la vía altera la adquisición de polaridad y el desarrollo neurítico en cultivo.
3. El uso de Cyc hasta las 36 horas de crecimiento induce un crecimiento neurítico por sobre el control pero no podemos determinar si estos efectos son o no canónicos. Estos efectos estuvieron acompañados de la fosforilación de LIMK-1 y cofilina, indicativo de la actividad de Rac1.
4. La activación de la vía no canónica usando Pur a través de Smo, induce la activación de la GTPasa monomérica RhoA.
5. La vía de Shh juega un papel en el desarrollo neurítico de neuronas hipocampales embrionarias, ya que modularía la actividad de las GTPasas monoméricas RhoA y Rac1.

Proyecciones

La regulación de las GTPasas RhoA y Rac1 parecen depender de Shh y del tiempo de cultivo, por lo cual podría estudiarse en las distintas etapas de desarrollo ya descrito el efecto de tratamientos cortos con Shh, Pur y Cyc. Además, es posible evaluar la expresión de co-receptores tales como Cdo, Boc y Hhip que pueden tener una participación importante de este proceso.

No ha sido demostrado que la vía canónica y no canónica sean excluyentes en un mismo modelo celular, por lo cual sería interesante evaluar esta situación pues es posible que cambios generados en tiempos cortos puedan ser perpetuados en el tiempo gracias a la transcripción de nuevos genes.

Presentaciones en Congresos

Zavala, G., Bórquez, D., Villarroel, D., Palma, V. y González-Billault, C. 2011. Sonic hedgehog (Shh) pathway regulates axonal elongation in hippocampal neurons through a non-canonical dependent signaling pathway which modulates RhoGTPases activity, 1st HEALING International Meeting: Hh-Gli Signaling in Development, Regeneration and Cancer, Creta, Grecia.

Bibliografía

1. Arimura, N. & Kaibuchi, K. 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**: 194-205.
2. Banker, G. & Cowan, M. 1977. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Research.* **126**: 397-425.
3. Bravo-Cordero, J., Magalhaes, M., Eddy, R., Hodgson, L., Condeelis, J. 2013. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **14**: 405-416.
4. Brennan, D., Chen, X., Cheng, L., Mahoney, M., Riobo, N. 2012. Noncanonical Hedgehog Signaling. **88**: 55-72.
5. Brewer, J., Torricelli, J., Evege, E., 1993. Price optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal™, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research* **35**: 567-576.
6. Bijlsma, M., Borensztajn, K., Roelink, H., Peppelenbosch, M., Spek, A. 2007. Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites. *Cellular Signalling* **19**: 2596-2604.
7. Bijlsma, M., Peppelenbosch, M., Spek, Roenlik, H. 2008. Leukotriene synthesis is required for hedgehog-dependent neurite projection in neuralized embryoid bodies but not for motor neuron differentiation. *Stem Cells* **26**:1138-1145.
8. Birukova, A., Smurova, K., Birukov, K., Usatyuk, P., Liu, F., Kaibuchi, K., Ricks-Cord, A., Natarajan, V., Alieva, I., Garcia, J., Verin, A. 2004. Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms. *J. Cell Physiol.* **201**: 55-70.
9. Bourikas, D., Pekarik, V., Baeriswyl, T., Grunditz, A., Sadhu, R., Nardó, M., Stoeckli, E. 2005. Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat. Neurosci.* **8**: 297-304.
10. Breunig, J., Sarkisian, M., Arellano, J., Morosov, Y., Ayoub, A., Sojitra, S., Wang, B., Flavell, R., Rakic, P., Town, T. 2008. Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *PNAS.* **105**: 13127-13132.
11. Briscoe, J., Théron, P. 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **14**: 416-429.
12. Carney, T. & Ingham, P. 2013. Drugging Hedgehog: signaling the pathway to translation. *BMC Biology.* **11**:37-42.
13. Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A. y Tessier-Lavigne, M. 2003. The Morphogen Sonic Hedgehog Is an Axonal Chemoattractant that Collaborates with Netrin-1 in Midline Axon Guidance. *Cell.* **113**: 11-23.
14. Chinchilla, P., Xiao, L., Kazanietz, M. y Riobo, N. 2010. Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle.* **3**: 570-579.
15. Dahmane, N & Ruiz i Altaba, A. 1999. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development.* **126**: 3089-3100.
16. Fabre P, Shimogori T, Charron F. 2010. Segregation of ipsilateral retinal cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc. *Journal of Neuroscience.* **30**: 266-275.

17. Fernando, P., Brunette, S., Megeney, L. 2005. Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity. *FASEB J* **19**: 1671-1673.
18. Fragoso, Y., Shearer, K., Sementilli, A., de Carvalho, L., McCaffery, P. 2012. High expression of retinoic acid receptors and synthetic enzymes in the human hippocampus. *Brain Struct Funct.* **217**: 473-483.
19. Fuccillo, M., Joyner, A. y Fishell, G. 2006. Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**: 772-784.
20. Fukushima, N., Furuta, D., Hidaka, Y., Moriyama, R., Tsujiuchi, T 2009. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem.* **109**: 683-693.
21. Gonzalez-Billault, C. Munoz-Llancao, P., Henriquez, D., Wojnacki, J., Conde, C., Caceres. 2011. The Role of Small GTPases in Neuronal Morphogenesis and Polarity. *Cytoskeleton*, **69**: 464-485.
22. Govek, E., Newey, S. y Van Aelst, L. 2005. The role of the Rho GTPases in neuronal development, *Genes Dev.* **19**: 1-49.
23. Guo, D., Standley, C., Bellve, K., Fogarty, K., Bao, Z. 2012. Protein kinase Ca and integrin-linked kinase mediate the negative axon guidance effects of Sonic hedgehog. *Molecular and Cellular Neuroscience.* **50**: 82-92.
24. Hammond, R., Blaess, S., Abeliovich, N. 2009. Sonic Hedgehog is a chemoattractant for midbrain dopaminergic axons. *PLoS One.* **4**: e7007.
25. Heasman, S. & Ridley, A. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Rev Mol Cell Bio.* **9**: 690-701.
26. Holtz, A., Peterson, K., Nishi, Y., Morin, S., Charron, F., McMahon, A., Allen, B., Song, Y. 2013. Essential role for ligand-dependent feedback antagonism of vertebrate hedgehog signaling by PTCH1, PTCH2 and HHIP1 during neural patterning. *Development.* **140**: 3423-3434.
27. Hui, C. & Angers, S. 2011. Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **27**: 513-537.
28. Ingham, P. 2001. Hedgehog signaling: a tale of two lipids. *Science.* **294**: 1879-1881.
29. Ingham, P. & McMahon, A. 2001. Hedgehog signaling in animal development paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**: 3059-3087.
30. Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F., Hartshorne, D. 2004. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem.* **259**: 197-209.
31. Jaffe, A. y Hall, A. 2005. Rho GTPases: Biochemistry and Biology, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**: 247-269.
32. Jeong, J. & McMahon, A. 2005. Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development.* **132**: 143-154.
33. Kanda, S., Mochizuki, Y., Suematsu, T., Miyata, Y., Nomata, K., Kanetake, H, 2003. Sonic Hedgehog Induces Capillary Morphogenesis by Endothelial Cells through Phosphoinositide 3-Kinase, *J. Biol. Chem.* **278**: 8244-8249.
34. Kaech, S. & Banker, G. 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols.* **1**: 2406-2416.
35. Kennedy, T., Serafini, T., de la Torre, J., Tessier-Lavigne, M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell.* **78**: 425-435.

36. Kolpak, A., Zhang, J., Bao, Z. 2005. Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *J. Neurosci.* **25**: 3432-3441.
37. Mitchell, R., Petralia, R., Currier, D., Wang, X., Kim, A., Mattson, M., Yao, P. 2012. Sonic hedgehog regulates presynaptic terminal size ultrastructure and function in hippocampal neurons, *J. Cell. Sci.* **125**: 4207-4213.
38. Luo L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci.* **1**:173-180.
39. Nüsslein-Volhard. C. & Wieschaus. E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* **287**: 795-801.
40. Park, H. & Poo, M. 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci.* **14**: 7-23.
41. Petralia, R., Schwartz, C., Wang, Y.X., Mattson, M. y Yao, P. 2011. Subcellular localization of Patched and Smoothed, the receptors for Sonic Hedgehog signaling, in the hippocampal neuron. *J. Comp. Neurol.* **519**: 3684-3699.
42. Polizio, A., Chinchilla, P., Chen, L., Kim, S., Manning, D. y Riobo, N. 2011. Heterotrimeric G_i proteins link hedgehog signaling to activation of Rho-small GTPases to promote fibroblast migration. *J Biol Chem.* **286**:19589-19596.
43. Pool, M., Thiemann, J., Bar-Or, A., Fournier, A. 2008. NeuriteTracer: A novel ImageJ plugin for automated quantification of neurite outgrowth. *J. Neurosci. Methods.* **168**: 134-139.
44. Renault, M., Roncalli, J., Tongers, J., Thorne, T., Klyachko, E., Misener, S., Volpert, O., Mehta, S., Burg, A., Luedemann, C., Qin, G., Kishore, R., Losordo, D. 2010. Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* **49**: 490-498.
45. Riobo, N., Saucy, B., DiLizio, C., Manning, D. 2006. Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed. *PNAS.* **103**: 12607-12612.
46. Riobo, N., Haines, G., Emerson, C., Jr. 2006. Protein Kinase C- δ and Mitogen-Activated Protein/Extracellular Signal-Regulated Kinase-1 Control GLI Activation in Hedgehog Signaling. *Cancer Res.* **15**: 839-845.
47. Rodger, J., Salvatore, L., Migani, P. 2012. Should I stay or should I go? Ephs and ephrins in neuronal migration. *Neurosignals.* **20**: 190-201.
48. Ruiz i Altaba, A., Palma, V. y Dahmane, N. 2002. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat. Rev. Neurosc.* **3**: 24-34.
49. Sakumura, Y., Tsukada, Y., Yamamoto, N., Ishii, S. 2005. A molecular model for axon guidance based on cross talk between rho GTPases. *Biophys J.* **89**: 812-822.
50. Sanchez-Camacho, C. & Bovolenta, P. 2008. Autonomous and non-autonomous Shh signaling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion axons. *Development.* **135**: 3531-3541.
51. Sánchez-Camacho, C. & Bovolenta, P. 2009. Emerging mechanisms in morphogen-mediated axon guidance- *BioEssays.* **9999**: 1-13.
52. Sasaki, N., Kurisu, J. y Kengaku, M. 2010. Sonic hedgehog signaling regulates actin cytoskeleton via Tiam1-Rac1 cascade during spine formation. *Mol. and Cell Neurosci.* **45**: 335-344.
53. Sauvageot, C. & Stiles, C., 2002. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Current Opinion in Neurobiology.* **12**: 244-249.

54. Sheng, T., Chi, S., Zhang, X. y Xie, J. 2006. Regulation of Gli1 localization by the cAMP/Protein kinase a signaling axis through a site near the nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* **281**: 9-12.
55. Sims, J., Lee, SW., Topalkara, K., Qiu, J., Xu, J., Zhou, Z. y Moskowitz, M. 2009. Sonic Hedgehog regulates ischemia/hypoxia-induced neural progenitor proliferation. *Stroke.* **40**: 3618-3626.
56. So, P., Yip, P., Bunting, S., Wong, L., Mazarakis, N., Hall, S. McMahon, S., Maden, M., Corcoran, J. 2006. Interactions between retinoic acid, nerve growth factor and sonic hedgehog signalling pathways in neurite outgrowth. *Developmental Biology.* **298**: 167-175.
57. Stanton, B. & Peng, L. 2010. Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Mol BioSyst.* **6**: 44-54.
58. Traiffort, E., Charytoniuk, D., Faure, H. y Ruat, M. 1998. Regional distribution of Sonic Hedgehog, Patched, and Smoothed in the adult rat brain. *J. Neurochem.* **70**: 1327, 1330.
59. Trousse, F., Martí, E., Gruss, P., Torres, M. y Bovolenta, P. 2001. Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development.* **128**: 3927-3936.
60. Wechsler-Reya, R., Scott, M. 1999. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron.* **22**: 103-114.
61. Williams, S., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D., Gale, N., Holt, C., Mason, C., Henkemeyer, M. 2003. Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron.* **39**: 919-935.
62. Yang, N., Higuchi, O. Ohashi, K. Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., Mizuno, K. 1998. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature.* **393**: 809-812.
63. Zafra, F., Lindholm, D., Castén, A., Hartikka, J., Thoenen, H. 1993. Regulation of Brain-derived Neurotrophic Factor and Nerve Growth Factor mRNA in Primary Cultures of Hippocampal Neurons and Astrocytes. *The Journal of Neuroscience.* **12**: 4793-4799.