

“Desarrollo del sistema respiratorio: Rol de Sonic hedgehog en modelo de ratón *Mus musculus*”

“Development of the respiratory system: Role of Sonic hedgehog in
Mus musculus mouse model”

Daniel Conei, Mariana Rojas

¹Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

²Laboratorio de Embriología Comparada, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Título Abreviado: Desarrollo del sistema respiratorio

Información del Artículo

Recepción: 18 de Junio de 2019

Aceptación: 25 de Julio de 2019

RESUMEN

Introducción: Para el desarrollo embrionario y fetal del sistema respiratorio, es necesaria la expresión de moléculas clave capaces de actuar dependientes de la distancia y de su concentración, llamadas morfógenos. Uno de ellos es Sonic hedgehog (Shh), proteína fundamental para la diferenciación epitelial y mesenquimal. Sin embargo, hay controversias sobre su localización y cuantificación en distintos estadios del desarrollo. **Objetivo:** Determinar la inmunolocalización e intensidad de inmunoreacción de Shh en embriones y fetos de ratón *Mus musculus* BALB/c. **Método:** Se utilizaron 10 ratones hembras jóvenes (*Mus musculus*) BALB/c, las cuales fueron divididas en 2 grupos de 5 gestantes cada uno: grupo embrionario de 12,5 días post-coital (dpc) y grupo fetal de 17,5 dpc. Los embriones y fetos fueron procesados y se realizaron cortes seriados de 5 m de espesor. Se realizó inmunohistoquímica con anticuerpo anti-Shh y se analizaron las muestras marcadas positivamente, midiéndose la densidad óptica integrada (DOI) y porcentaje de área positiva para inmunotinción. **Resultados:** A los 12,5 dpc, Shh se inmunolocalizó en las células epiteliales de bronquios grandes y bronquios segmentarios, no así en los bronquiolos en formación, con un DOI de $0,361 \pm 0,079$ y porcentaje de área inmunoreactiva de $13,87 \pm 1,109$ %. En el grupo fetal de 17,5 dpc, la inmunotinción se ubicó en el epitelio en bronquiolos segmentarios, y fue inmunonegativa en bronquiolos respiratorios, sacos alveolares y alvéolos, con DOI de $0,081 \pm 0,041$ y $0,409 \pm 0,077$ % de área reactiva, siendo significativamente menor ($p < 0,0001$). **Conclusiones:** Shh actúa como un morfógeno clave en el desarrollo respiratorio, expresándose tanto en las etapas embrionaria como fetal en los segmentos proximales: bronquios y bronquiolos, respectivamente, disminuyendo la intensidad de inmunoreacción a medida que avanza el desarrollo ontogénico pulmonar.

Palabras claves: Sonic hedgehog, morfógeno, desarrollo, sistema respiratorio, *Mus musculus*.

ABSTRACT

Introduction: For embryonic and fetal development of the respiratory system, is necessary the expression of key molecules capable of acting depending on the distance and concentration, called morphogens, is necessary. One of them is Sonic hedgehog (Shh), a fundamental protein for epithelial and mesenchymal differentiation. However, there are controversies about its location and quantification at different stages of development. **Objective:** Determine the immunolocalization and immunoreaction intensity of Shh in embryos and fetuses of *Mus musculus* mouse BALB/c. **Method:** We used 10 young female mice (*Mus musculus*) BALB/c, which were divided into 2 groups with 5 pregnant each: embryonic group of 12.5 days post-coital (dpc) and fetal group of 17.5 dpc. The embryos and fetuses were processed and serial cuts of 5 μ m thickness were made. Immunohistochemistry was performed with anti-Shh antibody and the positively labeled samples were analyzed, measuring the integrated optical density (IOD) and percentage of positive area for immunostaining. **Results:** At 12.5 dpc, Shh was immunolocalized at epithelial cells of large bronchi and segmental bronchi, but not in the bronchioles in formation, with a IOD of 0.361 ± 0.079 and a percentage of immunoreactive area of 13.87 ± 1.109 %. In the fetal group of 17.5 dpc, the immunostaining was located at the epithelium in segmental bronchioles, and was immunonegative in respiratory bronchioles, alveolar sacs and alveoli, with IOD of 0.081 ± 0.041 and 0.409 ± 0.077 % of reactive area, being significantly lower ($p < 0.0001$). **Conclusions:** Shh acts as a key morphogen in respiratory development, expressing itself in both the embryonic and fetal stages in the proximal segments: bronchi and bronchioles, respectively, decreasing the immunoreaction intensity as pulmonary ontogenetic development progresses.

Key word: Sonic hedgehog, morphogen, development, respiratory system, *Mus musculus*.

Introducción

El desarrollo de un ser individual funcional es el resultado de un proceso altamente regulado, el cual es comandado por diversas vías de señalización y mecanismos de interacción capaces de conformar una red molecular íntimamente entrelazada. Estas vías de señalización actúan controlando procesos celulares fundamentales, tales como: supervivencia, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis, entre otras, teniendo como resultado final la formación de órganos y sistemas¹.

Un ejemplo de ello es lo que ocurre en el desarrollo pulmonar tanto en el modelo humano como murino. La conformación de este sistema a lo largo de la gestación sigue el principio de morfogénesis de ramificación, en donde a partir de células provenientes de endodermo comienzan a proliferar hacia el mesénquima lateral esplácnico adyacente, generando una estructura tubular ramificada rodeada por células mesenquimales². Esta ramificación se divide en cinco fases: fase embrionaria, pseudoglandular, canalicular, sacular y alveolar. Las primeras cuatro dan como resultado la estructura ramificada que termina en sacos alveolares rodeados de vasos sanguíneos y son parte del desarrollo prenatal³. En cambio, la fase alveolar comienza desde la semana 34 de gestación y culmina entre los 8 a 10 años post-natal, en donde los sacos terminales dan lugar a conductos alveolares maduros y alvéolos, mientras que en el desarrollo pulmonar en modelo murino se completa en 4 semanas post-natales⁴.

Una red elaborada de factores de crecimiento, factores de transcripción y moléculas de matriz extracelular son capaces de regular el crecimiento pulmonar embrionario². En este proceso, estas moléculas se denominan morfógenos, las cuales son producidas y secretadas por un grupo de células embrionarias, teniendo la capacidad de difundir y actuar sobre otras células o tejidos a distancia, unirse a receptores de membrana y gatillar respuestas celulares dependientes de la concentración del morfógeno⁵. A raíz de ello, células localizadas de manera distante del centro morfogenético inductor responderán de manera diferente, adquiriendo la información posicional precisa⁶.

En el desarrollo del sistema respiratorio, varias vías que lo regulan han despertado interés en la comunidad científica, ya que algunas de ellas se vuelven a expresar en estados de enfermedad en la etapa adulta². Uno de estas es la vía hedgehog (HH), una cascada de señali-

zación que regula la morfogénesis del sistema respiratorio⁷. Dentro de las proteínas que comandan esta vía se encuentra Sonic Hedgehog (Shh), proteína que se inmunolocaliza en el desarrollo del epitelio respiratorio, comenzando su expresión en los extremos de la yema respiratoria, siendo posteriormente gradual a lo largo de las etapas pseudoglandular y canalicular, hasta disminuir en el periodo sacular y alveolar^{8,9}. Sin embargo, la cuantificación de su expresión aún genera controversias según el periodo de desarrollo. Es por ello que el objetivo de estudio fue determinar la inmunolocalización e intensidad de inmunoreacción de Shh en embriones y fetos de ratón *Mus musculus* BALB/c.

Material y método

Para la realización del presente estudio, se contó con la aprobación del Comité Ético Científico de la Universidad de La Frontera N° de Folio 085_15. Se conformaron dos grupos de 5 ratones hembras jóvenes (*Mus musculus*) BALB/c cada uno. Su cruce programada fue con machos reproductivamente sanos y jóvenes, y a las 12 h post-coital se verificó el tapón mucoso a nivel vaginal, correspondiendo al día post-coital (dpc) 0,5.

Se conformó el grupo embrionario, donde a los 12,5 dpc, 5 ratones gestantes se eutanasiaron con solución de eutanasia xilacina en dosis 1,1 a 2,2 mg/kg y ketamina en dosis de 10 a 20 mg/kg, extrayéndose los embriones. Para el grupo fetal, se aplicó el mismo protocolo de eutanasia a los 17,5 dpc a las 5 gestantes restantes, extrayendo los fetos.

Para inmunolocalizar Shh, se utilizó el anticuerpo policlonal anti-Shh (Santa Cruz Biotechnology, H-160, conejo). Las muestras se fijaron en formalina taponada en PBS y posteriormente incluidas en paraplast. Se realizaron cortes de 5 µm de manera transversal en micrótomo Leica (RM2255) desde el nivel cervical hasta el nivel torácico en sentido céfalo-caudal, siendo adheridos 4 cortes a un portaobjeto cargado positivamente (Citoglas), hasta obtener la totalidad del tejido respiratorio. Para la recuperación antigénica se utilizó vaporera con solución desenmascarante de antígenos (Vector Labs, H-3301). El bloque de peroxidasa endógena se realizó con peróxido de hidrógeno en metanol y el bloqueo inespecífico de proteínas con PBS+BSA al 3%. La dilución del anticuerpo primario fue 1:100 en PBS. Se incubó con polímero conjugado con anticuerpo anti-conejo y HRP por 15 minutos para la detección

del anticuerpo primario (SuperPicture™, Thermo Fisher, 878963). Como sustrato se utilizó diaminobencidina (DAB, Vector Labs, SK-4100) durante 1-2 minutos. Para el control negativo se desarrolló la técnica inmunohistoquímica completa sin la incubación con el anticuerpo primario. Como control positivo interno se consideró la notocorda.

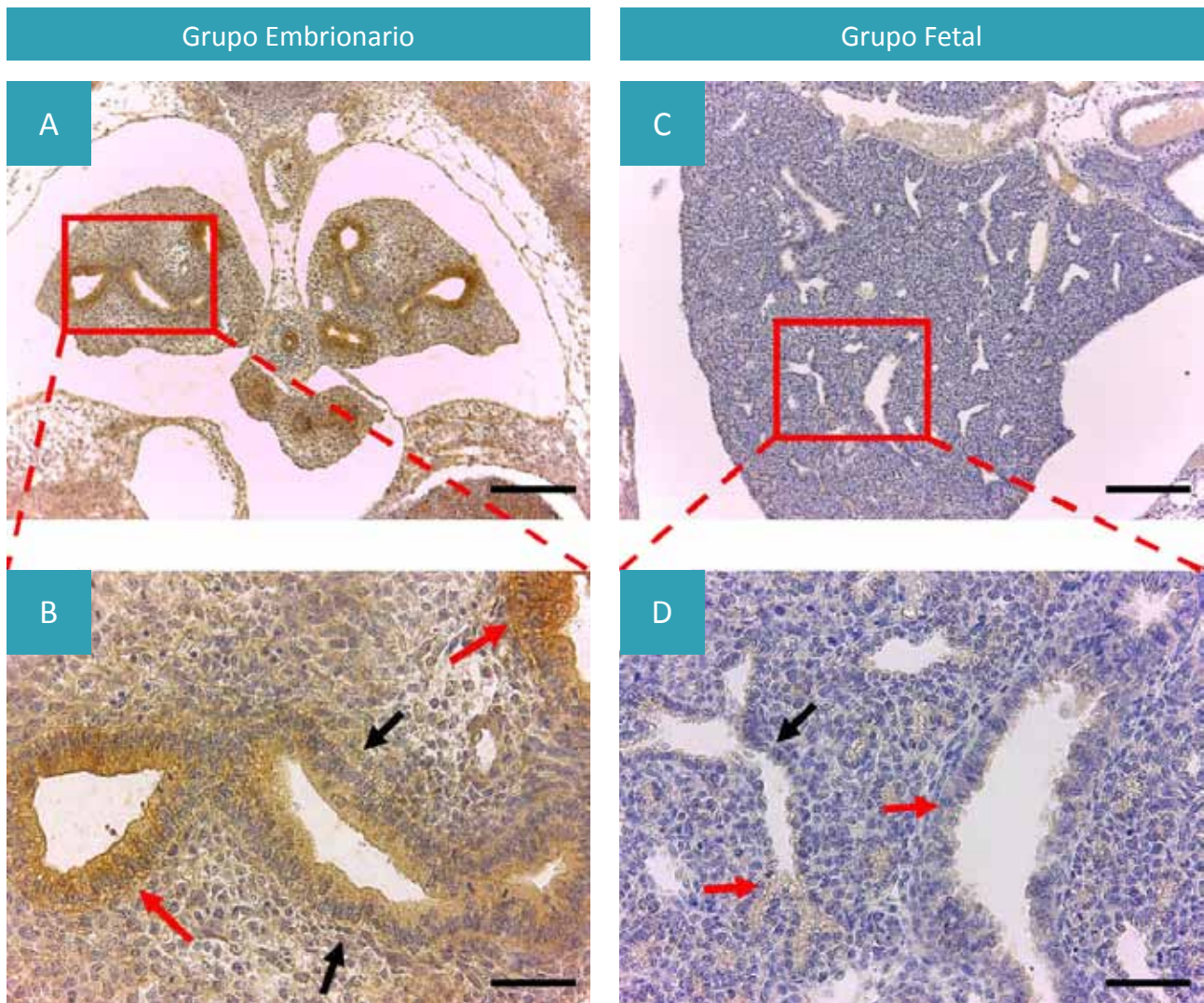
Se fotografiaron los cortes con un microscopio Leica (DM750) con cámara digital HD Leica (ICC50 HD), analizados según su marcación positiva al anticuerpo y descritos morfológicamente. Se midió densidad óptica integrada (DOI) y porcentaje de área positiva para inmunotinción con el programa ImageJ 1.8.0 (NIH, E.E.U.U.) en el sistema respiratorio. Los resultados fueron presentados como media y desviación estándar.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., E.E.U.U.). Se aplicó la prueba U de Mann-Whitney, y se consideró el valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

A los 12,5 dpc, se evidenció inmunotinción positiva a Shh en todas las muestras analizadas, inmunolocalizándose a nivel epitelial de bronquios grandes y bronquios segmentarios, no así en los bronquiolos en formación. Estos segmentos inmunopositivos presentan un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con núcleos celulares en diferentes alturas. En cambio, a nivel bronquiolar se encuentra un epitelio de

Figura 1. Inmunotinción de Shh en los grupos embrionario y fetal.



En A, se observa pulmón embrionario de 12,5 días post-coital. Barra 200 μm , 10x. En B (magnificación de la imagen anterior 400x) flechas rojas indican inmunopositividad a Shh en bronquios y flechas negras inmunonegatividad en bronquiolos. Barra 100 μm . En C, se observa pulmón fetal de 17,5 días post-coital. Barra 200 μm , 10x. En D, (magnificación de la imagen anterior 400x) flechas rojas indican inmunopositividad leve a Shh en bronquiolos segmentarios y flechas negras inmunonegatividad en bronquiolos respiratorios. Barra 100 μm .

transición, dando paso a un epitelio cilíndrico simple (Figura 1 A y B). En el grupo fetal de 17,5 dpc, la inmunotinción fue de carácter leve en el citoplasma del epitelio en bronquiolos segmentarios, y fue inmunonegativa en bronquiolos respiratorios, sacos alveolares y alvéolos (Figura 1 C y D).

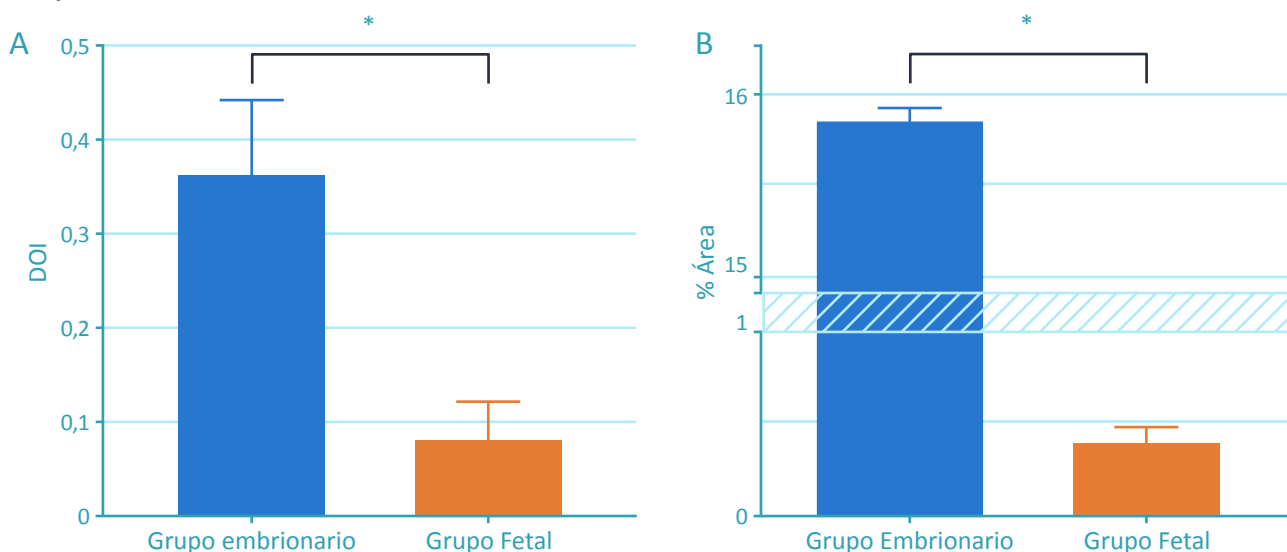
Al comparar ambos grupos, hubo diferencias significativas entre ambos tanto en la DOI, como en el porcentaje de área inmunoreactiva. En el caso de la DOI, el grupo embrionario presentó $0,361 \pm 0,079$, siendo mayor al grupo fetal con $0,081 \pm 0,041$, con valor $p < 0,0001$. En el caso del área inmunoreactiva, el comportamiento fue similar. El grupo embrionario evidenció un $13,871,109 \%$, comparado con el grupo fetal con $0,409 \pm 0,077 \%$ (Figura 2).

Discusión

El objetivo del presente estudio fue determinar la inmunolocalización e intensidad de inmunoreacción de Shh, tanto en embriones como en fetos en modelo murino. Se evidenció que en la etapa embrionaria, este morfógeno se expresa a nivel epitelial de las primeras divisiones del árbol bronquial con una elevada intensidad y porcentaje de área inmunorreactiva, no así en los segmentos más distales como en los bronquiolos en formación. En cambio, en el grupo fetal la intensidad de Shh fue de carácter leve en el epitelio de los bronquiolos segmentarios, e inmunonegativa en las porciones terminales del parénquima pulmonar.

A lo largo del desarrollo embrio-fetal, Shh se expresa en el epitelio respiratorio con un patrón complejo y cambiante. En este sentido, Miller *et al.* (2001) realizaron una evaluación inmunohistoquímica de Shh a través del desarrollo pulmonar de ratón desde los 10,5 dpc hasta los 24 días post-natal (dpcn). Detectaron Shh en el epitelio distal del pulmón en desarrollo desde los 10,5 a 16,5 dpc. Posteriormente, desde los 16,5 dpc hasta los 15 dpcn su inmunoexpresión se localizó en las células epiteliales de las vías aéreas periféricas⁹. Estos resultados concuerdan con lo presentado, como también la inmunolocalización de Shh fue en células epiteliales cilíndricas, no así en células cúbicas y planas de la vía respiratoria terminal. Similar a lo anterior pero con otra técnica para evaluar la expresión de Shh, fue lo realizado por Sato *et al.* en 2008, donde a través de tomografía de proyección óptica e hibridación *in situ* evaluaron tridimensionalmente la distribución tisular del ARN de Shh a lo largo de la organogénesis en modelo murino entre los 9 a 12 dpc, determinando que la expresión de Shh se sitúa a nivel epitelial de los grandes segmentos de la vía aérea, llegando a los 12 dpc a bronquios¹⁰. En el 2018, Conei *et al.* evaluaron la inmunolocalización de Shh en embriones de 12,5 y fetos de 17,5 dpc por medio de inmunohistoquímica en una serie de cortes seriados céfalo-caudal, en donde demostraron que la localización de Shh en la etapa embrionaria se encuentra a nivel de notocorda, placa del piso del tubo neural, precartilago de radio y ulna, en gran parte de los epitelios en desarrollo: bronquial, intestinal, vejiga y uretra. En cambio, en la etapa fetal la inmunopositividad desaparece en el cartílago a excepción de zonas

Figura 2: Gráficos de la cuantificación de Shh, comparando grupo embrionario de 12,5 días post-coital y grupo fetal de 17,5 días post-coital.



En A, Densidad óptica integrada (DOI). En B, porcentaje de área inmunoreactiva (%). * $p < 0,0001$.

de osificación, disminuye en la epidermis pero aparece en folículos pilosos, como también a nivel de las vellosidades intestinales es marcada⁸.

Estos hallazgos se relacionan con la actividad morfo-genética de Shh a lo largo de la gestación, debido a que distintos grupos celulares ubicados a diferentes distancias de un centro inductor capaz de elaborar un morfógeno, como Shh, son capaces de responder de manera diferenciada dependiendo del estadio del desarrollo ontogénico¹¹. Es por ello que no todas las células responderán de igual forma frente a un estímulo morfo-genético, tomando relevancia la concentración de éste, ya que a diferentes concentraciones será distinta la información posicional de estos grupos celulares, gatillando respuestas celulares diversas y relacionadas con el espacio y estadio de desarrollo⁵. En el caso del sistema respiratorio, la expresión de Shh sugiere un papel polarizador durante la fase de ramificación entre los periodos pseudoglandular y canalicular circunscrito a las células epiteliales cilíndricas, debido a que poco a poco comienza a disminuir su intensidad a medida que se acerca el desarrollo fetal. Incluso, se ha demostrado que Shh disminuye sólo después del nacimiento¹². Por su parte, una vez que se completa el desarrollo de un órgano en particular, muchas vías morfo-genéticas son capaces de suprimirse o restringirse al mantenimiento de células madre específicas del propio tejido¹³.

Shh es indispensable para la formación de pulmones embrionarios, la regulación de la morfogénesis de ramificación y la proliferación mesenquimal. En este sentido, se ha visto que en ratones *knockout* a los que se les inhibió la expresión de Shh, presentaron pulmones hipoplásicos de un solo lóbulo, tejido epitelial y mesenquimal escasos, y con presencia de fístulas traqueo-esofágicas^{14,15}. Otro estudio también en el mismo modelo, evidenció que al ausencia de Shh a los 12,5 dpc produce una leve anulación de la morfogénesis bronquial distal pero deja intacta la ramificación proximal, como también afecta la diferenciación de las células musculares lisas bronquiales¹⁶. Esto indica que Shh no sólo influye en la diferenciación epitelial, sino también en la diferenciación mesenquimática adyacente.

Por otro lado, el presente modelo animal utilizado presenta importantes similitudes al comparar la expresión de Shh con humanos. Zhang *et al.* (2010) demostraron que Shh se expresa en el epitelio respiratorio en humanos en desarrollo, siendo aumentada en el periodo pseudoglandular y con una marcada disminución en el

periodo canalicular. Además, evidenciaron que en la etapa pseudoglandular temprana tanto en el pulmón humano como en el de ratón, el epitelio primitivo de las vías respiratorias comenzó a diferenciarse en células ciliadas. En la misma etapa, las células mesenquimales comenzaron a formar células cartilagosas y musculares lisas¹⁷. Esto demuestra que el desarrollo pulmonar humano y el modelo murino comparten similitudes durante el proceso de ramificación temprana.

Como limitaciones del estudio, se encuentra el hecho de la cuantificación de la reacción inmunohistoquímica de manera indirecta, ya que para complementar el resultado sobre la disminución de la expresión de Shh en el periodo fetal, serían necesarios otros estudios más específicos de expresión génica y proteómica.

En conclusión, Shh actúa como un morfógeno clave en el desarrollo respiratorio, expresándose tanto en las etapas embrionaria como fetal en los segmentos proximales: bronquios y bronquiolos, respectivamente, disminuyendo la intensidad de inmunoreacción a medida que avanza el desarrollo ontogénico pulmonar.

Referencias bibliográficas

1. Fernandes-Silva H, Correia-Pinto J & Moura RS (2017). Canonical Sonic Hedgehog Signaling in Early Lung Development. *J Dev Biol.*;5(1): E3.
2. Kugler MC1, Joyner AL, Loomis CA, et al (2015). Sonic hedgehog signaling in the lung. From development to disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.*; 52(1): 1-13.
3. Kimura J & Deutsch GH (2007). Key mechanisms of early lung development. *Pediatr Dev Pathol.*;10(5): 335-47.
4. Joshi S & Kotecha S (2007). Lung growth and development. *Early Hum Dev.*;83(12): 789-94.
5. Rojas M, Signore IA & Mejías R (2014). Morfógenos durante el desarrollo embrionario de vertebrados. *Int J Morphol.*;32(1):319-326.
6. Briscoe J & Small S (2015). Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development.*, 142(23): 3996-4009.
7. Ingham PW & McMahon AP (2001). Hedgehog sig-

naling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.*;15(23): 3059-87.

8. Conei D, Saint-Pierre G, Fierro R, et al (2018). Inmunolocalización de Sonic hedgehog en el desarrollo embrio-fetal de ratones (*Mus musculus*). *Int J Morphol.*;36(2): 693-698.

9. Miller LA, Wert SE & Whitsett JA (2001). Immunolocalization of sonic hedgehog (Shh) in developing mouse lung. *J Histochem Cytochem.*;49(12): 1593-604.

10. Sato H, Murphy P, Giles S, et al (2008). Visualizing expression patterns of Shh and Foxf1 genes in the foregut and lung buds by optical projection tomography. *Pediatr Surg Int.*; 24(1): 3-11.

11. Cohen M, Briscoe J & Blassberg R (2013). Morphogen interpretation: the transcriptional logic of neural tube patterning. *Curr Opin Genet Dev.*;23(4):423-8.

12. Bellusci S, Furuta Y & Rush MG (1997). Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development.*;124(1): 53-63.

13. Brownell I, Guevara E, Bai CB, et al (2011). Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell Stem Cell.*; 8(5):552-65.

14. Pepicelli CV, Lewis PM & McMahon AP (1998). Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol.*;8(19): 1083-6.

15. Litingtung Y, Lei L, Westphal H, et al (1998). Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet.*;20(1): 58-61.

16. Bai CB, Auerbach W, Lee JS, et al (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development.*;129(20): 4753-61.

17. Zhang M, Wang H, Teng H, et al (2010). Expression of SHH signaling pathway components in the developing human lung. *Histochem Cell Biol.*;134(4): 327-35.

Correspondencia

Daniel Conei.

Dirección: Avenida Francisco Salazar # 01145, Universidad de La Frontera, Temuco Chile.

Telephone: +56452596550 – Mobile: +56957850987

E-mail: d.conei01@ufromail.cl