UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

INSTITUTO DO CÉREBRO- ICE

"EFEITOS DA SINALIZAÇÃO POR *SONIC HEDGEHOG* SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS E GLIOGÊNESE NO CÓRTEX CEREBRAL EM DESENVOLVIMENTO"

GEISSY LAINNY DE LIMA ARAÚJO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NATAL 2014

GEISSY LAINNY DE LIMA ARAÚJO

"EFEITOS DA SINALIZAÇÃO POR *SONIC HEDGEHOG* SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS E GLIOGÊNESE NO CÓRTEX CEREBRAL EM DESENVOLVIMENTO"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

ORIENTADOR:

Dr. Marcos Romualdo Costa

NATAL

2014

TÍTULO: “EFEITOS DA SINALIZAÇÃO POR *SONIC HEDGEHOG* SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS E GLIOGÊNESE NO CÓRTEX CEREBRAL EM DESENVOLVIMENTO”

Autora: Geissy Lainny de Lima Araújo

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcos Romualdo Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Profa. Dra. Cecília Hedin Pereira

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Rodrigo N. Romcy Pereira

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

DEDICATÓRIA

Todo o trabalho, todo o estudo, todo o esforço e todo crescimento proveniente disso eu dedico aos responsáveis pela minha existência e formação. Meus pais, Graça Araújo e Carlos Araújo, guerreiros e exemplos, minha referência em determinação, meu porto seguro. À vocês, todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Graça Araújo, responsáveis pela pessoa que me tornei e pela paciência ao longo de todos esses anos de existência;

Ao meu orientador, Marcos Romualdo Costa, referência de pessoa, professor e pesquisador. Obrigada pela oportunidade, confiança e disponibilidade em todos os momentos, fazendo todo o trabalho muito mais agradável;

Aos professores Cecília Hedin Pereira, Richardon Leão, Katarina Leão e Rodrigo Pereira, pela disponibilidade e atenção com esse trabalho;

À Luciana Nogaroli, um anjo em todos os momentos, pela ajuda nas situações adversas dessa pesquisa.

Aos meus amigos do Instituto do cérebro, em especial, a Juliana Brandão, Jéssica Alves, Daniela Moura, Eduardo Sequerra, Anne Montainer e Bruna Landeira, que se fazem presentes nos meus dias, me dando segurança e boas risadas quando preciso;

Aos meus amigos que a vida me trouxe fora do laboratório, especialmente a Kadja Benício por todo o apoio em todos os momentos e comemorações em cada meta alcançada;

À todos os funcionários do Instituto do cérebro pelo esforço para a viabilidade dos experimentos;

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O *Sonic Hedgehog* (Shh) é um morfógeno com importantes ações no sistema nervoso central (SNC) em desenvolvimento, assim como na vida adulta em quadros de lesão tecidual e processos tumorigênicos. A relação da sua via de sinalização com proliferação, diferenciação e sobrevivência celular é amplamente estudada em regiões ventrais do córtex cerebral, mesencéfalo e medula espinhal em desenvolvimento. No entanto, o papel da sinalização por Shh em regiões dorsais, como o telencéfalo dorsal, origem do córtex cerebral, não está bem documentada. A partir do cultivo de células de roedores retiradas do telencéfalo dorsal em desenvolvimento, observamos a influência do Shh sobre a proliferação e diferenciação das células-tronco neurais. Utilizando vídeo-microscopia de tempo intervalado, podemos avaliar o tempo de ciclo celular, tamanho de células progenitoras antes da divisão celular e tipo de divisão sofrida pelas células na presença ou na ausência de sinalização por Shh. Verificamos um aumento do número de células em estado proliferativo, assim como um aumento de células reativas para o marcador astrocitário GFAP com o tratamento com Shh. Em contrapartida, após bloqueio da sinalização por Shh, observamos um menor número de células em estado proliferativo, desaceleração do ciclo celular, aumento da morte celular e redução da astrogliogênese (Araújo *et al*., 2014). Com intuito de avaliar a influencia do Shh sobre progenitores dorsais *in vivo*, nós injetamos fármacos agonista (purmorfamina) e antagonista (ciclopamina) da via de sinalização dessa proteína em diferentes períodos da gestação de roedores. Ao avaliar o córtex cerebral dos animais na vida pós-natal, observamos um aumento no número de progenitores gliais gerados com o tratamento com Purmorfamina na substância branca, enquanto na substância cinzenta não parece haver alteração dessa população em ambos os tratamentos. Além disso, a população de células astrocitárias foi reduzida após bloqueio da sinalização por Shh. Em conjunto, nossos dados sugerem que a Shh está presente no telencéfalo dorsal em períodos precoces do desenvolvimento e influencia a geração, sobrevivência e proliferação de progenitores gliais e astrócitos.

Palavras Chaves: Sonic hedgehog, Gliogênese, Proliferação celular, Córtex cerebral

ABSTRACT

The *Sonic Hedgehog* (Shh) is a morphogen with important roles in the central nervous system (CNS) during development as well as in adulthood after injury and in tumorigenic processes. This signaling is widely studied in ventral regions of the cerebral cortex, mesencephalon and spinal cord during development, where it is related to proliferation, differentiation and cell survival. However, the role of Shh signaling in dorsal regions of the CNS, such as the cerebral cortex, is not well documented. Using cell cultures from the rodent dorsal telencephalon during development, we observed effects of Shh in the proliferation and differentiation of neural stem cells. Using time-lapse video-microscopy, we could evaluate the cell cycle length, the size of progenitors cells before cell division and type of division suffered by the cells in the presence or absence of Shh signaling. We show that cell cycle is fastened and there is an increase in the number of cells in proliferative state and an increase of reactive astrocytes cells with Shh treatment. In contrast, after blocking Shh signaling, we observed a reduced number of cells in proliferative state, deceleration of the cell cycle and increased cell death (Araújo *et al*. 2014). To evaluate the influence of Shh in dorsal telencephalic progenitors *in vivo*, we injected agonist (purmorphamine) and antagonist (cyclopamine) drugs for the Shh signaling pathway in different periods of pregnancy in rodents. Our results show an increase in the number of glial progenitors cells generated during the treatment with purmorphamine in the white matter. In the gray matter there is no change in this population after both treatments, with purmorphamine or cyclopamine. However, the astrocyte population is reduced in the gray matter and upper cortical layers following blockade of Shh signaling. Together, our data suggest that Shh is present in dorsal telencephalon during the early stages of development and influences the generation, survival and proliferation of astrocytes and glial progenitor cells.

Key words: Sonic hedgehog, Gliogenesis, Cell proliferation, Cerebral cortex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Esquemas ilustrativos mostrando os tipos de progenitores neurais presentes durante a formação do sistema nervoso central	12
2. Gráficos demonstram os tipos de células geradas por progenitores corticais em diferentes idades *in vivo* através da injeção de retrovírus	14
3. Geração de neurônios corticais segue padrão "inside-out"	15
4. Estudos das células corticais geradas em diferentes idades confirmam padrão "inside-out"	17
5. Esquema de geração de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos ao longo do desenvolvimento	19
6. Esquema ilustrativo demonstrando a relação dos neurônios pós mitóticos sobre o início da gliogênese.	21
7. Via de sinalização por Notch	24
8. Via de sinalização JAK-STAT e seus componentes	24
9. Via de sinalização por Sonic Hedgehog	29
10. Esquema temporal do experimento I: Tratamento com purmorfamina	33
11. Esquema temporal do experimento II: Tratamento com ciclopamina	34
12. Imagem representativa das áreas consideradas para análise	37
13. Co-marcação de células Olig2+ e BrdU+ em secção de cérebro de camundongo P7	38
14. Co-marcação de células GFAP+ e BrdU+ em secção de cérebro de camundongo P7	39
15. Quantificação de células Olig2+ na substância branca e cinzenta de camundongos P7	41
16. Imunohistoquímica em cortes coronais para Olig2 e BrdU na região da substância branca em cérebro de animais P7 tratados com purmorfamina entre E12-E14	43
17. Imunohistoquímica em cortes coronais para Olig2 e BrdU na substância cinzenta em cérebro de animais P7 tratados com purmorfamina entre E12-E14	43
18. Quantificação do número de células Brdu+ Olig2+ na substância branca e substância cinzenta	44
19. Imunohistoquímica em cortes coronais para Olig2 e BrdU na substância cinzenta (camada I-II/III) em cérebro de animais P7 tratados com Ciclopamina entre E16-E18	45
20. Imunohistoquímica em cortes coronais para Olig2 e BrdU na substância cinzenta (camada V-VI) em cérebro de animais P7 tratados com Ciclopamina entre E16-E18	46
21. Imunohistoquímica em cortes coronais para Olig2 e BrdU na substância branca periventricular em cérebro de animais P7 tratados com Ciclopamina entre E16-E18	46
22. Quantificação do número de células Brdu+ Olig2+ na substância branca e substância cinzenta profunda (V-VI) e superficial (I-II/III)	47
23. Quantificação de células GFAP+ na substância branca e em camadas superficiais e profundas da substância cinzenta de camundongos P7	47
24. Imunohistoquímica para BrdU e GFAP na substância cinzenta (Camadas I-II/III) em córtex coronais de cérebro de camundongo P7	48
25. Imunohistoquímica para BrdU e GFAP na substância cinzenta (Camadas V-VI) em córtex coronais de cérebro de camundongo P7	49
26. Imunohistoquímica para BrdU e GFAP na substância branca periventricular em córtex coronais de cérebro de camundongo P7:	50
27. Quantificação da co-marcaçao de células Brdu+/GFAP+ em cortes coronais de camundongos P7	50

LISTA DE ABREVIATURAS

2-hydroxypropyl – cyclodextrin	HBC
4’-6’-diamidino-2-fenil-indol	DAPI
5-bromo-2'-deoxyuridine	BrdU
Ácido clorídrico	HCL
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Cardiotrofina 1	CT-1
Células-tronco neurais	CTN
Dimethyl sulfoxide	DMSO
Eminência ganglionar caudal	EGC
Eminência ganglionar lateral	EGL
Eminência ganglionar medial	EGM
Fator neurotrófico ciliar	FNTC
Glial Fibrillary Acid Protein	GFAP
Glutamate aspartate transporter	GLAST
Hairy or Enhancer of Split	HES
Intracelular domain	ICD
Janus Kinase	JAK
Neocórtex	NC
Normal goat serum	NGS
Nuclear receptor co-repressor	NCoR
Patched	Ptch
Placa cortical	PC
Pré-placa	PP
Sistema nervoso central	SNC
Smoothened	Smo
Sonic Hedgehog	Shh
Substância branca	SB
Substância cinzenta	SC
Supressor of hairless	CSL
Tampão fosfato	PBS
Zona intermediária	ZI
Zona marginal	ZM
Zona Subventricular	ZSV
Zona Ventricular	ZV

SUMÁRIO

RESUMO 6
ABSTRACT 7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES 8
LISTA DE ABREVIATURAS 9
INTRODUÇÃO 11
- PROGENITORES NEURAIS 11
- NEUROGÊNESE X GLIOGÊNESE 14
- SINALIZAÇÃO PELAS VIAS JAK- STAT E NOTCH 22
- SONIC HEDGEHOG 25

OBJETIVOS 31
MATERIAIS E MÉTODOS 32
- ANIMAIS 32
- CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS 32
  - EXPERIMENTAL I: Tratamento com purmorfamina 32
  - EXPERIMENTAL II: Tratamento com ciclopamina 34
- CORTES HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICA: 35
- IMUNOHISTOQUÍMICA 35
- AQUISIÇÃO DE IMAGENS E ANÁLISES 36
- ANÁLISE ESTATÍSTICA 39

RESULTADOS 40
DISCUSSÃO 52
REFERÊNCIAS 59
ANEXOS 68

INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), células-tronco neurais (CTN) originam neurônios e células macrogliais – astrócitos, oligodendrócitos e células ependimárias. No córtex cerebral de mamíferos, a geração de neurônios e células macrogliais segue um padrão temporal, de modo que células neuronais e macrogliais originam-se, predominantemente, em períodos sequenciais sendo os neurônios gerados primeiro e logo após, as células macrogliais passam a ser geradas (Jacobson, 1991). No entanto, os mecanismos responsáveis pela especificação de células neuronais ou macrogliais ainda não são completamente conhecidos. Fatores externos ambientais, programa intrínseco celular e, também, a linhagem da célula progenitora que deu origem a determinado tipo celular podem ter influencia sobre seu fenótipo final, evidenciando a complexidade envolvida nesse mecanismo de geração e especificação celular.

- **PROGENITORES NEURAIS**

A célula-tronco neural é caracterizada por seu potencial de geração de todos os tipos celulares presentes no SNC. Durante o desenvolvimento, todo o sistema nervoso central é derivado de células neuroepiteliais presentes no tubo neural, que são capazes de proliferar e gerar células de diferentes fenótipos. Muitos trabalhos avaliaram o potencial desses progenitores, caracterizando-os como progenitores multipotentes ou progenitores restritos a uma única linhagem celular (revisado por Costa *et al*., 2009). Até o final da década de 90, havia uma discussão a respeito de duas teorias que buscavam elucidar o potencial neurogênico

e gliogênico dos progenitores neurais. Uma delas consistia na existência de um único progenitor bipotente e que, ao longo do tempo, passava da geração de neuroblastos, que originam neurônios pós-mitóticos, à geração de progenitores gliais, ou glioblastos, que originam células da glia, atendendo principalmente a um fator temporal. Por outro lado, a segunda teoria consistia na geração de progenitores neuronais e gliais aleatoriamente, sem necessariamente atender a um padrão temporal, e que a partir de sinais ambientais tais progenitores passariam a gerar neurônios e células da glia (Figura 1). Para testar essas hipóteses, foram realizados estudos *in vivo* utilizando retrovírus (Luskin *et al*., 1988; Kornack e Rakic, 1995; Reid *et al*., 1995; Mione *et al.,* 1997) e *in vitro* através do cultivo de progenitores corticais (Costa et al., 2009).

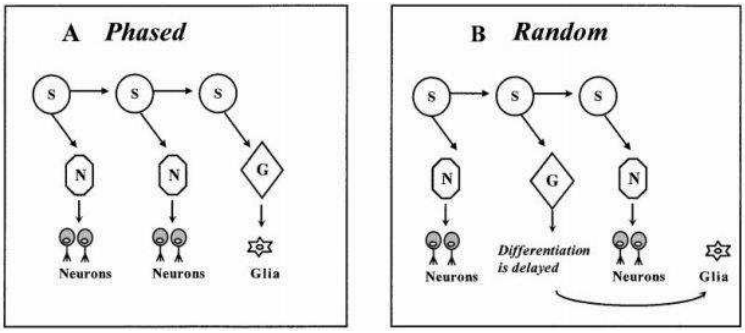

Figura 1: **Esquemas ilustrativos mostrando os tipos de progenitores neurais presentes durante a formação do sistema nervoso central**. No primeiro quadro (A), o progenitor bipotente (S – Stem cell) dá origem a neuroblastos (N), que são progenitores restritos à geração de neurônios, e glioblastos (G), que compõem uma linhagem restrita originando células da glia. No modelo em fase, essa geração de neuroblastos e glioblastos segue uma sequência temporal. No esquema B o progenitor bipotente origina neuroblastos e glioblastos de forma randômica ao longo do tempo. No entanto, a diferenciação das células gliais estaria retardada, explicando o aparecimento tardio dessas células durante o desenvolvimento (Qian *et al*., 2000).

Com o uso do recurso de vídeo-microscopia de tempo intervalado, tornou-se possível a visualização em tempo real dos progenitores neurais em idades precoces e tardias do desenvolvimento (Qian *et al*., 2000; Costa *et al*., 2009). Qian e colaboradores em 2000 observaram que células neuronais e células gliais são geradas sequencialmente, corroborando achados populacionais (Bayer e Altman, 1991; Jacobson, 1991). Além disso, os autores observaram que os progenitores neurais que dão origem a essas células se comportam de maneira similar a primeira teoria citada anteriormente (Figura 1). Ou seja, um mesmo progenitor pode gerar neurônios e células da glia de forma sequencial, havendo uma mudança no potencial dessa célula com o passar do tempo (Qian *et al*.,2000).

Costa *et al*., em 2009 em um elegante trabalho demonstrando dados *in vitro* e *in vivo* com uso de retrovírus, demonstram a existência de progenitores corticais restritos à linhagem neuronal e progenitores corticais bipotentes no cérebro de roedores. Estes progenitores bipotentes seguem um padrão temporal em fase (Figura 1), gerando primeiramente progenitores neuronais restritos e passando a originar progenitores gliais restritos no final do período gestacional (Figura 2) (Costa *et al*., 2009). Desta forma, a existência de um progenitor glial restrito no início da corticogênese foi descartada pelos autores, que sugerem um potencial neurogênico generalizado para os progenitores corticais iniciais. Diversos sinais podem contribuir para a mudança de neurogênese para gliogênese nesta população de progenitores bipotentes, como será discutido adiante.

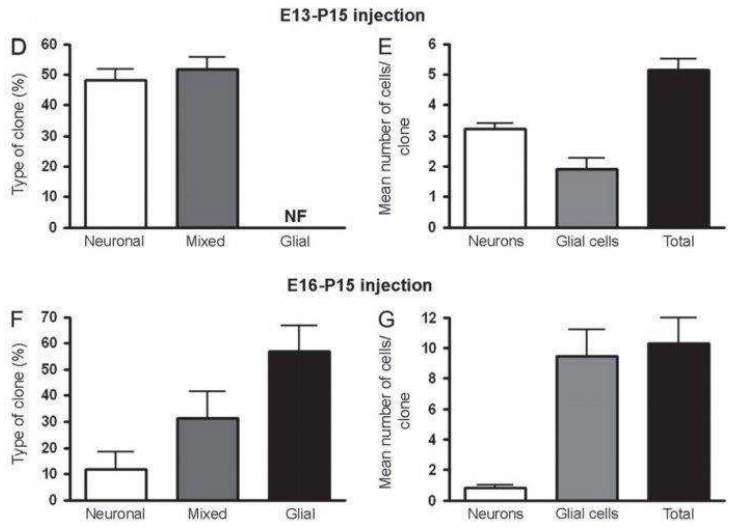

Figura 2: **Gráficos demonstram os tipos de células geradas por progenitores corticais em diferentes idades *in vivo* através da injeção de retrovírus.** Nos gráficos acima podemos observar os tipos de clones gerados por um progenitor cortical transfectado com retrovírus em diferentes idades. No gráfico D e E podemos observar os tipos de clones e a média do número de células por clone quando as células foram transfectadas no dia embrionário 13. Conclui-se que nessa idade, existem apenas progenitores neuronais restritos e bipotentes, que geram, respectivamente, clones neuronais e mistos (contendo neurônios e células gliais). Já nos gráficos F e G podemos observar os tipos de clones e média do número de células por clone quando os progenitores foram transfectados no dia embrionário 16. Nessa data, os clones do tipo glial e o número de células gliais por clone tem um aumento considerável, indicando que progenitores gliais no telencéfalo dorsal surgem em algum ponto entre E13 e 16 (retirado de Costa *et al*., 2009).

- **NEUROGÊNESE X GLIOGÊNESE**

A formação de novos neurônios, denominado neurogênese, no cérebro de camundongos se dá principalmente entre o dia embrionário 12 (E12) e dia embrionário 18 (E18) (Berry e Rogers 1965; Lent *et al*. 1990; Bayer e Altman 1991; Qian *et al*., 2000). Já a gliogênese, ou formação de células gliais, ocorre entre o dia embrionário 16 (E16) e tem seu pico nas

primeiras semanas de vida, com uma elevada geração de astrócitos na primeira semana pós-natal e de oligodendrócitos nas segunda e terceira semanas pós-natais (Qian *et al*., 2000; Kessaris *et al*., 2008).

A neurogênese cortical ocorre a partir dos progenitores contidos na zona ventricular (ZV) e zona subventricular (ZSV) de forma sequencial, obedecendo a um padrão "inside – out" ou seja, de dentro para fora. À medida que há a formação de novos neurônios, os neurônios mais jovens se depositam em uma camada acima dos já formados anteriormente, sendo, portanto, a camada mais superficial do córtex cerebral a mais recentemente gerada (Figura 3).

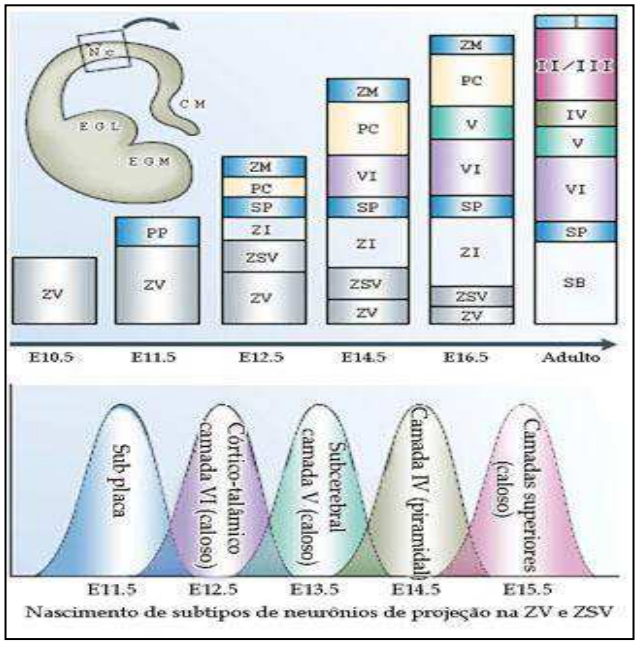

Figura 3: **Geração de neurônios corticais segue padrão "inside-out".** Primeiramente, é formada a Pré-Placa (PP), que posteriormente é dividida em Zona Marginal (ZM) e Subplaca (SP). A Placa Cortical (PC) é formada entre a ZM e a SP e consiste na região composta pelas várias camadas do córtex cerebral. A geração dos neurônios corticais ocorre de forma sequencial e as células geradas migram radialmente, ocupando inicialmente as camadas mais profundas. Desta forma, os neurônios gerados nos primeiros momentos de neurogênese estão localizados nas camadas mais profundas do córtex cerebral, enquanto os neurônios gerados posteriormente se encontram em camadas mais superficiais. CM: Córtex Medial; E: Dia Embrionário; NC: Neocórtex; ZI: zona intermediária; EGL: Eminência Ganglionar Lateral; EGM: Eminência Ganglionar Medial; ZSV: Zona Subventricular; ZV: Zona Ventricular; SB: substância branca. Modificado de Molyneaux *et al.,* 2007.

Esse padrão foi demonstrado a partir de estudos com roedores em estado gestacional que receberam injeção de 3H-Timidina (análogo de timidina que se incorpora ao DNA da célula durante a fase S do ciclo celular). Os cérebros de cada prole foram analisados na vida adulta (Figura 4) (Angevine e Jr. Sidman, 1961; Molyneaux *et al*. 2007). Os neurônios corticais em diferentes camadas apresentam características morfológicas e hodológicas específicas e também estão alocados em colunas formando unidades que contém aspectos eletrofisiológicos semelhantes (Douglas e Martin 2004; Mountcastle, 1997).

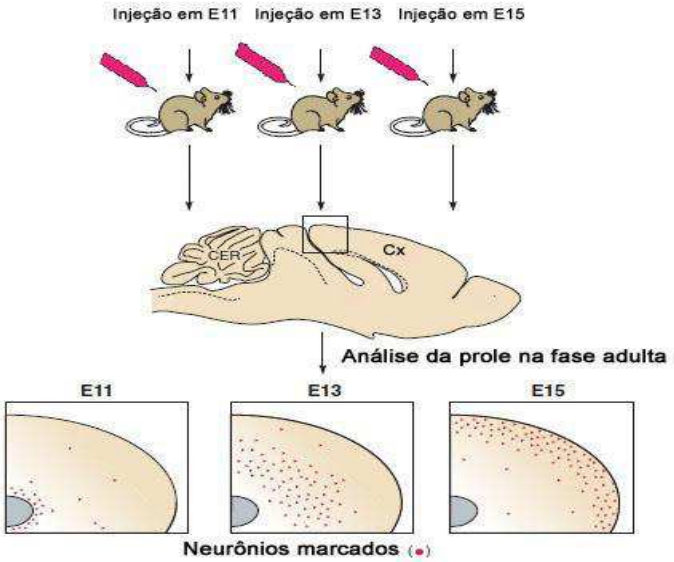

Figura 4: **Estudo das células corticais geradas em diferentes idades confirmam padrão "inside-out".** Com o uso de 3H-timidina, células em processo de síntese de DNA durante a fase S do ciclo celular são marcadas e podem ser evidenciadas na vida adulta. Fêmeas grávidas foram submetidas a injeção desse análogo de timidina no dia embrionário 11, 13 e 15. Na vida adulta, a prole dessas fêmeas foi analisada e, como podemos observar no esquema, dependendo da idade da injeção, os neurônios que adquiriam a 3h-timidina estavam em diferentes camadas do córtex cerebral. Esse experimento demonstra o padrão "Inside-out" na histogênese do córtex cerebral. Modificado de Sanes *et al*., 2006.

A gliogênese cortical se inicia ao redor de E16 e tem seu pico nas três primeiras semanas de vida pós-natal, sendo o processo responsável pela geração de astrócitos, células ependimárias e oligodendrócitos. Essas células foram estudadas e categorizadas, em humanos, de acordo com sua estrutura morfológica no ano de 1893 por Andriezen e colaboradores (Andriezen *et al.,* 1893).

Os astrócitos são células em formato estelar que tem papel importante na homeostase do SNC, atuando nas sinapses, dando suporte estrutural e trófico para os neurônios além de

participar da formação da barreira hemato-encefálica (para revisão ver: Wang e Bordey, 2008). Essas células parecem se originar a partir da transformação da célula de glia radial, célula-tronco neural embrionária derivada no neuroepitélio. Dependendo de sua localização, podem ser classificados como astrócitos protoplasmáticos (se localizados na substância cinzenta) ou astrócitos fibrosos se localizados na substância branca (Miller e Raff, 1984). São células que possuem uma alta densidade de filamentos intermediários citoplasmáticos, principalmente a proteína ácida fibrilar ou GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein), sendo essa utilizada como um marcador de tal população celular na vida embrionária e pós natal. (Vaughn e Peters 1967; Choi e Lapham 1978; Antanitus *et al*. 1975). Já na vida adulta, essas células podem ser evidenciadas também pela marcação de GLAST (Glutamate aspartate transporter) (Wang e Bordey, 2008).

As células ependimárias são células multiciliadas e de morfologia cuboide que se localizam nas paredes dos ventrículos cerebrais (Milhouse *et al*., 1971). Com principal função de propulsão do líquido encéfalo-raquidiano, essas células são originadas a partir das células de glia radial entre E14 e E16 (Spassky *et al*., 2005). Através de um estudo com uso de análogos de timidina e marcadores específicos dessa população, Spassky e colaboradores em 2005 demonstraram evidências da transformação da glia radial em células ependimárias e que sua maturação ocorre na primeira semana pós-natal. Além disso, o mesmo estudo demonstra que tal população não apresenta atividade mitótica na vida adulta, como discutido em vários outros trabalhos disponíveis na literatura, excluindo a possibilidade de representarem mais um nicho de células-tronco neurais no SNC (Spassky *et al*., 2005).

Os oligodendrócitos são células altamente arborizadas e sua função está principalmente voltada à produção de uma camada isolante e facilitadora do potencial de ação presente nos processos neuronais, a mielina. Essas células se originam a partir de progenitores

restritos de oligodendrócitos derivados da célula de glia radial e são geradas em diferentes idades durante a embriogênese e na vida pós-natal. Esses progenitores estão inicialmente localizados na região ventral do SNC e migram através de um movimento tangencial até o telencéfalo dorsal (Kessaris *et al*., 2001; 2006). Kessaris e colaboradores em 2006 demonstraram diferentes ondas compostas por células dessa população. A primeira delas é proveniente da eminência ganglionar medial (EGM) e é vista no telencéfalo em torno de E12. A segunda onda é proveniente da eminência ganglionar lateral (EGL) e chega ao córtex em torno de E16. Já a terceira onda de oligodendrócitos é proveniente de progenitores presentes no telencéfalo dorsal e é gerada em períodos próximos e após o nascimento. (Kessaris *et al*., 2006). A Figura 5 apresenta um esquema de geração de células no período neurogênico e gliogênico durante o desenvolvimento do SNC de roedores (Kriegstein e Buylla 2009).

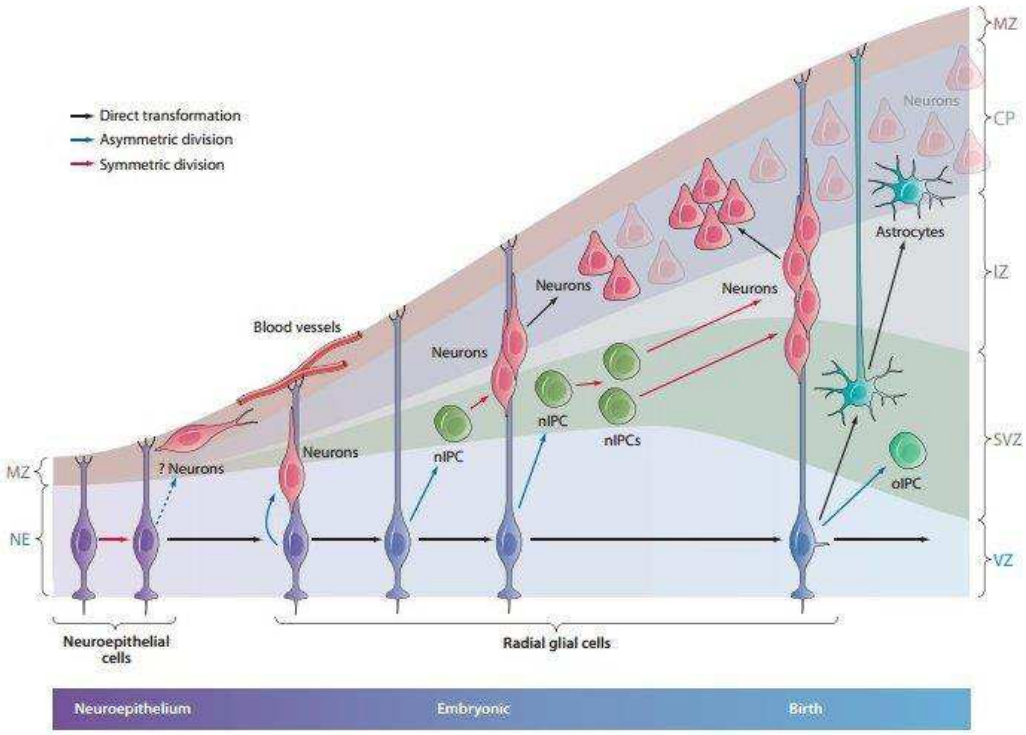

Figura 5: **Esquema de geração de neurônios, astrócitos e progenitores de oligodendrócitos ao longo do desenvolvimento:** No esquema acima podemos observar que as células neuroepiteliais passam por diversas fases durante o desenvolvimento. A partir dessas células há a formação de neurônios por meio de uma divisão assimétrica (setas azuis), onde há a geração de uma célula de fenótipo diferente da primeira e uma célula igual a sua progenitora no inicio do período embrionário. Um pouco mais tarde, através de divisão assimétrica, há também a formação de progenitores mais restritos como os progênitos neuronais (nIPC- neurogenic intermediate progenitor cell) que formam duas células neuronais pós-mitóticas, caracterizando uma divisão simétrica (seta vermelha). Em períodos próximos e após o nascimento há a transformação direta de glia radial em células astrócitárias (setas pretas) e a formação de progenitores de oligodendrócitos (oIPC – "Oligodendrocyte intermediate progenitor cell"). VZ: Ventricular zone – Zona ventricular; SVZ: Subventricular zone – Zona subventricular; IZ: Intermediate zone – Zona intermediária; CP: Cortical Plate: Placa Cortical; MZ: Marginal Zone- Zona Marginal; NE: Neuroepitélio. Retirado de Kriegstein e Buylla, 2009.

Tendo em vista a formação sequencial de neurônios e células gliais, podemos questionar o que promove a mudança de potencial de um progenitor de neurogênico para gliogênico. Levando em consideração a população de progenitores bipotentes, alguns sinais ambientais podem ser responsáveis pela mudança do potencial dessas células (Morrow *et al*., 2001; Miller e Gauthier 2007)

Morrow e colaboradores em 2001 mostraram que, ao colocar progenitores corticais isolados de camundongos em E15 sobre fatias de córtex cerebral de embriões de ratos em E18, havia a formação de neurônios. Por outro lado, quando os progenitores foram colocados sobre fatias de córtex de animais pós-natais P15 ao invés de neurônios, foram geradas células astrocitárias (Morrow *et al*., 2001). Esses resultados sugerem que o potencial neurogênico e gliogênico dos progenitores corticais são influenciados pelo ambiente, de modo que o

ambiente embrionário seria mais neurogênico, enquanto o pós-natal seria mais gliogênico (Morrow *et al*., 2001).

Em busca de fatores relacionados a esta mudança de potencial, estudos mostraram a influência de citocinas liberadas no córtex cerebral em períodos finais da embriogênese (Bonni *et al*., 1997; Rajan e McKay, 1998; Nakashima *et a*l., 1999; Ge *et al*., 2002; Barnabé-Heider *et al*., 2005; Miller e Gauthier 2007). A partir de neurônios diferenciados, citocinas como a cardiotrofina 1 (CT-1) e o fator neurotrófico ciliar (FNTC) são produzidas e liberadas e estimulam a geração de células de fenótipo glial, como astrócitos (Figura 6) (Bonni et al., 1997; Rajan e McKay, 1998; Barnabé-Heider *et al*., 2005).

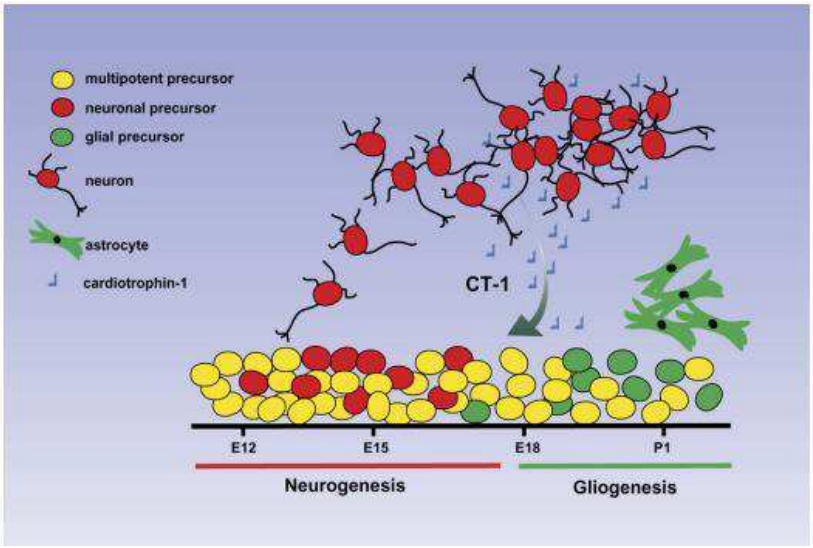

Figura 6: **Esquema ilustrativo demonstrando a relação dos neurônios pós mitóticos sobre o início da gliogênese.** A cardiotrofina 1 age sobre os precursores neurais na mudança do período neurogênico para gliogênico. Essa citocina é liberada por neurônios pós mitóticos durante a corticogênese. Esse sinal parece estar envolvido com a mudança do potencial neurogênico para gliogênico dos progenitores corticais. No esquema os círculos amarelos representam os precursores multipotentes/bipotentes; os círculos vermelhos representam os progenitores neuronais; círculos vermelhos com prolongamentos escuros representam os neurônios pós-

mitóticos; círculos verdes representam os progenitores gliais e os astrócitos estão representados como as células verdes originadas no período gliogênico. Retirado de Miller e Gauthier 2007.

- **SINALIZAÇÃO PELAS VIAS JAK- STAT E NOTCH**

A sinalização intracelular via JAK-STAT consiste em uma cascata regulatória principalmente envolvida com a regulação de expressão gênica em diferentes linhagens celulares como, por exemplo, neurônios e células hematopoiéticas. A família de proteínas nomeadas de "Janus Kinase" ou JAK compreende as proteínas tirosinas quinases JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2. Ao serem ativadas por polipeptídios como hormônios, citocinas e fatores de crescimento, essas proteínas levam a fosforilação de fatores de transcrição da família STAT e posterior dimerização (Nicolas *et al*., 2013). Membros da família STAT quando dimerizados, translocam-se para o núcleo e ativam a transcrição de alguns genes, dentre eles, genes relacionados à população glial (Nicolas *et al*., 2013; Miller e Gauthier 2007).

Barnabé-Heider e colaboradores demonstraram que animais transgênicos que não possuem receptores que ativam a via JAK-STAT não são capazes de produzir a população astrocitária tanto i*n vivo* quanto *in vitro* (Barnabé-Heider *et al*., 2005). O potencial das células progenitoras para gerar astrócitos está relacionado com a ativação de genes-alvo da via JAK-STAT, tal como o GFAP (Nakashima *et al*., 1999; Bonni *et al*., 2007). Essa via é ativada por moléculas secretadas por neurônios gerados durante o desenvolvimento, tais como a cardiotrofina 1 e o fator neurotrófico ciliar, citados anteriormente (Bonni *et al.,* 1997; Rajan e McKay, 1998; Barnabé-Heider *et al*., 2005).

A sinalização por Notch é uma via presente em diferentes espécies de organismos. Estudada primeiramente na *Drosophila*, foi demonstrada a forte relação dessa via de sinalização com a permanência da célula em um estado proliferativo e indiferenciado (Campos-Ortega 1993; Skeath e Doe 1996;). Os componentes dessa via são proteínas transmembrana presentes em células vizinhas, as proteínas Notch (Notch 1 e 2 por exemplo) e seus ligantes, Delta e Jagged, e necessitam contato célula-célula para ser ativada. Quando há o contato celular, a parte interna da proteína Notch é clivada e segue para o núcleo onde passa a promover a expressão de fatores de transcrição (Figura 7) (Sanes *et al*., 2006). No telencéfalo dorsal de mamíferos, além de promover a permanência dos progenitores em um estado indiferenciado, inibindo a neurogênese no início do desenvolvimento, a sinalização por Notch leva a formação de células de fenótipo glial durante o período gliogênico (Gaiano *et al*., 2000; Gaiano e Fishel 2002; Taylor *et al*., 2007). No entanto, fatores de transcrição ativados por essa via como os da família RBP-Jk (Recombining binding protein - Proteina ligadora recombinante), promovem a transcrição do promotor do GFAP, marcador astrocitário, unicamente quando a via JAK-STAT está ativada (Figura 8) (Ge *et al*., 2002). Quando essa via não está ativada, tais fatores de transcrição inibem a gliogênese através da ativação de uma proteína repressora conhecida como NCoR (Nuclear receptor co-repressor – Receptor nuclear de repressão) (Hermanson *et al*., 2002). Desta forma, uma possível interpretação destes experimentos acima seria que a ativação de Notch no início da corticogênese aumenta a população de progenitores nas zonas germinativas através da manutenção da célula em um estado proliferativo. Posteriormente, quando sinais gliogênicos surgem no meio, uma maior quantidade de progenitores estaria apta a responder a tais sinais, levando a um aumento da gliogênese (Costa *et al*., 2009).

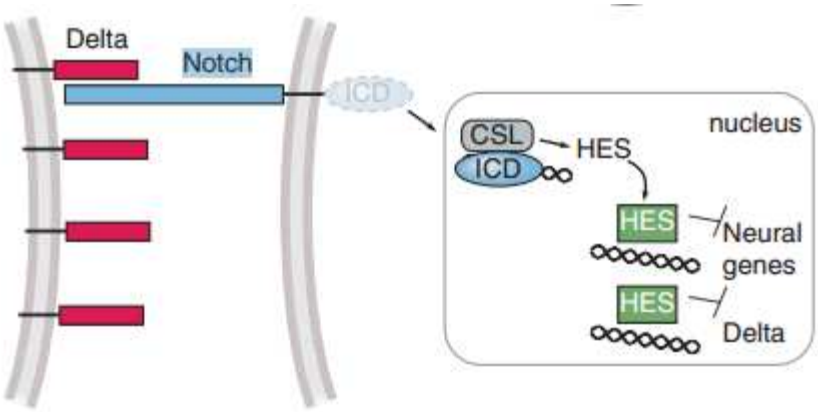

Figura 7: **Via de sinalização por Notch:** A via de sinalização por Notch exige contato célula-célula e no esquema acima podemos observar o ligante do Notch, conhecido como Delta, fazendo contato com a porção extracelular da proteína Notch. Com esse contato, o domínio intracelular do Notch (ICD – "intracelular domain") é proteolizado e interage com outras moléculas como o CSL ("Supressor of hairless") e se difunde para o núcleo levando a ativação de genes como o HES ("Hairy or Enhancer of Split"). Assim, há a inibição de genes pro-neurais e redução da expressão de Delta, levando a célula a se manter em estado indiferenciado (Sanes *et al.*, 2006).

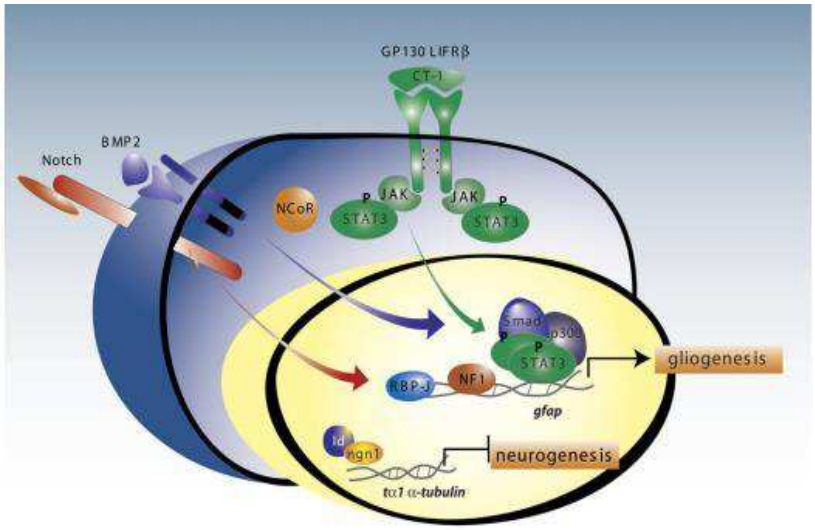

Figura 8: **Via de sinalização JAK-STAT e seus componentes:** A via de sinalização JAK-STAT é ativada por polipeptídeos como hormônios e citocinas. No esquema observamos a cardiotrofina 1 se ligando aos receptores tirosina-quinases GP130 e LIF. Tal ligação leva as proteínas quinases JAK fosforilarem as STATS que, por sua vez, se translocam para o núcleo ativando a expressão de genes relacionados a gliogênese e inibindo os relacionados a neurogênese. Paralelamente, a sinalização por Notch ativa fatores de transcrição RBP-J que também promovem a transcrição de promotores relacionados a população glial, como o GFAP. Retirado de Miller e Gauthier 2007.

Além das sinalizações mediadas por Notch e JAK-STAT outras moléculas sinalizadoras têm sua expressão regulada ao longo da transição neurogênese-gliogênese e poderiam interferir com este processo. Um potencial fator é o morfógeno *Sonic Hedgehog* (Shh), cuja expressão aumenta significativamente em torno de E15-16 no córtex cerebral (Dahmane *et al*., 2001), coincidindo então com o início da gliogênese nesta região.

- **SONIC HEDGEHOG**

O *Sonic Hedgehog* (Shh) é um importante morfógeno envolvido em diferentes processos durante o desenvolvimento do SNC (Ruiz i Altaba *et al*., 2002; Palma *et al*., 2005, Komada *et al*., 2008). Durante estágios iniciais da embriogênese, a notocorda é responsável pela liberação de Shh, que age na região ventral do tubo neural, formando um gradiente dorso-ventral importante para a especificação celular (Ericson *et al*., 1996). Em regiões mais caudais do SNC como a medula espinhal, o Shh tem importante função sobre a formação de motoneurônios e células da glia de fenótipo oligodendrocitário (Orentas *et al*., 1999). Em regiões ventrais localizadas mais rostralmente, há uma forte regulação da população de

progenitores de oligodendrócitos gerados na EGM pela sinalização por Shh (Tekki-Kessaris *et al*., 2001). Além disso, interneurônios provenientes da região ventral do telencéfalo, sobretudo os parvalbumina+ e somatostatina+, dependem da sinalização de Shh para sua especificação (Xu *et al.,* 2010).

Xu e colaboradores em 2010 demonstraram que através da deleção de um dos componentes da sinalização por Shh, o smoothened (Smo) na população de progenitores localizada na EGM, foi possível manipular a geração de interneurônios provenientes dessa região, caracterizados como parvalbumina + e somatostatina+. Para a geração e determinação fenotípica dessas populações, é necessária a expressão do fator de transcrição Nkx2.1 que, por sua vez, é regulado pela sinalização por Shh (Zhou *et al*., 2001; Xu *et al.,* 2005). Com o uso do animal nocaute condicional de Smo, a sinalização por Shh foi bloqueada da população de progenitores da EGM. Através disso, comprovou-se a relação do Shh com a especificação de interneurônios do tipo parvalbumina+, que tem uma forte redução nos animais experimentais, e somatostatina + que também sofrem redução de maneira geral, no entanto, passam a compensar essa perda ao longo do desenvolvimento. (Xu *et al*., 2010). Um outro achado importante foi a geração de interneurônios calretinina+, que normalmente são gerados a partir de progenitores da eminência ganglionar caudal (EGC), regulados pelo fator transcricional Gsx2, nos animais onde a sinalização por Shh através do Smo foi cessada. A razão disso foi o aumento da expressão de Gsx2 na EGM, local de recombinação gênica, levando a formação de um subtipo de interneurônio diferente devido à ausência de sinalização por Shh, demonstrando a importância da mesma para a especificação celular (Xu *et al.,* 2010).

Apesar da função dessa sinalização estar bem descrita em regiões do telencéfalo ventral, existem poucos estudos abordando sua função no telencéfalo dorsal. Dahmane e colaboradores em 2001 primeiramente demonstraram a presença da expressão de Shh e de

outros membros de sua via de sinalização em regiões dorsais do telencéfalo, especialmente na zona ventricular no período embrionário (a partir de E15.5) e na e zona subventricular (ZSV) pós natal (P3-P5) (Dahmane *et al.,* 2001). Esse estudo demonstrou o potencial mitogênico do Shh sobre células dessa região tanto *in vitro* quando *in vivo*, além de relacionar essa via de sinalização com o processo de tumorigênese, iniciando uma série de outros estudos a respeito da função do Shh sobre o controle de proliferação dos progenitores neurais no telencéfalo dorsal (Dahmane *et al.,* 2001)

De uma maneira mais abrangente, na ausência precoce desta proteína, ocorrem alterações na morfologia e função do encéfalo, causando quadros como a holoprosencefalia (Maity *et al*., 2005; Ribeiro *et al*., 2010). Palma e colaboradores em 2003 mostraram evidências apontando a importância da sinalização do Shh na formação do neocórtex de modo a influenciar a capacidade proliferativa das CTN. Utilizando animais mutantes para Shh, esse estudo demonstrou a inviabilidade dessa linhagem devido à más-formações presentes na vida embrionária. Além disso, utilizando ensaios de neurosferas a partir de células derivadas do telencéfalo dorsal desses animais durante a embriogênese (E15.5 e E18.5), Palma e colaboradores demonstraram a baixa capacidade dessas população em termos de proliferação celular, critério analisado através do tamanho das neurosferas geradas, sendo as provenientes dos animais experimentais significativamente menores do que as oriundas do grupo controle (Palma *et al*., 2003).

Além de estar presente durante o desenvolvimento embrionário, o Shh também é encontrado em quadros de lesão aguda no córtex cerebral em resposta a um quadro inflamatório local (Amankulor *et al*., 2009), onde regula a capacidade de astrócitos adultos se comportarem como células progenitoras (Sirko *et al*., 2013). Também está expresso nos nichos neurogênicos do cérebro adulto, regulando a proliferação de progenitores neurais no

hipocampo e na ZSV (Lai *et al*., 2003; Palma *et al*., 2005; Ihrie *et al*., 2011). Em 2005, Palma *et al*., demonstraram que o Shh é um importante mitógeno para os progenitores neurais da ZSV em roedores na vida pós-natal e adulta através de experimentos *in vivo* e *in vitro*. Com ensaios de hibridização *in situ*, foi possível observar a expressão do Shh e de fatores de transcrição regulados pela sua sinalização na parede lateral do ventrículo lateral do cérebro de roedores pós-natais (P3) e adultos. Além disso, com injeção intraperitoneal de ciclopamina, antagonista da via do Shh, e uso de BrdU, foi possível a quantificação da proliferação de células na ZSV de forma a comprovar uma menor taxa de proliferação dos progenitores dessa região com o bloqueio dessa sinalização (Palma *et al*., 2005).

A sinalização por Shh é bem caracterizada por sua correlação com proliferação e sobrevivência celular. Ela também vem sendo descrita como uma das responsáveis pela proliferação excessiva encontrada em tumores (Dahmane *et al*., 2001; Katayam *et al*., 2002; Bar *et al*., 2007; Stecca *et al*., 2007). Também digno de nota, o bloqueio da via de sinalização por Shh tem sido mostrado como um potencial tratamento para diversos tipos de câncer (Berman *et al*., 2003; Watkins *et al*., 2003; Karhadkar *et al*., 2004; Bar *et al*., 2007).

Tal sinalização envolve vários componentes da membrana e do citoplasma das células-alvo. Primeiramente, o Shh liga-se a seu receptor transmembrana conhecido como Patched (Ptch). Fisiologicamente, o Ptch apresenta uma função inibitória sobre outro componente desta via, outra proteína transmembrana conhecida como Smoothened (Smo). Uma vez que o Shh se liga ao Ptch, tal inibição é cessada e o Smo age sobre complexos citoplasmáticos contendo fatores de transcrição da família Gli (Gli1, Gli2 e Gli3). (Pasca di Magliano *et al*., 2003). A partir de então, ocorre a translocação de Gli para o núcleo, levando a expressão de uma série de genes no DNA da célula relacionados à proliferação e sobrevivência da mesma (Figura 9)

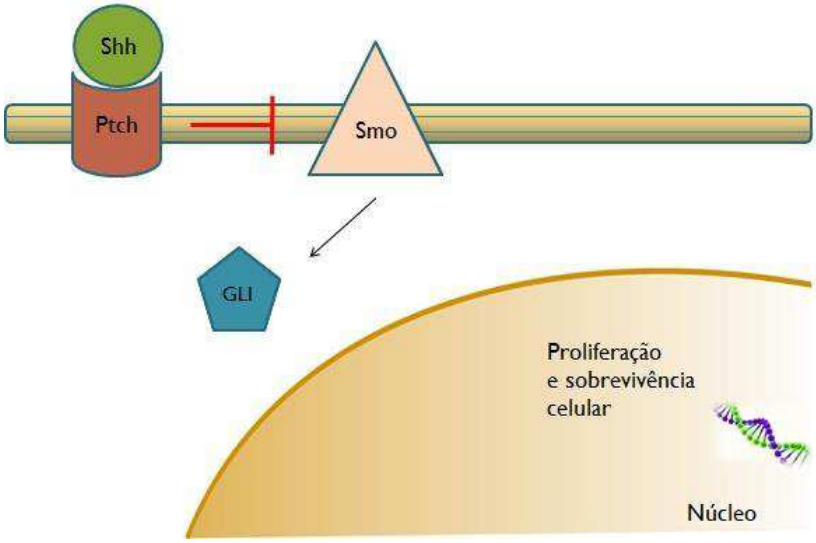

Figura 9: **Via de sinalização por Sonic Hedgehog :** O Sonic Hedgehog (Shh) se liga ao seu receptor Patched (Ptch) e cessa a inibição que esse causava sobe o Smoothened (Smo). O Smo leva a ativação de fatores de transcrição da família GLI que se translocam para o núcleo, promovendo a expressão de genes relacionados a proliferação e sobrevivência celular, entre outros.

Para avaliar o possível efeito de Shh sobre a proliferação e sobrevivência de progenitores corticais, nós realizamos um estudo de vídeo-microscopia de tempo intervalado com células-tronco neurais isoladas do telencéfalo dorsal de camundongos. Dessa forma, conseguimos avaliar aspectos como o tempo do ciclo celular e as características fenotípicas adquiridas por células expostas a esta proteína (Araújo *et al.*, 2014 – Anexo I).

Nós observarmos que o tratamento com Shh causa o encurtamento do tempo de ciclo celular, aumento da proliferação e maior sobrevivência celular (Araújo *et al.*, 2014). Além disso, nós observamos que o tratamento com Shh ocasionou uma maior geração de células

gliais, em especial astrócitos, enquanto que o bloqueio da sinalização por Shh com ciclopamina teve o efeito oposto.

Além desses resultados a respeito do efeito do Shh sobre o ciclo celular obtidos nos nosso estudo *in vitro*, Komada e colaboradores em 2008 demonstraram efeitos do Shh sobre o ciclo celular de progenitores neurais em momentos precoces do desenvolvimento do neocórtex i*n vivo*. Utilizando animais mutantes condicionais para membros da via de sinalização de Shh a partir de E10, eles mostraram que na ausência de sinalização mediada por Shh, ocorre a diminuição da proliferação e diferenciação de progenitores neurais no telencéfalo dorsal, além de alteração na migração de células pós-mitóticas e aumento da morte celular (Komada *et al*., 2008). No entanto, os autores não avaliaram o possível efeito do Shh sobre a gliogênese.

Tendo em vista a literatura apresentada e os nossos resultados obtidos *in vitro,* os quais evidenciam o claro efeito do Shh sobre a população glial, em especial a população astrocitária gerada a partir de progenitores dorsais, neste projeto avaliamos o efeito do Shh sobre a gliogênese cortical *in vivo.* Para isso*,* utilizamos o tratamento farmacológico de fêmeas grávidas com o agonista do Shh, purmorfamina (Sinha e Chen, 2006), e avaliamos o efeito deste composto sobre o fenótipo das células geradas. De maneira complementar, injetamos o antagonista de Shh, ciclopamina (Palma *et al*., 2005), durante o final do período gestacional, marcado pelo início da gliogênese em roedores, e avaliamos seu efeito sobre a proliferação de progenitores e geração de células gliais.

OBJETIVOS

- **Objetivo Geral**

  - Analisar a influência da via de sinalização por *Sonic Hedgehog* (Shh) sobre a população de progenitores neurais do córtex em desenvolvimento.

- **Objetivos específicos**

  - Estabelecer métodos farmacológicos para a manipulação da sinalização por Shh *in vivo*;
  - Verificar aspectos como proliferação, sobrevivência e diferenciação celular quando submetidos ao tratamento com agonista e antagonista da sinalização por Shh;
  - Avaliar se a ativação da via de Shh em períodos anteriores ao início da gliogênese induz a geração precoce de células gliais *in vivo;*
  - Avaliar se o bloqueio da sinaliazação por Shh no início da gliogênese bloqueio este processo *in vivo.*

.

MATERIAIS E MÉTODOS

- **ANIMAIS**

Os animais utilizados neste estudo foram camundongos C57/Bl6 mantidos em ciclos claro/escuro de 12h e com alimentação *ad libitum*. Foram utilizadas fêmeas grávidas com idade entre 2 à 9 meses no 12° dia gestacional e animais pós-natais no sétimo dia de vida (P7). O dia da detecção do tampão vaginal foi considerado como o dia embrionário zero (E0) e o dia de nascimento foi considerado como dia pós natal zero (P0). Todos os procedimentos realizados estão de acordo com as leis das Sociedades de Biologia Experimental para a experimentação com animais e foram previamente aprovados pelo comitê de ética das instituições envolvidas sob o parecer 040/2014.

- **CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

  - **EXPERIMENTAL I: Tratamento com purmorfamina**

A purmorfamina é um derivado de purina primeiramente descrito por sua função na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (Wu *et al.,* 2002). Através do cultivo celular de fibroblastos do mesoderma de camundongos e tratamento com Purmorfamina, foi observado um aumento na atividade de genes relacionados a linhagem osteoblástica, como a alcalina fosfatase, colégeno tipo II, Osteocalcina dentre outros. Além disso, mudanças morfológicas dos fibroblásticos em osteócitos foram observadas, levando a caracterizar esse composto como osteogênico (Wu *et al*., 2002). Em 2005, Sinha e Chen através de um estudo em uma linhagem celular, demonstraram que a purmorfamina exerce sua ação através de uma ligação ao co-receptor da via do Shh, o Smoothened (Smo), ativando a cascata de sinalização celular desse morfógeno (Sinha e Chen, 2006).

Para este estudo, fêmeas grávidas foram submetidas à injeção de Purmorfamina no 12° dia gestacional na concentração de 20mg/kg de forma intraperitoneal. Tal idade foi escolhida por anteceder o período gliogênico na espécie em estudo. Foi injetado o volume de 100µL/10g (purmorfamina + 10% DMSO- Dimethyl sulfoxide) durante três dias. No segundo dia de injeção, foi injetado também o BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) na concentração de 50mg/kg no volume de 100µL por 10g de peso do animal. O BrdU consiste em um análogo de timidina, incorporando no DNA (Ácido desoxirribonucleico) das células durante sua replicação na fase S do ciclo celular. Os animais controle foram injetados com PBS + 10% DMSO e também receberam o BrdU na mesma concentração no segundo dia de experimento (Figura 10).

Figura 10: **Esquema temporal do experimento I - Tratamento com purmorfamina:** Fêmeas grávidas sofrem injeção de purmorfamina (20mg/kg) nos dias embrionário 12 (E12), 13 (E13) e 14 (E14). Em E13 o BrdU (50mg/kg) também é injetado intraperitonealmente. O cérebro dos animais da prole é analisado no dia pós natal 7 (P7) através de imunohistoquímica para Brdu, Olig2 e GFAP.

- **EXPERIMENTAL II: Tratamento com ciclopamina**

A ciclopamina é um alcaloide esteroidal derivado de uma planta conhecida como *Veratrum Californicum.* Sua ação foi inicialmente estudada após a observação de casos de ciclopia (formação de apenas um olho) e holoprosencefalia (falha na divisão dos hemisférios cerebrais) na prole de animais que ingeriram a planta durante a gestação. A partir dos estudos desse composto, pode-se comprovar a sua relação com a via de sinalização por Shh através do antagonismo a um dos membros dessa via, o Smoothened (Smo) (Cooper *et al*., 1998; Incardona *et al*., 1998; Taipale *et al*., 2000.)

Para avaliar o efeito da ciclopamina, fêmeas grávidas foram submetidas à injeção desse composto no início do período gliogênico, no 16° dia gestacional. Foi injetado o volume de 100µL/10g na concentração de 10mg/kg (ciclopamina diluída em seu veículo HBC [2-hydroxypropyl – cyclodextrin])(Palma *et al*., 2005) durante três dias. No segundo dia de injeção, foi administrado também o BrdU na concentração de 50mg/kg no volume de 100µL por 10g de peso do animal por via intraperitoneal. Os animais controles são injetados com veículo HBC por três dias e também recebem o BrdU na mesma concentração no segundo dia de experimento. A prole foi avaliada em P7 (Figura 11).

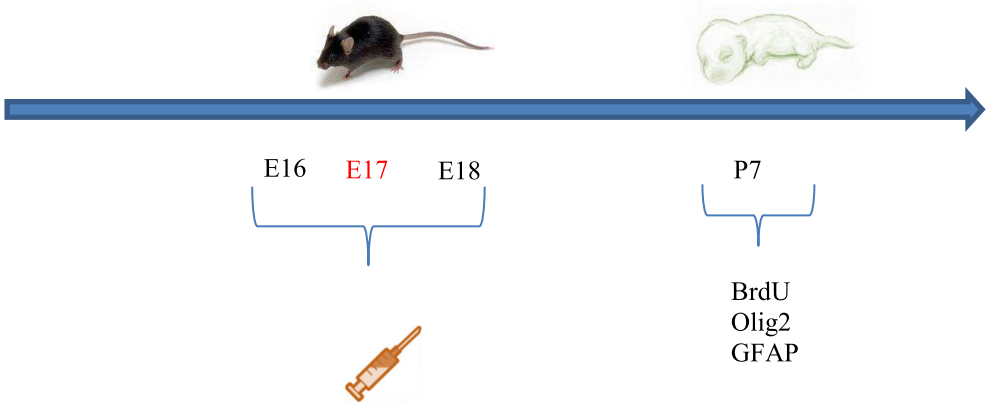

Figura 11: **Esquema temporal do experimento II - Tratamento com ciclopamina**: Fêmeas grávidas sofrem injeção de ciclopamina (10mg/kg) nos dias embrionário 16 (E16), 17 (E17) e 18 (E18). Em E17 o BrdU (50mg/kg) também é injetado intraperitonealmente. O cérebro dos animais da prole é analisado no dia pós natal 7 (P7) através de imunohistoquímica para Brdu, Olig2 e GFAP.

- **CORTES HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICA:**

Animais no dia pós-natal 7 (P7) foram anestesiados por meio de hipotermia e perfundidos inicialmente com solução salina estéril e então com paraformaldeído a 4% por via transcardíaca. Em seguida, os cérebros foram removidos por craniotomia e mantidos em solução de sacarose a 30% para crioproteção. Os cérebros crioprotegidos foram imersos em tissue-tek, congelados e fatiados coronalmente em secções de 30µm com o uso de criostato. Os cortes foram armazenados a –20°C para posterior análise.

- **IMUNOHISTOQUÍMICA**

Cortes histológicos foram submetidos ao tratamento de recuperação antigênica com tampão citrato 10mM e HCl (Ácido clorídrico) 2N. O protocolo de recuperação antigênica com o tampão citrato 10mM consiste na imersão dos cortes em solução tampão pré-aquecida a 60°C por 5 minutos, fervura em microondas por 50 segundos e imersão das lâminas em tampão citrato 10mM novamente por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução de HCL 2N em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Logo após, as secções foram lavadas com tampão borato 0,1M por duas vezes de 10 minutos cada. Em seguida, foi realizado o bloqueio antigênico com uma solução composta de tampão fosfato (PBS) 10mM,

triton-X a 0,5% e soro normal de cabra (NGS – Normal goat serum) a 5% por uma hora a temperatura ambiente. Após isso, os cortes histológicos foram expostos a anticorpos primários contra proteínas e marcadores específicos. Nesse estudo, foram utilizados anticorpos primários anti-Olig2 (Millipore, espécie coelho, concentração de uso 1:500), caracterizado como um típico marcador da população de progenitores gliais; Anti-BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine- ABCAM, espécie rato, concentração de uso 1:500), evidenciando as células que incorporaram tal análogo de timidina durante a replicação do DNA na fase S do ciclo celular; Anti- GFAP (glial fibrillary acidic protein- DAKO, espécie coelho, concentração de uso 1:500). Todos os anticorpos primários foram diluídos na solução de bloqueio anteriormente utilizada. Após 12h à 4°C, as secções foram lavadas em PBS 10mM por três vezes de 5 minutos. Para evidenciar a ligação antígeno-anticorpo promovida entre o anticorpo primário e os epítopos, foram utilizados anticorpos secundários conjugados a diferentes fluoróforos, sendo eles anti-coelho alexa 488 e o anti-rato 546 também diluídos em solução de bloqueio e incubados por duas horas à temperatura ambiente. Por fim, foram feitas duas lavagens com PBS 10mM por 30 minutos cada e os núcleos celulares foram corados com DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenil-indol) 0,02 mg/ml em PBS por 10 minutos, seguido por uma lavagem de 5 minutos com PBS 10 mM (DAPI forma complexos fluorescentes com o DNA que são excitados com comprimento de onda de 460 nm) e então as secções foram montadas com solução Acqua Polymount.

- **AQUISIÇÃO DE IMAGENS E ANÁLISES**

No presente trabalho, utilizamos o microscópio confocal (Examiner Z.1, Zeiss) com objetiva de 40x. Foram adquiridas imagens seriadas de uma mesma secção no eixo Z (Z-stack). A distância Z de cada stack é de 0.858 µm, correspondendo a uma unidade de ar

(abertura de pinhole sugerida para a objetiva). As marcações de Olig2, GFAP e de BrdU são analisadas na substância branca e na substância cinzenta. As regiões selecionadas para análise estão entre o Bregma 2.67 mm e 3.63 mm, e compreendem a substância branca periventricular, o cortéx motor primário entre as camadas V e VI e uma região mais superior dessa mesma área compreendendo as camadas I-II/III (Figura 12). São avaliadas co-marcações entre o BrdU e Olig2 e GFAP e BrdU (Figura 13 e 14). Com isso, podemos verificar o aumento ou diminuição da capacidade proliferativa dos progenitores neurais e caracterizar o fenótipo celular adquirido por essas células na vida pós-natal.

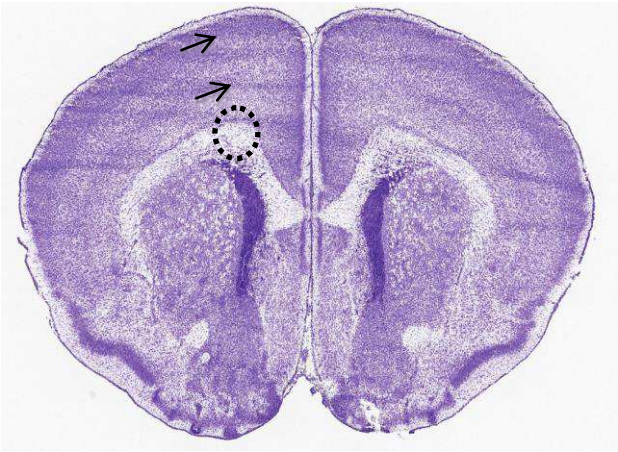

Figura 12**: Imagem representativa das áreas consideradas para análise:** Foram analisadas áreas em secções coronais de camundongos P7 localizadas na substância branca (círculo pontilhado) e em camadas profundas e superficiais da substância cinzenta (setas negras) localizadas na área motora primária (M1). Imagem retirada do atlas virtual Allen. Bregma: 2.67mm.

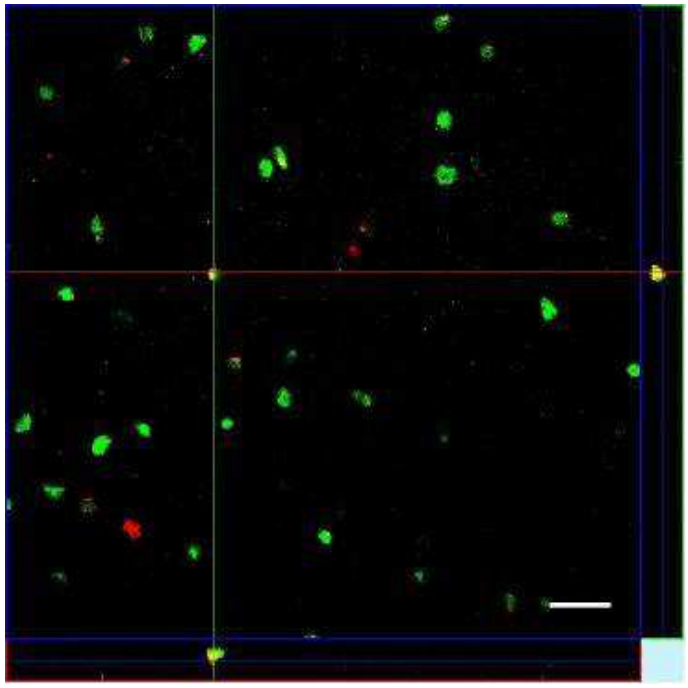

Figura 13: **Co-marcação de células Olig2+ e BrdU+ em secção de cérebro de camundongo P7:** Imunohistoquímica para Olig2 e BrdU evidenciando a co-marcação de uma mesma célula no canto inferior e no canto direito da imagem. Na imagem, observamos a projeção de todos os stacks no eixo Z, a projeção dos eixos X (abaixo) e Y (direita), confirmando a colocalização nos três planos. Em vermelho observamos a marcação para BrdU, em verde a marcação para Olig2. Imagem adquirida em microscópio confocal, objetiva de 40x. Barra de calibração 20 μm.

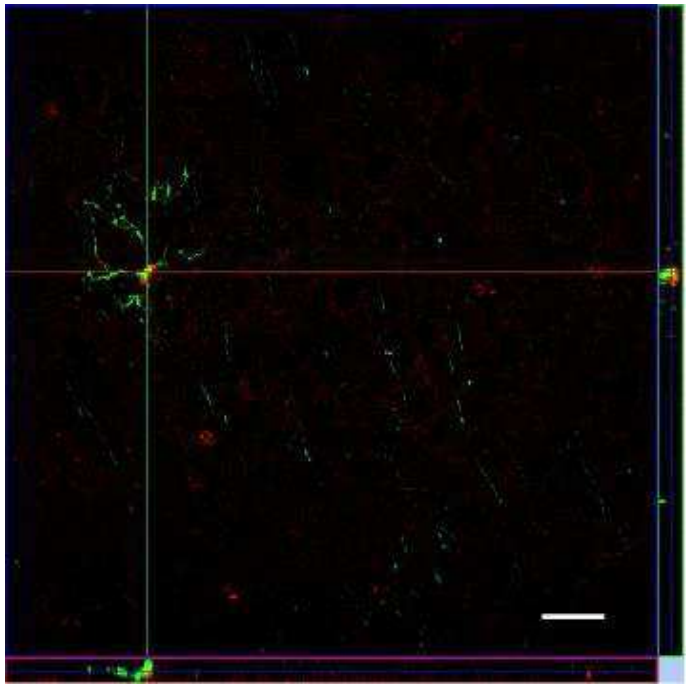

Figura 14: **Co-marcação de células GFAP+ e BrdU+ em secção de cérebro de camundongo P7:** Imunohistoquímica para GFAP e BrdU evidenciando a co-marcação de uma mesma célula no canto inferior e no canto direito da imagem. Na imagem, observamos a projeção de todos os stacks no eixo Z, a projeção dos eixos X (abaixo) e Y (direita), confirmando a colocalização nos três planos. Na imagem, em vermelho observamos a marcação para BrdU, em verde a marcação para GFAP. Imagem adquirida em microscópio confocal, objetiva de 40x. Barra de calibração 20 μm.

- **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Análises estatísticas são realizadas com o programa GraphPad Prism 5. Para comparar os grupos controle e experimentais (purmorfamina ou ciclopamina), é realizado teste t não-pareado. Análises envolvendo os três grupos foram realizadas com ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey. O valor calculado de *P* quando menor que 0,05 foi utilizado como critério de significância.

RESULTADOS

Tratamento com purmorfamina eleva o número de células Olig2+ na substância branca

A análise de animais tratados com purmorfamina, ciclopamina ou controles em P7 para a quantidade total de células Olig2+ revelou um aumento no número de células Olig2+ na substância branca dos animais tratados com purmorfamina em relação ao grupo controle e também em relação ao grupo ciclopamina. Já na substância cinzenta, não observamos diferença significativa entre os grupos (Figura 15). Essas observações iniciais sugerem que a ativação precoce da sinalização por Shh induz um aumento da gliogênese.

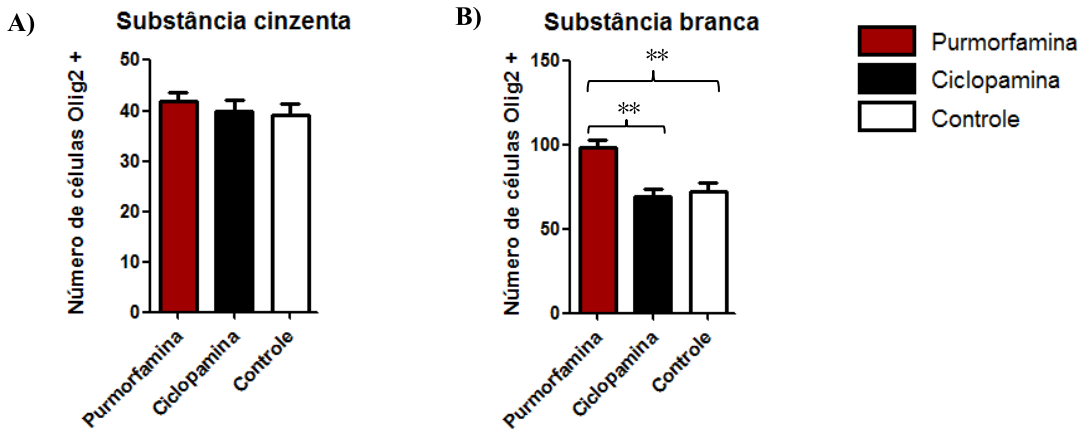

Figura 15: **Quantificação de células Olig2+ na substância branca e cinzenta de camundongos P7**: Os gráficos acima representam a quantificação da marcação para Olig2 observada na substância branca (A) e em camadas profundas da substância cinzenta (camadas V-VI). (B) As barras vermelhas representam o grupo experimental I, tratado com purmorfamina. As barras negras representam o grupo experimental II, tratado com ciclopamina. As barras brancas representam os grupos controle de ambos experimentos. Podemos observar diferença significativa na população de células Olig2+ entre os grupos controle e purmorfamina na substância

branca. Foi realizado o teste estatístico ANOVA de uma via com intuito de comparar os três grupos com pós-teste de Tukey (**p<0,001; Média+/-SEM). Número amostral (células) na substância cinzenta/substância branca: Purmorfamina: 1050/2558; Ciclopamina:1143/1815; Controle: 1683/3929. Foram analisados os cérebros de três animais em cada grupo experimental e controle. Foi analisada toda a área de interesse presente numa imagem de dimensão 45088,276µm².

A análise dos animais injetados com BrdU durante o período do experimento, permite uma avaliação mais fina das coortes celulares geradas em janelas específicas do desenvolvimento. O BrdU é incorporado em células na fase S do ciclo celular durante um período de aproximadamente 4h após a injeção. Desta forma, as células marcadas com BrdU podem ser interpretadas como geradas a partir de células proliferativas existentes no momento da injeção. A intensidade de marcação obtida com o BrdU depende diretamente do número de divisões sofridas pela célula após a aquisição desse análogo de timidina em seu DNA. Quanto mais concentrado, menos a célula dividiu após a injeção, e quanto mais diluído, mais divisões celulares ocorreram até a análise histológica dos animais. São consideradas marcações fortes (célula com núcleo completamente preenchido) e marcações mais fracas/diluídas (alguns pontilhados de BrdU na região nuclear). Tendo em vista que a população glial sofre divisões mais rápidas e em maior número (Costa *et al*., 2009), a co-marcação de Olig2 com o BrdU é principalmente representada por um padrão de marcação mais diluída (Figura 16).

Ao analisar as imagens dos animais da condição experimental I, tratados com purmorfamina, observamos uma maior co-marcação entre Olig2 e BrdU na substância branca (Figura 16). Já na substância cinzenta (Figura 17), não parece haver diferença entre os grupos controle e experimental.

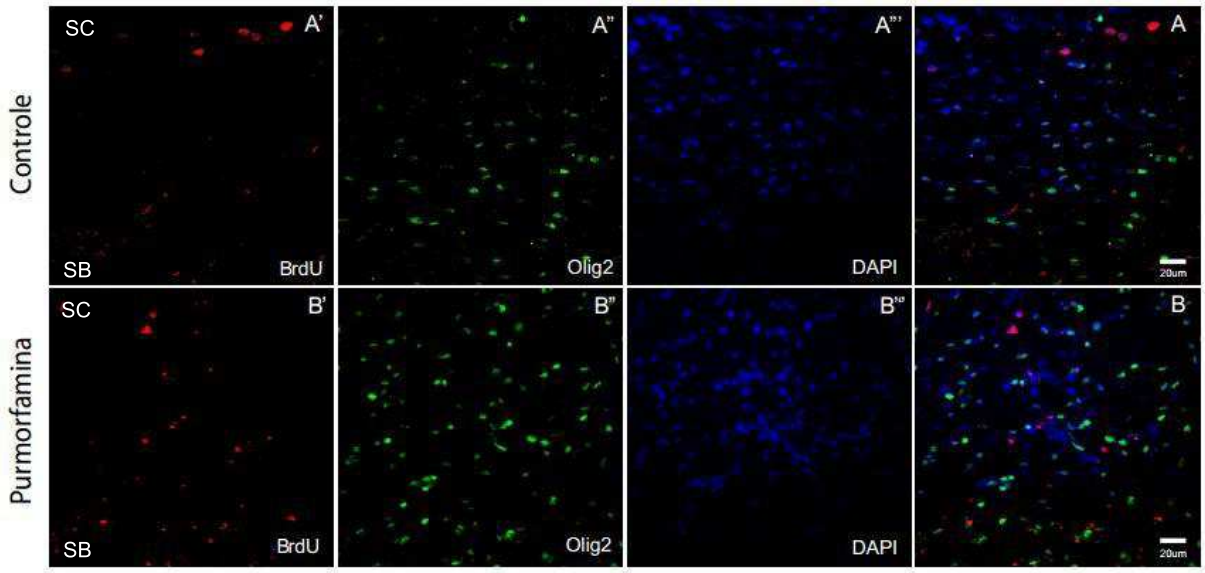

Figura 16**: Imunohistoquímica em cortes coronais para Olig2 e BrdU na região da substância branca em cérebro de animais P7 tratados com purmorfamina entre E12-E14**: No painel é possível observar marcação para BrdU (vermelho), Olig2 (verde) e DAPI (azul) na substância branca periventricular. Sendo "A" a condição controle e "B" a condição experimental. Observe a grande quantidade de células Olig2+ nessa região nos animais tratados com purmorfamina (B''). Imagens são projeções de 15 fatias óticas no eixo Z. SC: Substância cinzenta; SB: Substância branca.

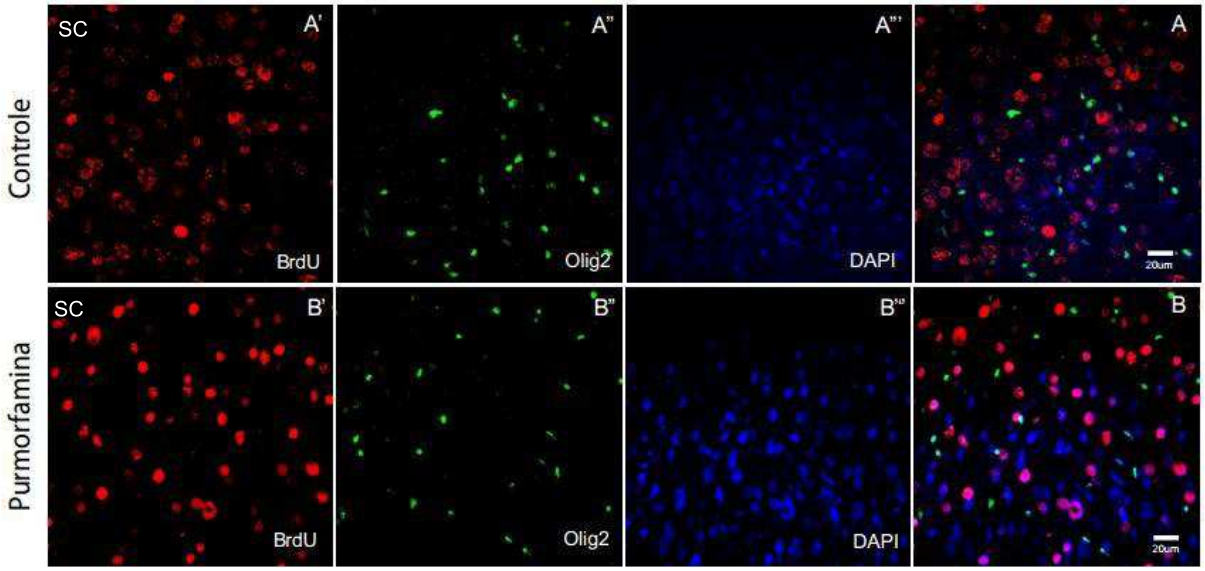

Figura 17**: Imunohistoquímica em cortes coronais para Olig2 e BrdU na substância cinzenta em cérebro de animais P7 tratados com purmorfamina entre E12-E14:** No painel é possível observar marcação para BrdU (vermelho), Olig2 (verde) e DAPI (azul) na substância branca periventricular. Sendo "A" a condição controle e "B" a condição experimental. Observe a similaridade na marcação para Olig2 e Olig2+/BrdU+ entre os dois grupos. Imagens são projeções de 15 fatias óticas no eixo Z. SC: Substância cinzenta;

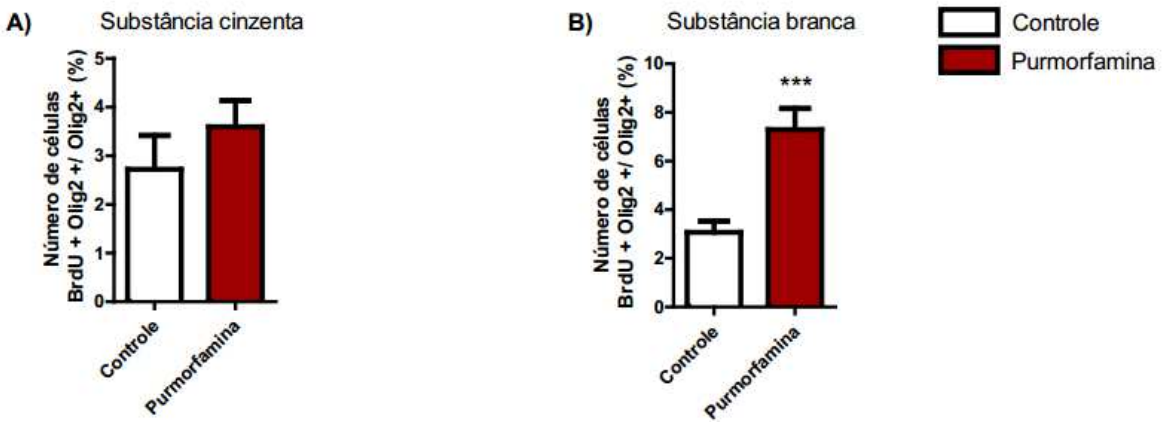

Figura 18: **Quantificação do número de células Brdu+ Olig2+ na substância branca e substância cinzenta:** No gráfico "A" podemos observar a quantificação de células co-marcadas com BrdU e Olig2 dividido pelo número de células Olig2+ na substância branca, e no gráfico "B" na substância cinzenta (Teste t, ***p<0,0001; Média+/-SEM). Número amostral (células) substância cinzenta/substância branca: Purmorfamina: Olig2+BrdU+

= 39/176; Olig2+ = 1050/2558. Controle: Olig2+BrdU+ = 30/78; Olig2+ = 1022/2485. Foram analisados três animais em cada grupo.

Tratamento com ciclopamina não altera o número de células Olig2+ in vivo

Nos animais tratados com ciclopamina não observamos diferença significativa na co-marcação de BrdU e Olig2 entre os grupos controle e experimental a nível de substância branca e substância cinzenta. Como o BrdU foi injetado numa fase mais tardia da gestação (E17), observamos uma maior marcação de células BrdU+ nas camadas mais superficiais na substância cinzenta do córtex cerebral (Figura 19).

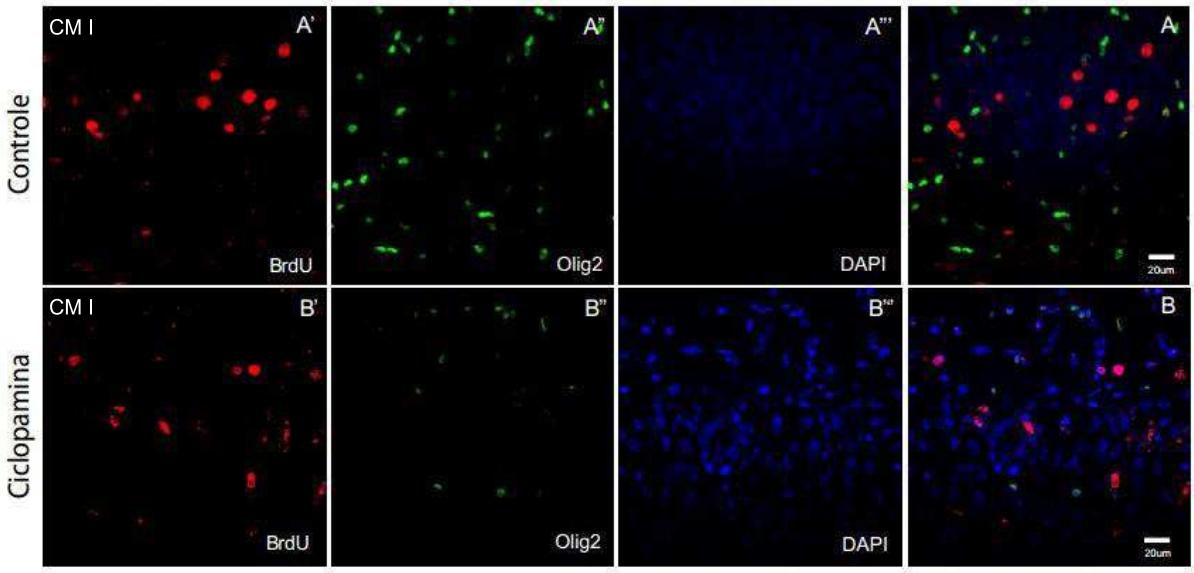

Figura 19: **Imunohistoquímica em cortes coronais para Olig2 e BrdU na substância cinzenta (camada I-II/III) em cérebro de animais P7 tratados com Ciclopamina entre E16-E18:** No painel é possível observar reações para BrdU (vermelho), Olig2 (verde) e DAPI (azul) em camadas superficiais do córtex cerebral de animais controle (A) e experimentais (B). Observe a forte marcação para BrdU nas camadas superiores,

condizente com o padrão neurogênico no período da injeção de BrdU (E17). Imagens são projeções de 15 fatias óticas no eixo Z. CM I: Camada I

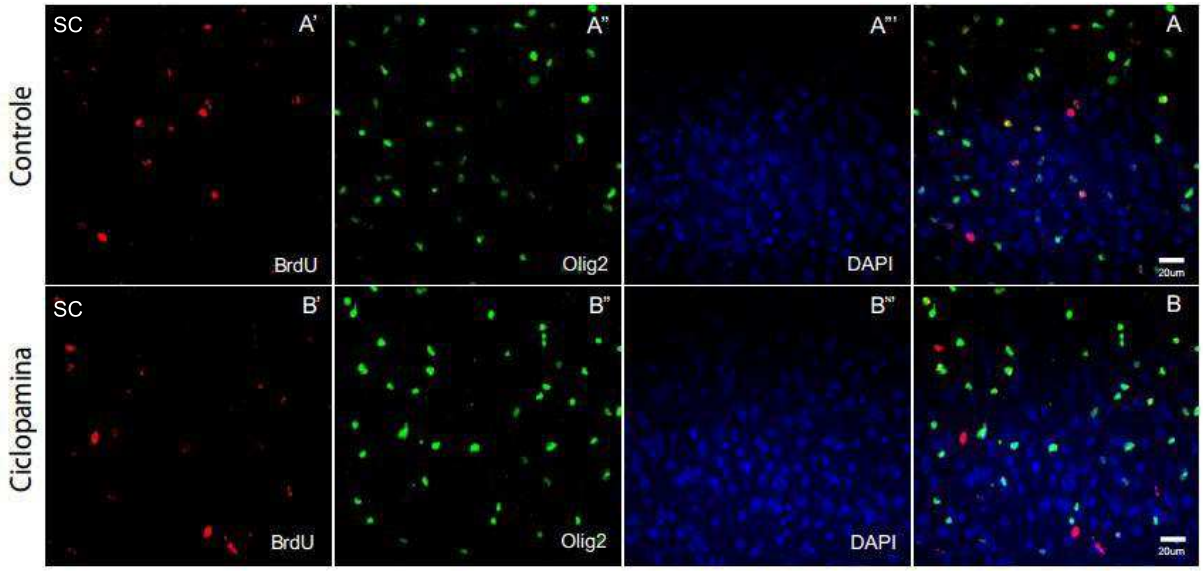

Figura 20: **Imunohistoquímica em cortes coronais para Olig2 e BrdU na substância cinzenta (camada V-VI) em cérebro de animais P7 tratados com Ciclopamina entre E16-E18:** No painel é possível observar reações para BrdU (vermelho), Olig2 (verde) e DAPI (azul) em camadas profundas do córtex cerebral. Sendo "A" a condição controle e "B" a condição experimental. Imagens são projeções de 15 fatias óticas no eixo Z. SC: Substância cinzenta.

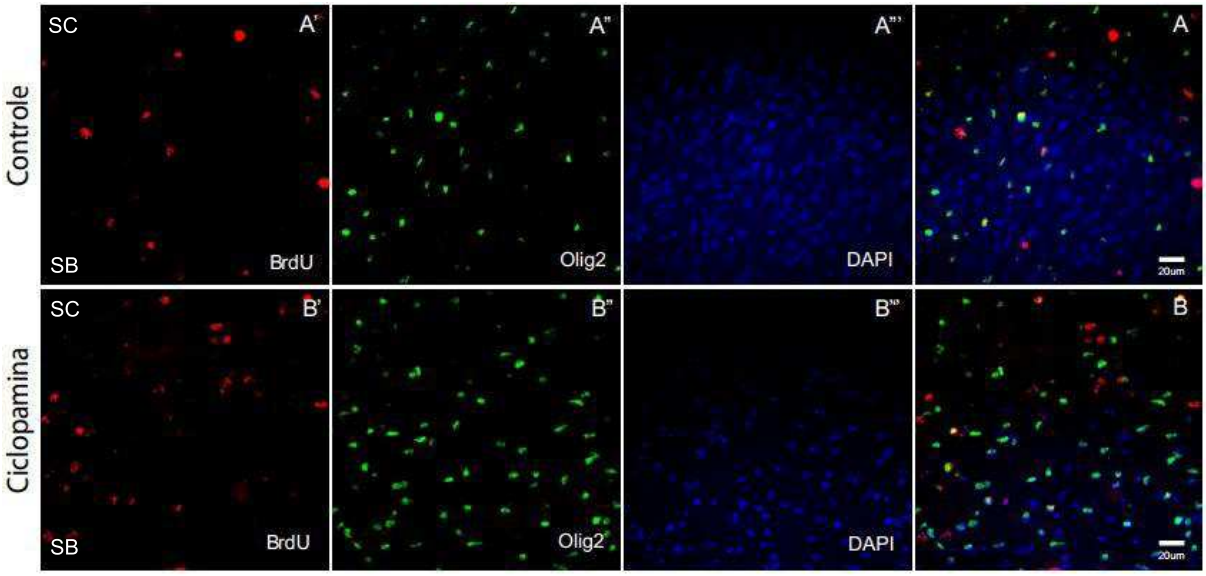

Figura 21: **Imunohistoquímica em cortes coronais para Olig2 e BrdU na substância branca periventricular em cérebro de animais P7 tratados com Ciclopamina entre E16-E18:** No painel acima é possível observar reações para BrdU (vermelho), Olig2 (verde) e DAPI (azul) na substância branca. Sendo "A" a condição controle e "B" a condição experimental. Imagens são projeções de 15 fatias óticas no eixo Z. SB: Substância branca; SC: Substância cinzenta.

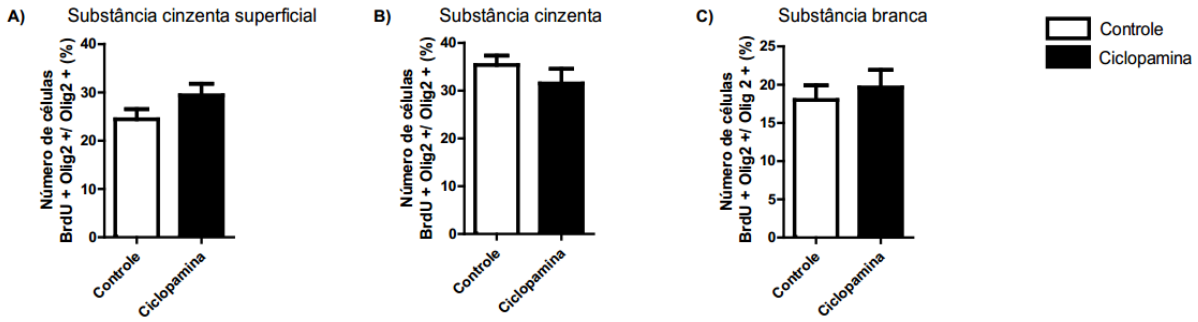

Figura 22: **Quantificação do número de células Brdu+ Olig2+ na substância branca e substância cinzenta profunda (V-VI) e superficial (I-II/III):** Os gráficos acima representam a quantificação do número de células co-marcadas com Olig2 e BrdU nas três regiões analisadas no grupo experimental tratado com ciclopamina e controles analisados em P7. Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle. Barras negras representam o grupo experimental e as barras brancas representam o grupo controle

(Teste t, p>0,05; Média +/- SEM). Grupo controle: Número amostral (células) na substância branca: Olig2+Brdu+ = 268; Olig2+ =1444; Substância cinzenta: Olig2+BrdU+ =312; Olig2+ =661. Substância cinzenta superficial: Olig2+Brdu+ = 328; Olig2+ = 1349. Grupo experimental: Número amostral (células) na substância branca: Olig2+Brdu+ = 372; Olig2+ = 1815; Substância cinzenta: Olig2+BrdU+ =336; Olig2+ = 1143; Substância cinzenta superficial: Olig2+Brdu+ = 294; Olig2+ = 977. Foram analisados três animais diferentes para cada grupo.

Tratamento com ciclopamina afeta geração de astrócitos GFAP+

Através da imunohistoquímica para GFAP e BrdU, podemos observar a geração de células de fenótipo astrocitário a partir de progenitores que estavam em processo mitótico durante o período de tratamento (E16-E18). Com as análises das imagens, observamos que não há diferença no número total de células GFAP entre os grupos controle e ciclopamina (figura 23). Já na análise de co-marcação de células BrdU e GFAP, há uma menor quantidade de células co-marcadas em duas das três regiões analisadas: na substância branca e em camadas superficiais do córtex cerebral (Figuras 24, 25, 26 e 27). Além disso, os processos radiais presentes nessa idade através da placa cortical parecem visualmente alterados no grupo tratado com ciclopamina em comparação ao grupo controle (Figura 25- A'' e B'').

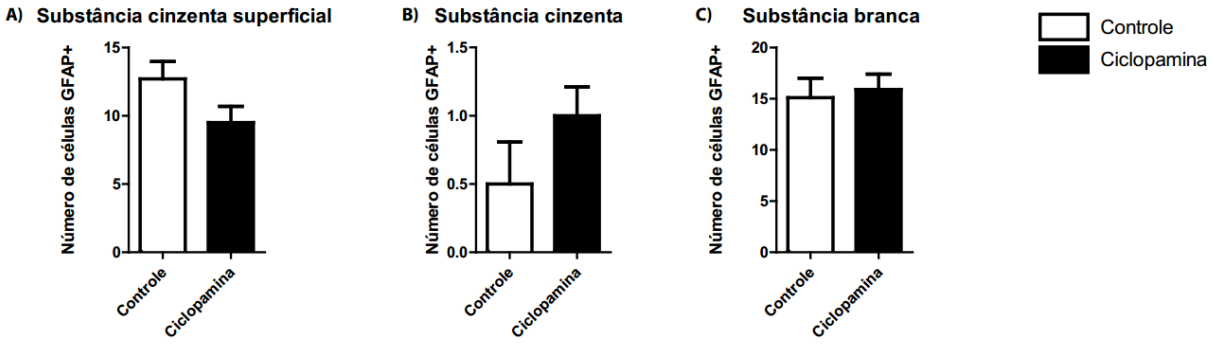

Figura 23: **Quantificação de células GFAP+ na substância branca e em camadas superficiais e profundas da substância cinzenta de camundongos P7**: Os gráficos acima representam a quantificação da marcação para GFAP observada na substância cinzenta superficial (A), na substância cinzenta em camadas mais profundas- camadas V e VI- (B) e na substância branca (C) de animais controle (barras brancas) e animais tratados com ciclopamina (barras negras). Não observamos diferença no número de células GFAP+ entre os grupos (Teste t, p>0,05 Média+/- SEM. Células GFAP+: Grupo controle: Substância cinzenta superficial: 127; Substância cinzenta: 5; Substância branca:151. Grupo ciclopamina: Substância cinzenta superficial:95; Substância cinzenta:10; Substância branca:159. Foram analisados dois animais em cada grupo. Foi analisada toda a área de interesse presente numa imagem de dimensão 45088,276μm²

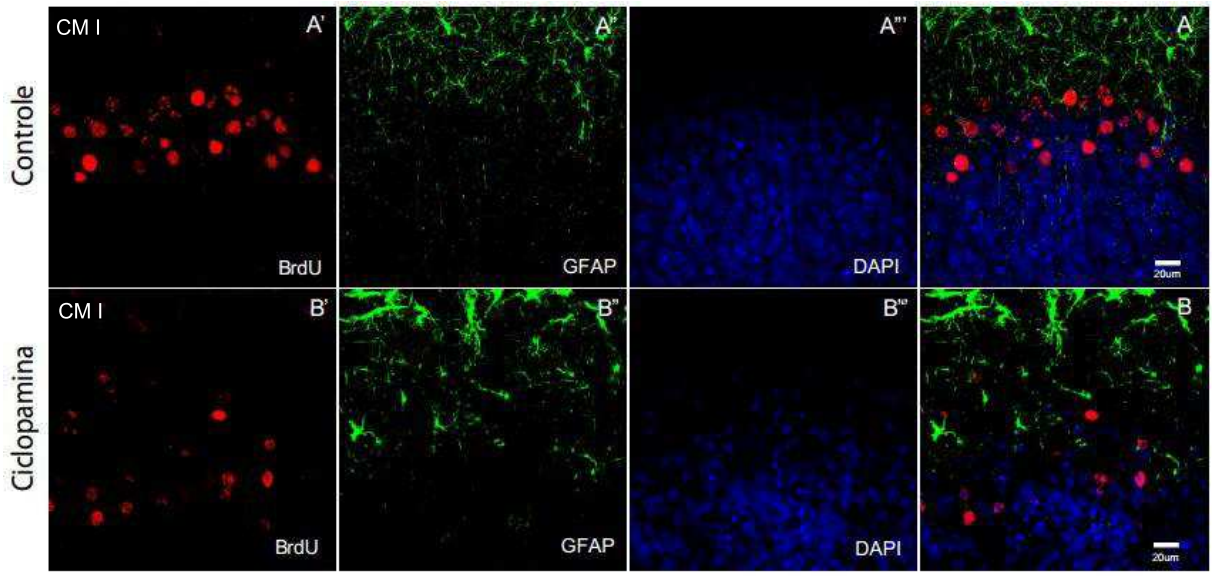

Figura 24**: Imunohistoquímica para BrdU e GFAP na substância cinzenta (Camadas I-II/III) em cortes coronais de cérebro de camundongo P7:** As imagens acima representam a marcação para BrdU (vermelho) GFAP (verde) e DAPI (azul) em camadas superficiais do córtex cerebral. Os animais foram submetidos à injeção de BrdU no dia E17. Imagens são projeções de 15 fatias óticas no eixo Z. CM I: Camada I

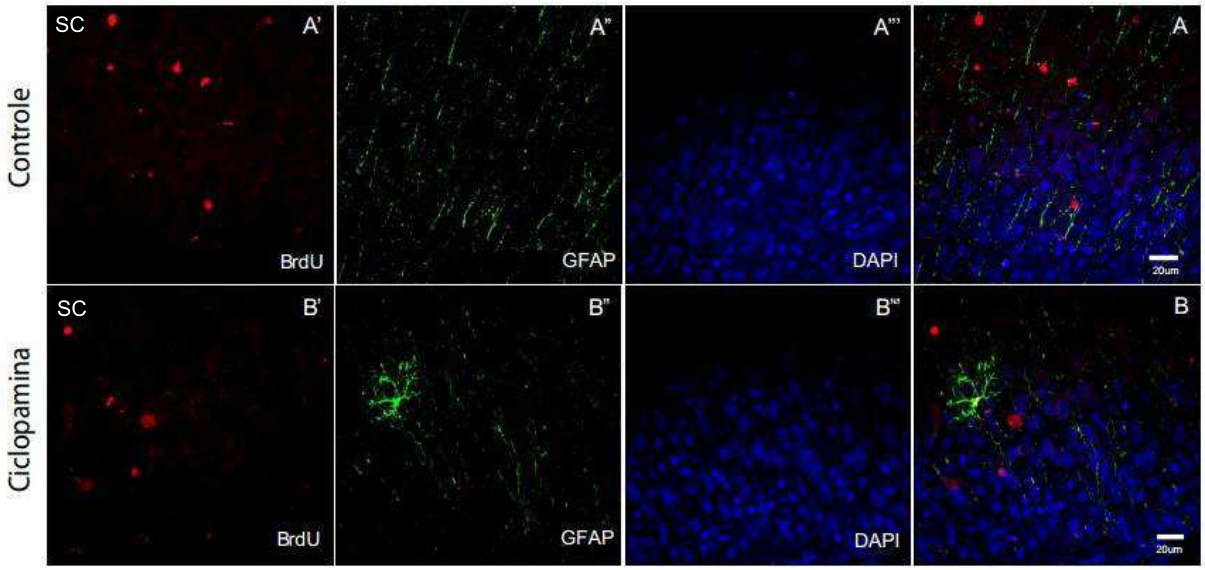

Figura 25**: Imunohistoquímica para BrdU e GFAP na substância cinzenta (Camadas V-VI) em cortes coronais de cérebro de camundongo P7:** As imagens acima representam a marcação para BrdU (vermelho) GFAP (verde) e DAPI (azul) em camadas profundas do córtex cerebral. Note a diferença visual entre os processos radiais marcados para GFAP na figura A'' e B''. Os animais foram submetidos a injeção de BrdU no dia E17. Imagens são projeções de 15 fatias óticas no eixo Z. SC: Substância cinzenta.

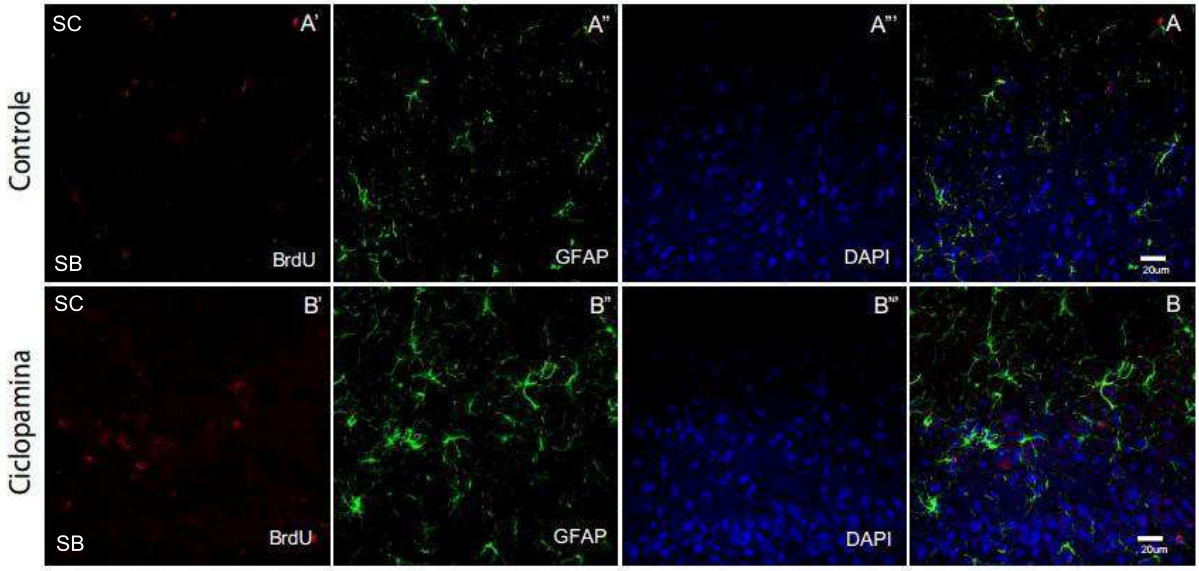

Figura 26**: Imunohistoquímica para BrdU e GFAP na substância branca periventricular em cortes coronais de cérebro de camundongo P7:** As imagens acima representam a marcação para BrdU (vermelho) GFAP (verde) e DAPI (azul) na substância branca periventricular. Os animais foram submetidos a injeção de BrdU no dia E17. Imagens são projeções de 15 fatias óticas no eixo Z. SC: Substância cinzenta; SB: Substância branca.

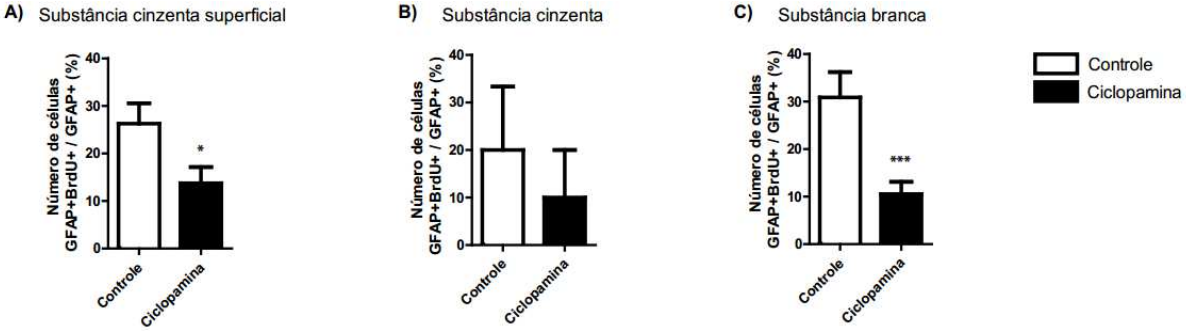

Figura 27: **Quantificação da co-marcaçao de células BrdU+/GFAP+ em cortes coronais de camundongos P7.** Os gráficos acima demonstram a análise realizada entre os grupos controle e experimental II em relação à co-marcação de células BrdU+ e GFAP+ divididas pelo número de células GFAP+ . Observamos diferença no número de células co-marcadas entre o grupo tratado com ciclopamina e o grupo controle na substância cinzenta superficial (gráfico A) e na substância branca (gráfico C). (Teste t, *p>0,05; ***p<0,0001; Média +/- SEM).

Número amostral (células) grupo controle: Substância cinzenta superficial: BrdU+ GFAP+ = 42; GFAP+ = 127; Substância cinzenta: BrdU+ GFAP+ = 2; GFAP+ =5; Substância branca: BrdU+ GFAP+ = 42; GFAP+ = 151. Grupo experimental: Substância cinzenta superficial: BrdU+ GFAP+ = 14 ; GFAP+ =95 ; Substância cinzenta: BrdU+ GFAP+ = 1; GFAP+ = 10; Substância branca: BrdU+ GFAP+ = 17; GFAP+ = 159. Foram analisados dois animais por grupo.

DISCUSSÃO

Diversos trabalhos têm demostrado os efeitos do Shh sobre progenitores neurais ao longo do desenvolvimento e na vida adulta em diferentes regiões do SNC (Roelink *et al*., 1995; Pringle *et al*., 1996; Ericson *et al*., 1997; Orentas *et al*., 1999;Dahmane *et al*., 2001; Tekki-Kessaris, 2001; Palma *et al*., 2003, 2005; Komada *et al*., 2008; Xu *et al.*, 2010; Araújo *et al*., 2014).

Na medula espinhal, alguns tipos de interneurônios e células da glia de fenótipo oligodedrocitários são dependentes da sinalização por Shh. Além disso, a formação de motoneurônios nessa região também caracteriza um evento ligado a esse morfógeno. De uma maneira dose e tempo dependente, ou seja, dependendo da concentração de Shh a que a célula foi exposta e da idade do tecido, ela pode apresentar diferentes comportamentos e adquirir fenótipos distintos tanto *in vitro* quando *in vivo*, mostrando a complexidade funcional dessa sinalização (Roelink *et al*., 1995; Pringle *et al*., 1996; Ericson *et al*., 1997; Orentas *et al*., 1999).

Já em regiões ventrais do telencéfalo, a sinalização por Shh também é bem descrita e sabe-se que sua ativação é necessária para a geração de células provenientes dessa região, como os oligodendrócitos e os interneurônios GABAérgicos do córtex cerebral (Tekki-Kessaris 2001; Xu *et al*., 2005, 2010; Rash e Grove, 2007). Ambos migram tangencialmente e atingem o telencéfalo dorsal durante a fase final da corticogênese e na vida pós-natal. No entanto, os efeitos da sinalização por Shh diretamente sobre a especificação dos progenitores em regiões do telencéfalo dorsal não estão bem definidos.

Recentemente, nós demostramos a ação da sinalização por Shh na astrogliogênese *in vitro* através da análise dos efeitos dessa proteína sobre a população de CTN isoladas do telencéfalo dorsal. Em linhas gerais, o tratamento com Shh promove maior proliferação e sobrevivência celular de progenitores e células com fenótipo astroglial (Araújo *et al*., 2014). Agindo diretamente sobre a dinâmica de ciclo celular, essa sinalização leva a uma redução do tempo do ciclo mitótico, especialmente no tipo de divisão simétrica progenitora, na qual ocorre a formação de duas células com semelhante capacidade proliferativa. Por outro lado, com o bloqueio dessa sinalização com o uso de ciclopamina, as CTN passam a ter um ciclo celular mais longo (Araújo *et al*., 2014). Komada e colaboradores em 2008 realizaram um trabalho *in vivo* com animais mutantes que não expressavam o gene para codificação do Shh e do Smo, também componente dessa via de sinalização, anteriormente descrito. Nesse trabalho, eles observaram que o tempo de ciclo celular das células progenitoras provenientes dos animais mutantes está significativamente alterado em relação ao tempo de ciclo das células de origem de animais selvagens (Komada *et al*., 2008). Esse resultado é similar ao encontrado *in vitro* pelo nosso grupo, com estudo realizado com células do telencéfalo dorsal de camundongos E13 e uso da técnica de vídeo-microscopia de tempo intervalado, permitindo o acompanhamento das células ao longo dos dias de experimento (Araújo *et al*., 2014).

Além do efeito sobre o tempo de ciclo celular, observamos também um importante aumento da taxa de proliferação celular devido o tratamento das CTN com Shh. Através da marcação com Ki67, um marcador mitótico, observamos que com 2 e 5 dias de cultivo celular, a ação do Shh sobre o aumento da proliferação das células é bastante importante, enquanto que o tratamento com ciclopamina leva a uma redução do número de células Ki67+ especialmente com 5 dias de cultivo. Isso mostra que o Shh está relacionando principalmente a proliferação celular de progenitores neurais através de divisões simétricas progenitoras,

aumentando a quantidade de células dessa população em um curto intervalo de tempo, também refletido pela diminuição do tempo de ciclo celular desse tipo de divisão (Araújo *et al*., 2014)

Em termos populacionais, observamos também um maior número de células geradas em culturas tratadas com Shh e o efeito contrário no tratamento com ciclopamina. Através de imunocitoquímica, demostramos que esse aumento populacional está relacionado principalmente a população de progenitores (Ki67+) e células gliais reativas para GFAP+ e não a população neuronal, também analisada através da marcação com MAP2 (Microtubule-associated protein 2). Esses dados sugerem, pela primeira vez, um papel para o Shh sobre a geração de progenitores gliais e astrócitos no córtex cerebral em desenvolvimento (Araújo *et al*., 2014).

Nossos resultados, apresentados neste trabalho, indicam que a sinalização de Shh manipulada através de métodos farmacológicos, também afeta a população de progenitores e células gliais no córtex cerebral *in vivo*.

O tratamento com o agonista da sinalização por Shh, a purmorfamina, feito em um período em que não há gliogênese cortical, entre E12-E14, tem o intuito de expor os progenitores neurais a sinalização por Shh precoce e verificar a interferência desse morfógeno sobre a proliferação dos progenitores neurais o fenótipo celular adquirido por essas células. Com um único pulso de BrdU, é possível observar o número de células que se encontram na fase S do ciclo celular no período do tratamento e caracterizar essa população em diferentes idades na vida pós-natal. A partir da análise em P7, observamos que o número de células reativas para um marcador específico de progenitores gliais, o Olig2, e também para o BrdU é significativamente maior na condição de tratamento com purmorfamina. No entanto, esse

efeito é observado apenas na substância branca periventricular do telencéfalo dorsal, enquanto na substância cinzenta não encontramos diferença entre o grupo experimental e o grupo controle (Figura 18). É possível que estas células Olig2+/BrdU+ representem progenitores gliais que irão contribuir para gerar células gliais na substância cinzenta do córtex cerebral futuramente. Essa possibilidade deverá ser avaliada com maiores sobrevidas (P21-28).

O Olig2 é um fator de transcrição relacionado a formação de progenitores gliais que dão origem tanto a astrócitos como a oligodendrócitos na região do telencéfalo (Lu *et al*., 2002; Zhou e Anderson, 2002; Marshall *et al*., 2005). Sua expressão é transiente ao longo do desenvolvimento, de forma a ser bastante expresso em fases finais da embriogênese no telencéfalo dorsal e fases iniciais na vida pós-natal, posteriormente, sua expressão cai em algumas populações que originarão células astrocitárias na vida pós-natal (Cai *et al*., 2007). Sua relação com a população astrocitária foi demonstrada por Cai e colaboradores em 2007. Nesse trabalho, foi descrita uma população de astrócitos GFAP+ na vida pós-natal que, quando imaturos, também apresentam uma forte expressão de Olig2. Com a maturação, a expressão desse fator de transcrição cai e desaparece na vida adulta entre as células pertencentes a essa população celular. Além disso, em animais mutantes para Olig2, há uma expressiva redução no número de células GFAP+ na substância branca, demostrando o forte efeito regulatório desse fator transcricional sobre o fenótipo das células dessa região (Cai *et al*., 2007).

De fato, alguns estudos mostram que os progenitores e células gliais se encontram na substância branca em períodos finais da corticogênese e no início da vida pós-natal (Levison e Goldman 1997). Tais populações, especialmente a população de progenitores gliais mais restritos a linhagem e oligodendrócitos (células Olig2+), podem ter origem em regiões ventrais ou dorsais do telencéfalo (Kessaris *et al*., 2006).

Kessaris e colaboradores em 2006 demonstraram a existência de diferentes ondas de oligodendrócitos que se destinam ao córtex cerebral. Essas células são derivadas de progenitores ventrais e de progenitores dorsais em diferentes períodos do desenvolvimento. Com o uso de animais transgênicos, esse estudo mostra que a primeira linhagem de progenitor de oligrodendrócito, surge em torno de E11-E12 na EGM e é dependente de Shh (Tekki-kessaris *et al*., 2001; Kessaris *et al*., 2006). Essa população migra de forma ventro-dorsal em direção ao córtex cerebral. Já a segunda linhagem aparece em torno de E16 e é derivada da EGL e também apresenta uma migração tangencial para o córtex cerebral. Próximo e após o nascimento, surge uma nova população no telencéfalo dorsal, proveniente de progenitores corticais que proliferam localmente (Kessaris *et al*., 2006). Após o nascimento, a população proveniente da EGM desaparece no telencéfalo dorsal, dando lugar a população derivada da EGL e do telencéfalo dorsal.

Portanto, o tratamento com purmorfamina em fases precoces da embriogênese pode estar atuando de forma a antecipar a geração de progenitores corticais responsáveis pela formação de células gliais ou pode estar agindo sobre a população migratória proveniente de regiões ventrais.

O tratamento com ciclopamina em um período mais tardio (E16-E18), início do período gliogênico, não teve efeito sobre a população Olig2+/BrdU+ em nenhuma região do telencéfalo dorsal analisada. Essa ausência de efeitos poderia ser explicada por uma inibição incompleta da sinalização por Shh em nosso modelo. No entanto, o efeito deste tratamento sobre a geração de células GFAP+ (veja abaixo) exclui, ao menos parcialmente, esta possibilidade. Alternativamente, o tratamento com ciclopamina poderia estar levando a uma redução do número de progenitores gliais imediatamente após o tratamento, mas seguido de

um aumento compensatório na proliferação da população de progenitores gliais remanescentes.

De acordo com nosso estudo *in vitro*, há uma diminuição na população de células GFAP + com o tratamento com ciclopamina, enquanto que, com a adição de Shh ao cultivo celular, há uma maior proliferação de progenitores que originam células reativas para esse marcador (Araújo *et al*., 2014). Corroborando esses resultados, nossos dados *in vivo* mostram uma redução da população GFAP+ e BrdU+ na substância branca e em camadas superficiais do córtex cerebral após o tratamento com ciclopamina, (Figura 27). A redução do número de células BrdU+/GFAP+ apenas na substância branca e em camadas superficiais do córtex pode ser explicada pela concentração de progenitores gliais nestas áreas (Levison e Goldman, 1997; Costa *et al.,* 2007).

A diminuição no número de células GFAP+ pode ser resultado de uma menor taxa de proliferação celular dos progenitores mais restritos a linhagem astrocitária durante o período de tratamento com ciclopamina. Uuma maior taxa de morte celular dessa população ou uma inibição da expressão do GFAP desencadeada pelo tratamento com esse composto, também são hipóteses a serem levadas em consideração. Interessante observar que a morfologia das células GFAP+ é ligeiramente diferente no grupo tratado com ciclopamina, podendo ser observadas células maiores, mais fortemente marcadas e mais desorganizadas na substância branca e em camadas superficiais do córtex cerebral, assim como menos processos celulares GFAP+ ao longo das camadas corticais mais profundas. Isso pode indicar que as células da glia radial teriam saído do ciclo celular mais precocemente e sofreram transformação em astrócitos (Alves *et al.,* 2002).

Conjuntamente, nossos dados sugerem que a manipulação da via de sinalização por Shh *in vivo* com o uso da purmorfamina leva a um aumento de proliferação de progenitores gliais localizados na substância branca do telencéfalo dorsal. Já o bloqueio dessa via, não altera a o número de progenitores gliais presentes no telencéfalo dorsal. Além disso, há uma significativa redução no número de células de fenótipo astrocitário presentes tanto na substância branca quanto em camadas superficiais do córtex cerebral, demonstrando o efeito do Shh sobre essa população. No entanto, para elucidar de forma mais específica qual linhagem de células está sendo afetada pela sinalização por Shh, se fazem necessários estudos com uso de técnicas de manipulação genética regionalmente seletivas.

REFERÊNCIAS

1. Alves, J.A., Barone, P., Engelender, S., Froes, M.M. & Menezes, J.R. Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone. *Journal of neurobiology* **52**, 251-265 (2002).
2. Amankulor, N.M. *et al.* Sonic hedgehog pathway activation is induced by acute brain injury and regulated by injury-related inflammation. *J Neurosci* **29**, 10299-10308 (2009).
3. Andriezen, W.L. The Neuroglia Elements in the Human Brain. *Br Med J* **2**, 227-230 (1893).
4. Angevine, J.B., Jr. & Sidman, R.L. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* **192**, 766-768 (1961).
5. Antanitus, D.S., Choi, B.H. & Lapham, L.W. Immunofluorescence staining of astrocytes in vitro using antiserum to glial fibrillary acidic protein. *Brain Res* **89**, 363-367 (1975).
6. Araujo, G.L., Araujo, J.A., Schroeder, T., Tort, A.B. & Costa, M.R. Sonic hedgehog signaling regulates mode of cell division of early cerebral cortex progenitors and increases astrogliogenesis. *Front Cell Neurosci* **8**, 77.
7. Bar, E.E. *et al.* Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells* **25**, 2524-2533 (2007).
8. Barnabe-Heider, F. *et al.* Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron* **48**, 253-265 (2005).
9. Bayer, S.A., Altman, J., Russo, R.J., Dai, X.F. & Simmons, J.A. Cell migration in the

rat embryonic neocortex. *J Comp Neurol* **307**, 499-516 (1991).

10. Berman, D.M. *et al.* Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* **425**, 846-851 (2003).

11. Berry, M. & Rogers, A.W. The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J Anat* **99**, 691-709 (1965).

12. Bonni, A. *et al.* Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* **278**, 477-483 (1997).

13. Cai, J. *et al.* A crucial role for Olig2 in white matter astrocyte development. *Development (Cambridge, England)* **134**, 1887-1899 (2007).

14. Campos-Ortega, J.A. Mechanisms of early neurogenesis in Drosophila melanogaster. *Journal of neurobiology* **24**, 1305-1327 (1993).

15. Choi, B.H. & Lapham, L.W. Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study. *Brain Res* **148**, 295-311 (1978).

16. Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E. & Beachy, P.A. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* **280**, 1603-1607 (1998).

17. Costa, M.R., Bucholz, O., Schroeder, T. & Gotz, M. Late origin of glia-restricted progenitors in the developing mouse cerebral cortex. *Cereb Cortex* **19 Suppl 1**, i135-143 (2009).

18. Costa, M.R., Kessaris, N., Richardson, W.D., Gotz, M. & Hedin-Pereira, C. The marginal zone/layer I as a novel niche for neurogenesis and gliogenesis in developing cerebral cortex. *J Neurosci* **27**, 11376-11388 (2007).

19. Dahmane, N. *et al.* The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development (Cambridge, England)* **128**, 5201-5212 (2001).

20. Doe, C.Q. & Skeath, J.B. Neurogenesis in the insect central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 18-24 (1996).

21. Douglas, R.J. & Martin, K.A. Neuronal circuits of the neocortex. *Annual review of neuroscience* **27**, 419-451 (2004).

22. Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H. & Jessell, T.M. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**, 661-673 (1996).

23. Ericson, J. *et al.* Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* **90**, 169-180 (1997).

24. Gaiano, N. & Fishell, G. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annual review of neuroscience* **25**, 471-490 (2002).

25. Gaiano, N., Nye, J.S. & Fishell, G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* **26**, 395-404 (2000).

26. Ge, W. *et al.* Notch signaling promotes astrogliogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation. *Journal of neuroscience research* **69**, 848-860 (2002).

27. Gunhaga, L., Jessell, T.M. & Edlund, T. Sonic hedgehog signaling at gastrula stages specifies ventral telencephalic cells in the chick embryo. *Development (Cambridge, England)* **127**, 3283-3293 (2000).

28. He, F. *et al.* A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis. *Nature neuroscience* **8**, 616-625 (2005).

29. Hermanson, O., Jepsen, K. & Rosenfeld, M.G. N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* **419**, 934-939 (2002).

30. Ihrie, R.A. *et al.* Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron* **71**, 250-262.

31. Incardona, J.P., Gaffield, W., Kapur, R.P. & Roelink, H. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development (Cambridge, England)* **125**, 3553-3562 (1998).

32. Karhadkar, S.S. *et al.* Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* **431**, 707-712 (2004).

33. Katayam, M. *et al.* Patched and smoothened mRNA expression in human astrocytic tumors inversely correlates with histological malignancy. *J Neurooncol* **59**, 107-115 (2002).

34. Katayam, M. *et al.* Patched and smoothened mRNA expression in human astrocytic tumors inversely correlates with histological malignancy. *J Neurooncol* **59**, 107-115 (2002).

35. Kessaris, N. *et al.* Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature neuroscience* **9**, 173-179 (2006).

36. Kessaris, N., Pringle, N. & Richardson, W.D. Ventral neurogenesis and the neuron-glial switch. *Neuron* **31**, 677-680 (2001).

37. Kessaris, N., Pringle, N. & Richardson, W.D. Specification of CNS glia from neural stem cells in the embryonic neuroepithelium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**, 71-85 (2008).

38. Komada, M. *et al.* Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development (Cambridge, England)* **135**, 2717-2727 (2008).

39. Kornack, D.R. & Rakic, P. Radial and horizontal deployment of clonally related cells in the primate neocortex: relationship to distinct mitotic lineages. *Neuron* **15**, 311-321 (1995).

40. Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla, A. The glial nature of embryonic and adult neural

stem cells. *Annual review of neuroscience* **32**, 149-184 (2009).

41. Lai, K., Kaspar, B.K., Gage, F.H. & Schaffer, D.V. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature neuroscience* **6**, 21-27 (2003).

42. Lent, R., Hedin-Pereira, C., Menezes, J.R. & Jhaveri, S. Neurogenesis and development of callosal and intracortical connections in the hamster. *Neuroscience* **38**, 21-37 (1990).

43. Levison, S.W. & Goldman, J.E. Multipotential and lineage restricted precursors coexist in the mammalian perinatal subventricular zone. *Journal of neuroscience research* **48**, 83-94 (1997).

44. Lu, Q.R. *et al.* Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* **109**, 75-86 (2002).

45. Luskin, M.B. Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate. *Journal of neurobiology* **36**, 221-233 (1998).

46. Maity, T., Fuse, N. & Beachy, P.A. Molecular mechanisms of Sonic hedgehog mutant effects in holoprosencephaly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17026-17031 (2005).

47. Marshall, C.A., Novitch, B.G. & Goldman, J.E. Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. *J Neurosci* **25**, 7289-7298 (2005).

48. Miller, F.D. & Gauthier, A.S. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* **54**, 357-369 (2007).

49. Miller, R.H. & Raff, M.C. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci* **4**, 585-592 (1984).

50. Millhouse, O.E. A Golgi study of third ventricle tanycytes in the adult rodent brain. *Z*

Zellforsch Mikrosk Anat **121**, 1-13 (1971).

51. Mione, M.C., Cavanagh, J.F., Harris, B. & Parnavelas, J.G. Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **17**, 2018-2029 (1997).

52. Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R. & Macklis, J.D. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* **8**, 427-437 (2007).

53. Morrow, T., Song, M.R. & Ghosh, A. Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development (Cambridge, England)* **128**, 3585-3594 (2001).

54. Mountcastle, V.B. The columnar organization of the neocortex. *Brain* **120 (Pt 4)**, 701-722 (1997).

55. Nakashima, K. *et al.* Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J Neurosci* **19**, 5429-5434 (1999).

56. Nicolas, C.S. *et al.* The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *Jakstat* **2**, e22925.

57. Orentas, D.M., Hayes, J.E., Dyer, K.L. & Miller, R.H. Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development (Cambridge, England)* **126**, 2419-2429 (1999).

58. Palma, V. *et al.* Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development (Cambridge, England)* **132**, 335-344 (2005).

59. Palma, V. & Ruiz i Altaba, A. Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development (Cambridge, England)* **131**, 337-345 (2004).

60. Pasca di Magliano, M. & Hebrok, M. Hedgehog signalling in cancer formation and

maintenance. *Nat Rev Cancer* **3**, 903-911 (2003).

61. Peters, A. & Vaughn, J.E. Microtubules and filaments in the axons and astrocytes of early postnatal rat optic nerves. *J Cell Biol* **32**, 113-119 (1967).

62. Pringle, N.P. *et al.* Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev Biol* **177**, 30-42 (1996).

63. Qian, X. *et al.* Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* **28**, 69-80 (2000).

64. Rajan, P. & McKay, R.D. Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* **18**, 3620-3629 (1998).

65. Rash, B.G. & Grove, E.A. Patterning the dorsal telencephalon: a role for sonic hedgehog? *J Neurosci* **27**, 11595-11603 (2007).

66. Reid, C.B., Liang, I. & Walsh, C. Systematic widespread clonal organization in cerebral cortex. *Neuron* **15**, 299-310 (1995).

67. Ribeiro, L.A., Quiezi, R.G., Nascimento, A., Bertolacini, C.P. & Richieri-Costa, A. Holoprosencephaly and holoprosencephaly-like phenotype and GAS1 DNA sequence changes: Report of four Brazilian patients. *Am J Med Genet A* **152A**, 1688-1694.

68. Roelink, H. *et al.* Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81**, 445-455 (1995).

69. Ruiz i Altaba, A., Palma, V. & Dahmane, N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* **3**, 24-33 (2002).

70. Sanes D, Reh T, Harris W (2006) Development of nervous system. Elsevier.2 ed.

71. Sinha, S. & Chen, J.K. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened. *Nat Chem Biol* **2**, 29-30 (2006).

72. Spassky, N. *et al.* Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* **25**, 10-18 (2005).

73. Stecca, B. *et al.* Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5895-5900 (2007).

74. Taipale, J. *et al.* Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**, 1005-1009 (2000).

75. Taylor, M.K., Yeager, K. & Morrison, S.J. Physiological Notch signaling promotes gliogenesis in the developing peripheral and central nervous systems. *Development (Cambridge, England)* **134**, 2435-2447 (2007).

76. Tekki-Kessaris, N. *et al.* Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development (Cambridge, England)* **128**, 2545-2554 (2001).

77. Vaughn, J.E. & Peters, A. Electron microscopy of the early postnatal development of fibrous astrocytes. *Am J Anat* **121**, 131-152 (1967).

78. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. & Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **36**, 131-149 (2003).

79. Wang, D.D. & Bordey, A. The astrocyte odyssey. *Progress in neurobiology* **86**, 342-367 (2008).

80. Watkins, D.N. *et al.* Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* **422**, 313-317 (2003).

81. Wu, X., Ding, S., Ding, Q., Gray, N.S. & Schultz, P.G. A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. *J Am Chem Soc* **124**, 14520-14521 (2002).

82. Xu, Q. *et al.* Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with distinct cortical interneuron fates. *Neuron* **65**, 328-340.

83. Xu, Q., Wonders, C.P. & Anderson, S.A. Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon. *Development (Cambridge, England)* **132**, 4987-4998 (2005).

84. Zhou, Q., Choi, G. & Anderson, D.J. The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* **31**, 791-807 (2001).

ANEXOS

frontiers in
CELLULAR NEUROSCIENCE

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE
published: 11 March 2014
doi: 10.3389/fncel.2014.00077

Sonic hedgehog signaling regulates mode of cell division of early cerebral cortex progenitors and increases astrogliogenesis

Geissy L. L. Araújo[1†], Jessica A. M. Araújo[1†], Timm Schroeder[2], Adriano B. L. Tort[1] and Marcos R. Costa[1]*

[1] Brain Institute, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil
[2] Department of Biosystems Science and Engineering, Cell Systems Dynamics, ETH Zurich, Basel, Switzerland

Edited by:
Eran Meshorer, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

Reviewed by:
Kathy Keyvani, University Hospital Essen, Germany
Nissim Ben-Arie, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

***Correspondence:**
Marcos R. Costa, Brain Institute, Federal University of Rio Grande do Norte, Av. Nascimento de Castro 2155, Lagoa Nova, Natal 59056-450, Brazil
e-mail: mrcosta@neuro.ufrn.br

† These authors have contributed equally to this work.

The morphogen Sonic Hedgehog (SHH) plays a critical role in the development of different tissues. In the central nervous system, SHH is well known to contribute to the patterning of the spinal cord and separation of the brain hemispheres. In addition, it has recently been shown that SHH signaling also contributes to the patterning of the telencephalon and establishment of adult neurogenic niches. In this work, we investigated whether SHH signaling influences the behavior of neural progenitors isolated from the dorsal telencephalon, which generate excitatory neurons and macroglial cells *in vitro*. We observed that SHH increases proliferation of cortical progenitors and generation of astrocytes, whereas blocking SHH signaling with cyclopamine has opposite effects. In both cases, generation of neurons did not seem to be affected. However, cell survival was broadly affected by blockade of SHH signaling. SHH effects were related to three different cell phenomena: mode of cell division, cell cycle length and cell growth. Together, our data *in vitro* demonstrate that SHH signaling controls cell behaviors that are important for proliferation of cerebral cortex progenitors, as well as differentiation and survival of neurons and astroglial cells.

Keywords: cerebral cortex development, progenitor cells, sonic hedgehog (SHH), mode of cell division, neurogenesis, gliogenesis, cell survival, astrocytes

INTRODUCTION

Members of the Hedgehog (HH) family of proteins have been involved in a plethora of processes in the developing embryo (Ingham and McMahon, 2001). In vertebrates, the HH homolog Sonic Hedgehog (SHH) plays critical roles in the patterning of the developing neural tube system, limbs, axial skeleton, and other derivatives of the somites (Chiang et al., 1996). In the neural tube, SHH signaling is pivotal for the patterning of ventral structures (Echelard et al., 1993), proliferation and survival of ventral progenitors (Rowitch et al., 1999) and specification of ventral neurons, such as motoneurons in the spinal cord (Ericson et al., 1995; Roelink et al., 1995; Briscoe et al., 2000) and GABAergic interneurons in the cerebral cortex (Xu et al., 2005, 2010).

SHH is also expressed in the dorsal telencephalon during mid and late corticogenesis where it has been associated with growth of cortical structures (Dahmane et al., 2001), generation and maintenance of post-natal and adult neural stem cell pools (Machold et al., 2003; Ahn and Joyner, 2005; Palma et al., 2005; Han et al., 2008). Selective genetic deletion of SHH or its receptor Smoothened (SMO) in the dorsal telencephalon leads to decreased proliferation of progenitor cells, reduced neurogenesis and increased cell death (Komada et al., 2008), indicating a central role for SHH signaling in the control of cortical neurogenesis. However, the cellular mechanisms underlying these effects are still poorly understood.

In this study, we show that SHH affects cell survival, cell cycle progression, cell growth and mode of cell division of cortical progenitors isolated from the dorsal telencephalon at early corticogenesis. Blockade of SHH signaling using cyclopamine in cultures of embryonic day (E)13 cortices led to a premature depletion of progenitor cells and diminished astrogliogenesis, with no direct effect on neurogenesis. Conversely, stimulation of SHH pathway increased proliferation and generation of astroglial cells, but did not affect the generation of neurons. Intriguingly, we show that SHH effects on cell cycle length and mode of cell division of cortical progenitors are linked suggesting that control of cell cycle by SHH may be an important mechanism to govern the balance between proliferation and differentiation of neural cells.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

C57/Bl/6J and Tau-GFP (Tucker et al., 2001) mice were maintained on a 12-h (7:00 or 19:00 h) light-dark cycle. The day of the vaginal plug was considered as E0 and the day of birth as P0. All experimental procedures were done in accordance with the Society for Neuroscience and were approved by our institutional animal care and utilization committees.

PRIMARY CELL CULTURE

Embryonic brains were isolated from E13 timed pregnant mice. The lateral portion of the dorsal telencephalon was dissected and dissociated as previously described (Costa et al., 2009). Approximately, 5×10^5 cells (containing both neural progenitor cells and post-mitotic neurons) were plated on poly-D-lysine (PDL) coated glass coverslips in DMEM GlutaMax (GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (GIBCO). After 2 h, cultures were infected with low titer (<25 particles) of the retroviruses carrying the gene encoding for the green fluorescent protein GFP and treated with cyclopamine (5 μM), SHH (5 nM), or etanol (0.05%). Twenty-four hours later, equal volume of DMEM GlutaMax supplemented with B27 (GIBCO) and the respective treatments were added, reducing the FCS concentration to 5% while keeping the same concentration of cyclopamine, SHH or etanol. After 2, 5, or 7 days, cultures were fixed with 4% PFA at room temperature (5 min) and processed for immunocytochemistry.

IMMUNOCYTOCHEMISTRY

Cell cultures were incubated in primary antibody overnight at 4°C in 0.5% of triton X-100 and 10% of normal goat serum in PBS 0.1M. Primary antibodies used were anti-MAP2 (mouse IgG1, SIGMA 1:1000), anti-GFP (chicken, AvesLab 1:500) anti-Ki67 (rat, DAKO 1:50), anti-GFAP (rabbit, DAKO 1:500). Fluorescent secondary antibodies were used according to the manufacturer's recommendations (Life Technologies). Nuclei were visualized by incubating cells for 10 min with 0.1 μg/mL DAPI (4′6′-diamidino-2-phenylindone, SIGMA) in PBS 0.1 M. Cells were mounted in Aqua Polymount (Polyscience) and analyzed using a Cell Observer equipped with epi-fluorecence and LSM 710 confocal laser scanning microscopes (Zeiss).

For quantification of cell numbers by immunocytochemistry, we randomly sampled 12 areas (measuring 143315.21 μm^2 each) from 3 independent experiments and quantified the total number of DAPI nuclei, Ki67, GFAP, or MAP2 labeled cells.

CLONAL ANALYSIS *IN VITRO*

Clones were classified according to the expression of GFP and the neuronal MAP2 and astroglial GFAP markers. Immunoreactivity for these markers was revealed with secondary antibodies with different conjugated fluorophores, allowing the identification of three types of clones: pure neuronal (all cells stained for MAP2), pure glial (absence of MAP2-positive cells and immunoreactivity for GFAP), and mixed clones (at least one MAP2-positive cell and one O4 or GFAP-positive). We analyzed 578 clones from 4 independent experiments (Control: 329 clones; Cyc: 134 clones; SHH: 115 clones).

TIME-LAPSE VIDEO MICROSCOPY

Cell cycle parameters, cell area, mode of cell division and cell survival were analyzed by time-lapse video microscopy (Costa et al., 2008, 2011). Briefly, cultures were imaged every 4 min using a Cell Observer microscope (Zeiss) and a self-written VBA module remote controlling Zeiss AxioVision software (Rieger et al., 2009). Images were assembled into a movie using the software Timm's Tracking Tool—TTT (Rieger et al., 2009), allowing the identification and tracking of individual clones. Mode of cell division was classified based on the behavior of daughter cells in: Symmetric Progenitor (both daughter cells continue to proliferate), Asymmetric (one daughter cell continues to proliferate and the other becomes post-mitotic), or Symmetric Terminal (both daughter cells become post-mitotic). Cell cycle length was measured as the time spanned by proliferating cells between their generation and division. Cell size was measured as the area covered by the cell's soma (in μm^2) 10 min prior to division. Cell survival was quantified every 12 h for each cell lineage. Briefly, the number of cells alive at 12, 24, 36, 48, 60, 72, and 84 h was divided by the total number of cells generated before these time-points within individual clones.

STATISTICAL ANALYSIS

Data were derived from at least 3 independent batches of cell culture. In each experiment, cells were isolated from the dorsal telencephalon of 5–6 embryos and we analyzed at least 2–3 coverslips from each condition (control, cyclopamine, and SHH) per experiment. The total number of cells or clones analyzed is provided throughout the results section.

Statistical analyses were made using the software GraphPad Prism version 5 (GraphPad) and MATLAB. Data in the graphics are presented as Mean ± Standard Error of the Mean (SEM). For statistical significance we considered $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$, using *t*-test, One-Way ANOVA followed by Tuckey or Dunnet *post-hoc* tests, or Two-Way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test, as indicated in the figure legends.

RESULTS

SHH SIGNALING AFFECTS THE GENERATION OF GLIAL CELLS FROM DORSAL TELENCEPHALIC PROGENITORS

Progenitor cells in the dorsal telencephalon express SHH targets such as GLI genes at early and mid-neurogenesis (Dahmane et al., 2001; Komada et al., 2008). However, the effects of this signaling in the fate of cortical progenitors are poorly understood. To test whether SHH signaling could influence the fate of early cortical progenitors, we treated cultures of cortical progenitors with recombinant SHH or cyclopamine, a HH signaling pathway inhibitor (Chen et al., 2002). After 7 days *in vitro* (div), we observed that cultures treated with SHH displayed an increase in the number of cells (**Figure 1**). While the amount of cells reactive for the neuronal marker MAP2 (microtubule-associated protein 2) was not affected (**Figure 1K**), the total number of cells and cells reactive for the astrocyte marker GFAP (glial-fibrilliary acidic protein) was higher in SHH treated cultures as compared to controls. In contrast, cultures treated with cyclopamine exhibited lower numbers of GFAP-expressing cells and total number of cells than controls (**Figures 1J,L**).

To isolate the effects of SHH in progenitor cells from those in post-mitotic neurons isolated in our cell culture preparation, we used retroviral labeling of cortical progenitors after 2 h *in vitro* and analyzed clone size and composition after 7 div (**Figure 2**). Since only mitotic progenitor cells incorporate

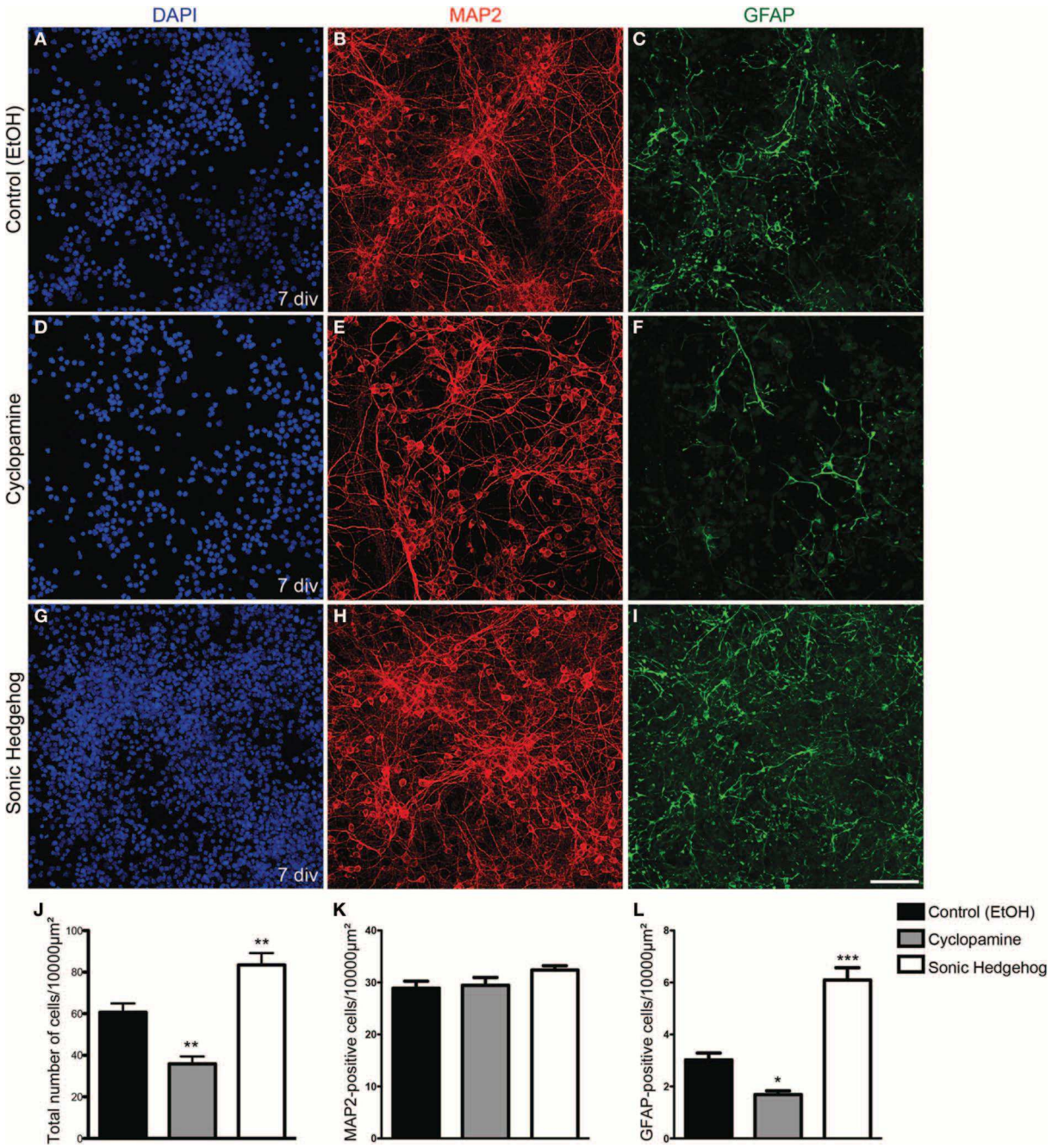

FIGURE 1 | Increased cellularity in cultures treated with SHH. (A–I) Images of E13 cortical cell cultures treated with EtOH **(A–C)** control, cyclopamine **(D–F)**, or SHH **(G–I)**. Cultures were immunolabeled after 7 div using antibodies against GFAP (green) and MAP2 (red) and stained with DAPI (blue). Note the reduction in GFAP-expressing cells in cultures treated with cyclopamine **(F)** and the increase in this population upon SHH exposure **(I)**, compared to control **(C)**. **(J–L)** Quantification of the total number of cells **(J)** MAP2-positive neurons **(K)** or GFAP-positive astrocytes **(L)** after 7 div. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, One-Way ANOVA followed by Dunnet *post-hoc* test. Calibration bar: 100 μm.

the retroviral genome carrying the reporter gene (Price et al., 1987), the use of a low number of retroviral particles allows the identification of cells derived from a single progenitor, i.e., a clone. We could observe that the frequency of pure neuronal, mixed and pure glial clones was not significantly affected by SHH or cyclopamine (**Figure 2J**). However, the number of cells per clone was significantly decreased in cultures treated with cyclopamine, and increased with SHH (**Figure 2K**). Interestingly, the mean number of neurons per clone was not affected (**Figure 2L**), suggesting that SHH signaling increases the number of undifferentiated and/or macroglial cells, leading to a reduction in the percentage of neurons per clone (**Figure 2M**).

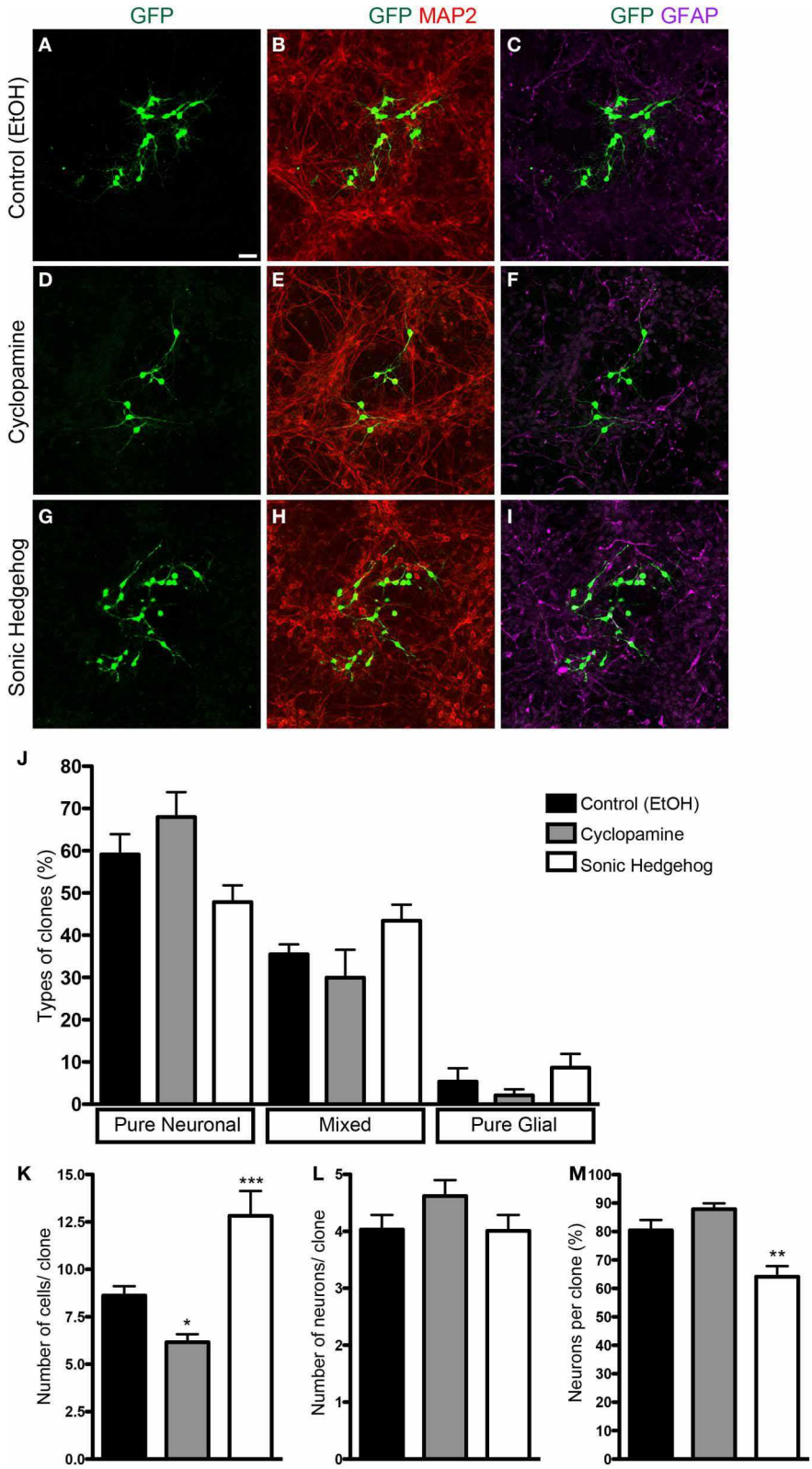

FIGURE 2 | Clonal analysis using retroviral vectors. (A–I) Images of cortical cell cultures after 7 div, immunolabeled with antibodies against GFP (green), MAP-2 (red), and GFAP (magenta). **(J)** Quantification of the types of clones in different conditions. **(K–M)** Quantifications of total number of cells **(K)**, number of neurons **(L)**, and percentage of neurons **(M)** per clone. Note that the effects in the number of cells are not accompanied by changes in the number of neurons per clone **(K,L)**. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, One-Way ANOVA followed by Dunnet *post-hoc* test (Control: 329 clones; Cyc: 134 clones; SHH: 115 clones; $n = 4$ independent experiments). Calibration bar: 50 μm.

Next, we quantified the total number of cells and progenitors after 2 and 5 div. SHH treatment increased the number of both proliferating (Ki67-expressing) and non-proliferating cells after 2 div, and this effect persisted after 5 div (**Figure 3**). In contrast, cyclopamine did not affect the number of proliferating and non-proliferating cells at day 2 *in vitro* (**Figure 3D**), but led to a significant decrease in the number of proliferating cells at day 5 (**Figure 3H**), with no effect in the number of non-proliferating cells. These data indicate that cyclopamine is mainly affecting progenitor cells generated at late stages in culture (between 2nd and 5th day).

SHH SIGNALING INFLUENCES CELL DIVISION MODE

To get a better understanding on the cellular mechanisms leading to the changes in cell population induced by SHH and cyclopamine, we next performed time-lapse video microscopy experiments. Cortical progenitor cultures were imaged every 5 min up to 7 div. Images were assembled into a movie using Timm's Tracking Tool (TTT), allowing the tracking of individual progenitor cells and its progeny (**Movies 1–3**). **Figure 4** shows examples of common lineages trees observed in cultures treated with cyclopamine (**Figure 4A**), control (**Figure 4B**), and SHH (**Figure 4C**). Lineages are color coded to facilitate identification of cell division mode: symmetrically, generating two progenitor cells (Symmetric Progenitor, SP) or two post mitotic cells (Symmetric Terminal, ST); and asymmetrically, generating one progenitor and one post mitotic cell (Asymmetric, As).

We quantified the frequency of cortical progenitors undergoing each type of cell division (**Figures 4D–F**). In the first generation (first recorded round of cell division), we observed a significant increase in the number of SP cell divisions and a decrease in ST and As divisions after SHH treatment, whereas cyclopamine significantly increased ST cell divisions (**Figure 4D**). A similar trend persisted for ST and SP cell division in the second generation (progenitor cells generated from first generation cells), but with no changes in As cell divisions (**Figure 4E**). Interestingly, in the third generation we failed to observe any difference between control and cyclopamine treated cultures, but SHH still increased SP and decreased ST cell divisions (**Figure 4F**).

Next, we plotted the frequency of SP, ST, and As cell divisions per generation for each group. As previously described, we observed that cortical progenitors divided more symmetrically generating two progenitors in the first generation, but progressively shifted to generate two post mitotic cells (**Figure 4G**). However, both cyclopamine and SHH changed this pattern of frequency of SP and ST divisions over time (**Figures 4H,I**). Together, these data indicate that SHH signaling regulates cell cycle exit and reentry in cortical progenitors *in vitro*.

EFFECTS OF SHH SIGNALING IN CELL CYCLE LENGTH AND CELL GROWTH

Cell cycle length of cortical progenitors is an important predictor for neuronal differentiation (Calegari et al., 2005; Arai et al., 2011). To test whether SHH signaling interferes with cell

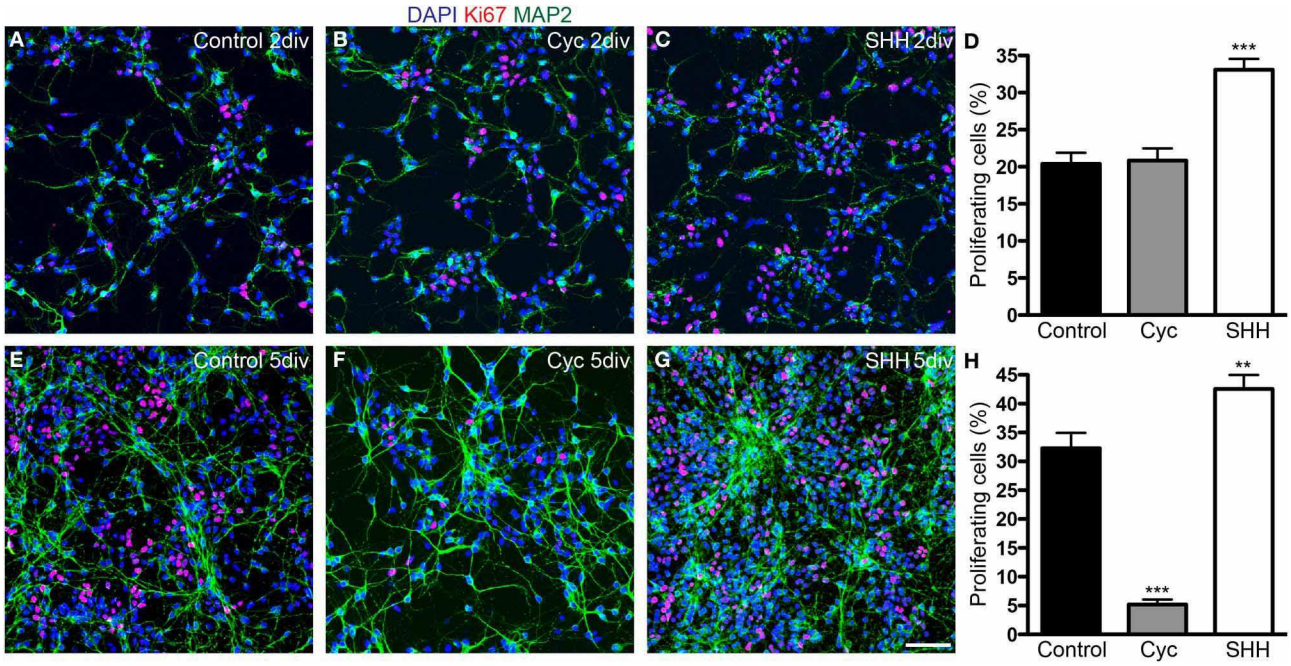

FIGURE 3 | SHH signaling increases the number of proliferating cells. (A–C,E–G) Images of cortical cell cultures after 2 **(A–C)** or 5 div **(E–G)** immunolabeled with antibodies against Ki67 (red) and MAP-2 (green). Cell nuclei are stained with DAPI (blue). **(D,H)** Quantification of Ki67-expressing cells. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, One-Way ANOVA followed by Dunnet *post-hoc* test (Number of cells analyzed, 2 div—Control: 1863; Cyc: 2170; SHH: 2986; 5 div—Control: 5342; Cyc: 3015; SHH: 6170; 3 independent experiments). Calibration bar: 50 μm.

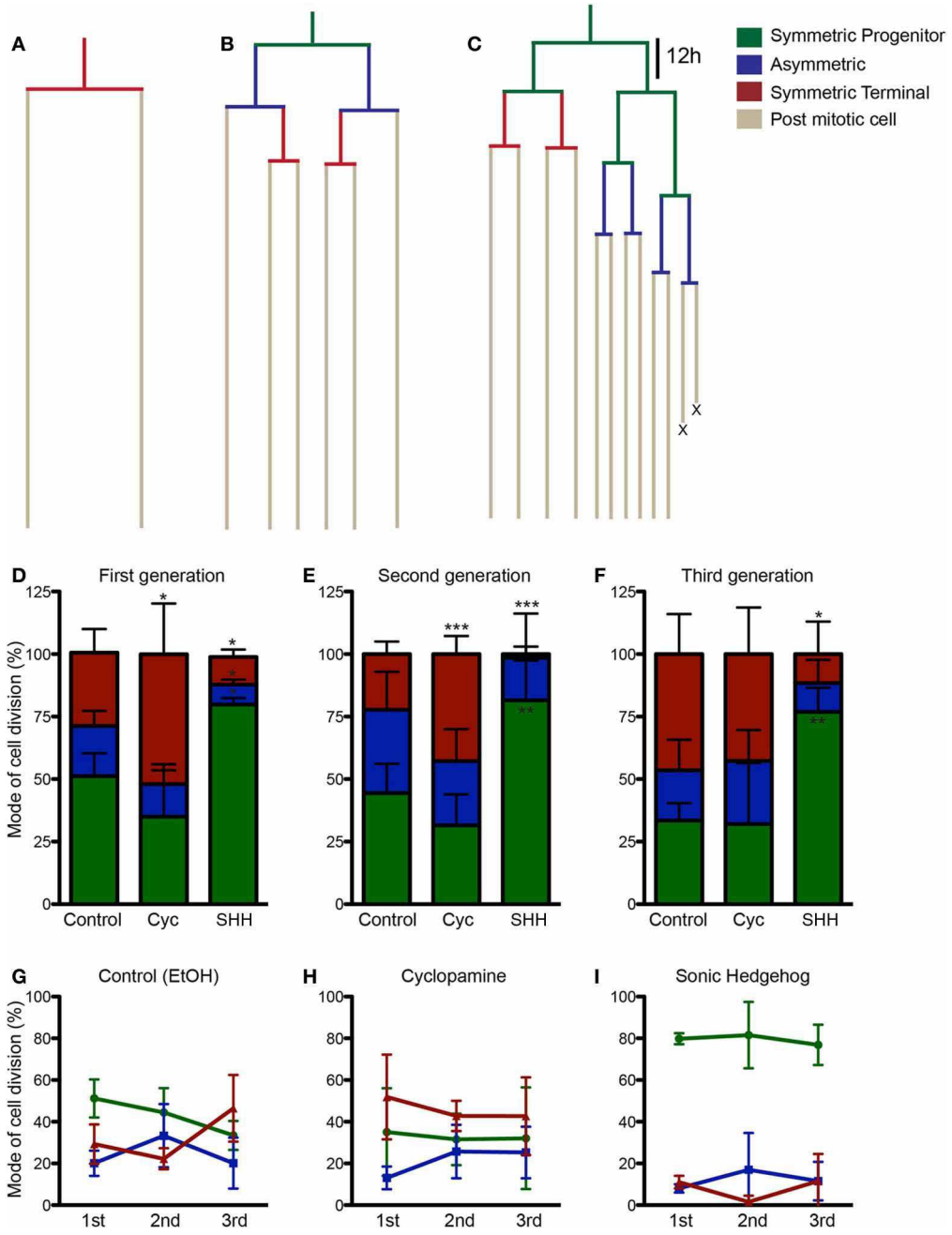

FIGURE 4 | SHH increase frequency of progenitor cell divisions. (A–C) Examples of lineages trees from individual cortical progenitors observed in cyclopamine **(A)**, control **(B)** and SHH **(C)** treated cultures. Lines are color coded to indicate cells undergoing SP (green), As (blue), or ST (red) cell divisions. **(D–F)** Quantification of SP, As and ST cell divisions in the first **(D)**, second **(E),** and third **(F)** cell generations. **(G–I)** Graphics showing the evolution in the frequency of SP, As and ST cell division in the lineage progression of control **(G)**, cyclopamine **(H)**, and SHH **(I)** treated cells. Note that the pattern observed between SP and ST cell divisions in control cultures is abolished in cyclopamine and SHH treated conditions. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, One-Way ANOVA followed by Dunnet *post-hoc* test (Number of cells analyzed, first generation—Control: 77, Cyc: 66, SHH: 86; second generation—Control: 55, Cyc: 51, SHH: 75; third generation—Control: 60, Cyc: 27, SHH: 59).

cycle length, we quantified the time spanned by proliferating cells in the second (between the first and second cell division), third (between the second and third cell division), and fourth (between the third and fourth cell division) generations (**Figure 5**). We observed that SHH treatment shortened the cell cycle in every generation, whereas cyclopamine did not affect cell cycle length (**Figure 5A**). These observations suggest that SHH signaling controls proliferation and differentiation of

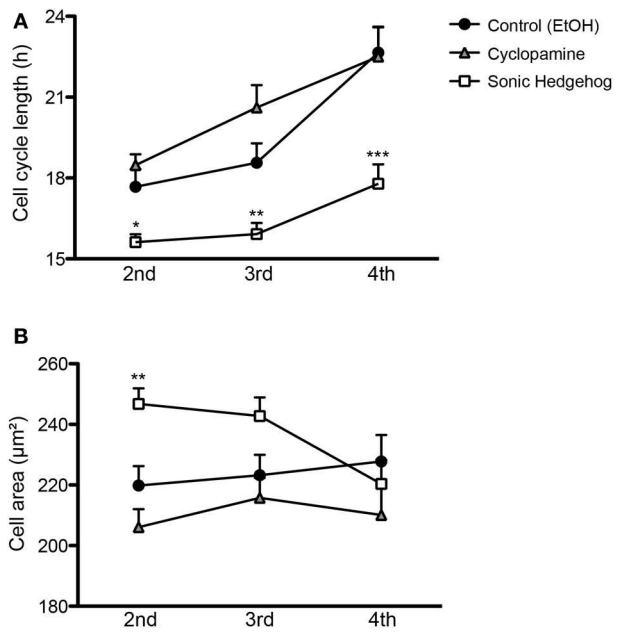

FIGURE 5 | SHH signaling influences cell cycle length and cell size of cortical progenitors. (A,B) Quantification of cell cycle length **(A)** and cell area prior to division **(B)** of cortical progenitors in the second, third and fourth generations. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, One-Way ANOVA followed by Dunnet *post-hoc* test (Number of cells analyzed, second generation—Control: 55, Cyc: 51, SHH: 75; third generation—Control: 60, Cyc: 27, SHH: 59; fourth generation—Control: 40, Cyc: 19, SHH: 157).

cortical progenitors by regulating the expression of cell cycle molecules.

Alternatively, cell cycle length could indirectly affect the fate of newly generated cells by interfering with cell growth, which has been related to the proliferative capacity of adult neural stem cells (Costa et al., 2011). To rule out the possibility that a shorter cell cycle could lead to a smaller cell volume prior to cell division, we measured the size of progenitor cells 10 min before cell division. We observed that SHH increased cell size only in the second progenitor generation (**Figure 5B**), an effect contrary to the idea that a longer cell cycle would lead to larger cells. These observations suggest that changes in cell cycle length and cell area induced by SHH are not directly correlated.

Next, we analyzed the effects of SHH signaling on cell cycle length and cell area of progenitors undergoing different types of cell divisions (**Figure 6**). Interestingly, we observed that the cell cycle length varied specifically among progenitors undergoing SP cell divisions (**Figure 6A**), suggesting that the capacity to continue proliferating may be directly affected by cell cycle length. Similarly, cell area of SP progenitors was also affected by treatments (**Figure 6D**). Contrary to the cell cycle, however, we also observed changes in the cell area of ST progenitors (**Figure 6F**). For both parameters, no changes were observed among As progenitors (**Figures 6B,E**). Taken together, these data suggest that SHH effects on the mode of cell division of cortical progenitors could be related to cell cycle length and cell growth control.

CHANGES IN CELL CYCLE LENGTH AND CELL SIZE ARE RELATED TO THE MODE OF CELL DIVISION

It has recently been shown that cell fate is tightly associated with the cell-cycle machinery and that the capacity of differentiation of stem cells varies during their cell cycle (Pauklin and Vallier, 2013). To test whether cell cycle length could predict a specific mode of cell division, we next compared changes in cell cycle length among progenitors cells undergoing SP, As, or ST cell divisions (**Figure 7**). In controls, we found that cell cycle length of cells undergoing ST was significantly longer than that of cells undergoing SP cell divisions (**Figure 7A**). In cyclopamine treated cultures, this difference was abolished (**Figure 7B**), whereas in SHH treated cultures cell cycle length of SP, As, and ST cell divisions were significantly different (**Figure 7C**). In contrast, only in cultures treated with SHH we could observe a significant difference between the size of progenitors undergoing SP vs. ST cell division (**Figure 7F**). These data suggest that cell cycle length is a positive predictor of the mode of cell division and may be indirectly responsible for the effects of SHH signaling on the proliferation of cortical progenitors, contributing to control the number of cells in the cerebral cortex.

INHIBITION OF SHH SIGNALING INCREASES CELL DEATH

Cellular survival is another important mechanism controlling cell number during cerebral cortex development (Blaschke et al., 1996; Thomaidou et al., 1997). In order to evaluate the influence of SHH signaling on cortical cell death, we quantified the cumulative survival of cells within individual cell lineages (**Figure 8**). We found that SHH significantly increased cell survival after 36 h *in vitro*, and this effect persisted up to 84 h (**Figure 8A**). Conversely, blockade of SHH signaling by cyclopamine led to a significant decrease of cell survival at 84 h, with no detectable effects at earlier time points (**Figure 8A**).

We also noticed a substantial amount of neuronal (Tau-GFP) cell death in cyclopamine treated cultures compared to SHH and control (**Movies 1–3**). To quantify this effect, we divided the total number of GFP-expressing neurons undergoing cell death by the number of cells dying within individual cell lineages. In fact, we found that half of the cells suffering cell death in cyclopamine treated cultures were neurons (**Figure 8B**). Moreover, we observed a significant effect of SHH on neuronal survival, reducing about 6-fold the percentage of neurons suffering cell death.

Taken together, our data indicate that augmented SHH signaling positively affects proliferation and survival, whereas SHH blockade induces cell differentiation and reduces cell survival of both neurons and cortical progenitors. These lead to a remarkable effect on the number of cells generated by individual cortical progenitors (**Figure 8C**), especially after 48 h of culture when the effects of cyclopamine on proliferation (**Figures 3**, **4**) and survival (**Figure 8A**) become more prominent.

DISCUSSION

In this *in vitro* work, we have unraveled a potential new role for SHH in the developing forebrain. Besides its well-known functions in midline formation, patterning of ventral telencephalon and specification of GABAergic interneurons (Tole et al., 2000;

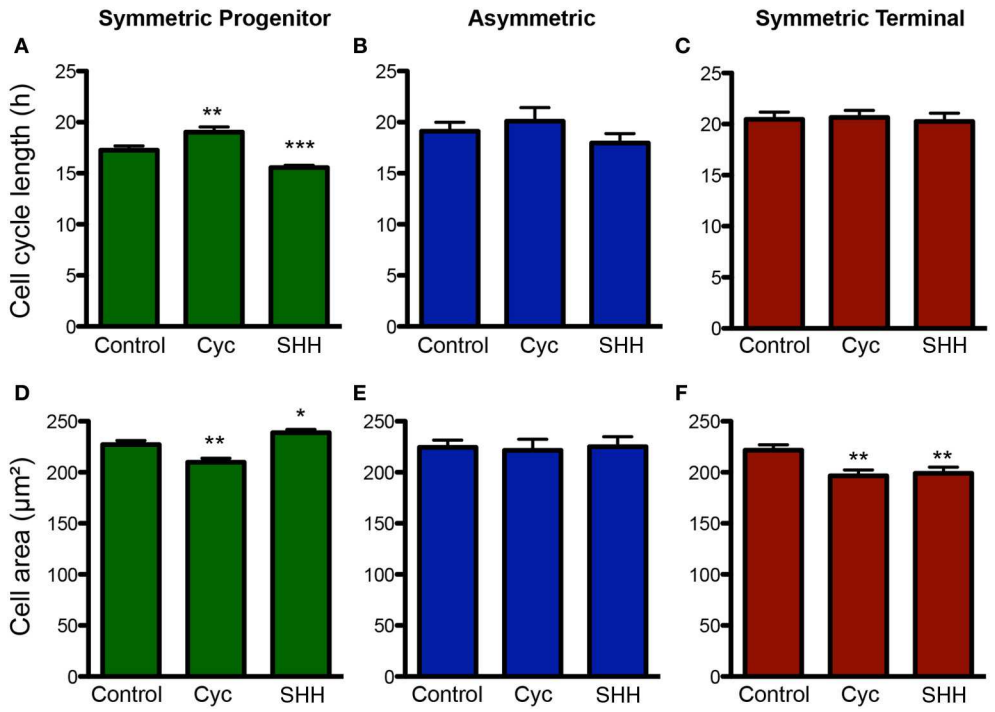

FIGURE 6 | Changes in cell cycle length and cell size are more pronounced among SP progenitors. (A–C) Quantification of cell cycle length for progenitors undergoing SP **(A)**, As **(B)** or ST **(C)** cell divisions upon control, cyclopamine or SHH treatments. **(D–F)** Quantification of cell area for progenitors undergoing SP **(D)**, As **(E),** or ST **(F)** cell division. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, One-Way ANOVA followed by Dunnet *post-hoc* test (Number of cells analyzed, SP control: 123, SP cyc: 100, SP SHH: 224; As control: 38, As cyc: 18, As SHH: 21; ST Control: 95, ST cyc: 60, ST SHH: 45).

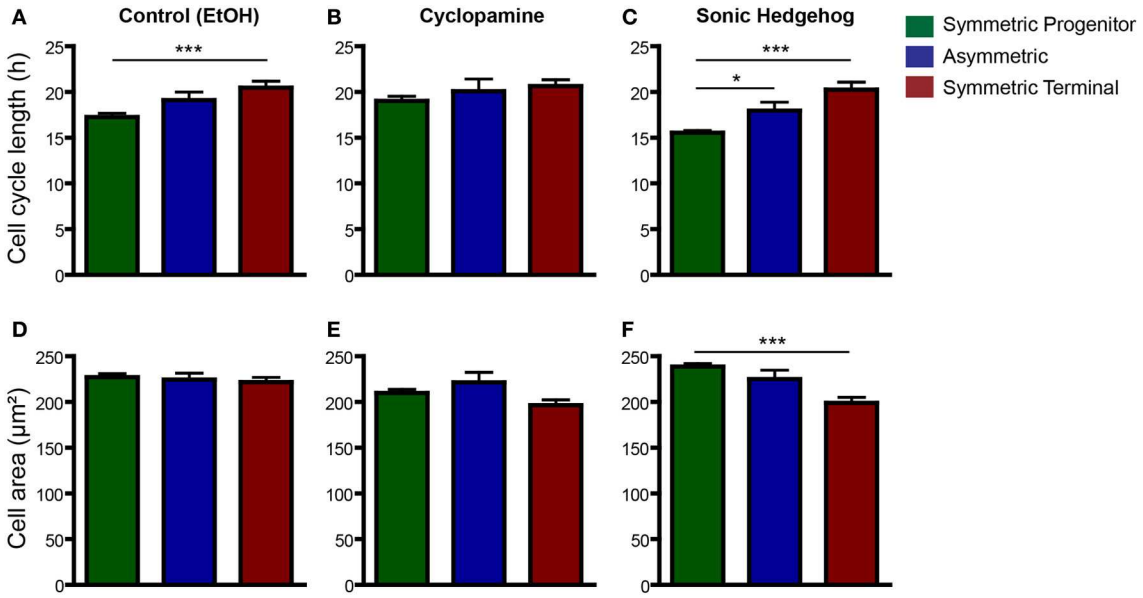

FIGURE 7 | Cell cycle length is a good predictor for SP and ST cell division. (A–C) Same data as in **Figure 6**, but with plots rearranged to allow comparisons across division modes—control **(A)**, cyclopamine **(B)**, or SHH **(C)** treated cell cultures. Observe that cell cycle of ST progenitors is significantly longer than SP progenitors in control conditions **(A)**. This difference is also observed in SHH treated cultures **(C)**, but not upon cyclopamine treatment **(B)**. **(D–F)** Quantification of cell area of SP, As or ST progenitors in control **(D)**, cyclopamine **(E)**, or SHH **(F)** treated cell cultures. $^{*}p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$, One-Way ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test (Number of cells analyzed, SP control: 123, SP cyc: 100, SP SHH: 224; As control: 38, As cyc: 18, As SHH: 21; ST Control: 95, ST cyc: 60, ST SHH: 45).

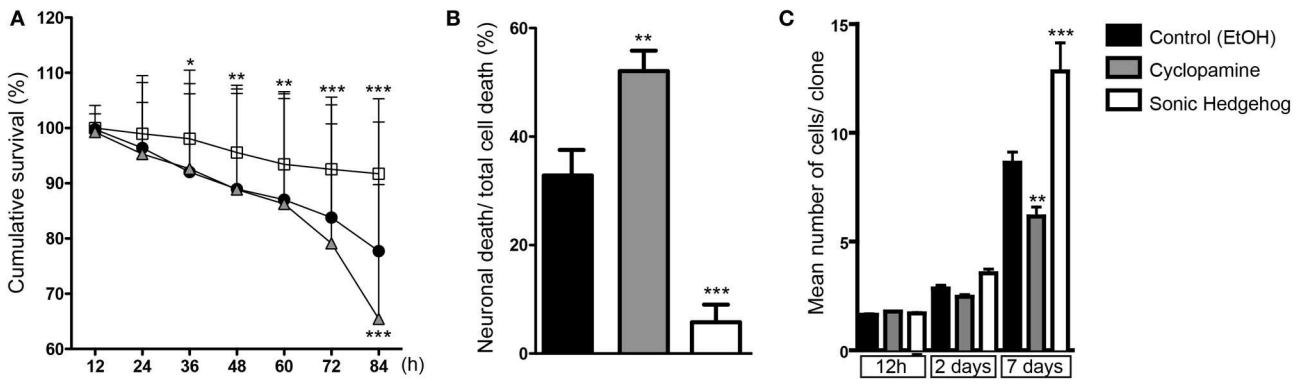

FIGURE 8 | SHH improves survival of cortical cells. (A) Cumulative cell survival of cortical cells in cultures treated with cyclopamine (gray triangles), SHH (white squares), and control (black circles). Note that SHH increases cell survival at early time-points, whereas cyclopamine decreases cell survival at 84 h. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ (row factor), Two-Way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test, number of clones analyzed, control: 137, cyc: 125, SHH: 182. **(B)** Quantification of the percentage of neuronal death among total cell death within lineages ($^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, One-Way ANOVA followed by Dunnet *post-hoc* test). **(C)** Quantification of the mean number of cells generated from a single progenitor, e.g., clones, after 12 h, 2 and 7 days *in vitro* ($n = 3$ independent experiments; $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, One-Way ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test).

Xu et al., 2005, 2010; Rash and Grove, 2007), here we showed that SHH signaling controls progenitor cell proliferation, cell survival and generation of glial progenitors/astrocytes in cells isolated from the dorsal telencephalon at early corticogenesis and grown *in vitro*. Moreover, we described a strong correlation between SHH effects on cell cycle length and cellular growth and the mode of cell division, which could help understanding the molecular mechanisms regulating proliferation and differentiation in the developing nervous system.

Expression of SHH and its target genes in the dorsal telencephalon has been previously reported. Yet, studies about the functions of SHH signaling in this region have mostly concentrated at mid to late-corticogenesis (Dahmane et al., 2001; Machold et al., 2003; Palma and Ruiz i Altaba, 2004; Ahn and Joyner, 2005; Palma et al., 2005). Recently, it has been shown that conditional genetic deletion of SHH or its receptor SMO in dorsal telencephalic progenitors at early corticogenesis (around E10.5 using Emx1-Cre) leads to a reduction in the brain size, possibly caused by changes in cell proliferation and cell death in the dorsal telencephalon of conditional SHH and SMO knockouts (Komada et al., 2008). Our present results shed new light on the cellular mechanisms responsible for the effects of SHH signaling on the control of cell number in the developing cerebral cortex.

Similarly to previous work (Palma et al., 2005; Komada et al., 2008), we observed a reduction in cell proliferation after decreasing SHH activity with cyclopamine. Moreover, we showed that this effect was a consequence of a longer cell cycle, increased symmetric terminal divisions and augmented cell death. The finding that cyclopamine did not affect the number of neurons generated *in vitro*, but did affect the generation of GFAP-expressing cells indicates that SHH signaling is important to keep the progenitor pool that will become gliogenic at late corticogenesis (Costa et al., 2009). Alternatively, cyclopamine treatment could be directly interfering with specification of glial progenitors.

In an opposite direction, exposure to SHH led to a dramatic increase in proliferation and, consequently, in cell numbers. Notably, however, this increase in cell number was not caused by an enhanced generation of neurons, but was rather accompanied by an increase in the number of Ki67- and GFAP-expressing cells. This result indicates that SHH is acting to keep cells in a proliferative state and toward increasing gliogenesis. In fact, SHH signaling is involved in the generation of oligodendrocytes in the ventral telencephalon of mice (Tekki-Kessaris et al., 2001) and oligodendrocyte progenitors (OPCs) in the human embryonic brain (Ortega et al., 2013). However, our results indicate that SHH signaling may also be important for the generation of astrocytes in the cerebral cortex. Future experiments should address this possibility *in vivo*.

Our findings *in vitro* are also in accordance with previous results *in vivo* indicating that cell cycle length of cortical progenitors is an important predictor of cell fate (Calegari et al., 2005; Lange et al., 2009; Attardo et al., 2010; Arai et al., 2011). In fact, it has been shown that cortical progenitors with longer cell cycle are more likely to give rise to post-mitotic neurons after division (Arai et al., 2011). Therefore, the effects of SHH and cyclopamine treatments on cell cycle could be indirectly affecting the outcome of cell division of cortical progenitors observed here.

SHH signaling is a well-known regulator of cell cycle through transcriptional regulation of genes directly involved in cell proliferation, such as cyclin D1 and D2, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and N-myc (Oliver et al., 2003). In addition, it has recently been shown that SHH induces transactivation of the epidermal-growth factor receptor (EGFR) and facilitates mitogenic signaling via the ERK1/2 pathway (Reinchisi et al., 2013). Changes in cell size upon SHH or cyclopamine treatment could also affect mitogenic activity by altering protein phosphorylation levels (Meyers et al., 2006). Thus, the changes in cell cycle described here are in accordance with established functions of SHH.

An important novelty of our study, however, is the observation that cell cycle length may be a predictor for the mode of cell division. In fact, we showed that cortical progenitors dividing

symmetrically to generate two progenitors have a shorter cell cycle than cells dividing symmetrically to generate two post mitotic cells under control conditions. Upon cyclopamine treatment, the cell cycle length of ST, As, or SP progenitors were virtually equal and cortical progenitors were not capable of progressing from a high SP stage (first and second generation) to a high ST stage (third generation). Conversely, treatment with SHH kept cortical progenitors in a high SP state, but due to a shorter cell cycle. Interestingly, this effect on cell cycle length was particularly evident among SP progenitors, suggesting that SHH signaling is an important mechanism to control the proliferative state of cortical progenitors.

SHH signaling is also implicated in cell survival (Komada et al., 2008; Reinchisi et al., 2013). Indeed, we showed that SHH improves while cyclopamine decreases the survival of cells. Interestingly, increased cell death in cyclopamine treated cultures was evident after 72 h, when many progenitors have already lost neurogenic potential and became gliogenic (Costa et al., 2009). Together with the absence of effect in neurogenesis showed by clonal analysis, these data *in vitro* suggest that SHH signaling regulates generation and/or survival of glia-restricted progenitors in the developing cerebral cortex.

Collectively, our results indicate that SHH signaling plays important roles in the control of cell cycle, cell growth, and mode of cell division of dorsal telencephalic progenitors at early corticogenesis, thus likely contributing to the intricate balance between proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. Together with SHH effects on astrogliogenesis, neuronal and progenitor cell survival, our data reveal new functions for this multipurpose morphogen.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fncel.2014.00077/abstract

Movie 1 | Control treatment. E13 Tau-GFP (green) cortical cells treated with ethanol and infected with retroviruses carrying the gene for the red fluorescent protein (RFP). Increased number of RFP reflects mitotic activity in the culture, whereas Tau-GFP expression reveals neuronal differentiation.

Movie 2 | Cyclopamine treatment. E13 Tau-GFP cortical cells treated with cyclopamine and infected with retroviruses carrying the gene for RFP. Note the discrete increase in numbers of RFP and Tau-GFP cells as compared to control (**Movie 1**). Note also the important decrease in the number of Tau-GFP cells after day 3, due to cell death.

Movie 3 | Sonic Hedgehog treatment. E13 Tau-GFP cortical cells treated with SHH and infected with retroviruses carrying the gene for RFP. Note the massive increase in numbers of RFP cells as compared to control (**Movie 1**). Notice also the slight decrease in the number of Tau-GFP cells after day 3.

REFERENCES

Ahn, S., and Joyner, A. L. (2005). *In vivo* analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437, 894–897. doi: 10.1038/nature03994

Arai, Y., Pulvers, J. N., Haffner, C., Schilling, B., Nusslein, I., Calegari, F., et al. (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat. Commun.* 2, 154. doi: 10.1038/ncomms1155

Attardo, A., Fabel, K., Krebs, J., Haubensak, W., Huttner, W. B., and Kempermann, G. (2010). Tis21 expression marks not only populations of neurogenic precursor cells but also new postmitotic neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cereb. Cortex* 20, 304–314. doi: 10.1093/cercor/bhp100

Blaschke, A. J., Staley, K., and Chun, J. (1996). Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* 122, 1165–1174.

Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M., and Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435–445. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80853-3

Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., and Huttner, W. B. (2005). Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J. Neurosci.* 25, 6533–6538. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0778-05.2005

Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K., and Beachy, P. A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 16, 2743–2748. doi: 10.1101/gad.1025302

Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., et al. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407–413. doi: 10.1038/383407a0

Costa, M. R., Bucholz, O., Schroeder, T., and Gotz, M. (2009). Late origin of glia-restricted progenitors in the developing mouse cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 19(Suppl. 1), i135–i143. doi: 10.1093/cercor/bhp046

Costa, M. R., Ortega, F., Brill, M. S., Beckervordersandforth, R., Petrone, C., Schroeder, T., et al. (2011). Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression *in vitro*. *Development* 138, 1057–1068. doi: 10.1242/dev.061663

Costa, M. R., Wen, G., Lepier, A., Schroeder, T., and Gotz, M. (2008). Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex. *Development* 135, 11–22. doi: 10.1242/dev.009951

Dahmane, N., Sanchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., et al. (2001). The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 128, 5201–5212.

Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., et al. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417–1430. doi: 10.1016/0092-8674(93)90627-3

Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T. M., and Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81, 747–756. doi: 10.1016/0092-8674(95)90536-7

Han, Y. G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J. M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S., et al. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 11, 277–284. doi: 10.1038/nn2059

Ingham, P. W., and McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15, 3059–3087. doi: 10.1101/gad.938601

Komada, M., Saitsu, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., and Ishibashi, M. (2008). Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development* 135, 2717–2727. doi: 10.1242/dev.015891

Lange, C., Huttner, W. B., and Calegari, F. (2009). Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* 5, 320–331. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.026

Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., et al. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39, 937–950. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00561-0

Meyers, J., Craig, J., and Odde, D. J. (2006). Potential for control of signaling pathways via cell size and shape. *Curr. Biol.* 16, 1685–1693. doi: 10.1016/j.cub.2006.07.056

Oliver, T. G., Grasfeder, L. L., Carroll, A. L., Kaiser, C., Gillingham, C. L., Lin, S. M., et al. (2003). Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7331–7336. doi: 10.1073/pnas.0832317100

Ortega, J. A., Radonjic, N. V., and Zecevic, N. (2013). Sonic hedgehog promotes generation and maintenance of human forebrain Olig2 progenitors. *Front. Cell Neurosci.* 7:254. doi: 10.3389/fncel.2013.00254

Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., et al. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132, 335–344. doi: 10.1242/dev.01567

Palma, V., and Ruiz i Altaba, A. (2004). Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* 131, 337–345. doi: 10.1242/dev.00930

Pauklin, S., and Vallier, L. (2013). The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity. *Cell* 155, 135–147. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.031

Price, J., Turner, D., and Cepko, C. (1987). Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 156–160. doi: 10.1073/pnas.84.1.156

Rash, B. G., and Grove, E. A. (2007). Patterning the dorsal telencephalon: a role for sonic hedgehog? *J. Neurosci*. 27, 11595–11603. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3204-07.2007

Reinchisi, G., Parada, M., Lois, P., Oyanadel, C., Shaughnessy, R., Gonzalez, A., et al. (2013). Sonic Hedgehog modulates EGFR dependent proliferation of neural stem cells during late mouse embryogenesis through EGFR transactivation. *Front. Cell Neurosci*. 7:166. doi: 10.3389/fncel.2013.00166

Rieger, M. A., Hoppe, P. S., Smejkal, B. M., Eitelhuber, A. C., and Schroeder, T. (2009). Hematopoietic cytokines can instruct lineage choice. *Science* 325, 217–218. doi: 10.1126/science.1171461

Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A., et al. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445–455. doi: 10.1016/0092-8674(95)90397-6

Rowitch, D. H., S-Jacques, B., Lee, S. M., Flax, J. D., Snyder, E. Y., and McMahon, A. P. (1999). Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J. Neurosci*. 19, 8954–8965.

Tekki-Kessaris, N., Woodruff, R., Hall, A. C., Gaffield, W., Kimura, S., Stiles, C. D., et al. (2001). Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* 128, 2545–2554.

Thomaidou, D., Mione, M. C., Cavanagh, J. F., and Parnavelas, J. G. (1997). Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci*. 17, 1075–1085.

Tole, S., Ragsdale, C. W., and Grove, E. A. (2000). Dorsoventral patterning of the telencephalon is disrupted in the mouse mutant extra-toes(J). *Dev. Biol*. 217, 254–265. doi: 10.1006/dbio.1999.9509

Tucker, K. L., Meyer, M., and Barde, Y. A. (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat. Neurosci*. 4, 29–37. doi: 10.1038/82868

Xu, Q., Guo, L., Moore, H., Waclaw, R. R., Campbell, K., and Anderson, S. A. (2010). Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with distinct cortical interneuron fates. *Neuron* 65, 328–340. doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.004

Xu, Q., Wonders, C. P., and Anderson, S. A. (2005). Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon. *Development* 132, 4987–4998. doi: 10.1242/dev.02090

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 24 December 2013; accepted: 21 February 2014; published online: 11 March 2014.

Citation: Araújo GLL, Araújo JAM, Schroeder T, Tort ABL and Costa MR (2014) Sonic hedgehog signaling regulates mode of cell division of early cerebral cortex progenitors and increases astrogliogenesis. Front. Cell. Neurosci. ***8****:77. doi: 10.3389/fncel.2014.00077*

This article was submitted to the journal Frontiers in Cellular Neuroscience.

Copyright © 2014 Araújo, Araújo, Schroeder, Tort and Costa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.