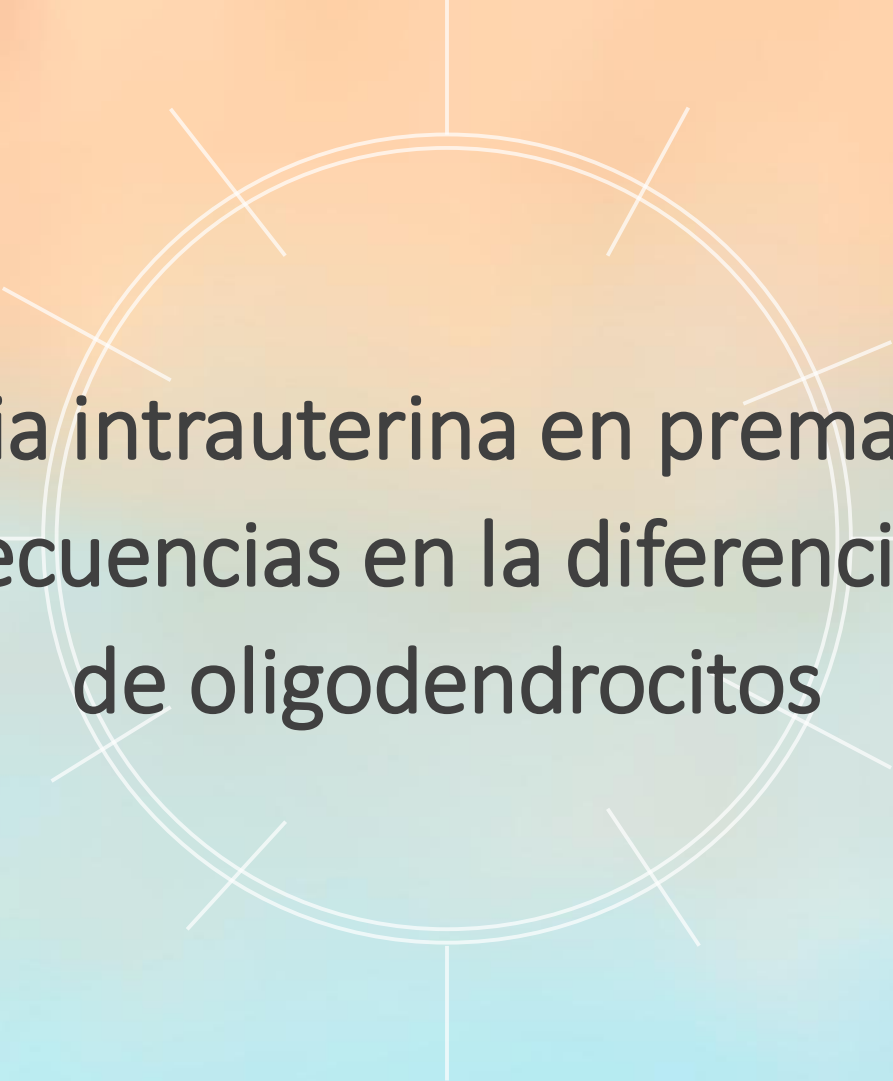
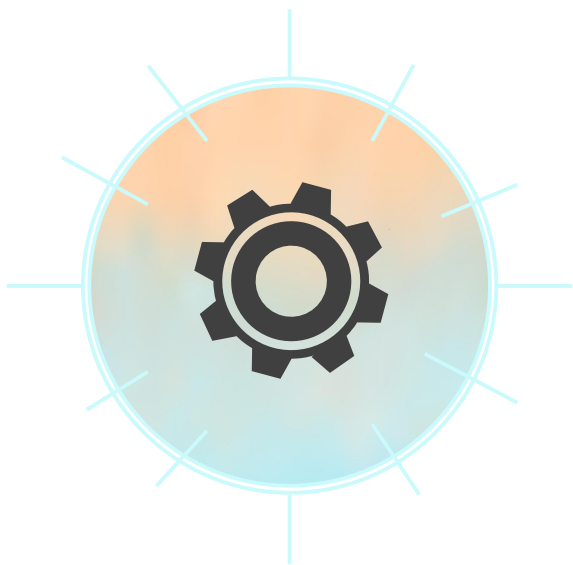




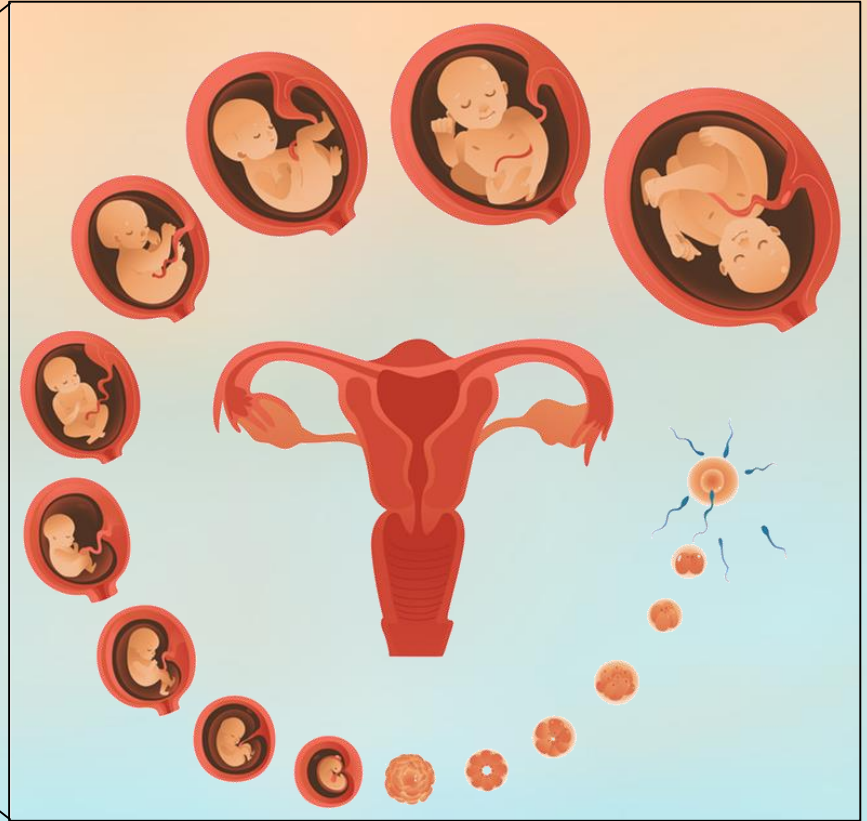
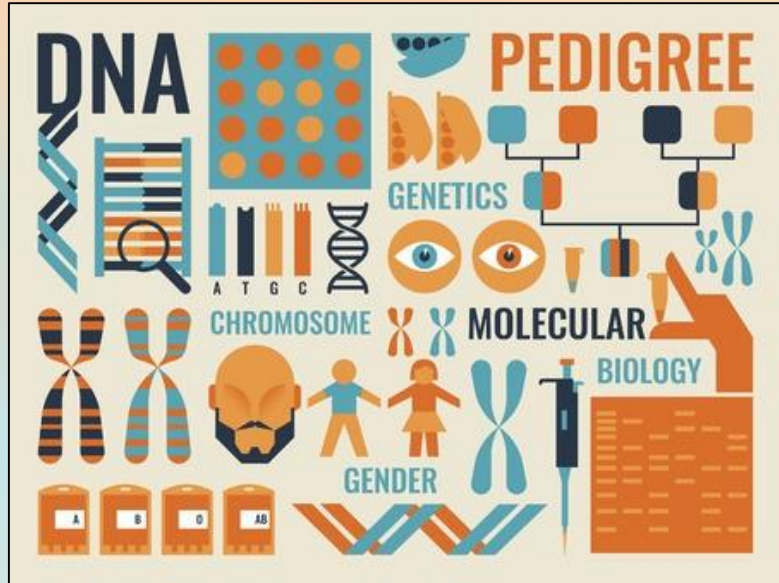
Hipoxia intrauterina en prematuros: consecuencias en la diferenciación de oligodendrocitos

Cornejo, Anyelén
Lede, Miranda
Sánchez, Paula
Verleene, Fantine
Zabaleta, Florencia



1. Introducción

Genética del desarrollo





Organización
Mundial de la Salud



15.000.000

Nacimientos prematuros por año

36 semanas

Edad gestacional

1 de cada 10

Bebés prematuros



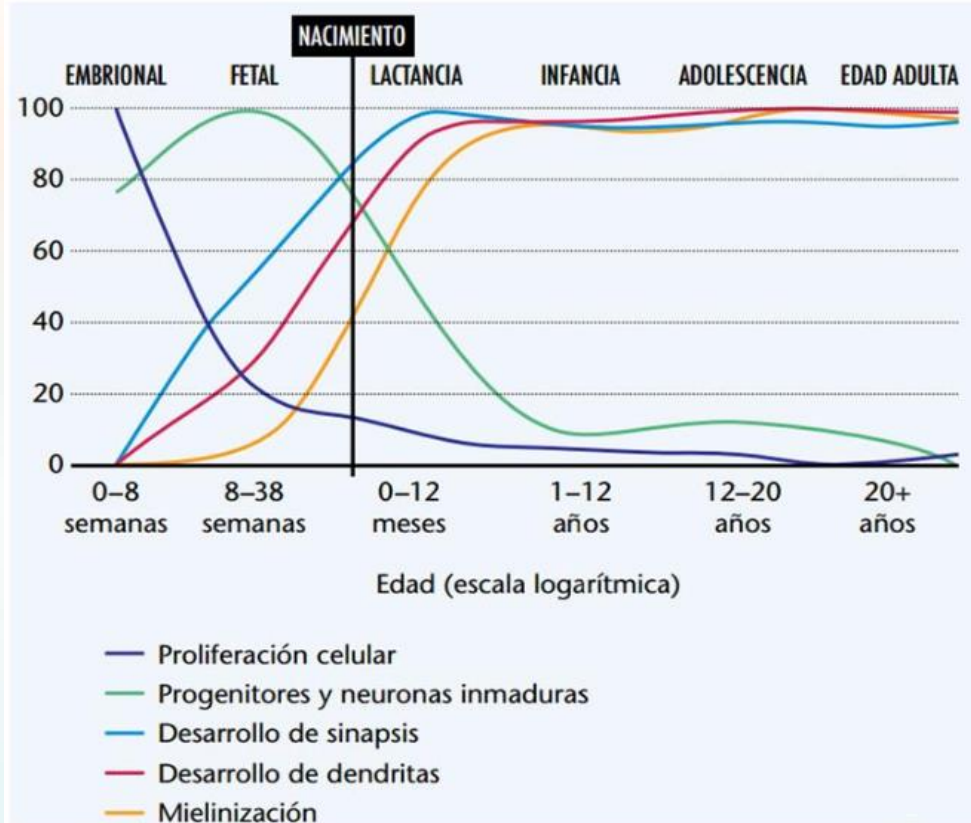
- Dificultades en el aprendizaje, problemas visuales y auditivos.
- Alteraciones neuropsicológicas.
- Déficit de atención, trastornos aritméticos académicos

Desarrollo del SN se lleva a cabo a través de eventos coordinados con precisión en el tiempo y espacio



Sistema nervioso de un prematuro es diferente al de un nacido a término

Desarrollo del Sistema Nervioso



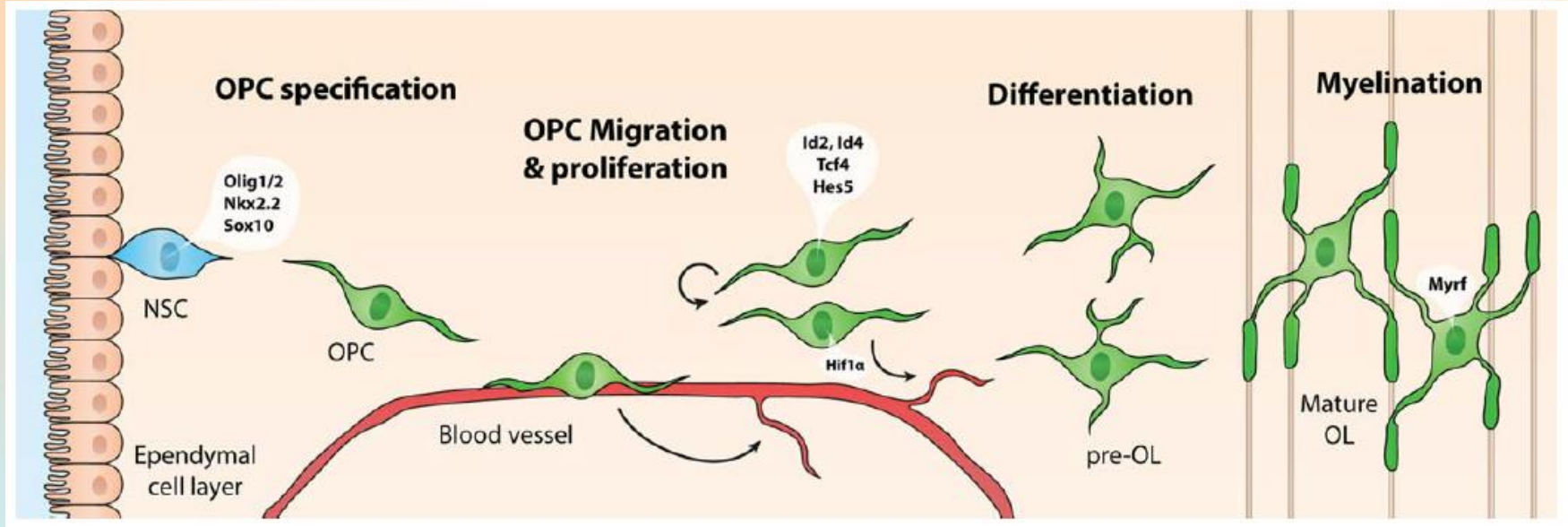
Desarrollo de Oligodendrocitos

- Ocurre en la **Zona Subventricular (ZSV)** del SNC de vertebrados.
- Durante el periodo prenatal.
- Consiste en 4 etapas.
- Es importante porque son las células formadoras de **mielina**.



Imagen: ZSV en embrión de ratón.
Popp et al. (2009)

Etapas del desarrollo de oligodendrocitos



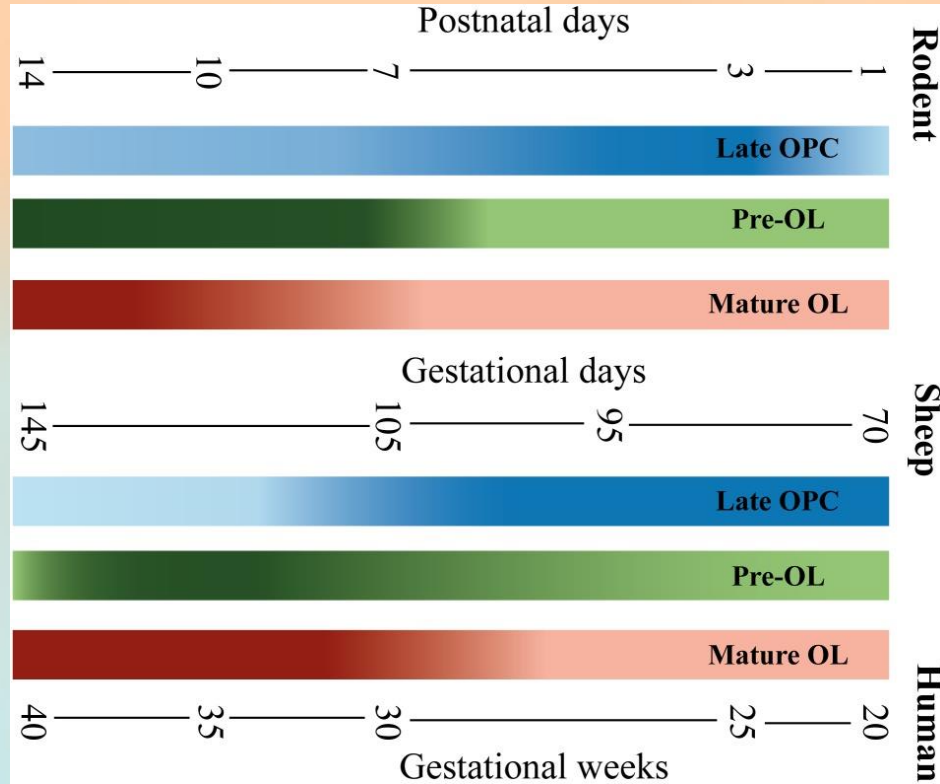
van Tilborg *et al.* (2017)

OPC: Células precursoras de oligodendrocitos.

Pre-OL: oligodendrocitos inmaduros pre-mielinizantes.

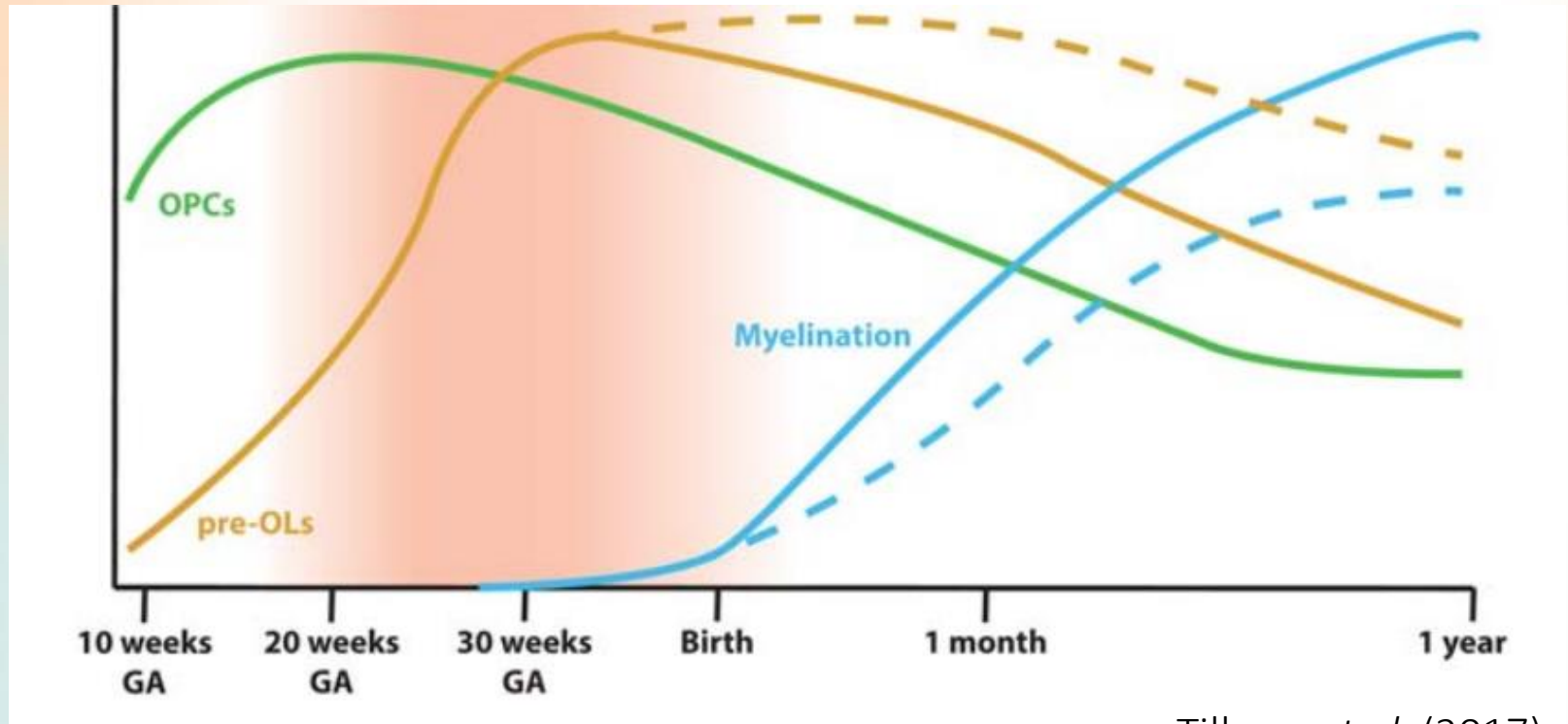
OL: oligodendrocitos maduros.

Patrón temporal del desarrollo de oligodendrocitos



Vaes, J. E. *et al.* (2019)

Progresión del desarrollo de OPC, pre-OL y mielinización en humanos



van Tilborg *et al.* (2017)

Concentración de O_2 in utero: 25-30 mmHg
Concentración de O_2 despues del parto
premature: 50-60 mmHg
(Soothil *et al.* 1986)



“El entorno intrauterino es hipóxico”
(Soothil *et al.* 1986)



Estrés oxidativo



OPC

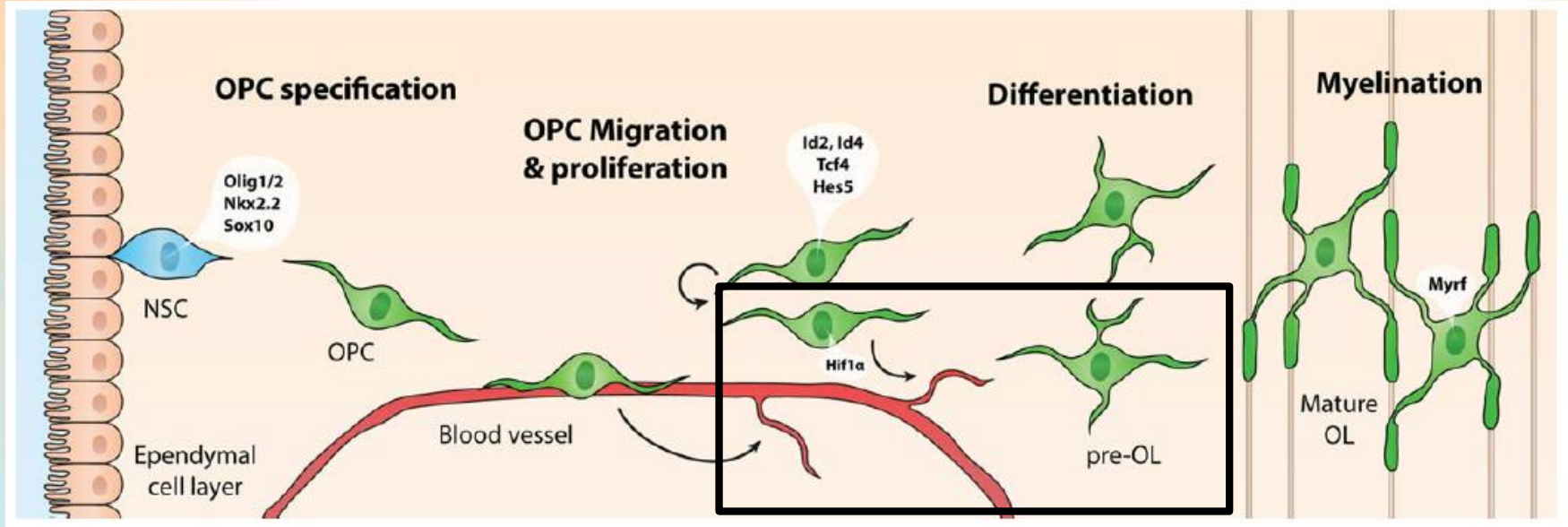


Sensibles al daño oxidativo. Carecen de enzimas antioxidantes (Vaes *et al.* 2019)

La producción de radicales libres supera la capacidad de las enzimas de defensa antioxidantes (Perrone *et al.* 2013)

Las células responden a su microambiente hipóxico estimulando varios factores inducibles por la hipoxia (Simon 2008)

Etapas del desarrollo de oligodendrocitos



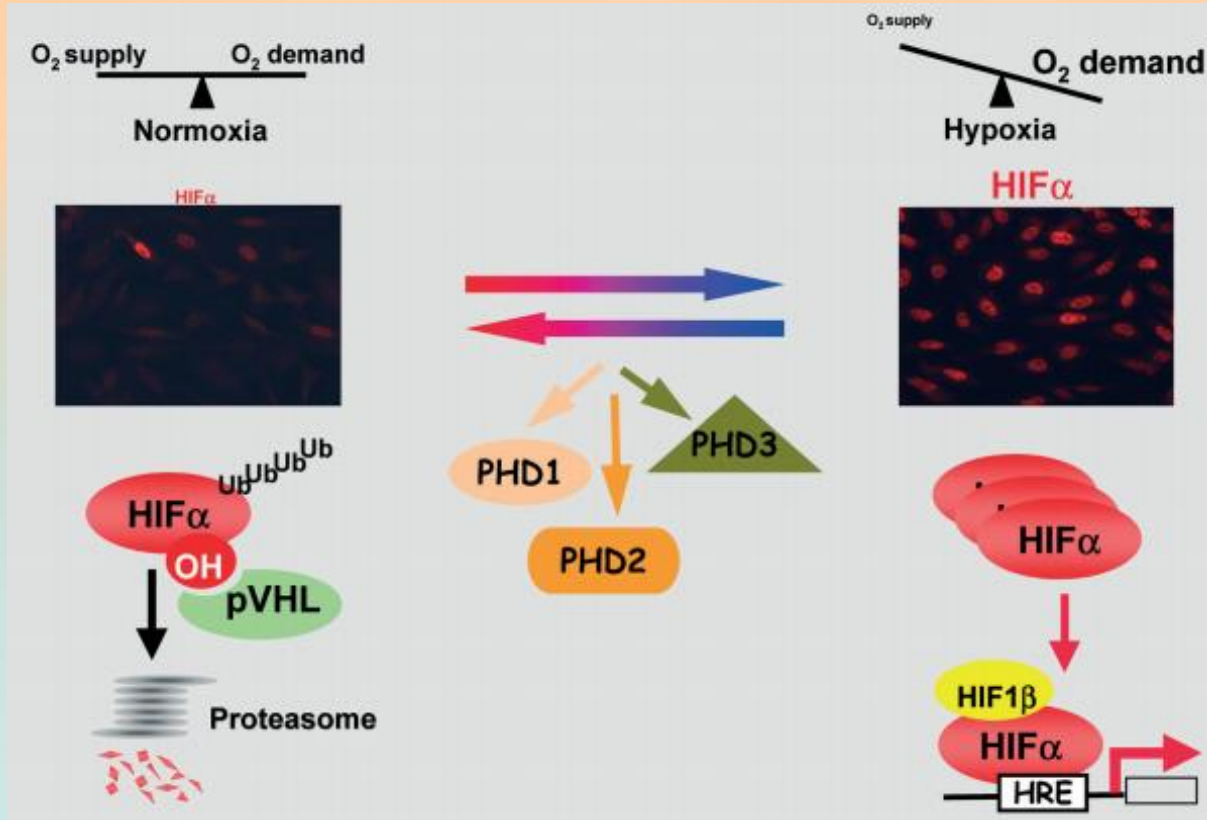
van Tilborg *et al.* (2017)

OPC: Células precursoras de oligodendrocitos.

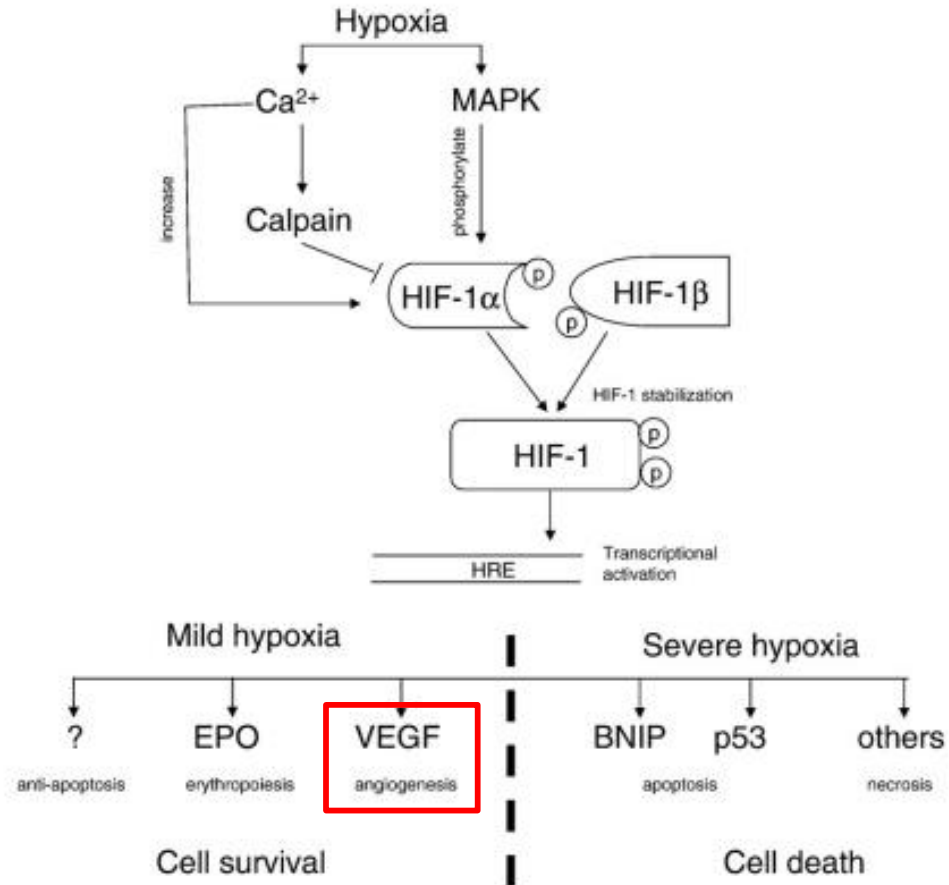
Pre-OL: oligodendrocitos inmaduros pre-mielinizantes.

OL: oligodendrocitos maduros.

HIF1



(Benzrini *et al.* 2008)



(Wiyong *et al.* 2009)

VEGFB

Hipoxia



HIF1A



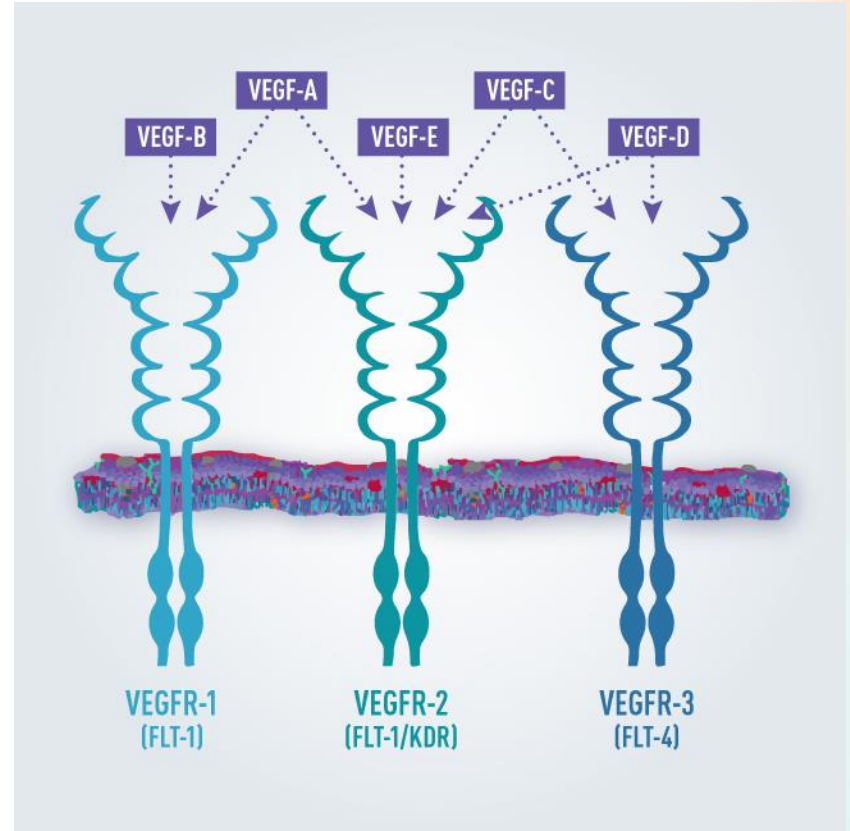
Familia de factores VEGF



Reclutan células endoteliales en áreas avasculares

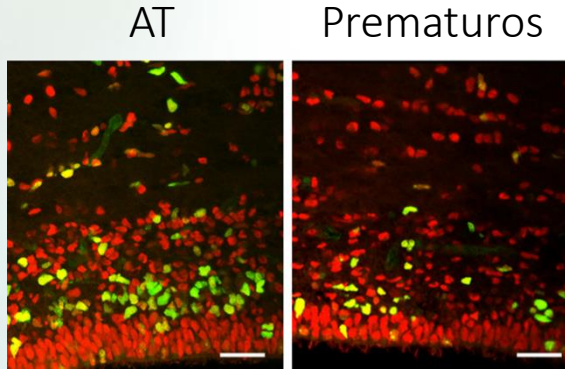


Angiogénesis

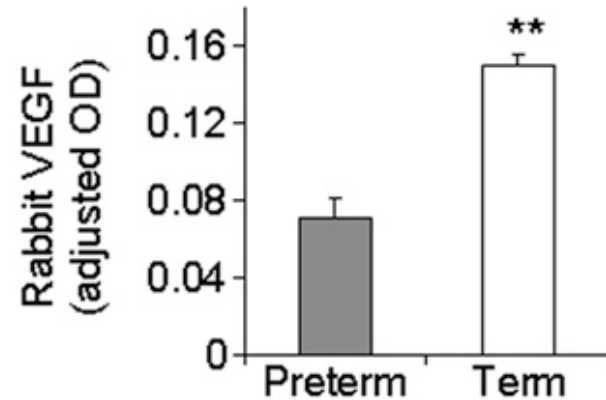


Antecedente: Malik *et al.* 2013

- Estudios en prematuros el parto prematuro suprimiría la neurogénesis.
- Importancia de las bajas concentraciones de O₂ para la neurogénesis.



Inmunofluorescencia de precursores neuronales





2. Nicho de interés

Pregunta:

¿Cómo afecta el nacimiento prematuro a la diferenciación de oligodendrocitos?

Hipótesis:

La interrupción de la hipoxia intrauterina en prematuros afecta la diferenciación de oligodendrocitos

Objetivos

1

Determinar que en fetos prematuros hay una menor proporción de pre-OL en comparación con fetos nacidos a término.

2

Determinar que la concentración de oxígeno en el tejido cerebral es menor en fetos prematuros que en fetos a término AT.

3

Determinar que el factor HIF1a a través de la señalización por factor VEGF, tiene un rol crucial en la diferenciación de OPC.

Muestras de estudio

Trabajaremos en el Centro Médico de Westchester (Valhalla, NY) con fetos de abortos espontáneos.

✓ Junta de Revisión Institucional del Colegio Médico de Nueva York = comité de ética



Máximo 18 horas postmortem



Grupo 1:
Fetos prematuros de 24 a 27 semanas de gestación



Grupo 2:
Fetos prematuros de 28 a 31 semanas de gestación



Grupo 3:
Fetos prematuros de 32 a 35 semanas de gestación



Grupo 4:
Fetos nacidos a termino - 36 a 40 semanas de gestación

5 individuos de cada grupo
X

10 secciones del tejido
neocortex de cada individuo



3. Diseño experimental

Experimento 1: Medida de la concentración de oxígeno cerebral de humanos, in vivo



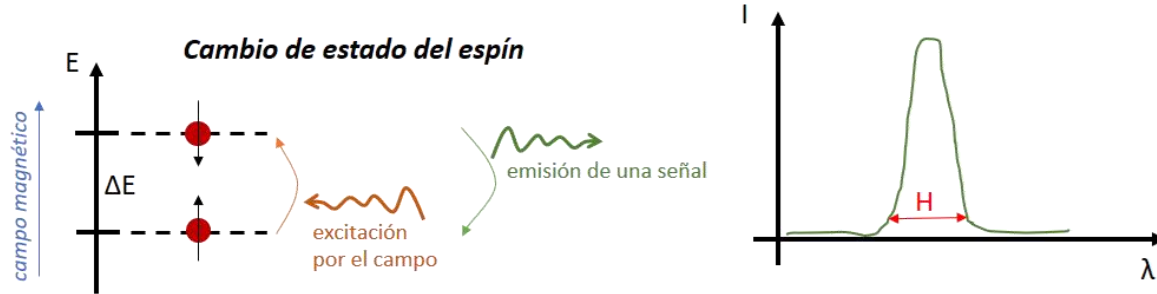
Porqué ?

Para averiguar que la concentración en oxígeno aumenta a lo largo de la gestación

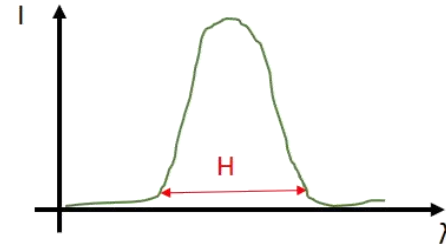


Como ?

Usando la espectrometría EPR (Resonancia Paramagnética Electronica) => Muy parecida a la RMN



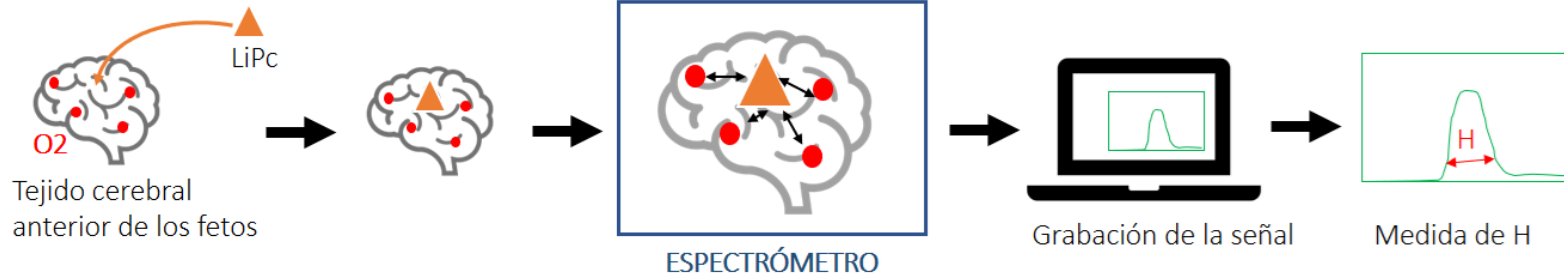
En presencia de oxígeno: interacción espín-espín que estabiliza la forma excitada y aumenta el tiempo de relajación y entonces el ancho del pico (H).



H aumenta

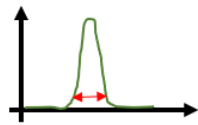


In vivo

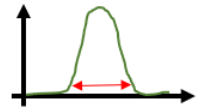


Control negativo:

Hacemos el experimento en un tejido de feto que ya no tiene más oxígeno (después mucho tiempo postmortem). Así tendremos la señal « pura » del espín de LiPc, y su H asociado = valor standard. Los otros valores serán relativos con respecto al valor de referencia, y se podrán comparar entre ellos.



menor H $\rightarrow$ menor interacción LiPc-oxígeno $\rightarrow$ menor concentración de O2 en el tejido



mayor H $\rightarrow$ mayor interacción LiPc-oxígeno $\rightarrow$ mayor concentración de O2 en el tejido



Experimento 2: “determinación de la proporción de OPC y pre-OL por inmunistoquímica”

Objetivo: “determinar que en fetos prematuros hay una menor proporción de pre-OL en comparación con fetos a término”

- Fijación y crioprotección de muestras.
- Análisis de muestras:

Cuantificación de
OPC y pre-OL

Ensayo Inmunistoquímico: anticuerpos
monoclonales O4 y O1

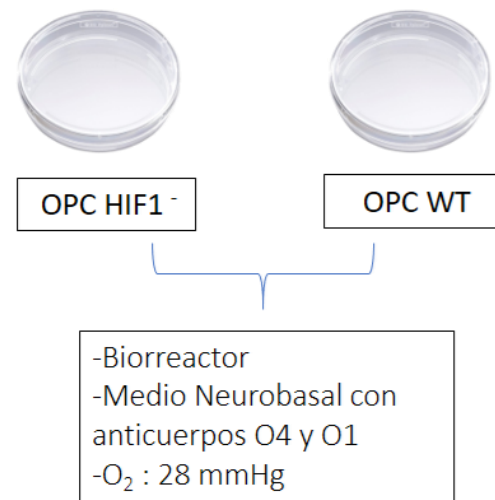
Análisis de expresión
de VEGFB

Westernblot: antihumano recombinante
humano VEGFB (Abnova Corporation) y
anti-humanoVEGFB conjugado con
peroxidasa de Horseradish.



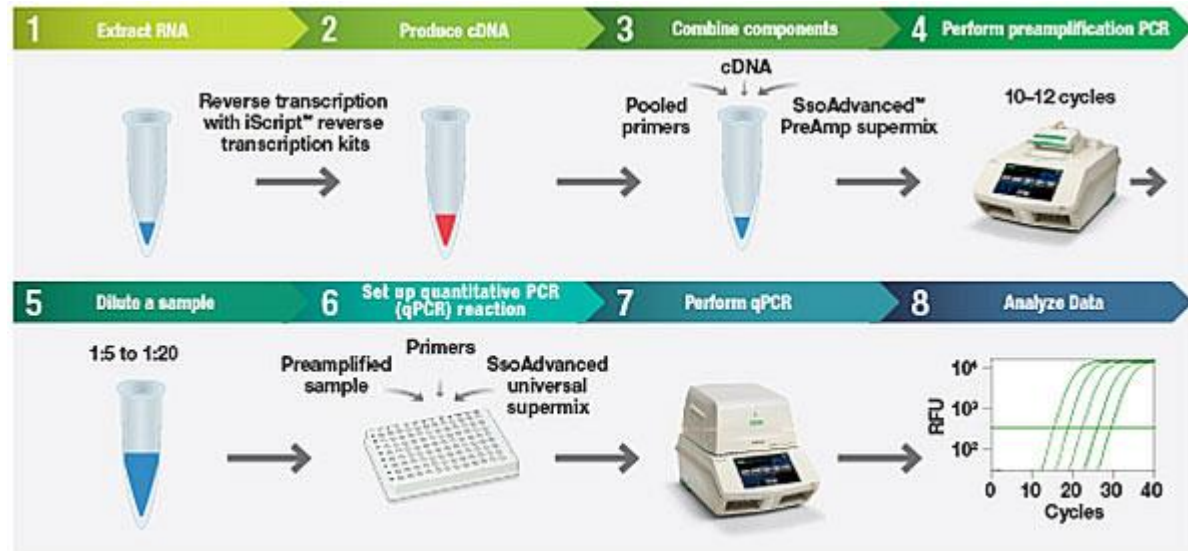
Experimento 3: “Determinar que el factor HIF1a, a través del factor VEGF tiene un rol crucial en la angiogénesis y la diferenciación de OPC”

- Se tomarán secciones de tejido cerebral de la Zona Subventricular y se aplicará el Protocolo de aislamiento de OPC formulado por (Chen et al., 2007).
- A una muestra de OPC se le silenciará la expresión de HIF1 a través de un siRNA.
- Se cultivará la muestra OPC silenciada (HIF1⁻) y la muestra OPC WT (que expresa HIF1) dentro de un biorreactor en condiciones de hipoxia intrauterina (concentración de O₂ de 25-30 mmHg (Soothil et al. 1986)).
- Análisis de las muestras:
 - Cuantificación por inmunohistoquímica
 - Western blot de la cantidad de VEGF expresado



qPCR: análisis de cuantificación de la expresión génica de VEGF.

- Procesamiento de OPCs diferenciados.

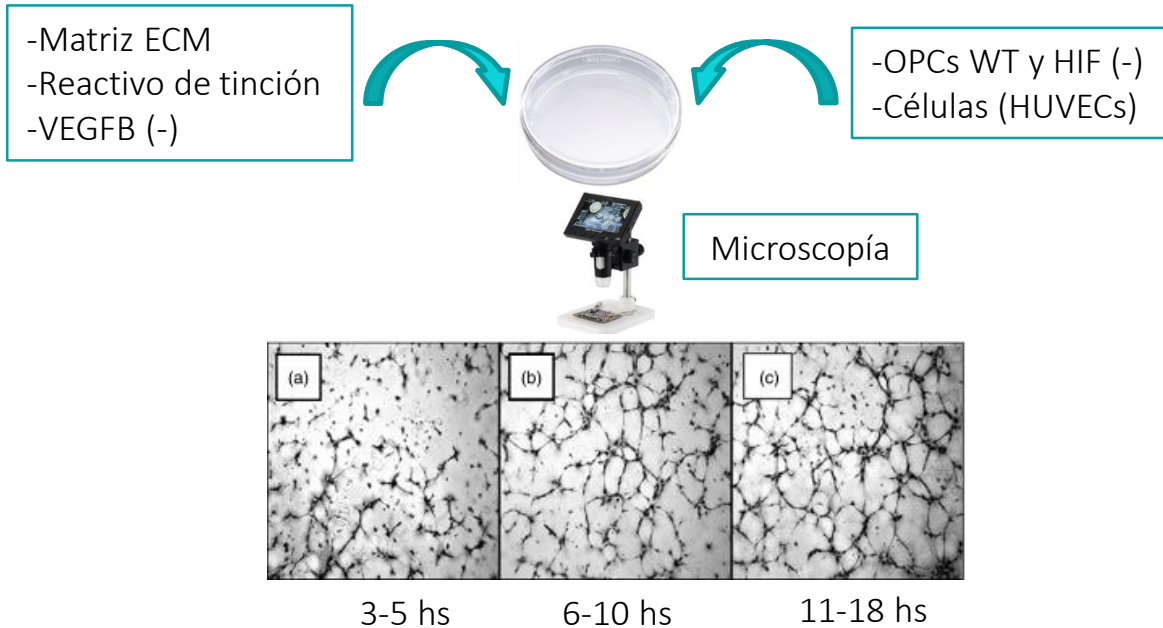


Preamplification workflow.



Ensayos *in vitro* de angiogénesis

- Variable fenotípica.
- Kit Innoprot® de ensayo de formación de tubos.



Experimento 4:



- **Base de datos** pública que contiene datos de transcriptomas y metadatos asociados para el cerebro humano en desarrollo y adulto.
- Transcriptomas de más de 1,340 muestras de tejido muestreadas de cerebros humanos **postmortem**.
- Se tomaron muestras de un total de **16 regiones cerebrales**.



Experimento 4:



Gene Search



Basic search

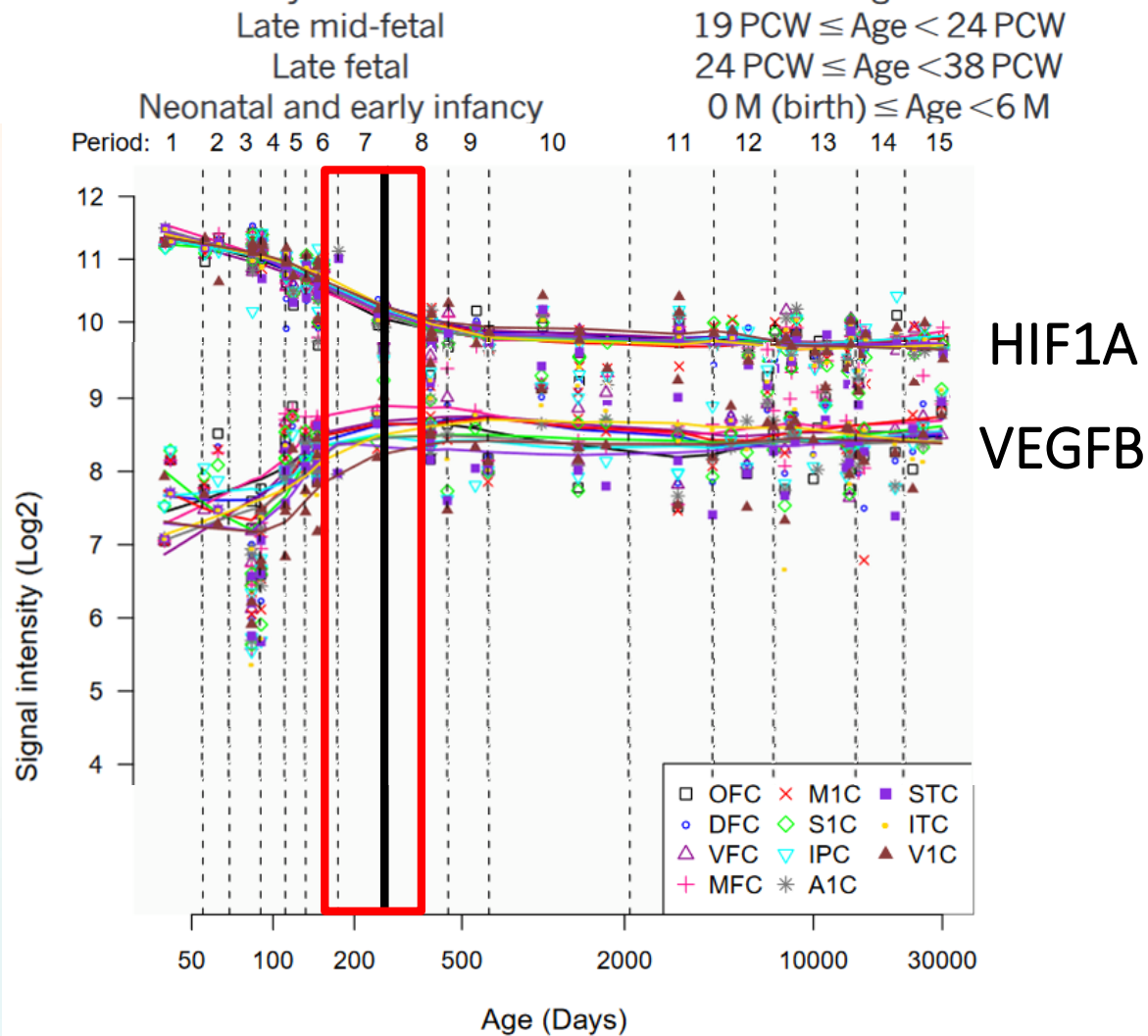
Gene identifier:

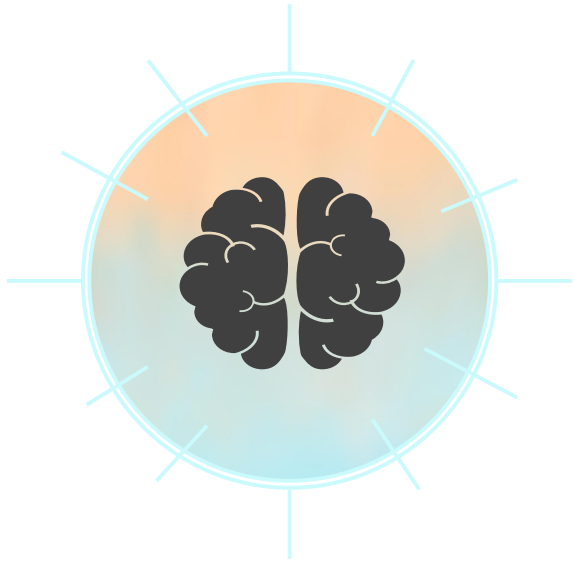
Enter gene names ([Separated by space](#)):

Brain structure:



6
7
8

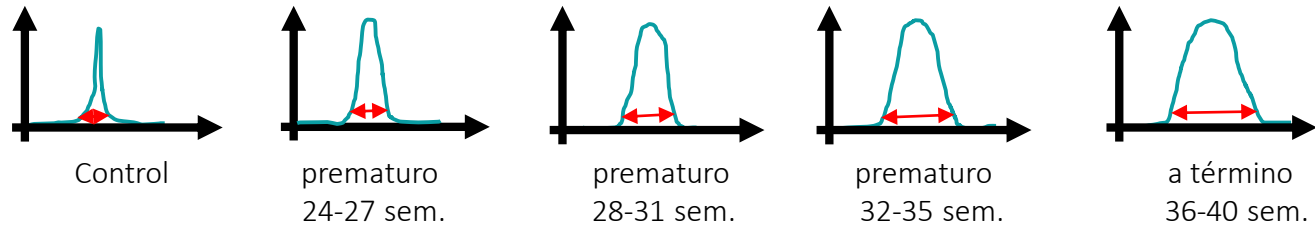




4. Resultados esperados

Experimento 1:

- Diferencia de concentración en oxígeno entre los 4 grupos.
- La concentración en oxígeno aumenta en correlación con el aumento de las semanas de gestación.



concentración en oxígeno creciente



Experimento 2A:

- Mayor proporción media de preOL en los fetos del grupo 4 (nacidos a término) y menor proporción media de preOL en los fetos del grupo 1.
- $X1 \text{ preOL/OPC} < X2 \text{ preOL/OPC} < X3 \text{ preOL/OPC} < X4 \text{ preOL/OPC}$
- La cantidad de VEGF aumenta en correlación con el aumento de las semanas de gestación.



Experimento 3A:

- *Esperamos ver mayor nivel de expresión de VEGF en el WT en comparación con el HIF(-).*
- *Esperamos ver mayor proporción de pre-OLs en el WT en comparación con HIF(-).*

Experimento 3B:

- *Esperamos ver mayor cantidad de VEGF en el WT en comparación con el HIF(-).*

Experimento 3C:

- *Esperamos observar mas vascularización (formación de tubos) en el WT en comparación al HIF(-).*



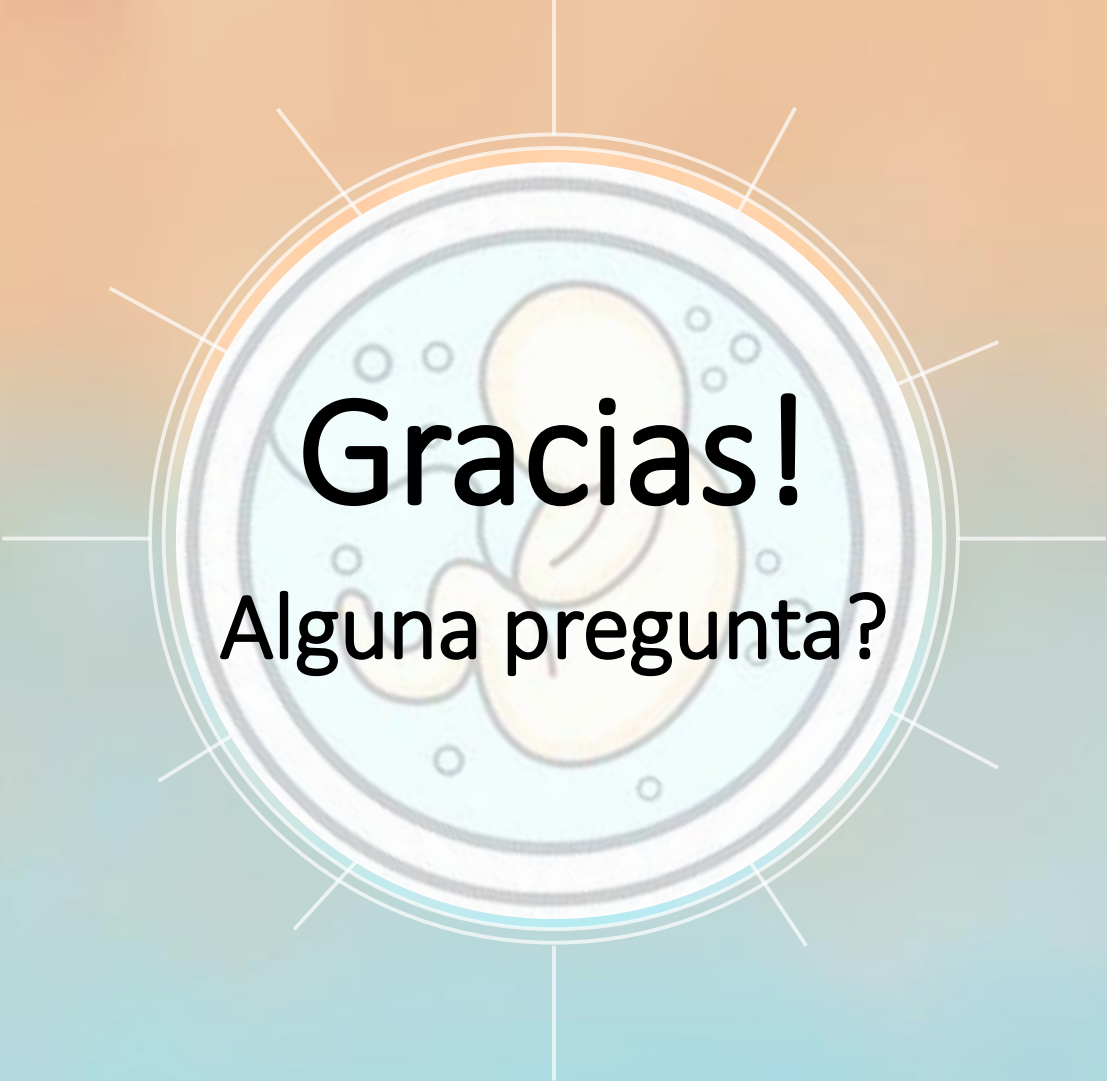


5. Estudios a futuro



Estudios a futuro

- Contribuir al conocimiento del proceso de diferenciación de oligodendrocitos y de los factores que intervienen.
- En la actualidad, no existen opciones de tratamiento para combatir daños en la materia blanca del prematuro (Vaes et al. 2019).
- Cáncer: desarrollo de tratamientos relacionados al metabolismo tumoral.
- Línea de investigación respecto de la regulación de VEGFB por vías alternativas antes del período 6.



Gracias!
Alguna pregunta?

Referencias

- Alberto, G., Ramírez, T., Toro, L.J., Palacio, J., Henao, D.C., Osorio, C.C., *et al.* (2017). Ensayo angiogénesis in vitro, 1–5.
- <https://www.allencell.org/videos-and-tutorials.html#sectionAllenCellMethods> (Allen Cell Explorer)(Techniques while working with Matrigel)
- Benizri, E., Ginouves, A. & Berra, E. (2008). The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 1133–1149.
- Chen, Y., Balasubramanian, V., Peng, J., Hurlock, E.C., Tallquist, M., Li, J., and Lu, Q.R. (2007). Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat. Protoc.* 2, 1044–1051.
- Fan, X., Heijnen, C.J., Kooij, M.A., Van Der Groenendaal, F. & Bel, F. Van. (2009). The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α expression in brain development and neonatal hypoxic–ischemic brain injury. *Brain Res. Rev.*, 62, 99–108.
- <http://hbatlas.org/> (Human Brain Transcriptome)
- Ilangoan, G., Liebgott, T., Kutala, V.K., Petryakov, S., Zweier, J.L. & Kuppusamy, P. (2004). EPR Oximetry in the Beating Heart : Myocardial Oxygen Consumption Rate as an Index of Postischemic Recovery, 842, 835–842.
- Jensen, R.L., Ragel, B.T., Whang, K. & Gillespie, D. (2006). Inhibition of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas, 233–247.
- Malik, S., Vinukonda, G., Vose, L.R., Diamond, D., Bhimavarapu, B.B.R., Hu, F., *et al.* (2013). Neurogenesis Continues in the Third Trimester of Pregnancy and Is Suppressed by Premature Birth, 33, 411–423.
- <https://www.who.int/es> (Organización Mundial de la Salud)
- Panchision, D.M. (2009). The Role of Oxygen in Regulating Neural Stem Cells in Development and Disease, 562–568.
- Perrone, S., Tataranno, L.M., Stazzoni, G., Ramenghi, L. & Buonocore, G. (2013). Brain susceptibility to oxidative stress in the perinatal period, 7058, 1–5.
- Popp, A., Urbach, A., Witte, O.W. & Frahm, C. (2009). Adult and Embryonic GAD Transcripts Are Spatiotemporally Regulated during Postnatal Development in the Rat Brain, 4.
- Simon, M.C. & Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function, 9.
- Sommer, I. & Schachner, M. (1982). Cells that are O4 Antigen-Positive and O1 Antigen-negative Differentiate into O1 Antigen-Positive Oligodendrocytes., 29, 183–188.
- Soothill, P.W., Nicolaides, K.H., Rodeck, C.H. & Gamsu, H. (1986). Blood Gases and Acid-Base Status of the Human Second-Trimester Fetus. *Obstet. Gynecol.*, 68, 173–175.
- Tilborg, E. Van, Wagenaar, N., Theije, C.G.M. De, Hal, M. Van, Vries, L.S. De, Benders, M.J., *et al.* (2017). Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain : Implications for perinatal white matter injury, 1–18.
- Tsai, H., Niu, J., Munji, R., Davalos, D., Chang, J., Zhang, H., *et al.* (2016). Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system, 351, 379–384.
- Vaes, J.E.G., Vink, M.A., Theije, C.G.M. De, Hoebeek, F.E., Dean, J. & Clowry, G.J. (2019). The Potential of Stem Cell Therapy to Repair White Matter Injury in Preterm Infants : Lessons Learned From Experimental Models, 10, 1–20.
- Yuen, T.J., Silbereis, J.C., Griveau, A., Chang, S.M., Daneman, R., Fancy, S.P.J., *et al.* (2014). Oligodendrocyte-Encoded HIF Function Couples Postnatal Myelination and White Matter Angiogenesis. *Cell*, 158, 383–396.