



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

RESPUESTA DE PRECURSORES NEURALES
EXPANDIDOS "IN VITRO" AL FACTOR DE
CRECIMIENTO SONIC HEDGEHOG

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

MARIANA CONSUELO FREGOSO LOMAS

286804

TUTOR: DR. LUIS COVARRUBIAS ROBLES
CO-TUTOR: DR. JESUS SANTA-OLALLA TAPIA

MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la tutoría del Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia y el Dr. Luis Covarrubias Robles, fue apoyado parcialmente por CONACyT proyecto n° 30717-M y por DGAPA proyecto n° IN208697

finalmente fue revisado por los miembros del jurado constituido de la siguiente manera:

Presidente: Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia
Secretario: Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia
Vocal: Dr. Luis Covarrubias Robles
Primer Suplente: Dr. Julio Morán Andrade
Segundo Suplente: Dr. Alejandro García Carrancá

A mis papás:

*por sembrar en mi la semillita de la inquietud
por inculcarme siempre la búsqueda de lo trascendente
por apoyarme en todas mis locuras
por brindarme toda su confianza, cariño y buenos momentos
por tratarme siempre de la manera más humana posible
por demostrarme que no hay nada que el amor no pueda lograr*

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por brindarme todas las oportunidades de desarrollo que pude aprovechar desde pequeña.

A todos mis MAESTROS y TUTORES, que a lo largo de la vida, me han inculcado de una u otra forma el deseo de aprender, me han brindado su confianza, apoyo y motivación.

Al Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia por asesorarme todo el tiempo durante el desarrollo y escritura de este trabajo, por tenerme toda la paciencia del mundo y por constituir un muy buen equipo de trabajo.

Al Dr. Luis Covarrubias Robles por el apoyo, la confianza y las buenas asesorías durante el desarrollo del proyecto.

A los miembros del Jurado por la revisión y los comentarios a este manuscrito.

A todos mis cuates y amigos que me han ayudado a disfrutar la vida, han sido cómplices en mis planes y me han brindado la mano incondicionalmente.

A mi familia (toda completita), por todo el incomparable apoyo que siempre me han brindado, por ser mi raíz, sangre y mi hogar.



ÍNDICE

Página

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
• Establecimiento de los ejes corporales durante el desarrollo del SN.....	4
• Bioquímica de Sonic Hedgehog.....	12
• Cascada de señalización por Sonic Hedgehog.....	15
ANTECEDENTES.....	22
• Sonic Hedgehog durante el desarrollo del SNC.....	22
• Precursores neurales.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	28
MATERIAL BIOLÓGICO.....	29
METODOLOGÍA.....	30
• Disección y cultivo de región mesencefálica rostral.....	30
• Subcultivo de precursores neurales.....	33
• Extracción de RNA de subcultivos de precursores neurales.....	36
• Cuantificación de RNA con reactivo RIBOGREEN.....	38
• Electroforesis de RNA en geles de Urea ácido.....	39
• Purificación de oligonucleótidos.....	41
• Procedimiento para realizar cDNA y RT-PCR de subcultivos.....	42
• Condiciones de amplificación para cada marcador.....	44
• Electroporación.....	45
• Purificación de plásmido a gran escala.....	46
• Subcultivo de línea celular 293T.....	48
• Transfección de línea celular 293T.....	49
• Subcultivo de línea celular 10T1/2.....	50
• Tinción para ver actividad de fosfatasa alcalina en monocapa.....	51
RESULTADOS.....	53
• Los precursores neurales que se propagan con EGF expresan el receptor a <i>Sonic Hedgehog</i> , Ptc.....	53
• EGF regula la expresión de Ptc de manera dosis dependiente.....	56
• Los precursores neurales propagados con EGF sobreviven en cultivos de alta densidad en ausencia de señal proliferativa.....	59
• Shh induce la expresión de Ptc y en combinación con bFGF la de Hnf3 β	61

• La población de precursores neurales expandidos con EGF responde a Shh en un lapso corto de tiempo expresando Gli1, Ptc y Shh.....	64
• Activación de la cascada de señalización por Shh en el mesencéfalo ventral ' <i>in vivo</i> '	69
• Producción de Shh activo por medio de transfección en células 293T.....	72
DISCUSIÓN.....	76
• Los precursores que conforman la neuroesfera expresan Ptc y Smo: moléculas indispensables para la recepción y transducción de la señal.....	77
• Gli 1, Gli 2 y Gli 3 se expresan diferencialmente en los precursores neurales que responden a EGF.....	79
• El precursor responde a Shh induciendo sus genes blanco.....	82
• Shh actúa en coordinación con otros factores de crecimiento para inducir el marcador de la placa del piso HNF3 β	84
• EGF regula la expresión de Ptc en los precursores neurales expandidos ' <i>in vitro</i> ' de manera independiente al estímulo de Shh.....	86
• La respuesta a Shh de los precursores neurales expandidos con EGF ' <i>in vitro</i> ', presenta un patrón de expresión semejante al encontrado en el tejido mesencefálico ventral ' <i>in vivo</i> '	87
CONCLUSIONES.....	90
APÉNDICE DE TÉCNICAS.....	91
I Reactivos y soluciones para cultivos primarios y subcultivos de precursores neurales.....	91
II Soluciones para la extracción de RNA de subcultivos de precursores neurales.....	94
III Reactivos para cuantificar RNA con el reactivo RiboGreen.....	97
IV Soluciones para preparar geles de Urea Ácido.....	98
V Soluciones para preparar geles de acrilamida para purificación de oligos.....	99
VI Soluciones para electroporar.....	100
VII Soluciones para purificar plásmido a gran escala.....	102
VIII Medio para cultivo y subcultivo de líneas celulares 293T y 10T1/2.....	103
IX Reactivos para transfección de células 293T.....	105
X Soluciones para teñir actividad de fosfatasa alcalina.....	105
REFERENCIAS.....	107

RESUMEN

Durante el desarrollo de los organismos multicelulares se llevan a cabo una serie de eventos morfogenéticos cuyo objetivo principal es el de establecer patrones de desarrollo para dar origen a tejidos y órganos bien definidos. Durante este proceso se definen zonas *organizadoras* que secretan moléculas, mejor conocidas como morfógenos, cuya función principal es controlar la proliferación, la diferenciación, la muerte y el arresto de diferentes tipos celulares. Las proteínas que pertenecen a la familia de *Hedgehog* (Hh) son moléculas que están involucradas en dichos procesos. En vertebrados se conocen varios miembros; de éstos, *Sonic Hedgehog* (Shh) es el más estudiado y el único involucrado en el desarrollo embrionario del Sistema Nervioso Central. Shh al actuar sobre su célula blanco por medio de la unión a su receptor *ptc*, induce la expresión de factores transcripcionales de la familia de los *Gli* así como de *Ptc* y *Shh* mismo. En el Sistema Nervioso Shh establece distintos fenotipos ventrales dependiendo de la región a lo largo del eje antero-posterior en combinación con señales intrínsecas de la zona y, adicionalmente a su rol diferenciativo, estudios recientes han implicado a Shh en proliferación. En el laboratorio se ha establecido un protocolo experimental que permite la expansión de precursores neurales multipotentes *in vitro* en donde se podría caracterizar el efecto de Shh sobre su célula blanco, aprovechando que es un sistema enriquecido en células precursoras, y más homogéneo que un tejido completo. Nosotros encontramos que las células precursoras neurales provenientes del mesencéfalo ventral que responden a EGF, poseen las moléculas necesarias para la recepción y la transducción de la señal: *Ptc* y *Smo*, y que al ser estimulados por Shh inducen, de manera transitoria, la expresión de sus moléculas blanco *Ptc*, *Gli1* y *Shh* congruentemente a lo que se ha descrito para otros sistemas. Además, estos precursores son capaces de diferenciar al fenotipo temprano de células de la placa del piso, a juzgar por la expresión del marcador *Hnf3 β* , gracias a la estimulación por Shh en combinación con otros factores de crecimiento como EGF y bFGF. Un análisis comparativo de la expresión de estos mismos marcadores en el mesencéfalo ventral '*in vivo*' con los datos observados '*in vitro*', valida nuestro sistema como modelo de estudio para analizar los efectos de Shh sobre las células precursoras neurales. Paralelamente, y de manera independiente a la regulación de *Ptc* por Shh, encontramos una regulación positiva de *Ptc* por EGF no descrita hasta ahora en otros sistemas.

ABREVIATURAS

AMP	adenosin mono phosphate (mono fosfato de adenosina)
A-P	antero-posterior
BF1	brain factor 1 (factor del cerebro 1)
BMP-4	bone morphogenetic protein-4 (proteína de morfogénesis de los huesos-4)
BMP-7	bone morphogenetic protein-7 (proteína de morfogénesis de los huesos-7)
Ci	cubitus interruptus
Ci-155	cubitus interruptus de 155Kd
Ci-75	cubitus interruptus de 75Kd
Cos2	costal2
C-terminal	carboxilo terminal
CPN	células precursoras neurales
Dhh	Desert Hedgehog
d.p.c	días post coito
dpp	decapentaplegic
D-V	dorso-ventral
EGF	epidermal growth factor (factor de crecimiento epidérmico)
EN-1	engrailed-1
EN-2	engrailed-2
FA	fosfatasa alcalina
FGF	fibroblast growth factor (factor de crecimiento de fibroblastos)
FGF-4	fibroblast growth factor-4 (factor de crecimiento de fibroblastos-4)
FGF-8	fibroblast growth factor-8 (factor de crecimiento de fibroblastos-8)
bFGF	basic fibroblast growth factor (factor de crecimiento básico de fibroblastos)
Fu	fused
Gli 1	glioblastoma protein 1 (proteína de glioblastoma 1)
Gli 2	glioblastoma protein 2 (proteína de glioblastoma 2)
Gli 3	glioblastoma protein 3 (proteína de glioblastoma 3)
Hh	Hedgehog
Hnf3- β	hepatic nuclear factor 3 β (factor nuclear de hepatocitos-3 β)
Hox	homeobox-containing genes (genes que contienen caja homeótica)
Ihh	Indian Hedgehog
Isl-1	Islet-1
Kd	kiloDaltons (kilodaltones)
Krox-20	Krüpel box gene-20 (gen con caja Krüpel-20)
M-L	medio-lateral
MV	mesencéfalo ventral
N-Shh	Sonic Hedgehog amino terminal
N-terminal	amino terminal

NT3	neurotrofina 3
Otx2	orthodenticle-related gene 2
cDNA	complementary Desoxiribonucleic acid (Ácido desoxiribonucleico complementario)
Pax-3	paired box containing protein-3 (Proteína con caja <i>paired-3</i>)
Pb	pares de bases
PKA	protein kinase A (proteína cinasa dependiente de AMP cíclico)
Ptc 1	Patched-1
Ptc 2	Patched-2
PN	placa neural
RNA	ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
RNAm	ribonucleic acid mesenger (mensajero de ácido ribonucleico)
RT-PCR	Retro transcription-Polimerase Chain Reaction (técnica de retro transcripción y reacción en cadena de la polimerasa)
SCF	Stem cell factor (factor de la célula tallo)
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
Su(fu)	supresor de fused
TGF β	transforming growth factor- β (factor de crecimiento transformante- β)
Wg	Wingless
Wnt	homólogo de Wingless en vertebrados
XIPou2	<i>Xenopus laevis</i> POU domain protein 2 (Proteína 2 con dominio POU de <i>Xenopus laevis</i>)
ZV	zona ventricular

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo de los organismos pluricelulares se llevan a cabo una serie de eventos morfogénéticos (cambios en la forma del embrión en desarrollo) que darán lugar a la formación de órganos y tejidos bien definidos. Durante este proceso se establecen zonas *organizadoras* que secretan moléculas con la capacidad de difundir en el medio extracelular a manera de gradiente y generar diferentes respuestas celulares dependiendo de su concentración; dichas propiedades las definen como morfógenos. Estas moléculas regulan la proliferación, la diferenciación y la muerte de los diferentes tipos celulares durante el crecimiento del organismo.

Las primeras zonas *organizadoras* que se forman durante la embriogénesis, como en el caso de la gastrulación, tienen una importancia crucial para la formación correcta del embrión, ya que participan en el establecimiento de los ejes antero-posterior (A-P) y dorso-ventral (D-V) que regirán su polaridad, y dictan los lugares en donde se formarán las distintas estructuras que conforman el cuerpo del organismo adulto como las extremidades y la cabeza entre otros.

Establecimiento de los ejes corporales durante el desarrollo del Sistema Nervioso.

Una de las primeras regiones organizadoras que aparecen en el embrión es conocida como *nodo* (en el ratón), organizador de Spemann (en anfibios) y nodo de Hensen (en pollo) y está formado por futuro tejido mesodérmico dorsal (Kintner and Dodd, 1991). Esta estructura posee una función reguladora global capaz de inducir la formación de ejes completos. Si es transplantado a otro embrión en el estadio adecuado y en una región ventral diferente a la que normalmente se encuentra, es capaz de organizar y coordinar la formación de ambos patrones corporales, el A-P y el D-V (Kintner and Dodd, 1991, Slack, et al, 1992). Posteriormente a que se define la posición de esta región organizadora en el

embrión temprano, se establece el patrón A-P y se genera el neuroepitelio que originará el Sistema Nervioso (SN). Durante la gastrulación, el ectodermo presente a lo largo de la línea media dorsal del embrión va adquiriendo la identidad de la placa neural que se refleja en patrones específicos en el estadio de néurula, que van acompañados por el establecimiento de los ejes que regirán el desarrollo futuro del tejido neural (Doniach, et al, 1992; Ruiz i Altaba, 1992; Slack, and Tannahill, 1992). El primer patrón controla la diferenciación a lo largo del eje antero-posterior sustentado en la expresión diferencial de los genes *BF1*, *Otx2*, *EN-1* y *Hox*, que son los que participan en la adquisición de la identidad posicional de las células en este eje (revisado por Tanabe and Jessell, 1996). El segundo controla el desarrollo de la placa neural a lo largo del eje medio-lateral, que más tarde será el eje dorso-ventral del tubo neural (revisado por Graham, 1997). En la placa neural se formarán distintos tipos celulares que eventualmente producirán diferentes neuronas y células gliales ocupando posiciones ventro-dorsales (V-D) únicas. La generación del tejido neural a partir del ectodermo se identificó gracias a los trasplantes del organizador en *Xenopus* en donde se observó que en el sitio del trasplante se desarrolla tejido nervioso a partir del ectodermo que normalmente habría formado epidermis. (Kintner and Dodd., 1991). Las moléculas responsables de la inducción neural no se han identificado claramente, aunque actualmente ya existen algunos candidatos fuertes como *Noggin* (Lamb, 1993) y *Cordina* (Sasai et al, 1995) que se expresan en el organizador y tienen actividad como inductores neurales. Sin embargo, contrariamente a lo que se pensó originalmente, las moléculas inductoras no actúan directamente sobre las células que formarán el tejido neural sino más bien interactúan con moléculas que normalmente inhiben a las células para formar tejido neural. Uno de estos factores inhibidores de la placa neural es el factor de crecimiento *BMP-4* (proteína de morfogénesis de los huesos-4) (Wilson and Kemmati-Brivanlou, 1995). Por lo tanto si la señal de *BMP-4* es inhibida por alguna de las moléculas candidatas como *Cordina*, se desarrolla tejido nervioso (Sasai, et al, 1995).

Para explicar la regionalización A-P del ectodermo neural existen actualmente dos modelos (Doniach 1992; Ruiz i Altaba, 1992; revisado por Slack and Tannahill, 1992). El primero propone que existen diferentes inductores mesodérmicos que se encuentran localizados en diferentes posiciones a lo largo del eje antero-posterior. Este tejido mesodérmico se encuentra justo por debajo de la placa neural formando una estructura conocida como notocorda. En el otro modelo se proponen sólo dos señales que participan en el establecimiento del patrón A-P neural, y se postula que las diferencias a lo largo de dicho eje se deben a cambios en la cantidad más que en la identidad de la señal inductora (Nieuwkoop's, 1952a, 1952b). La primera señal es producida por el mesodermo anterior y la notocorda e induce al ectodermo a volverse tejido neural anterior. *Cordina*, *Noggin* y *Activina* son moléculas secretables que constituyen buenos candidatos para representar esta señal. Cuando se aplican ectópicamente dorsalizan el mesodermo ventral e inducen tejido neural anterior al activar la expresión de los genes *Otx2*, *XlPou2* y *EN-2* que se expresan diferencialmente en las regiones anterior y media del SNC (revisado por Kelly and Melton, 1995). La segunda señal transforma parte de este tejido para que adquiera identidad más posterior y se postula que ésta podría estar presente en forma de gradiente en el mesodermo, con la mayor concentración en el extremo posterior. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Kengaku and Okamoto, 1995; Lamb and Harland, 1995), las proteínas Wnt (McGrew et al., 1995) y el ácido retinóico (Ruiz i Altaba and Jessell, 1991; Sive et al., 1990) son buenos candidatos como señales posteriorizantes. Existen evidencias experimentales que postulan a estos factores como los responsables de inducir la expresión diferencial de genes que le dan la identidad posterior a las células del neuroepitelio como *Hox* y *Krox-20* (Lamb and Harland, 1995; Ruiz i Altaba and Jessell, 1991).

El patrón inicial a lo largo del eje medio-lateral (M-L) en el ectodermo dorsal, como también pasa con el eje A-P, ocurre en los estadios en los que no se ha cerrado el tubo neural. En el momento en el que éste se cierra, las células que se

encuentran en la parte media de la placa neural asumen identidades ventrales, dando origen primero a la *placa del piso* y posteriormente a diferentes tipos de neuronas ventrales como las *motoneuronas* en la región ventrolateral y las *interneuronas ventrales* en una región más dorsal. Al mismo tiempo las células ubicadas más lateralmente en la placa neural pasan a formar parte de las estructuras dorsales del tubo neural y se convierten en células de la *placa del techo* y *neuronas dorsales*. Las señales inductivas que establecen el patrón D-V y controlan la identidad y la localización de estos tipos celulares provienen de dos grupos celulares no neurales, la notocorda y el tejido mesodérmico paraxial y, lateralmente, el ectodermo epidermal que la delimita (revisado por Graham, 1997). Cuando la notocorda es transplantada en la parte dorsal del tubo se induce una placa del piso secundaria y aparecen motoneuronas (tipo celular característico de la región ventral) (Plackzec et al., 1990, 93). Cuando la notocorda se elimina por completo de su posición original la placa del piso no se desarrolla y el tejido dorsal se extiende hasta invadir completamente la región ventral (van Straaten and Hekking, 1991; Yamada et al., 1991). Estos hechos demuestran el efecto ventralizante de la notocorda.

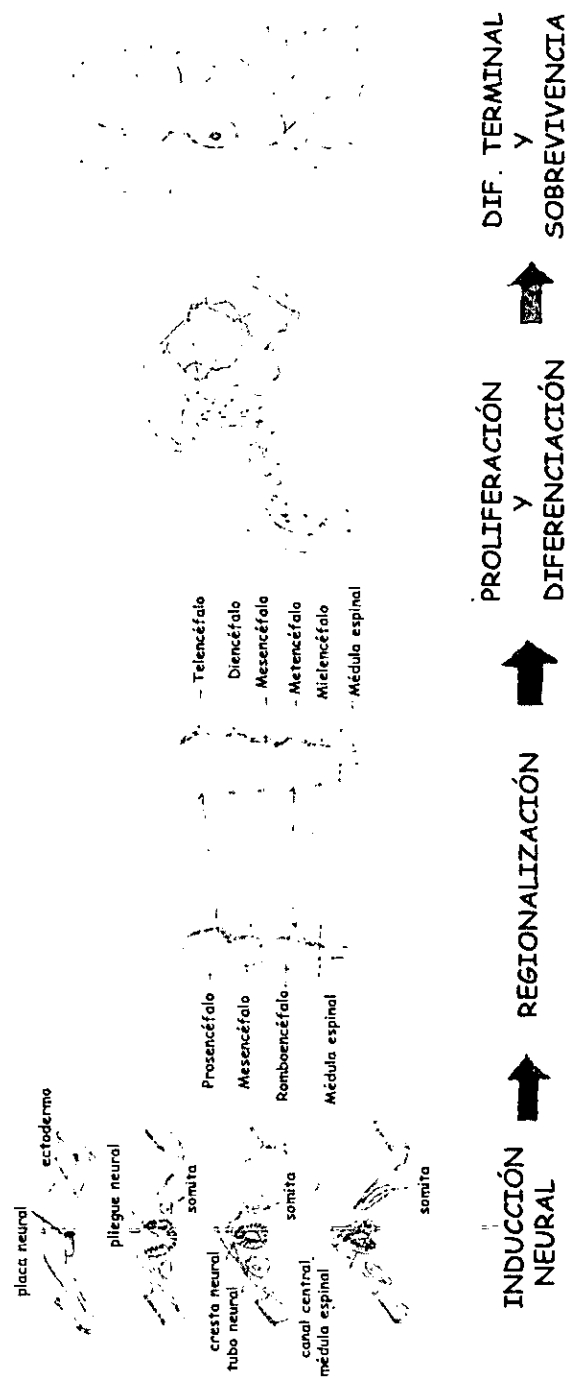


Fig.1 *Desarrollo del Sistema Nervioso Central*. El patrón D-V se forma después de la inducción neural, al momento de la invaginación del tubo neural. El patrón A-P se establece más temprano en el desarrollo que el D-V, pero morfológicamente, las regiones que darán origen a las diferentes estructuras presentes en el SNC adulto se hacen evidentes de manera posterior. Después estas regiones sufren proliferación y diferenciación generando, finalmente, los estados celulares terminales que conforman el SNC.

Se han caracterizado dos tipos de respuestas celulares provenientes de la notocorda. Una llamada de *corta distancia*, originalmente caracterizada como *dependiente de contacto*, que es la que induce la diferenciación de la placa del piso en las células de la línea media de la placa neural, proceso asociado a la expresión del factor nuclear de hepatocitos (Hnf3- β) (Roelink, et al, 1995). Hnf3 β se ha utilizado como un marcador de diferenciación temprano específico de la placa del piso. Y otra, de *larga distancia*, que induce la diferenciación de las motoneuronas en la región ventral de la médula espinal (Roelink, et al, 1995). Una vez generada la placa del piso, si se transplanta de manera ectópica, es capaz de generar los dos tipos de señales por si misma (Placzek et al., 1993) (fig.2). Los efectos ventralizantes de la notocorda, y los de la placa del piso, están mediados por la molécula secretable Sonic Hedgehog (Shh) (Echelard et al., 1993; Roelink et al., 1994). Cuando se expresa en la parte dorsal del tubo neural induce la expresión ectópica de marcadores de la placa del piso. Shh es un factor que pertenece a una familia de proteínas originalmente identificada por su homología al gen de polaridad de los segmentos en *Drosophila*, Hedgehog (Hh) (Echelard et al., 1993; Roelink et al., 1994). Este homólogo de Hh en vertebrados (Shh) se expresa inicialmente en la notocorda, y posteriormente en la placa del piso, (Roelink et al., 1995). La expresión localizada y la difusión limitada de esta proteína podrían ayudar a crear un gradiente de Shh que, actuando así como morfógeno, induciría diferentes fenotipos ventrales a diferentes umbrales de concentración, desde placa del piso hasta motoneuronas (Johnson and Tabin, 1995; Roelink et al., 1995). Inicialmente, durante el proceso de adquisición de la identidad ventral ocasionada por Shh, se regula la expresión de algunos genes de la familia de los Pax, factores transcripcionales que contienen homeodominio, que inicialmente se expresan en toda la placa neural incluyendo la región media (revisado por Gruss and Walter, 1992; Másouri et al., 1996). Durante el desarrollo del tubo neural, la expresión regulada de los genes Pax (Pax 3, Pax 6 y Pax 7) lo subdivide en diferentes dominios. En un inicio Pax 3 y Pax 7 se expresan en toda la placa neural a nivel caudal. En el momento en el que los pliegues del tubo comienzan a formarse, la

expresión de Pax 3 y Pax 7 se limita a regiones más dorsales mientras que Pax 6 comienza a expresarse en posiciones medio-laterales exceptuando la línea media (a los 10dpc.). Después del cierre del tubo neural, la expresión de Pax 3 y Pax 7 se restringe completamente a la mitad dorsal del tubo neural y Pax 6 conserva una expresión más ventral (Goulding et al., 1993; Liem et al., 1995). La represión ventral de Pax 3 y Pax 7 está mediada por el Shh proveniente de la notocorda y parece ser un requisito previo a la generación de tipos celulares ventrales. Esto está apoyado por experimentos en donde al transplantar la notocorda a regiones dorsales del tubo neural, la expresión de Pax 3 y Pax 7 se inhibe y se generan fenotipos ventrales (Goulding et al., 1993; Hirano et al., 1991; Plackzec et al., 1990, 1993; van Straaten et al., 1988; Yamada et al., 1991). De manera simultánea a la restricción de la expresión de los genes Pax 3 y Pax 7 a la región dorsal, las células de la línea media ventral del tubo comienzan a expresar Hnf3- β . Una vez que estas células ventrales adquieren el fenotipo de la placa del piso comienzan a secretar Shh y a expresar las moléculas involucradas en su cascada de transducción de señales como Ptc y Gli 1. En la región ventro-lateral adyacente a la placa del piso se generan las *motoneuronas* (en la médula), o *neuronas ventrales* características en el cerebro medio y anterior, y en una posición más lateral las *interneuronas*. La diferenciación de estos fenotipos se genera por un efecto de Shh como morfógeno. Un ejemplo muy claro de este mecanismo es el hecho de que para la generación de las células de la placa del piso se requiere una concentración 2 ó 3 veces mayor que la necesaria para la formación de motoneuronas (Ericson et al., 1996; Roelink et al., 1995). Por lo tanto pequeños cambios en la concentración de Shh pueden desatar la generación de distintos tipos celulares.

Por otro lado, en la parte dorsal del tubo neural, señales provenientes de la epidermis determinan los destinos celulares dorsales (Liem et al., 1995) (fig.2). Los mediadores de esta señal ectodérmica son los BMPs, miembros de la familia de los TGF β . De manera análoga a la forma como actúa Shh en el tubo neural ventral, diferentes concentraciones de BMPs pueden inducir diferentes tipos celulares dorsales. Cuando se realizan co-cultivos de placa neural con explantes de epidermis

se generan células dorsales (como células de la placa del techo y células de la cresta) siendo que estos tipos celulares no se encuentran presentes en ninguno de los dos explantes cultivados por separado (Dickinson et al., 1995; Selleck and Bronner-Fraser, 1995). En el momento en el que a estos co-cultivos se les agregan antagonistas de los BMPs como Noggin o Folistatina, la expresión de los marcadores dorsales se inhibe (Liem et al., 1997). A su vez, los BMPs que se expresan en la epidermis en los estadios en los que el tubo neural todavía no se cierra, como BMP4 y BMP7, inducen la expresión de marcadores de la cresta neural además de otros marcadores dorsales (Liem et al., 1995).

Dado que Shh parece ser el morfógeno responsable de la generación de los distintos fenotipos ventrales a todo lo largo del tubo neural, resulta de gran interés el estudio de su participación durante el desarrollo del SNC. En particular, es importante caracterizar cómo esta sola molécula es capaz de generar distintas respuestas celulares dentro de una misma estructura en desarrollo.

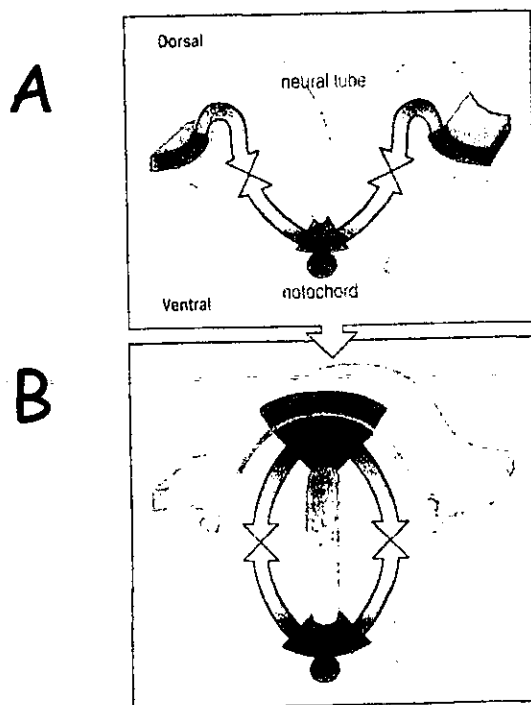


Fig. 2 **Señales dorsales y ventrales.** A. Durante la formación del tubo neural las señales dorsalizantes provienen del ectodermo epidermal (región azul) que inicialmente delimita a la placa neural, mientras que las ventralizantes son secretadas por la notocorda y posteriormente también por la placa del piso (tejido ectodérmico mostrado en rojo en el panel A). B. Una vez cerrado el tubo neural, las señales dorsales se siguen expresando en el

ectodermo dorsal que permanece en contacto con el tubo neural, y ahora también en las células de la placa del techo (tejido dorsal del tubo neural mostrado en azul en el panel B). Las flechas provenientes de los centros señalizadores indican que ambas señales eventualmente se cruzan en forma de gradiente generando de esta manera la diversidad celular presente en el eje D-V del tubo neural. (tomada de Wolper, L. ed. Oxford).

Bioquímica de Sonic Hedgehog

Hedgehog es una proteína originalmente descrita en *Drosophila* en donde se caracterizaron sus efectos a corta distancia como el establecimiento de la polaridad de los segmentos en embriones tempranos, y a larga distancia como el establecimiento del patrón en los discos imagales (revisado por Hammerschmidt, et al, 1997). En mamíferos se han caracterizado 3 homólogos: *Desert Hedgehog* (Dhh), que se expresa principalmente en las células de Sertoli en el testículo (Bitgood et al., 1996), *Indian Hedgehog* (Ihh), que está involucrado en el desarrollo de los condrocitos (Vortkamp et al., 1996) y *Sonic Hedgehog* (Shh) que tiene una expresión más generalizada (revisado por Ekker et al, 1995; Hammerschmidt, 1997). Para este último se ha demostrado ampliamente su actividad como morfógeno y en los diversos tejidos en donde se expresa establece patrones de desarrollo y diferenciación que conservan la expresión de factores de crecimiento, receptores y factores transcripcionales. Esto destaca la existencia de un programa general durante los eventos morfogenéticos en donde Shh juega un papel fundamental (revisado por Goodrich and Scott, 1998; Hammerschmidt, et al, 1997; Ingham, 1998). Todos los Hedgehog se unen aparentemente a un mismo receptor, pero como la distribución de estos efectores no se sobrepone, es probable que no compartan respuestas celulares. De estos factores, Shh es el único involucrado en el desarrollo del sistema nervioso central en su etapa embrionaria y su participación es clave para la diferenciación adecuada en los ejes A-P y D-V (Echelard et al, 1993).

Las proteínas pertenecientes a la familia de Hedgehog contienen un péptido señal, una región N-terminal bastante conservada y un dominio C-terminal más divergente. Aunque sólo algunos miembros de la familia en vertebrados, como Shh

de ratón y de pez-cebra se han estudiado más rigurosamente, es muy probable que todos los Hedgehog biológicamente activos se formen de una proteína precursora más grande (Lai et al, 1995), como sucede con Hedgehog en *Drosophila* (Porter et al., 1995). De manera adicional al corte del péptido señal, encargado de localizar a la proteína en el retículo endoplásmico para su secreción, la molécula precursora de Hedgehog sufre un corte autocatalítico que depende de una actividad presente en su región carboxilo terminal (Lee et al., 1994; Porter et al., 1995). Este autocorte genera un péptido N-terminal de 19kDa y uno C-terminal de 26 a 28kDa, de los cuales, el N-terminal permanece fuertemente asociado a la superficie de las células que lo sintetizan, mientras que el C-terminal difunde libremente (fig.3). El corte autocatalítico del precursor de Shh se da por la formación de un tioester interno intermediario que después es cortado gracias a una sustitución nucleofílica catalizada por una molécula de colesterol, que se une covalentemente al extremo C-terminal del péptido N-terminal favoreciendo su anclaje a la membrana celular (Porter et al., 1996). Adicionalmente se encontró que en algunos sistemas el N-péptido posee una molécula de palmitato en su extremo amino. Cuando se evalúa su actividad en un ensayo celular basado en la diferenciación de fibroblastos en osteoblastos (Kinto et al., 1997), esta modificación le da 30% más potencia que el péptido recombinante sin modificaciones post-traduccionales (Pepinsky et al., 1998). Se esperaría que ambas modificaciones post-traduccionales provocaran una alta concentración de Shh en la superficie de las células que lo producen. El péptido N-terminal es la molécula responsable de todos los efectos biológicos conocidos de Shh ya sea los de corta o larga distancia (Fan et al, 1995; Fietz et al, 1995), como la diferenciación de las células de la placa del piso y las motoneuronas, respectivamente (Lai et al, 1995; Martí et al, 1995; Porter et al, 1995; Roelink et al, 1995). La manera de llevar a cabo los efectos a larga distancia, siendo que parecería ser una molécula preferentemente anclada a la membrana, no se han podido explicar, sin embargo existen algunos datos experimentales que permiten postular algunas moléculas participantes. En *Drosophila* se identificó un gen llamado *tout-velu* que codifica para una enzima involucrada en la biosíntesis de

proteoglicanos que se necesita para el movimiento de Hedgehog modificado por el colesterol (The et al., 1999), hecho que sugiere un rol importante de los proteoglicanos en el tránsito intercelular de Hedgehog modificado. Un segundo acercamiento a la posible respuesta sobre el tránsito extracelular de Hh es la observación de prolongaciones celulares citoplasmáticas llamadas *citonemas* que se producen en las células dentro del área de acción de Hh. Se especula que estos citonemas pudieran jugar un papel importante mediando el transporte de Hh para su acción a larga distancia (Ramírez-Weber and Kornberg, 1999). Si esto es posible, la habilidad de Hh de unirse a la membrana por medio del colesterol podría ser crítica para el transporte mediado por citonemas (comentado por McMahon, 2000).

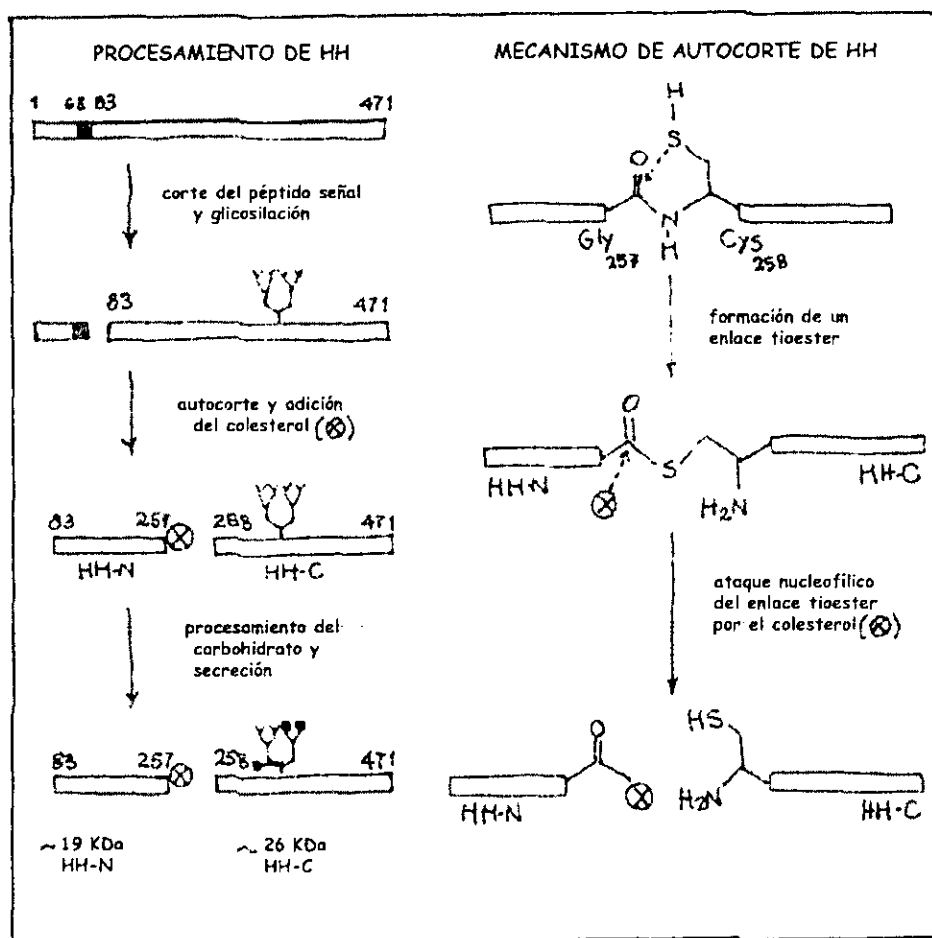


Fig. 3 *Procesamiento de Hh en Drosophila*. Mientras que Hh en *Drosophila* contiene el péptido señal de manera interna (AA 63-83), esta secuencia se encuentra localizada directamente en el extremo N-terminal de todos los genes Hh en vertebrados. (tomado de Hammerschmidt, M. et al 1997).

Cascada de señalización por Hh

Uno de los modelos biológicos que ha permitido la mayor identificación de componentes moleculares en la transducción de señales mediada por Hh ha sido *Drosophila Melanogaster*. Por estudios genéticos se han identificado 2 proteínas transmembranales: Patched (Ptc) (Nakano et al., 1989; Hooper et al., 1989) y Smoothened (Smo) (van den Heuvel et al., 1996) como elementos importantes en la recepción y la transducción de la señal por Hh y que se proponen como candidatos para ser receptores de Hh.

Ptc es una proteína de 12 fragmentos transmembranales cuya estructura se asemeja a un canal iónico. Análisis genéticos en *Drosophila* indican que Ptc es un regulador negativo de la cascada que limita la difusión de la señal al interferir con la inducción de los genes blancos de Hh (Chen et al., 1996). En vertebrados se han identificado dos homólogos a patched: Ptc1 (Goodrich et al., 1996) y Ptc2 (Motoyama et al., 1998). Utilizando ensayos bioquímicos se demostró que las constantes de afinidad de los tres Hh de mamíferos con Ptc1 y Ptc2 son muy similares (Carpenter et al., 1998; Marigo et al., 1996a); sin embargo, como la expresión de Ptc2 se asocia a la célula que transmite la señal principalmente en espermatoцитos (Carpenter et al., 1998), se postula que pudieran estar mediando señales diferentes. Ptc1, al igual que el Ptc de *Drosophila*, se regula positivamente en respuesta a Hh como parte de un mecanismo de retroalimentación negativa que restringe espacio-temporalmente la señal de Hh. Ya que Ptc es un gen que invariablemente se activa aumentando su transcripción en respuesta a Hh, es considerado un marcador universal de la activación de la cascada (revisado por Goodrich et al., 1998).

Smo es una proteína de 7 fragmentos transmembranales que se identificó como un regulador positivo de la cascada. Esta molécula tiene la estructura general de los receptores acoplados a proteínas G y tiene sitios probables de fosforilación por proteína cinasa A (PKA) en su extremo carboxilo (van den Heuvel et al., 1996). Smo no se une a Shh ni tampoco participa en la unión de Shh a Ptc, dado que se ha

visto que esta interacción puede ocurrir en ausencia de Smo (Chen et al., 1996). Además esta molécula se expresa constitutivamente en ausencia de Ptc. La sobreexpresión de Smo en una línea celular responsiva a Shh que posee niveles muy bajos de expresión de Ptc (C3H10T1/2) es suficiente para inducir la respuesta celular típica de Shh en ausencia del factor. Cuando se cotransfecta con Ptc1 en este mismo sistema, se reprime la actividad de Smo, mientras que si se agrega N-Shh recombinante al cultivo, se elimina la represión de Smo causada por Ptc1. Cuando se cotransfectan Ptc1 y Smo en células de mamífero forman un complejo, lo que sugiere que *in vivo* también puede existir una interacción física entre ambas proteínas (Stone et al., 1996), aunque esto último está por demostrarse. En base a las evidencias anteriores se propone entonces, que Smo participa como el transductor en la respuesta celular mediada por Shh. En este modelo se propone que gracias a la unión de Shh a su receptor Ptc, cuya función principal es inhibir la señal mediada por Smo, se favorece la activación de Smo permitiendo la transducción de la señal inducida por Shh.

En *Drosophila* se han encontrado varias moléculas que juegan un rol muy importante en la transducción de la señal a partir de Smo. En presencia de Hh Smo transduce una señal positiva a *Ci* (*cubitus interruptus*), a través de *Fused* (*Fu*) que es una cinasa de treonina-serina (Préat, T., et al, 1990). Al mismo tiempo la transducción desencadenada por Smo impide el efecto inhibitorio de *Costal2* (*Cos2*), una proteína parecida a las kinesinas (Robbins, D.J., et al, 1997; Sisson, J.C., et al, 1997), de la cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) (Jiang, J., and Struhl, G., 1995; Li, W., 1995), y del supresor de *fused* (*Su(fu)*) (Monnier, V., et al, 1998). Actualmente no se conoce el mecanismo de acción por el cual Smo regula a estas moléculas. Sin embargo se ha demostrado que *Ci*, *Fu*, *Su(fu)* y *Cos2* se encuentran generalmente como complejo asociado a los microtúbulos y esta asociación se impide cuando Hh está presente (Monnier, V., et al, 1998; Robbins, D.J., et al, 1997) (fig.4). De esta manera se propone que Hh previene la asociación de este complejo al citoesqueleto y al mismo tiempo la acción de *Ci*. Algunos de los

factores homólogos a Fu, Su(fu) y Cos2 ya se han identificado en vertebrados y se postula que podrían tener actividades equivalentes.

En vertebrados se han aislado moléculas homólogas a *Cubitus interruptus* (Ci), llamados Glis. Estas moléculas tienen un alto grado de homología en su secuencia aminoacídica (Hui C. Et al, 1994) lo que ha permitido agruparlas en una nueva familia de factores transcripcionales que poseen como característica común cinco motivos de "dedos de zinc" en su dominio de unión al DNA. Los miembros de la familia Ci/Gli se unen a una secuencia consenso de 9 pares de bases localizada en la región promotora de varios de los genes blanco de Hh, (como Hnf3- β , ptc, wg y dpp en *Drosophila*) que permite regular positivamente su transcripción (Alexandre et al., 1996; Sasaki et al., 1997). En *Drosophila* se ha demostrado que Ci experimenta un procesamiento post-traducciona l que regula su actividad. En ausencia de Hh, Ci (Ci-155) sufre un corte proteolítico generando la variante represora N-terminal (Ci-75)(Aza-Blanc et al., 1997). En el momento en que Hh se une a su receptor, se impide el corte de Ci y la proteína se mantiene intacta (Ci-155) constituyendo a la molécula activadora. El corte de Ci está regulado por una fosforilación del extremo C-terminal de Ci por la PKA.

Si bien existen similitudes entre la proteína Ci de *Drosophila* y las proteínas Glis de vertebrados también hay diferencias importantes, quizás el hecho más notable es que se han identificado tres Glis distintos en vertebrados (Gli1 (Kinzler and Vogelstein, 1990), Gli2 y Gli3 (Ruppert et al, 1990)) (Hui et al, 1994) siendo que en *Drosophila* existe únicamente Ci. A las diferentes variantes de Glis se les han atribuido distintas funciones que en algunos casos parecen complementarias. Gli1 es el que se ha caracterizado mejor y se considera el principal mediador de la señal por Shh en vertebrados. En diversos sistemas experimentales basta la sobre-expresión de Gli1 para inducir la respuesta celular esperada en presencia de Shh. Por ejemplo, en tejido neural se induce la expresión de marcadores ventrales neurales atribuidos a Shh como Ptc, Hnf3- β y Shh mismo, al mismo tiempo que suprime marcadores dorsales como Pax-3 (Hynes M., et al, 1997; Ruiz i Altaba, 1998; 1999). De manera distinta a lo que sucede con Ci en *Drosophila*, la expresión

de Gli1 es regulada transcripcionalmente de manera positiva por Shh (Marigo et al., 1996b; Ruiz i Altaba, 1998), y la proteína resultante actúa como un potente activador de los genes blanco de Shh como Hnf3- β , Ptc, Shh e incluyendo al mismo Gli1 (Hynes M., et al, 1997; Ruiz i Altaba, 1998, 1999; Sasaki et al, 1997). Se ha encontrado que Gli2 es un activador débil de los genes blanco de Shh (Sasaki et al., 1999) y también es regulado transcripcionalmente de manera positiva por éste (Ruiz i Altaba, 1998, 1999; von Mering, 1999). Recientemente se ha encontrado que Gli2 al igual que Gli3, a semejanza de Ci, son procesados post-traduccionalmente desenmáscarando funciones represoras y activadoras 'in vivo'. Cuando Gli2 es cortado en su extremo amino terminal se convierte en un activador muy potente capaz de inducir la expresión de genes blanco de Shh como Hnf3- β , con la consecuente inducción de la placa del piso en el tubo neural (Sasaki, et al, 1999), mientras que si se corta en su extremo carboxilo el resultado es un fuerte represor que inhibe la formación de dicha estructura (Ruiz i Altaba, 1999; Sasaki, et al, 1999). Gli3, a diferencia de Gli1 y Gli2, no es inducido transcripcionalmente por Shh, además entre ellos se presenta un mecanismo de represión transcripcional mutua (Marigo et al., 1996b; Ruiz i Altaba, 1998; von Mering, C., 1999). La naturaleza de la proteína completa generada a partir del gen de Gli3 es la de un represor (Ruiz i Altaba, 1998, 1999). Se ha encontrado que esta proteína es la más parecida en secuencia y comportamiento a Ci de *Drosophila* y que, como ésta, es procesada para generar un represor muy potente en ausencia de Shh (Sasaki H., et al, 1999; Wang B., et al, 2000). Estos datos apoyan la idea de la existencia de una forma activadora de Gli3, que en ausencia de la señal de Shh, es procesada dando origen al represor que a su vez impide la expresión del activador Gli1 y por lo tanto de los genes blancos de Shh (Dai, et al, 1999, Sasaki H., et al, 1999). En sistemas como en embriones de rana y células COS-7 los tres Glis producen formas C-terminales truncadas, dando evidencias a favor del modelo que postula que los tres Glis pudieran tener funciones activadoras o represoras dependiendo del entorno donde se encuentren las células que responden a Shh (Ruiz i Altaba, 1999).

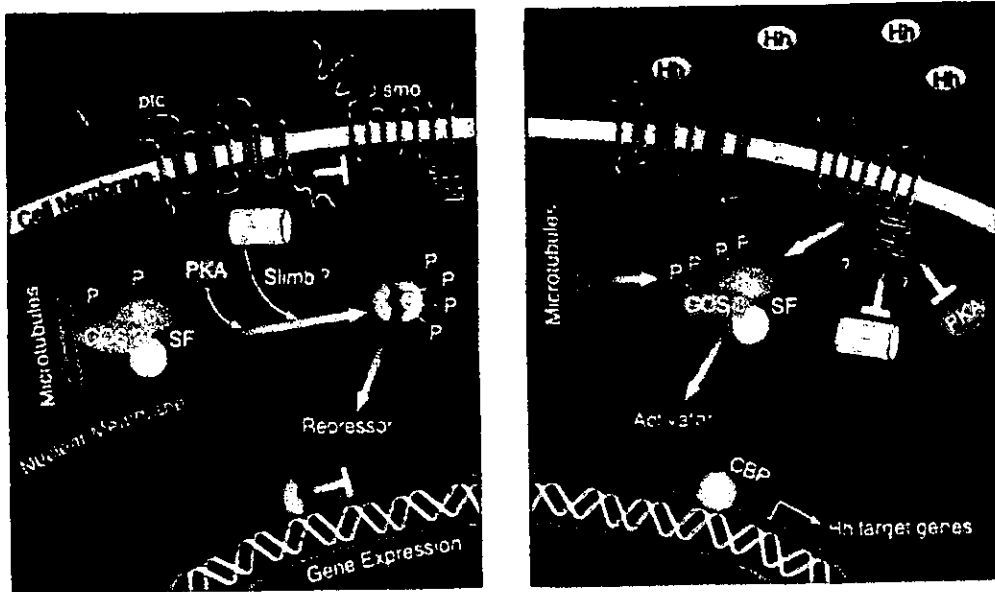


Fig. 4 **Transducción de hh en Drosophila.** (izq.) En ausencia de hh, Ptc interactúa con el transductor transmembranal Smo previniendo la activación de los genes blancos de Hh. Por otro lado, el factor transcripcional Ci (ci-155Kd) forma un complejo unido a los microtúbulos con Cos-2, Fu y Su(Fu), y es convertido en su forma represora (ci-75Kd) al ser fosforilado por la PKA. (der.) Cuando Hh se une a Ptc, se transduce la señal por medio de Smo. De esta manera Hh inhibe la proteólisis de Ci y promueve la disociación del complejo Cos-2/Fu/Su(fu)/ci-155 de los microtúbulos. Ci-155 se convierte en un activador transcripcional en asociación con CBP e induce la transcripción de los genes blanco de Hh (Tomado de Murone, M. et al 1999).

Estudios del patrón de expresión de los tres Glis, Hnf3- β y Shh durante el desarrollo embrionario del ratón muestran que, a los 8.5dpc cuando el tubo neural comienza a invaginarse, los 3 genes Glis se expresan en toda la placa neural, excepto que Gli3 no se expresa en la línea media posterior y ninguno de los 3 en la región rostral (Lee et al, 1997; Ruiz i Altaba, 1998). Hnf3- β se expresa en las células de la línea media a partir de la inducción de la placa del piso por la notocorda (que también lo expresa) mientras que Shh en este estadio sólo se expresa en la notocorda. Con el comienzo de la expresión de Shh en la placa del piso a los 9.5dpc, cuando el tubo neural ya se encuentra cerrado, la expresión de Gli1 se restringe a la zona ventricular (ZV) ventral adyacente al área de expresión de Shh, mientras que Gli2 y Gli3 se expresan en la ZV dorsal. Adicionalmente Gli2 conserva niveles bajos de expresión en la ZV ventral que sobrelapa con la presencia de los transcritos de Gli1 (Ruiz i Altaba, 1997, 1998). En este momento, Hnf3- β se

expresa en la placa del piso y en un grupo de células adyacentes a ésta y la expresión de Shh en la notocorda se mantiene.

La expresión de los genes *Glis* en diferentes tejidos embrionarios en desarrollo (como las extremidades y el sistema nervioso del ratón, así como durante el desarrollo temprano de *Drosophila*) parece seguir reglas similares. Una vez que se establece una fuente de producción de Shh, los genes *Glis* dejan de expresarse en estas células y entonces la expresión de *Gli1* se limita a las zonas adyacentes. Esto es consistente con el rol de *Gli1* como mediador transcripcional de la señal de Shh. Por otro lado, los transcritos de *Gli3* se encuentran en células situadas en el lado opuesto al centro señalizador que secreta Shh, sugiriendo que su función es principalmente la de contrarrestar esta señal y limitar su rango de acción, además de que pudiera estar involucrado en otras vías de señalización independientes de Shh. La expresión de *Gli2* está más difundida, y aunque posee una tendencia similar a la de *Gli3* muy evidente, existen algunas regiones en donde su expresión se sobrelapa con la de *Gli1*. Dado lo anterior se considera que los genes *Gli* subdividen el tejido en diferentes dominios (revisado por Theil, et al., 1999).

Algunos datos funcionales sugieren que *Gli1* y *Gli2* pudieran actuar principalmente como mediadores positivos de la señal de Shh mientras que *Gli3* pudiera tener un rol similar a *Ci-75* como represor pero, como ya se mencionó anteriormente, recientemente se ha encontrado que cada uno de estos factores posee la capacidad de actuar como activador o represor dependiendo del tipo celular analizado (Ruiz i Altaba, 1999; Sasaki et al., 1999). Ratones mutantes que no poseen alelos funcionales de *Gli1* son completamente viables y no poseen defectos obvios, lo que sugiere que los tres *Glis* de mamíferos juegan roles redundantes. Los ratones que carecen de ambos alelos de *Gli2* mueren al nacer, no desarrollan la placa del piso pero sí poseen motoneuronas (Matise et al., 1998; Ding et al., 1998), sugiriendo que *Gli2* está implicado en la transducción de la señal de Shh sólo en donde ésta actúa a concentraciones altas, es decir, en la placa del piso y no en la región ventro-lateral del tubo neural en donde se generan las neuronas

motoras. Los embriones *Gli2*^{-/-} de manera similar al ratón mutante *extra toes*, que tiene una deleción en el extremo 3' del gen *Gli3*, presentan daños esqueléticos severos (Mo et al., 1997). Estos datos demuestran su relevancia también durante los procesos de desarrollo en estas estructuras. Los fenotipos anteriores (*Gli2*^{-/-}, y *Gli3*^{-/-}) sugieren una probable acción sinergista de estos dos genes durante el desarrollo esquelético embrionario, sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que durante el desarrollo del sistema nervioso sus roles sean diferentes.

ANTECEDENTES

Sonic Hedgehog durante el desarrollo del SNC

La participación de Shh en el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) se extiende a todo lo largo del eje A-P del tubo neural durante diferentes estadios. Como ya se mencionó anteriormente, su expresión se localiza inicialmente en la notocorda y después en la región ventral del tubo neural. Finalmente es ahí donde es responsable de la diferenciación temprana de la placa del piso y posteriormente de fenotipos neuronales ventrales.

El rol ventralizante de Shh se describió originalmente por su acción a nivel de la médula espinal en donde es el responsable de la diferenciación de los tres tipos celulares ventrales que, como se mencionó en la introducción, son las células de la placa del piso, las motoneuronas y las interneuronas ventrales (Placzek et al., 1990, 1991; van Straaten et al., 1988; Yamada et al., 1991, 1993). El papel de Shh como factor ventralizante se demostró una vez más cuando al expresarlo de manera ectópica en la parte dorsal del tubo neural fue capaz de inducir la expresión de Hnf3 β (Echelard et al., 1993; Roelink et al., 1994). Por otro lado, en el cerebro medio, experimentos 'in vivo' o 'in vitro' han demostrado que Shh también participa en generar la diversidad neuronal en la región ventral, que incluye la aparición de neuronas dopaminérgicas (Hynes et al., 1995a; Wang et al., 1995), mientras que cuando se utilizan explantes de romboencéfalo rostral ventral (Yamada et al., 1991), Shh induce la diferenciación de neuronas serotoninérgicas. Es interesante comentar que en estas dos últimas regiones es donde se encuentran enriquecidas estas poblaciones neuronales 'in vivo'. Además de la presencia de estos fenotipos, Shh induce en los mismos explantes de la región media ventral, el incremento en el área de expresión de Hnf3 β (Hynes et al., 1995b). Finalmente se encontró que Shh induce diferenciación neuronal ventral en tejido proveniente de regiones del cerebro anterior como el telencéfalo y diencefalo en donde provoca un aumento de las poblaciones celulares que caracterizan a ambas regiones 'in

vivo': Isl1+/SC1-/Lim1- y Isl1+/SC1-/Lim1+ respectivamente (Ericson et al., 1995). Adicionalmente a los efectos de Shh como inductor de diferenciación neuronal, se le atribuye la inducción de oligodendrocitos (Pringle et al., 1996; Poncet et al., 1996), que es otro linaje celular presente en el SNC adyacente a la placa del piso (Noll and Miller, 1993; Yu et al, 1994).

Las evidencias anteriores indican que el espectro de participación de Shh en el SNC es amplio, caracterizándose por ser un 'factor ventralizante'. Pero dado que el fenotipo neural inducido por Shh varía de acuerdo a la región ventral del tubo neural con la cual se trabaje, el repertorio de destinos que puede asumir un progenitor en respuesta a Shh parece depender de otras moléculas adicionales presentes a lo largo del eje A-P, como podrían ser factores extracelulares o factores transcripcionales específicos expresados por el precursor en un momento dado. Existen datos que apoyan fuertemente esta idea; por ejemplo, se demostró que el Shh secretado por la notocorda junto con el factor de crecimiento de fibroblastos-8 (FGF8) producido localmente en la frontera entre el cerebro medio y el cerebro anterior inducen la diferenciación de neuronas dopaminérgicas, y que cuando en la misma intersección esta expresión es precedida por la producción del factor de crecimiento de fibroblastos-4 (FGF4), se genera el centro inductor de neuronas serotoninérgicas (Ye et al., 1998). Por otro lado se ha descrito que Shh actúa en combinación con Neurotrofina 3 (NT3) para inducir la expresión del marcador de motoneuronas Isl-1 en cultivos de baja densidad de precursores de médula espinal, aunado al hecho de que la inducción de Isl-1 en explantes mediada por Shh es bloqueada con un anticuerpo anti-NT3 (Dutton, et al, 1999). Anteriormente ya se había mostrado que NT3 se expresa en la región de diferenciación de las motoneuronas (Zhou, X., and Rush, R., 1994) y que éstas se pierden en ratones mutantes para NT3 (Kucera, J., et al, 1995). Estos datos apoyan fuertemente la cooperación de Shh con NT3 en la producción de las motoneuronas durante la diferenciación del SNC. Actualmente existen evidencias 'in vitro' de la acción sinérgica de Shh con otros factores de crecimiento durante la generación de fenotipos celulares ventrales, como en el caso del grupo

de Lee y colaboradores, que lograron inducir la producción de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas a partir de células troncales embrionarias con ayuda de la combinación de Shh y FGF8 (Lee et al., 2000). Estas evidencias apoyan la idea de que durante la diferenciación del SNC es necesaria la convergencia de diversas señales para dar origen a los tipos celulares característicos de cada región.

Además de su rol en el establecimiento de patrones de desarrollo y diferenciación neural en el SNC, algunos estudios han implicado a Shh en eventos de proliferación. Se encontró que cuando Shh se expresa de manera ectópica en el tubo neural dorsal los precursores neurales presentes en esta región proliferan más rápido de lo normal (Rowitch, et al, 1999). Además se demostró que Shh se requiere para la proliferación del precursor de las células granulares durante el desarrollo del cerebelo (Dahmane, N., and Ruiz i Altaba, A., 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999). Previamente se habían encontrado mutaciones en humanos de componentes de la vía de señalización por Shh que desencadenaban la generación de tumores y cáncer. Estas evidencias ya daban indicios de una correlación entre la señalización por Shh y la proliferación celular. Por ejemplo, mutaciones que inactivan Patched (Ptc) se han encontrado en algunos meduloblastomas (Raffel et al, 1997) y carcinomas de células basales, y ratones heterocigos para mutaciones de Patched en los que los genes blancos de Shh están potencialmente sobreexpresados, desarrollan tumores cerebelares (Goodrich et al 1997). Por otro lado se han observado efectos mitogénicos de Shh en diversos tejidos durante el desarrollo del ratón (Bellusci et al., 1997; Fan and Tessier-Lavigne, 1994; Jensen and Wallace, 1997), del pollo (Duprez et al, 1998) y de *Drosophila* (Forbes et al., 1996), y que la expresión ectópica de Shh (Echelard et al., 1993), el efector positivo Gli1 (Hynes et al 1997) o genes que activan los blancos de Shh, resulta en hiperplasia del SNC embrionario.

Entonces, en diferentes contextos biológicos, Shh puede controlar el destino y la proliferación celular actuando como señal instructiva o selectiva dando como resultado final el incremento neto de una población celular con respecto a

otra. Pero dado que la propagación de un grupo de precursores en especial puede generar también cambios en la proporción de los diferentes fenotipos celulares, y la sobrevivencia de cierta población de precursores puede confundirse con proliferación celular en un contexto dado, definir el rol primario de Shh resulta un reto muy importante a vencer.

La mayoría de las evidencias antes mencionadas en donde se caracteriza a Shh como inductor de fenotipos ventrales en el tubo neural están basadas en experimentos hechos con explantes de tejido en donde, cabe mencionar, el porcentaje de diferenciación obtenido es muy bajo. Este sistema permite conservar el entorno celular apropiado para el desarrollo normal del tejido pero, dado que es un sistema altamente heterogéneo, no permite evaluar si Shh actúa directamente sobre las células precursoras que darán origen a los distintos fenotipos celulares o si actúa sobre células vecinas responsables a su vez de generar la señal que induzca dichos fenotipos. Por este motivo, actualmente no se conoce la respuesta celular promovida por Shh y demás moléculas participantes, al producir los efectos biológicos descritos anteriormente. La complejidad de los sistemas de estudio actuales obliga a buscar sistemas menos heterogéneos en los que se puedan manipular fácilmente variables de interés (como factores de crecimiento, densidad celular, población de estudio, etc.) para así poder conocer la respuesta celular mediada por Shh sobre su célula blanco, además de poder aumentar el porcentaje de células que responden al estímulo.

Precursoras neurales

Las células que constituyen el sistema nervioso central (SNC) surgen de células precursoras neurales (CPN) originadas a lo largo del eje anteroposterior del embrión que constituye el neuroepitelio. Actualmente se postula que estos precursores pudieran ser capaces de generar todos los tipos celulares del SNC (McKay, 1997). Estas CPN proliferan y se determinan, restringiendo así su potencial hacia el linaje glial o neuronal durante su desarrollo (Gage et al, 1995). En

el proceso de determinación se generan células precursoras más avanzadas en el desarrollo pero todavía intermedias en el proceso de diferenciación terminal, conservándose, según se ha observado recientemente, las CPN tempranas hasta etapas adultas. En los últimos años se ha mostrado un gran interés por aislar, expandir y caracterizar dichas CPN ya que constituyen una gran herramienta para el estudio de la proliferación, determinación y diferenciación de las células del SNC. Gracias a esto, se han identificado diversos factores de crecimiento involucrados en la proliferación y supervivencia de las CPN en condiciones 'in vitro' (Reynolds et al, 1992; Vescovi et al, 1993). El estudio de los factores de crecimiento que participan en el desarrollo de estos precursores permite utilizarlos a nuestra conveniencia, manteniendo al mayor número de variables constante en el cultivo mientras manipulamos exclusivamente las que deseamos para dirigir su destino. Dentro de dichos factores, se encontró que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) es capaz de expandir células precursoras neurales con la capacidad de diferenciar a neurona o glia (Fisher et al, 1997; Kilpatrick et al, 1995; Reynolds et al, 1992).

En particular, en nuestro grupo de trabajo se logró estimular la proliferación de CPN del mesencéfalo embrionario de ratón con EGF y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Santa-Olalla and Covarrubias, 1995a). De esta manera se estableció un protocolo que permite la expansión de CPN en cultivo con ayuda de estos factores que promueven su proliferación. Dicho sistema experimental está constituido por una población enriquecida de precursores neurales capaces de proliferar generando estructuras clonales conocidas como neuroesferas (ver metodología). Este protocolo es de gran utilidad para evaluar la respuesta de las CPNs a diferentes factores extracelulares, contribuyendo de esta manera, al estudio de la restricción del linaje de las células neurales. Se sabe que estos progenitores expandidos con EGF son muy tempranos en el desarrollo, ya que poseen la capacidad de dar origen a los dos linajes del SN, el neuronal y el glial (Santa-Olalla and Covarrubias, 1995a). Además son capaces de generar distintos fenotipos neuronales terminales como el dopaminérgico y el gabaérgico. En el caso

de la diferenciación dopaminérgica parece ser aleatoria, lo que sugiere que son necesarias señales inductivas o selectivas para la generación de este fenotipo (Santa-Olalla and Covarrubias, 1995b) y que el factor involucrado en tal proceso pudiera ser Shh por sus efectos antes mencionados.

JUSTIFICACIÓN

Sabemos que Shh es el morfógeno involucrado en el establecimiento del patrón ventro-dorsal durante el desarrollo del SNC y que es capaz de dar origen a los diferentes fenotipos ventrales presentes a todo lo largo del eje antero-posterior del tubo neural. Por lo tanto el estudio de sus efectos sobre precursores neurales resulta de gran interés y constituye una contribución importante a la caracterización del rol de Shh durante el desarrollo del SNC. En el laboratorio contamos con un sistema experimental enriquecido en CPN muy tempranas que son capaces de generar ambos linajes celulares que conforman el SN además de diferentes fenotipos neuronales terminales, entre los que se encuentra el dopaminérgico que parece necesitar de una señal inductiva para su establecimiento, que pudiera ser Shh. Dado lo anterior creemos que los precursores neurales expandidos con EGF *in vitro* presentes en nuestro sistema serán capaces de responder a Shh. Al mismo tiempo sabemos que el contar con este sistema más homogéneo que el tejido completo nos permitirá evaluar de manera más directa la acción de Shh sobre los precursores neurales, conocer a la célula responsiva y caracterizar su respuesta.

de la diferenciación dopaminérgica parece ser aleatoria, lo que sugiere que son necesarias señales inductivas o selectivas para la generación de este fenotipo (Santa-Olalla and Covarrubias, 1995b) y que el factor involucrado en tal proceso pudiera ser Shh por sus efectos antes mencionados.

JUSTIFICACIÓN

Sabemos que Shh es el morfógeno involucrado en el establecimiento del patrón ventro-dorsal durante el desarrollo del SNC y que es capaz de dar origen a los diferentes fenotipos ventrales presentes a todo lo largo del eje antero-posterior del tubo neural. Por lo tanto el estudio de sus efectos sobre precursores neurales resulta de gran interés y constituye una contribución importante a la caracterización del rol de Shh durante el desarrollo del SNC. En el laboratorio contamos con un sistema experimental enriquecido en CPN muy tempranas que son capaces de generar ambos linajes celulares que conforman el SN además de diferentes fenotipos neuronales terminales, entre los que se encuentra el dopaminérgico que parece necesitar de una señal inductiva para su establecimiento, que pudiera ser Shh. Dado lo anterior creemos que los precursores neurales expandidos con EGF *in vitro* presentes en nuestro sistema serán capaces de responder a Shh. Al mismo tiempo sabemos que el contar con este sistema más homogéneo que el tejido completo nos permitirá evaluar de manera más directa la acción de Shh sobre los precursores neurales, conocer a la célula responsiva y caracterizar su respuesta.

HIPÓTESIS

- Los precursores neurales expandidos con EGF *in vitro* son capaces de responder a Shh.

OBJETIVOS

- Evaluar si la población de precursores neurales expandidos con EGF es capaz de activar la ruta de transducción caracterizada de Shh.
- Determinar los efectos combinados de Shh con EGF y bFGF en la expresión de marcadores ventrales.

MATERIAL BIOLÓGICO

- La cepa de ratones utilizada fue la *CD1* obtenida del Bioterio del IBT.
- Los factores de crecimiento *EGF* y *bFGF* fueron obtenidos de **Gibco BRL**. El factor *N-Shh* nos lo proporcionó **Ontogeny**.
- Los Plásmidos utilizados para la transfección fueron el pRK5 y el pRK5-Shh
- La cepa de *E. Coli* fue la *dh5 α* .
- Las líneas celulares utilizadas fueron la **293T** de riñón de mono y la línea pluripotente de fibroblastos de ratón **C3H10T1/2**.

SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

SHH 1	5' CGG-CAG-ATA-TGA-AGG-GAA-GAT-CA	23 bases
SHH 2	5' CGG-AGT-TCT-CTG-CTT-TCA-CAG-AA	23 bases
Hnf3 β 1	5' AAG-CGA-GCT-AAA-GGG-AGC-ACC-TG	23 bases
Hnf3 β 2	5' CCT-GGA-GTA-CAC-TCC-TTG-GTA-GTA	24 bases
GLI1-1	5' GCT-GGA-TAT-GAT-GGT-TGG-CAA-GTG	24 bases
GLI1-2	5' GGT-CCG-ATT-CTG-GTG-CTT-GGC-G	21 bases
GLI2-1	5' GCC-TAC-CCA-ACT-CAG-CAG-CAG-TA	23 bases
GLI3-1	5' AAG-ACA-GGA-AA \bar{G} -CTG-GCT-CGT-TCT	24 bases
GLI3-2	5' TGT-GTT-TGT-GGT-CCT-CCT-TGC-CTA	24 bases
SMO 1	5' AGT-GCC-ACC-AGA-AGA-ACA-AGC-CAA	24 bases
SMO 2	5' GCC-TCC-ATT-AGG-TTA-GTG-CGG-GA	23 bases
PTC1-1	5' CCG-GAC-CGG-GAC-TAT-CTG-CAC-C	22 bases
PTC1-2	5' TTT-GCC-CCT-TCC-CAG-AAG-CAG-TC	23 bases
HPRT 1	5' CCT-GCT-GGA-TTA-CAT-TAA-AGC-ACT-G	25 bases
HPRT 2	5' GTC-AAG-GGC-ATA-TCC-AAC-AAC-AAA-C	25 bases

METODOLOGÍA

DISECCIÓN Y CULTIVO DE REGIÓN MESENCEFÁLICA ROSTRAL

Preparar los siguientes materiales y reactivos antes de comenzar como se indica en el Apéndice I:

- Etanol 96%
- Gasas estériles
- Solución salina I estéril
- Medio D-MEM con suero
- Medio Definido
- Azul de tripano 0.4%
- Poli-D lisina 10 μ g/ml
- Tripsina 0.1%
- Medio definido con albúmina 1mg/ml

Realizar todo el procedimiento bajo la campana de flujo laminar a partir del paso 7

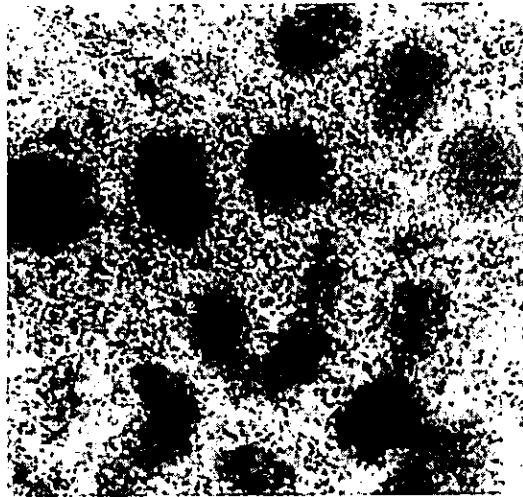
1. Esterilizar por inmersión en etanol al 96% todos los instrumentos de disección durante 30 minutos antes de iniciar el cultivo y dejar secar sobre gasa estéril antes de utilizarlos. Antes de iniciar la disección aplicar 0.5ml de poli-D lisina en cada uno de los pozos de las cajas de cultivo (multipozos de 24), dejar entre 2 y 4 horas a temperatura ambiente, pasado este tiempo retirar la poli-D lisina y enjuagar 2 veces con un volumen de solución salina estéril o medio D-MEM.
2. Sacrificar la ratona embarazada por dislocación cervical, realizarlo a la edad gestacional requerida (13.5 dpc).
3. Bañar el abdomen con etanol al 95%.

4. Realizar disección por planos, retirar los cuernos uterinos y colocarlos en una caja Petri estéril.
5. En el cuarto de precultivo, remover cada uno de los embriones del útero, retirar el saco amniótico y colocarlos en una caja Petri de 100mm de diámetro en 30ml de sol. salina I sobre hielo de agua.
6. Bajo un microscopio estereoscópico de disección, disectar la región Mesencefálica Rostral, para ello se realizan los siguientes pasos en 4 ml de Sol. Salina I fría en cajas de Petri de 35mm:
 - I. Tomando como punto de referencia la copa óptica, realizar un corte transversal ligeramente por arriba de ella hasta la primer bifurcación de la carotida externa. A partir de este punto realizar un corte longitudinal a la altura del primordio ótico (tener cuidado en la intersección de estos cortes ya que la flexura pontina es muy prominente). Retirar completamente el hocico del feto, y realizar un corte a la altura del hombro para desprender la cabeza del resto del cuerpo.
 - II. Exponer el Sistema Nervioso Central (SNC) realizando disección de la piel y cráneo con pinzas de disección número 5, iniciar la separación por la región telencefálica, la disección debe ir en forma progresiva sujetando con una pinza y rasgando con la otra. Los cortes realizados en el paso anterior dejan demasiado tejido no neural en el mesencéfalo y flexura pontina, sin embargo, el daño sobre el tejido es mínimo, en estas regiones es posible ayudar la disección cerrando la punta de la pinza y abriéndola en los lugares de las adherencias. Una vez expuestas todas las vesículas cerebrales, se rasga el techo ependimario (roof plate) y se depositan en otra caja petri de 35mm con 4ml de sol. Salina I fría, mientras se realiza el mismo procedimiento para todos los fetos, (cambiar la sol. Salina cada 4 embriones).

- III. Realizar cortes con tijeras para separar el mesencéfalo rostral.
- IV. Retirar las meninges con pinzas finas, una vez rasgadas longitudinalmente se retiran fácilmente, colocar el tejido disectado en otra caja de Petri.
7. Colocar dentro de tubos falcon de 15 ml el tejido disectado en 3 ml de sol. de tripsina durante 15 min. con agitación gentil ocasional (aproximadamente cada 5 minutos). Para detener la actividad de la tripsina agregar 3 ml de medio con 10% de suero.
 8. Realizar dispersión mecánica, ayudado con una pipeta de 5 ml se pasa varias veces (30 veces), se dejan sedimentar los trozos más grandes durante 10 min., se retira el medio con las células ya disgregadas; al resto del tejido se agrega 1 ml de medio con suero y se dispersan las células con ayuda de una pipeta Pasteur cuya punta se encuentre redondeada (aproximadamente 20 pases), se continúa la dispersión hasta que no se aprecian fragmentos de tejido, se deja sedimentar 5 min. por segunda vez y finalmente se vuelve a tomar el medio con las células ya disgregadas y se pasa al primer tubo con otra pipeta Pasteur.
 9. Centrifugar las células a 800g durante 5 minutos en centrífuga de mesa.
 10. Resuspender la pastilla celular en 5 ml de medio de cultivo y estimar la viabilidad celular por medio de la tinción con azul de tripano (a 10 μ l de células agregar 10 μ l de colorante, incubar durante 5 min. a 37°C), colocar 10 μ l de los 20 en la cámara de Neubauer, el valor se multiplica por 20,000 con lo que se obtiene un total de células por ml.
 11. Una vez conocido el número de células se resuspende en el volumen necesario para alcanzar la densidad de un millón por ml. Colocando 500,000 células por pozo de 16mm (cajas de multipozo de 24).
 12. Incubar en 0.5ml de medio definido a 37°C con 5% de CO₂ durante 1 hora y después agregar el factor de crecimiento deseado resuspendido en medio

definido con albúmina. Incubar en las mismás condiciones durante todo el cultivo.

13. Cambiar el medio cada 3 días.



Neurosferas generadas en un cultivo primario de células de mesencéfalo ventral embrionario de 13.5dpc en presencia de EGF a 100ng/ml durante 8 días. Cada una de estas estructuras representa un precursor neural que fue capás de proliferar en respuesta a EGF.

SUBCULTIVO DE PRECURSORES NEURALES

Preparar los siguientes materiales y reactivos antes de comenzar como se indica en el Apéndice I:

- Etanol 96%
- Gasas estériles
- Medio Definido
- Inhibidor de tripsina 1mg/ml
- Azul de tripano 0.4%
- Poli-D lisina 10µg/ml
- Tripsina 0.025%
- Medio definido con albúmina 1mg/ml

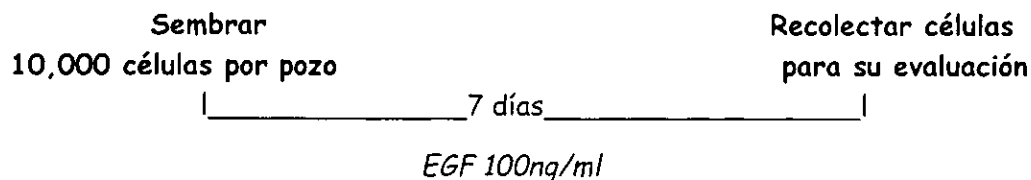
Realizar todo el procedimiento bajo la campana de flujo laminar a partir del paso 5.

1. Esterilizar por inmersión en etanol al 96% un par de pinzas de disección del número 5 durante 30 minutos antes de iniciar el cultivo y dejar secar sobre gasa estéril antes de utilizarlos. Antes de iniciar la toma de colonias, aplicar 0.5ml de poli-D lisina en cada uno de los pozos de las cajas de cultivo (multipozos de 24), dejar entre 2 y 4 horas a temperatura ambiente, pasado este tiempo retirar la poli-D lisina y enjuagar 2 veces con un volumen de solución salina estéril o medio D-MEM.
2. En una caja de Petri estéril, colocar 100 μ l de medio definido con EGF 100ng/ml por cada grupo de colonias a recolectar. Dejar equilibrando el medio en la incubadora
3. Mientras tanto, bajo un microscopio estereoscópico despegar las colonias formadas con EGF en el cultivo primario 1 a 1 con mucho cuidado para no arrastrar monocapa. Es importante que la caja de cultivo no esté mucho tiempo fuera de la incubadora (máximo 1hr), por lo tanto es bueno tener varias cajas para poder alternarlas. Aspirar con pipeta Gilson las colonias despegadas y colocarlas en la gota de medio de la caja de Petri.
4. Ya que todas las colonias deseadas están en la gota de medio en la caja de petri, aspirarlas con una punta de pipeta Gilson de 20 μ l y colocarlas en una gota de 100 μ l de tripsina en la misma caja. Incubarlas a 37°C durante 10 minutos.
5. Agregar 100 μ l de inhibidor de tripsina, subir y bajar 30 veces con pipeta Gilson hasta que se disgreguen las colonias (es importante monitorearlas bajo el microscopio invertido durante la disgregación).
6. Se pasa el volumen total a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml que debe contener previamente 400 μ l de medio. Se lava la caja 2 veces con este medio y se centrifuga a 400g por 5 minutos.

7. En este paso es muy probable que no se vea el pellet, por lo tanto es muy importante tener mucho cuidado al eliminar el sobrenadante con la pipeta gilson de 1 ml.
8. Resuspender el pellet en 300 μ l de medio fresco. Subir y bajar 20 veces.
9. Tomar 10 μ l y agregar a un tubo con 10 μ l de colorante (azul de tripano) a temperatura ambiente. Tomar 10 de los 20 μ l y colocarlos en la cámara de Neubauer, calcular viabilidad celular y diluir a la concentración deseada.
10. Colocar en las cajas de 24 pozos 10,000 células en un volumen final de 500 μ l de medio por pozo. Agregar factores de crecimiento deseados e incubar a 37°C con 5% de CO₂. Cambiar el medio cada 4 días.

Condiciones de proliferación en subcultivo

11. Sembrar 10,000 células por pozo en un volumen total de 500 μ l de medio definido con EGF 100ng/ml durante 7 días, al término de los cuales se cuentan las colonias y/o se recolectan las células para purificar su RNA.



Condiciones de diferenciación en subcultivo

12. Sembrar 10,000 células por pozo en un volumen total de 500 μ l de medio definido con EGF 100ng/ml durante 7 días , al término de los cuales, el pozo se lava 3 veces con medio definido (teniendo mucho cuidado porque las colonias se desprenden con facilidad) para eliminar el EGF. A partir de entonces se añade bFGF, bFGF + Shh, Shh (a la concentración deseada), o sólo medio definido. Las

células en esta condición se recolectan a partir de 1 y hasta 24 horas después de aplicada la condición dependiendo del experimento.

Sembrar 10,000 células por pozo	3 lavados con medio definido	Recolectar células para su evaluación
_____ 7 días _____	_____ de 1-24hrs _____	
<i>EGF 100ng/ml</i>		<i>bFGF</i> ó <i>Shh</i> ó <i>bFGF + Shh</i> ó <i>Medio Definido</i>

EXTRACCIÓN DE RNA DE SUBCULTIVOS DE PRECURSORES NEURALES

Preparar soluciones y reactivos como se indica en el Apéndice II:

- Colocar la caja del subcultivo a procesar sobre hielo de agua, retirar el medio de cultivo y agregar inmediatamente 500µl de solución Urea/LiCl, lisar las células con 30 pases de pipeta Gilson. Pasar el homogenado a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml previamente enfriado, repetir el procedimiento con 500µl más de sol. Urea/LiCl realizando 15 pases. Dar vortex durante 2 minutos.
- Incubar a -20°C durante toda la noche.
- Centrifugar durante 10 minutos a 4°C a 10,000g en microfuga. Antes de centrifugar permitir que se descongelen perfectamente cada uno de los tubos, y dar vortex durante 15´´. Decantar el sobrenadante, colocar el tubo en forma invertida sobre un papel absorbente, secar el exceso de solución con isopo de algodón, realizar lo anterior sólo en la mitad superior del tubo eppendorf, NO LLEGAR MÁS ALLÁ DE DONDE INICIA LA REDUCCIÓN DEL TUBO, colocar el tubo en hielo de agua.
- Resuspender en 500µl de solución D recién preparada; dar vortex en dos ocasiones durante 30´´, agregar 1/10 (50µl) de acetato de sodio 2M pH4 y 1µl

de RNA de transferencia 10ug/ μ l (sólo cuando no se quiera cuantificar el RNA); dar vortex 5', agregar 500 μ l de fenol ácido (saturado en agua); dar vortex 2', agregar 2/10 del vol. inicial (100 μ l) de cloroformo/alcohol isoamílico; dar vortex 3'.

5. Incubar en hielo de agua 15 minutos. (AQUÍ SE FORMAN LAS DOS FASES).
6. Centrifugar 20 minutos a 4°C a 16,000g.
7. Tomar la fase acuosa y añadir 1 volumen de isopropanol frío, dar vortex 10'.
8. Precipitar a -70°C toda la noche o en hielo seco por 1 hora.
9. Centrifugar 20 minutos a 16,000g en microfuga a 4°C. Realizar este paso igual que el paso 3, aquí se aprecia fácilmente el pellet en el fondo del tubo.
10. Lavar el pellet con etanol al 70%, dar vortex 5', centrifugar 5' a 16,000g en microfuga a 4°C, decantar el etanol y retirar el exceso como en el paso 3.
11. Secar el pellet durante 5'.
12. Resuspender en 50 μ l de buffer 1X para DNAsa que contenga 10U de DNAsa libre de RNAsa. Por reacción son 43.87 μ l de agua para RNA, 5 μ l de buffer para DNAsa 10X y 0.25 μ l de DNAsa libre de RNAsa (Boheringer 40 U/ μ l). Dar vortex dos pulsos de 30'.
13. Incubar durante 30' a 37°C.
14. Inactivar reacción agregando 450 μ l de sol. D más 50 μ l de acetato de Sodio. Dar vortex 5' y precipitar con 500 μ l de isopropanol.
15. Incubar durante 1 hora a -70°C.
16. Centrifugar 10 minutos a 16,000g a 4°C en microfuga. Decantar sobrenadante y retirar exceso como en el paso 3.
17. Lavar el pellet con 500 μ l de etanol al 70% frío, centrifugar a máx. vel. en microfuga durante 5 minutos a 4°C. Decantar sobrenadante y retirar exceso como en el paso 3.
18. Secar 2 minutos en el 'savat', colocar los tubos en hielo y resuspender en 20 μ l de H₂O especial fría, dar vortex dos pulsos de 30' (cuando es de tejido, se resuspende en un volumen dependiendo del tamaño del pellet).
19. Leer Densidad Óptica a 260nm y calcular concentración como sigue:

Tomar 1 μ l de muestra +59 μ l H₂O en celda de cuarzo de 50 μ l. Leer DO260.

$DO260/16.66 \times 40\mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{concentración } \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

NOTA: Manejar los tubos en hielo después de la primera precipitación.

CUANTIFICACIÓN DE RNA con reactivo RIBOGREEN

R-11491 RiboGreen RNA quantitation reagent

Molecular Probes

Manejar todos los reactivos en hielo y con guantes. Revisar Apéndice III.

1. Preparar la solución RiboGreen, diluyendo una alícuota del concentrado 200 veces en TE para realizar el ensayo de '*alto rango*', y 2000 veces para el de '*bajo rango*'. Tomar en cuenta que se requieren 100 μ l por muestra y que siempre es preferible cuantificarlas por duplicado. **Mantener el reactivo RiboGreen protegido de la luz.**
2. Preparar al momento la solución de RNA estándar para realizar la curva control. Para la curva de '*alto rango*', preparar la solución a 2 μ g/ml en TE, y para la de '*bajo rango*' diluir esta última 20 veces a que quede a 100ng/ml.
3. Descongelar muestras, y mantenerlas a 4°C listas para tomar 1 μ l de cada una (en el caso de subcultivos de precursores neurales deben leerse con el ensayo de alto rango).
4. Mezclar el TE con cada una de las muestra de modo que el volumen final de cada una sea de 100 μ l. Esta mezcla se realiza directamente en las cajas de 96 pozos, en donde se realiza el ensayo. A la par se ponen las curvas estándar necesarias (de alto y/o bajo rango) según el ensayo que se desee realizar, siguiendo los volúmenes de las tablas siguientes:

Ensayo de *Alto Rango*Ensayo de *Bajo Rango*

TE (μ l)	RNA 2 μ g/ml (μ l)	RiboG. Diluido 200	Conc. Final de RNA	TE (μ l)	RNA 100ng/ml (μ l)	RiboG. Diluido 2000	Conc. Final de RNA
0	100	100	1 μ g/ml	0	100	100	50ng/ml
50	50	100	0.5 μ g/ml	50	50	100	25ng/ml
90	10	100	0.1 μ g/ml	90	10	100	5ng/ml
98	2	100	0.02 μ g/ml	98	2	100	1ng/ml
100	0	100	0	100	0	100	0

5. Agregar 100 μ l de solución RiboGreen a la dilución correspondiente dependiendo del tipo de ensayo a realizar (de alto y/o bajo rango), por muestra. Manejar en la oscuridad.
6. Mezclar perfectamente con la pipeta multicanal, subiendo y bajando aprox.10 veces.
7. Incubar de 2 a 5 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
8. Leer en citofluorómetro para leer placas, con los filtros que se utilizan para leer fluoresceína (Ex/Em: 500/525).
9. Corregir y graficar valores de fluorescencia de la curva estándar haciendo regresión lineal, y en base a la curva corregida, calcular la concentración de las muestras problema. Usar la fórmula $y=mx+b$.

ELECTROFORESIS DE RNA en geles de Urea ácido

Preparar las soluciones necesarias como se indica en el Apéndice IV.

Cantidades proporcionales para:

Reactivo 50ml 25ml 17ml 12.5ml

Agarosa	0.75gr	0.37gr	0.25gr	0.18gr
Urea 10M	30ml	15ml	10.2ml	7.5ml
Agua	15ml	7.5ml	5.1ml	3.7ml
Ácido cítrico	5ml	2.5ml	1.7ml	1.25ml

1. Lavar los vidrios, los separadores y el peine de 1.5mm de la cámara vertical Tall-Migthy, limpiar los vidrios perfectamente con alcohol sin tocarlos con las manos (usar guantes) y armar la cámara.
2. Pesarse la agarosa y agregar a la sol. de Urea y el agua en las proporciones correspondientes según la tabla anterior.
3. Licuar la agarosa en el horno de microondas sin que llegue a hervir la Urea (15' N.P. 90, 2' N.P. 10).
4. Dejar enfriar y agregar el volumen correspondiente de ácido cítrico.
5. Checar volumen y aforar al volumen final.
6. Colocar la cámara de manera horizontal en el cuarto frío (4°C) y agregar la agarosa con jeringa de 25ml (15ml de agarosa para gel de 1.5mm aprox.). Poner peine y mantener a 4°C por 20 minutos. No sobrepasar este tiempo porque la urea se cristaliza.
7. Una vez polimerizado el gel, quitar peine con mucho cuidado y poner una tira de papel wattman en la parte inferior del gel para que no se resbale.
8. Colocar el gel de manera vertical en la cámara con buffer de corrida 1X (ácido cítrico 25mM) evitando que queden burbujas en la parte inferior.
9. Preparar las muestras como sigue:

5µl de Urea 10M

5µl de buffer (de Urea 10M)

10µl de muestra (1µg de RNA)

10. Hervir las muestras 5 minutos y colocar en hielo.

11. Antes de cargar las muestras en el gel, lavar los pozos con buffer.
12. Correr el gel a 80volts durante aproximadamente 2 horas.
13. Teñir gel con bromuro de etidio

PURIFICACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

1. Lavar los vidrios, los separadores y el peine de 1.5mm de la cámara vertical Tall-Mighty. Limpiar los vidrios perfectamente con etanol 70% y montar cámara de manera horizontal. Mantener a temperatura ambiente.
2. Mezclar en un vaso de pp pequeño:

15ml de Acrilamida 20% / Urea 8M (tomarla con jeringa de 25ml)

75 μ l de persulfato de amonio al 10%

7.5 μ l de TEMED

3. Llenar la cámara con la mezcla con MUCHO CUIDADO para no permitir la formación de burbujas.
4. Dejar polimerizar durante 20 minutos aproximadamente.
5. Poner a correr el gel sin muestras con TBE 1X nuevo a 400volts durante 30'.
6. Mientras tanto preparar los oligos crudos como sigue:

150 μ l de oligo crudo más 30 μ l de *sample buffer*

7. Calentar las muestras a 65°C por 5 minutos y poner en hielo.
8. Antes de colocar las muestras en el gel, lavar los pozos con buffer.
9. Correr las muestras durante 2 horas a 400volts.
10. Al término de la corrida, cortar las bandas principales del oligo ayudándose de una placa de silica fluorescente y luz de UV de onda corta para visualizarlas.

11. Poner cada banda en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml y dejar eluyendo toda la noche a 37°C en aproximadamente 1.5ml de agua especial para RNA.
12. Al día siguiente concentrar los oligos con ayuda de un evaporador hasta que el volumen total sea de 100µl aprox. Resuspende las sales cristalizadas en el volumen restante.
13. Precipitar con 1-butanol (hasta llenar el tubo), dar vortex 30´´, centrifugar 5 min. a máxima velocidad en microfuga a temperatura ambiente. Eliminar la mayor parte del volumen del tubo con pipeta Gilson. NO DECANTAR, dejar aprox. 100µl en el tubo.
14. Agregar otro volumen de 1-butanol, dar vortex 30´´, centrifugar 5 min. y decantar el sobrenadante.
15. Lavar el pellet con etanol absoluto, dar vortex 30´´, centrifugar 3 min. a 10,000rpm. Realizar este paso 2 veces.
16. Resuspender en 50µl de H2O especial cada tubo. Leer DO a 260nm para calcular concentración y hacer dilución para dejar a la concentración deseada.

Tomar 1µl de muestra + 59µl de H2O. Leer DO260

$DO_{260}/16.66 \times 33\mu\text{g}/\mu\text{l} / 2 = \text{concentración } \mu\text{g}/\mu\text{l}$

PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR cDNA y RT-PCR de SUBCULTIVOS

1. Preparar mezcla para cDNA, tomando en cuenta los volúmenes por reacción como sigue:

H2O bidestilada estéril	6.5µl
Buffer RT (BRL) 5X	6µl
DTT 0.1M 10X	3µl
dNTPs 5mM	3µl
Oligo dT 0.5µg/µl	1µl
Transcriptasa Reversa (BRL) 200 U/µl	0.5µl

Volumen total de mezcla por reacción 20 μ l

2. Resuspender el RNA en 20 μ l de agua bidestilada estéril, dar dos pulsos de vortex a cada tubo durante 30 segundos, colocar en hielo.
3. Calentar la muestra de RNA a 65°C durante 5 min.
4. Colocar en hielo.
5. Centrifugar para bajar lo condensado en la tapa.
6. Tomar 10 μ l y agregar a los 20 μ l de mezcla para cDNA. En caso de cuantificar el RNA, homogenizar las cantidades de RNA de las diferentes muestras para hacer el cDNA y completar el volumen faltante con H₂O (cbp 10 μ l). Cuando el RNA proviene de tejido se toma 1 μ g.
7. Mezclar con vortex, centrifugar e incubar a 37°C durante 1 hora.
8. Al terminar la reacción puede guardarse la mezcla a 4°C o proceder inmediatamente con la reacción de PCR.
9. Preparar mezcla para PCR, tomando en cuenta los volúmenes por reacción como sigue:

H ₂ O bidestilada	37.5 μ l
Buffer Taq DNA polimerasa 10X	5 μ l
DNTPs 5mM	2 μ l
Oligonucleótido 1 (0.1 μ g/ml)	1 μ l
Oligonucleótido 2 (0.1 μ g/ml)	1 μ l
Taq DNA polimerasa 5 U/ μ l	0.5 μ l
Volumen total de mezcla por reacción	47 μ l

10. Tomar 3 μ l de cDNA (de los 30 μ l finales, paso 6) y agregar a los 47 μ l de mezcla para PCR.

11. Cubrir con 50 μ l de aceite mineral. Colocar en la máquina para PCR y programar el protocolo de ciclos y temperatura adecuado para cada par de oligonucleótidos utilizados.
12. Al terminar la reacción, correr 10 μ l de muestra + 2 μ l de buffer de muestra en gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X teñido con bromuro de etidio.

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA CADA MARCADOR

<i>Marcador</i>	<i>Par de oligos</i>	<i>Temperatura de amplificación</i>	<i>Tamaño del producto de amplificación</i>
Shh	SHH 1, SHH 2	92°x1' ,64°x1' , 72°x1' . 72°x10'	395 pb
Hnf3b	HNF3b1, HNF3b2	92°x1' ,64°x1' , 72°x1' . 72°x10'	400 pb
Gli1	GLI1-1, GLI1-2	92°x1' ,62°x1' , 72°x1' . 72°x10'	520 pb
Gli2	GLI2-1, GLI1-2	92°x1' ,60°x1' , 72°x1' . 72°x10'	613 pb
Gli3	GLI3-1, GLI3-2	92°x1' ,60°x1' , 72°x1' . 72°x10'	415 pb
Smo	SMO 1, SMO 2	92°x1' ,60°x1' , 72°x1' . 72°x10'	405 pb
Ptc1	PTC1-1, PTC1-2	92°x1' ,62°x1' , 72°x1' . 72°x10'	587 pb
HPRT	HPRT1, HPRT2	92°x1' ,57°x1' , 72°x1' . 72°x10'	353 pb

La identidad de los fragmentos amplificados fue corroborada por patrones de restricción. Datos no mostrados.

ELECTROPORACIÓN

Tener listas las soluciones que se indican en el Apéndice VI.

1. Poner las celdas para electroporación en hielo.
2. Preparar los tubos para la recuperación con 980 μ l de medio SOB + 10 μ l Mg 2M + 10 μ l glucosa 2M (vol. Total 1ml) c/u.
3. Diluir las ligaciones 1:2 (10 μ l de ligación + 20 μ l de agua) y calentarlas 10 minutos a 75°C (esto aumenta la eficiencia)
4. Descongelar en hielo una alícuota de células por cada electroporación a realizar.
5. Mezclar 3 μ l de la ligación diluida con las células y pasarlas inmediatamente a la celda, tratando de que no se formen burbujas y que las células queden bien repartidas en el fondo de la cubeta (darle unos golpecitos).
6. Prender el electroporador y apretar los botones "raise" y "lower" simultáneamente, deberá aparecer 1.8mV en el display.
7. Secar la cubeta y ponerla en el brazo del electroporador, empujar hasta que se sienta el tope.
8. Apretar los 2 botones rojos simultáneamente hasta que suene la chicharra.
9. INMEDIATAMENTE agregar a la celda el medio preparado en el punto 2, y se mezclan las células gentilmente 3 veces. Pasar el medio con las células al tubo, deslizando sobre la pared para que no se maltraten las células.
10. Poner a recuperar de 30 minutos a 1 hora a 37°C.
11. Platear 10 μ l y 100 μ l de células en cajas de medio sólido con antibiótico.
12. Dejar crecer ON a 37°C. Seleccionar y picar colonias separadas.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO A GRAN ESCALA

Preparar las soluciones indicadas en el Apéndice VII.

1. Sembrar una colonia de bacterias en 10ml de medio Luria con el antibiótico respectivo al gen de resistencia (10 μ l de ampicilina a 200 μ g/ μ l, 10 μ l de carbenicilina a 50 μ g/ml ó 10 μ l de kanamicina a 40 μ g/ μ l). Incubar por lo menos 10 horas a 37°C con agitación (2500rpm). NOTA: Si se hace "stock" de células con glicerol al 10%, se toman las células de este cultivo.
2. Inocular con 5 ml de cultivo "overnight" 1 litro de medio Luria que contenga antibiótico a 100 μ g/ml (ampicilina, kanamicina ó carbenicilina según sea el caso). Incubar de 12 a 14 horas a 37°C con agitación (2500rpm).
3. Dividir el litro de cultivo en 2 botellas para centrífuga de 500ml (asegurarse de que sellen bien), equilibrarlos con el mismo medio y centrifugar en la centrífuga Beckman en el rotor JA10 durante 9 minutos a 6000 rpm a 4°C.
4. Decantar el sobrenadante y resuspender pipeteando la pastilla (pellet) con 20ml de buffer P1 + 200 μ l de RNAsa (10mg/ml). Pasar a 4 tubos de plástico de 50ml para centrífuga (10ml por tubo) a temperatura ambiente.

POR CADA 1 DE LOS 4 TUBOS DE 50 ML:

5. Agregar 10 ml de Buffer P2, mezclar suavemente e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 10ml de buffer P3 frío, mezclar por inversión e incubar 20 minutos en hielo. Cada 5 minutos agitar cuidadosamente manteniendo en hielo.
7. Centrifugar a 4°C durante 30 minutos a 15,000rpm (rotor JA20 en la Beckman).
8. Tomar el sobrenadante, filtrarlo con gasa en una probeta de plástico y medirle el volumen.

9. Agregar 0.6 volúmenes (de sobrenadante) de isopropanol e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
10. Repartir el sobrenadante en tubos de 50ml para centrífuga, equilibrarlos y centrifugar 30 minutos a 9000 rpm en el rotor JA20 en la centrífuga Beckman a 4°C.
11. Resuspender cuidadosamente cada una de las pastillas en 2ml de TE + 20 μ l de RNAsa, mezclando suavemente hasta que se resuspenda totalmente. Colocar el volumen total en un tubo de plástico de 50ml para centrífuga (cuando se está purificando plásmido a partir de un cultivo de 500ml se pueden realizar las extracciones en tubos de polipropileno con capacidad de 15ml, en cuyo caso se hacen las extracciones con 4ml de fenol y 4ml de cloroformo).
12. Hacer dos extracciones con 8ml de fenol equilibrado a pH8 y 8ml de cloroformo. Agitar por inversión permitiendo que se mezclen bien ambas fases, centrifugar durante 5 minutos a 5000 rpm (rotorJA20) a 4°C. Tomar siempre la fase acuosa (superior).
13. Hacer una extracción con 8ml de cloroformo. Agitar por inversión permitiendo que se mezclen bien ambas fases, centrifugar durante 5 minutos a 5000 rpm (rotorJA20) a 4°C.
14. Tomar el sobrenadante y pasarlo a otro tubo de centrífuga de 50ml y añadir 0.2 volúmenes de NaCl 5M + 0.33 volúmenes de PEG 30% (preparado al momento). Incubar 2 horas a -70°C o toda la noche a -20°C. (Esta precipitación también se puede realizar en tubos de polipropileno en caso de que se tengan 4ml).
15. Centrifugar 20 minutos a 7000rpm a 4°C en el rotor JS-13.
16. Resuspender en 1.2ml de TE y poner 600ul en cada uno de 2 tubos epp. de 1.5ml.
17. Hacer una extracción con 600ul de cloroformo, mezclar por inversión durante 2 minutos, centrifugar a 14,000rpm a temp. ambiente durante 3 minutos.

18. Tomar la fase acuosa y repetir extracción como en el paso 17. (Aquí se puede leer la DO para estimar el rendimiento y poder prever el volumen final en el cual resuspender el DNA de acuerdo a la concentración deseada).
19. Agregar 20 μ l de Cloruro de sodio 5M y 1ml de etanol, por tubo.
20. Centrifugar 10 minutos a 14,000rpm en microfuga a 4°C
21. Lavar con etanol al 70% y centrifugar 10 minutos a 14,000rpm en microfuga. Realizar este lavado dos veces.
22. Decantar el etanol y secar en el savat (no dejar mucho tiempo), resuspender en 1ml de TE (cuando se trata de plásmidos para transfección se resuspenden en Agua bidestilada).

SUBCULTIVO DE LÍNEA CELULAR 293T

Preparar MEDIO COMPLETO como se indica en el Apéndice VIII.

1. Aspirar el medio viejo ayudándose con la bomba de vacío.
2. Despegar las células con 5ml de Medio Completo fresco con ayuda de una pipeta de 5ml. Subir y bajar 5 veces sin hacer espuma y colocarlas en un tubo de 15ml estéril con 5ml de Medio Completo. Si se recolectan varias, trabajar cada una por separado.
3. Subir y bajar la suspensión de células 20 veces con una pipeta de 10ml estéril cuidando de no hacer espuma.
4. Centrifugar a 400g en la centrífuga de mesa durante 5 minutos.
5. Retirar el sobrenadante con todo y la espuma que se haya formado. Usar bomba de vacío.
6. Resuspender el pellet en 1ml de medio fresco con la pipeta Gilson y subir y bajar la suspensión 30 veces. Agregar 4ml más de medio y hacer lo mismo con la pipeta de vidrio de 5ml.
7. Tomar 10 μ l, agregar 10 μ l de colorante azul de tripano a temperatura ambiente y contar en la cámara de Neubauer.

8. Calcular total de células: contar los 5 cuadrantes, dividir entre 5 y multiplicar por 20,000 = células/ml
9. Diluirlas a 1×10^6 células por ml.
10. Poner 9ml de medio fresco en una caja de 10mm + 1ml de suspensión de células para subcultivar.
11. Dar golpecitos a toda la orilla de la caja antes de dejarla en la incubadora para que las células se distribuyan de manera homogénea. Incubar a 37°C con 5% de CO_2 .
12. Subcultivar cada tercer día.

TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS 293T

Tener listos los reactivos que se indican en el Apéndice IX.

Día 1 Sembrar 1×10^6 células en 4 ml de medio completo por caja de 6mm.

Día 2 **NOTA IMPORTANTE:** *Todos los reactivos deberán estar a temperatura ambiente y el medio previamente equilibrado en la incubadora. En el caso del HBS 2X y el CaCl_2 deberán descongelarse alícuotas nuevas y usarse en el lapso de 1 semana.*

- Cambiar el medio a las cajas (4ml) e incubar 30 minutos a 37°C . Mientras tanto realizar lo siguiente por cada muestra:
- Mezclar en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml para 2.5 cajas:
 - 31.25 μl de CaCl_2 2M
 - 25 μg totales de DNA
 - H_2O estéril grado cultivo cbp 250 μl
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 250 μl de HBS 2X y mezclar con la pipeta.

- Incubar 2 minutos a 37°C.
- Agregar 200µl de la mezcla a cada una de 2 cajas con 1X10(6) células, distribuyendo lo mejor posible. Agitar la caja en todas direcciones. Incubar a 37°C con 5% deCO₂.

Día 3 Cambiar el medio (por 4ml de Medio Completo fresco) a las 17 horas después de la transfección. Esperar 5 horas aprox. para observar fluorescencia.

Día 4 Observar fluorescencia y/o recolectar sobrenadantes a las 24 horas después de haber realizado el último cambio de medio. Contar porcentaje de transfección.

Al recolectar sobrenadantes:

- Rotular los tubos perfectamente.
- Filtrarlos antes de hacer las alícuotas.
- Ponerle parafilm a cada tubo y guardarlos a -20°C.

SUBCULTIVO DE LÍNEA CELULAR 10T1/2

Para preparar soluciones referirse al Apéndice VIII.

1. Aspirar el medio viejo.
2. Lavar con 1ml de PBS 1X estéril una sola vez y aspirar con vacío.
3. Poner 1ml de tripsina al 0.25% e incubar a 37°C durante 5 minutos.
4. Agregar 4ml de medio completo para inactivar tripsina. Subir y bajar aprox. 8 veces con pipeta de 5ml y recuperar en un tubo de 15ml estéril.
5. Centrifugar a 400g durante 5 minutos.
6. Aspirar sobrenadante y resuspender en 1ml de medio completo con pipeta Gilson (hacer 20 pases). Agregar 4ml más de medio y subir y bajar 20 veces con pipeta de vidrio de 5ml.

7. Tomar 10 μ l, agregar 10 μ l de colorante azul de tripano a temperatura ambiente y contar en la cámara de Neubauer.
8. Calcular total de células: contar los 5 cuadrantes, dividir entre 5 y multiplicar por 20,000 = células/ml
9. Diluirlas a 1X10⁶ células/ml
10. Para subcultivar sembrar 1ml de células más 9ml de medio completo en caja de 10mm. Para hacer ensayo de actividad de sobrenadantes, sembrar 10,000 células por pozo en cajas de 24, en un volumen total de 500 μ l.
11. Dar golpecitos a toda la orilla de la caja antes de dejarla en la incubadora para que las células se distribuyan de manera homogénea. Incubar a 37°C con 5% de CO₂.
12. Subcultivar cada tercer día.

TINCIÓN PARA VER ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA EN MONOCAPA

(en cajas de 24 pozos)

Preparar los reactivos que se indican en el Apéndice X.

1. Aspirar el medio
2. Lavar con 500 μ l de PBS 1X pH7.3 dos veces. TENER MUCHO CUIDADO PORQUE SE DESPRENDE LA MONOCAPA: (Para lavar es muy recomendable deslizar el buffer por la pared del pozo inclinando ligeramente la caja hacia delante y bajando la punta lo más cerca del fondo sin tocar la monocapa. Para retirar cualquier solución del pozo se utiliza la pipeta Gilson y se inclina la caja de la misma manera).
3. Fijar con 500 μ l de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos.
4. Lavar con 500 μ l de PBS 1X tres veces.
5. Incubar 10 minutos con 500 μ l de buffer PA fresco.

6. Incubar con 400 μ l de solución de revelado en la oscuridad durante el tiempo que sea necesario cuidando que el control negativo permanezca sin teñirse, aprox. de 15 a 45 minutos.
7. Para parar la reacción lavar con 500 μ l de PBS 1X una vez.
8. Dejar con 500 μ l de PBS 1X a 4°C.

RESULTADOS

Los precursores neurales que se propagan con EGF expresan el receptor a *Sonic Hedgehog*, *Ptc*.

Un primer acercamiento para conocer si las células precursoras neurales propagados con EGF podrían responder a *Sonic Hedgehog* (Shh) consistió en investigar la presencia en estas células del RNA mensajero (RNAm) del receptor a Shh *Patched* (*Ptc*). El determinar los niveles de expresión de este RNAm, además, permitiría evaluar si existe respuesta de los precursores neurales a *Sonic Hedgehog*. Lo anterior fundamentado en observaciones en otros sistemas donde el gen de *Ptc* incrementa su transcripción en respuesta a Shh.

La detección del RNAm que codifica para *Ptc* se realizó en un subcultivo de precursores neurales. Éste consiste de un cultivo de células disgregadas obtenidas de neuroesferas generadas a partir de un cultivo primario de mesencéfalo de ratón, que fue incubado de manera continua con EGF por 7 días. Se usaron diferentes condiciones de cultivo para evaluar si el receptor se encuentra en el precursor proliferante que constituye la neuroesfera y/o en las células que migran de ésta, se adhieren al plato y diferencian. En la primera condición, llamada de proliferación, se utilizó EGF; aquí se generan las dos poblaciones de células, la que constituye la neuroesfera y la de células adheridas al plato. En una segunda condición en donde se empleó sólo bFGF, hay poca proliferación y por lo tanto sólo hay células adheridas provenientes de la neuroesfera primaria. Es preciso decir aquí que se conocen algunos efectos relacionados con la sobrevivencia del precursor que prolifera con EGF atribuidos a bFGF, por lo que se utilizó este factor para promover la permanencia de estas células en los protocolos empleados. La tercera y última condición fue la combinación de EGF más bFGF; en estas condiciones sabemos que la actividad proliferativa aumenta y pudiera acompañarse por un incremento en la

sobrevivencia de algunos tipos celulares. En la condición llamada '*tiempo cero*' del subcultivo está representada sólo la población que conforma la neuroesfera generada con EGF en el cultivo primario, antes del subcultivo. Al mismo tiempo quisimos evaluar si las células presentes en el cultivo eran capaces de responder a Shh aumentando la expresión de Ptc que, como se mencionó anteriormente, se sabe que se incrementa en respuesta al estímulo de Shh. Para tal efecto se utilizaron a la par las mismas condiciones de cultivo en combinación con Shh.

Al evaluar la presencia del mensajero de Ptc en el '*tiempo cero*', se encontró que desde antes del subcultivo, Ptc se expresa en las células que conforman la neuroesfera (fig.1 carril 1). La presencia del receptor de Shh sugiere que dichas células podrían responder a este factor. Al término de los 7 días de cultivo, se encontró que hubo expresión abundante de Ptc en todas las condiciones con EGF (fig.1 carriles 2,3,6 y 7), hecho que aunado a una observación previa (datos no mostrados, véase fig.4) de que en ausencia de EGF la expresión de Ptc disminuye, sugiere una regulación positiva de Ptc por EGF. En las condiciones con bFGF no se detectó Ptc (fig.1 carriles 4 y 5), pero como la recuperación de las células fue muy pobre debido a que no hay proliferación en el cultivo, el que no se haya detectado el RNAm de Ptc en dichas condiciones no es conclusivo. Así mismo, las distintas cantidades de RNA obtenidas en el experimento (a juzgar por las cantidades de HPRT) no permiten evaluar, de manera precisa, diferencias de expresión de Ptc entre las condiciones con y sin N-Shh (fig.1 comparar carriles 2-3, 4-5 y 6-7) por lo que aquí no pudimos concluir si hay respuesta a Shh, problema que se aborda más adelante. Cabe señalar que no se encontraron diferencias morfológicas entre las condiciones con y sin N-Shh que indicaran un efecto proliferativo y/o diferenciativo evidente causado por N-Shh. Con este hecho se concluyó que el criterio morfológico no permite evaluar si existe alguna respuesta a Shh en estas condiciones.

Detectar el RNAm del receptor a Shh en muestras obtenidas de las neuroesferas generadas con EGF en el cultivo primario (*tiempo cero*) nos indica que

hay células que podrían responder a Shh presentes en esta población. Además el hecho de que estas células expresen Ptc independientemente de la adición de Shh recombinante al cultivo, abre la posibilidad de que exista Shh endógeno que regule su expresión. Es importante mencionar que detectamos niveles de expresión de Ptc por arriba de lo reportado para las células antes de la estimulación con Shh. Esto, de entrada, nos impide evaluar la inducción de Ptc por N-Shh y nos invita a pensar que Ptc pudiera estar regulado por EGF en nuestro sistema, activando o desreprimiendo su transcripción en el subcultivo. En suma, la presencia del receptor Ptc en las células de la neuroesfera sugiere que estas células podrían responder a *Sonic Hedgehog*. La comparación de los datos fué cualitativa, y este experimento fué preliminar en el desarrollo del proyecto.

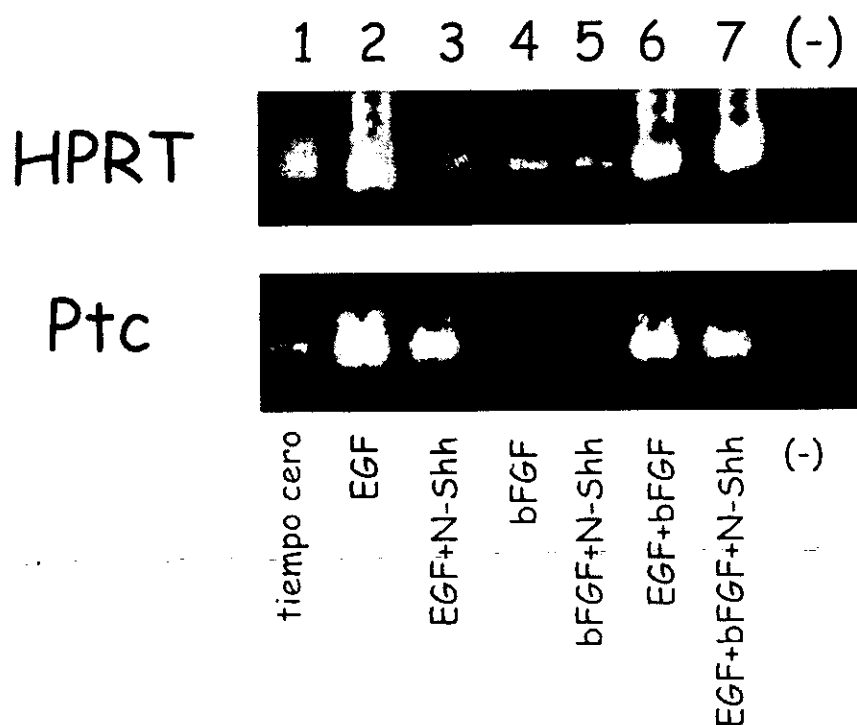


Fig. 1 **Detección del RNAm de Ptc en subcultivos de precursores neurales.** Se realizó un subcultivo de colonias generadas con EGF a partir de un cultivo primario (ver metodología), se sembraron 10,000 células por pozo y se mantuvieron por 7 días en cultivo con los factores correspondientes (N-Shh 100ng/ml, EGF 100ng/ml y bFGF 10ng/ml). Se recolectaron las células, se purificó el RNA y se realizó un RT-PCR a 40 ciclos. Se detectaron los RNAm de HPRT, mensajero de expresión constitutiva que se utilizó como indicador de la cantidad de

muestra empleada en la reacción, y el de Ptc, utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos (ver métodos). En el último carril, se muestra el control negativo de la reacción de PCR. La identidad de los fragmentos obtenidos se corroboró con el patrón de corte de DNA generado con enzimas de restricción, predicho gracias a las secuencias reportadas (datos no mostrados). Los productos de amplificación fueron del tamaño esperado, HPRT 353pares de bases (pb) y Ptc 587pb. Se muestra fotografía de un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. La figura representa datos de un sólo experimento.

EGF regula la expresión de Ptc de manera dosis dependiente

Para determinar si EGF regula los niveles de expresión de Ptc, se realizó una curva de dosis de EGF en un subcultivo de precursores neurales. Por otro lado, en vista de que la morfología no permitió detectar cambios provocados por Shh, se decidió evaluar también la respuesta, en los experimentos subsecuentes, midiendo los niveles en la expresión de los genes que codifican para las moléculas transductoras conocidas hasta el momento de la cascada encendida por Shh, y que se sabe, se modulan bajo su influencia. Se conoce, por el estudio en otros sistemas que, en respuesta a Shh, de manera paralela al incremento en la expresión de Ptc, se induce la expresión de los factores transcripcionales Gli1 y Gli2, el mismo Shh y algunos genes que codifican para factores de diferenciación como Hnf3 β , mientras que se reprime la expresión de Gli3. También se sabe que Smo, transductor membranal de la cascada, es indispensable para que Shh induzca una respuesta.

En muestras obtenidas de un subcultivo de precursores neurales que fue expuesto a diferentes dosis de EGF, no se detectó el RNAm de Ptc ni a los 40 ciclos de amplificación, cuando se utiliza 1ng/ml de EGF en el medio de cultivo (fig.2 carril 3). No obstante el RNAm de Ptc empieza a detectarse con 10ng/ml de EGF (fig.2 carriles 4-6) y aumenta con 100ng/ml (fig.2 carriles 7-9). En ninguna de las condiciones se detectó Gli1 ni Gli2, mientras que si se encontró el RNAm de Gli3 (fig.2). De estos resultados llama la atención no haber encontrado Gli1, siendo que Ptc si aparece en el sistema. Esto es porque en otros sistemas en desarrollo los

cambios en la expresión de Ptc y Gli1 siempre van acompañados, reflejo de la activación de la cascada de transducción inducida por Shh (Lee et al., 1997; Marigo et al., 1996b; Sasaki et al., 1997). Por otra parte también fue interesante encontrar el RNAm de Gli3, que se sabe tiene efectos inhibitorios en la cascada de Shh. En esta misma curva se encontró el RNAm de Smo, molécula indispensable para la transducción de la señal por Shh (fig.2 Smo) cuyos niveles disminuyeron con 100ng/ml de EGF. Finalmente el RNAm de Hnf3 β se indujo en forma significativa con 100 ng/ml de EGF (fig.2, detección a los 40 ciclos). También resalta de estos experimentos que Shh se exprese endógenamente, en particular a las dosis altas de EGF, en forma similar a Ptc.

De este experimento podemos concluir que las células presentes en el sistema expresan Smo y por lo tanto poseen este elemento indispensable para transducir la señal de Shh. También se demuestra que EGF regula la expresión de Ptc en nuestro sistema y se acompaña por los cambios en la expresión de Shh. Es importante hacer notar que no detectamos la expresión de Gli1 por lo tanto EGF no regula su expresión en estas condiciones. Por último, logramos detectar la expresión de Hnf3 β con la dosis más alta de EGF empleada. La comparación de los datos fué sólo semicuantitativa. La regulación de Ptc por EGF fué corroborada en experimentos posteriores aunque hubo variabilidad en el sistema.. Dado lo anterior en un futuro será necesario realizar mediciones cuantitativas del RNAm de Ptc.



Fig.2 Curva Dosis-Respuesta de EGF. Se realizó un subcultivo de las colonias obtenidas con EGF de un cultivo primario (ver metodología), se sembraron 10,000 células por pozo y se mantuvieron por 7 días en cultivo con diferentes dosis de EGF (0.1, 1, 10 y 100ng/ml). Se recolectaron las células, se purificó el RNA y se realizó RT-PCR de los diferentes marcadores tomando muestras a los 30, 35 y 40 ciclos para detectar diferencias de órdenes de magnitud. Cada muestra equivale a un carril y por lo tanto cada condición está representada por 3 carriles continuos. Se amplificaron los RNAs de los genes Ptc, Gli1, Gli2, Gli3, Smo, Hnf3 β y Shh. Para dicho efecto, se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos (ver métodos). La identidad de los fragmentos obtenidos se corroboró de manera similar a lo descrito en la fig.1. Los amplificados fueron del tamaño esperado: 353pb, Ptc 587pb, Gli1 520pb, Gli2 613pb, Gli3 415pb, Smo 405pb, Hnf3 β 400pb y Shh 395pb. En los carriles finales se muestran los controles negativo y positivo de la reacción de

PCR. Como molde para el control positivo se utilizó cDNA (DNA complementario) de cerebelo P4. Se muestra fotografía de un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. La figura representa datos de un sólo experimento.

Los precursores neurales propagados con EGF sobreviven en cultivos de alta densidad en ausencia de señal proliferativa.

Como se vió anteriormente, EGF regula la expresión de Ptc en nuestro sistema, hecho que no permite distinguir de manera clara los efectos de Shh sobre Ptc. Aunado a lo anterior sabemos que los precursores neurales propagados con EGF cuando se subcultivan en ausencia del factor de crecimiento tienden a morir. Se sabe que las células en cultivo necesitan de una gran variedad de factores solubles para sobrevivir, muchos de los cuales son producidos por ellas mismas. La importancia de estos factores para el crecimiento celular se ha demostrado en los casos en que ha sido necesario cultivar células a muy baja densidad e incluso células individuales (como en el caso de las clonaciones), en donde para solucionar el problema, se ha recurrido al uso de medio condicionado de otro cultivo, ya sea del mismo o de distinto tipo celular. El condicionamiento del medio, es decir que el medio adquiera todos los factores necesarios secretados por las mismas células a una concentración adecuada para el buen desarrollo del cultivo, depende de la densidad celular, por lo que entre mayor sea la densidad del cultivo, mejor será el condicionamiento del medio y menor la dependencia de factores de crecimiento adicionales al cultivo para la sobrevivencia celular. Tomando en cuenta lo anterior se ensayaron condiciones de cultivo en donde en ausencia de EGF, las células se mantuvieran viables para poder evaluar en ellas, el efecto de N-Shh.

Con las consideraciones anteriores en mente, se realizó un subcultivo de precursores neurales obtenidos de un cultivo primario, el cual se mantuvo durante 6 días en fase de proliferación con EGF. Es importante mencionar aquí que el número de células obtenido de las neuroesferas para realizar un subcultivo, es muy bajo (de

800 a 1200 células por colonia) si necesitamos analizar un gran número de condiciones sembrando a alta densidad desde un inicio, por tal motivo se decidió sembrar 10,000 células por pozo y dejar el cultivo durante un período de proliferación suficiente para incrementar la población. Al término de dicho tiempo, ya había formación de neuroesferas y células adheridas al plato. Este comportamiento resulta ventajoso ya que nos permite conservar las dos poblaciones que sabemos se generan en respuesta a EGF y que podrían responder a Shh. En este momento, se realizaron lavados para eliminar completamente la presencia de EGF y a partir de entonces (*tiempo cero*) se adicionó Sonic Hedhehog recombinante sólo o en combinación con bFGF por 24 horas, ya que como se había mencionado anteriormente, a este último se le atribuyen efectos relacionados con la sobrevivencia del precursor que prolifera con EGF.

En las condiciones con sólo medio definido, la adición de N-Shh, o la adición de N-Shh+bFGF, las células sobrevivieron y diferenciaron en ausencia de EGF, lo que nos indica que éste es un protocolo apropiado para evaluar el efecto de Shh. En los dos casos las células presentaron la misma morfología y tasas de sobrevivencia similares (Tabla 1).

TABLA 1. Sobrevivencia de las células en ausencia de EGF	
24hrs. con:	% de sobrevivencia
bFGF 10ng/ml	88.2%
Shh 5µg/ml	88.2%
Shh 5µg/ml + bFGF 10ng/ml	80.2%
Medio Definido	80.5%

Para medir la viabilidad celular, las células se tiñeron con el colorante vital azul de tripano. El porcentaje de sobrevivencia es el cálculo de células vivas sobre el número total de células en el pozo (vivas + muertas).

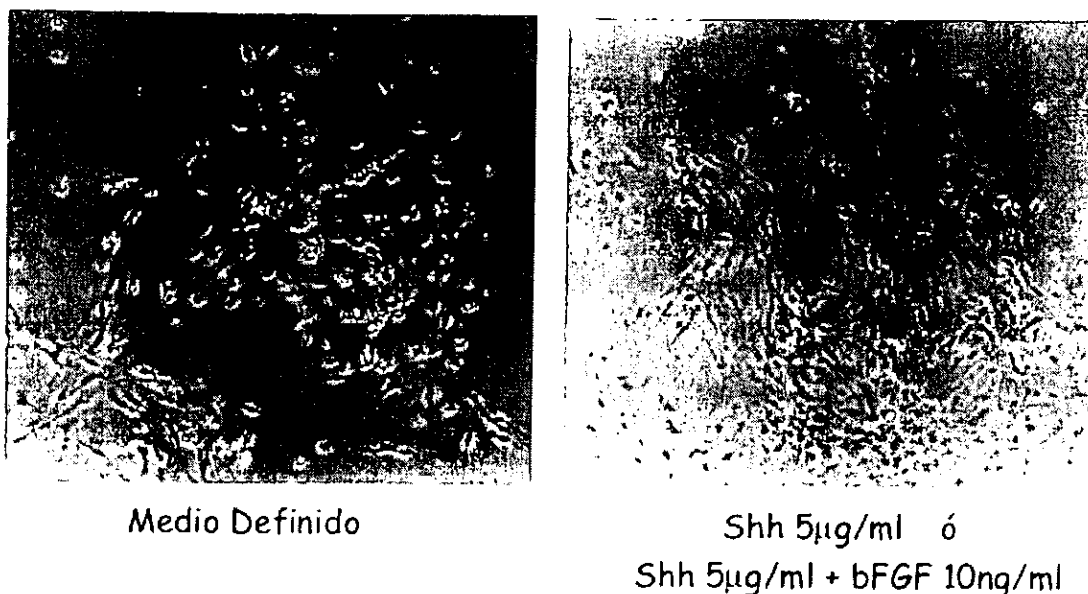


Fig.3 *Condición de sobrevivencia celular en ausencia de EGF*. Las células provenientes de la neuroesfera generada con EGF en el cultivo primario se sembraron en un subcultivo a 10,000 células por pozo, se expandieron con EGF durante 6 días, se realizaron 3 lavados con medio definido e inmediatamente después se pusieron las condiciones de medio definido, con la adición de Shh 5µg/ml ó de Shh + bFGF 10ng/ml por 24 horas. Se muestran fotos de ambas condiciones. La figura representa datos obtenidos de 3 experimentos independientes.

Shh induce la expresión de Ptc y en combinación con bFGF la de Hnf3β.

Tomando en cuenta las condiciones de cultivo establecidas anteriormente, se diseñó un experimento para medir la respuesta de los precursores neurales expandidos con EGF a Shh. Para evaluar la respuesta se detectó la presencia de los mismos componentes de la cascada de Shh empleados en la fig.2.

En este cultivo empleamos dos concentraciones distintas de N-Shh para tener dos puntos de referencia, ya que como se sabe (véanse los antecedentes), los efectos de Shh dependen de la concentración. Las concentraciones utilizadas fueron muy altas (5 y 10µg/ml) ya que en los experimentos previos en donde utilizamos la dosis de 100ng/ml no vimos ningún efecto además de que se han reportado efectos con concentraciones similares. Además se incluyeron las combinaciones de ambas

concentraciones de N-Shh con bFGF para asegurar la sobrevivencia de la posible población responsiva. El '*tiempo cero*' de este cultivo corresponde a la población de células expandida durante 6 días con EGF en el subcultivo (fig.4 carriles 1-3) (ver metodología pág.36) y representa a la población de precursores antes de retirar el EGF. En esta misma condición se detectó previamente Ptc y Hnf3 β (fig.2 EGF 100ng/ml). La condición con medio definido es aquella en donde se recolectan las células después de 24 horas con medio definido a partir de la eliminación del EGF (fig.4 carriles 4-6), y es la condición de referencia para evaluar los efectos de los demás factores en el mismo lapso de tiempo. Se analizó también la condición con bFGF solo por 24 horas (fig.4 carriles 13-15) que constituye el control de las condiciones en donde se combina Shh con bFGF y en donde se esperaría que la sobrevivencia estuviera incrementada.

Al evaluar la presencia de los RNAs de las diferentes proteínas involucradas en la transducción de la señal de Shh mencionadas en la fig.2 a las 24 horas de eliminada la señal de EGF, encontramos que la expresión de Ptc se abate (fig.4 carriles 4-6) lo que corrobora la regulación de Ptc por EGF en nuestro sistema. No se detectó expresión de Gli1 ni Gli2, pero la de Gli3 y Smo se mantuvo. Cuando por el contrario, se adiciona N-Shh a dos concentraciones distintas desde el momento en que se elimina el EGF, la expresión de Ptc se regula positivamente (fig.4 carriles 7-9 y 10-12) y sólo en el caso de Shh 10 μ g/ml se observa una disminución en la expresión de Gli3 y un incremento en Shh (fig.4 carriles 10-12). En la condición en la que se mantiene el cultivo con bFGF solo, se detecta el RNAm de Ptc, Gli3, Smo y Shh (fig.4 carriles 13-15) mientras que de manera muy interesante, cuando se combina bFGF con Shh 5 μ g/ml pero no con 10 μ g/ml se induce además la expresión de Hnf3 β en forma significativa. Este hecho sugiere que Shh induce su expresión en combinación con bFGF además de que invita a pensar que la activación de Hnf3 β por EGF a 100ng/ml (fig.4 carriles 1-3) pudiera deberse a la combinación de este último con el Shh endógeno presente (fig.4 carriles 1-3). Finalmente, cuando se combina

bFGF con la concentración alta de Shh (10 μ g/ml) (fig.4 carriles 19-21) se detecta Ptc y una disminución importante en la expresión de Gli3 y Shh. Este comportamiento resulta similar al observado cuando se agrega sólo N-Shh a 10 μ g/ml y sugiere que estas moléculas son inhibidas por Shh a dosis altas. Es de gran importancia señalar que a pesar de que se logró descubrir la expresión de Ptc causada por Shh, no se detectó Gli1 en estas condiciones.

De este experimento podemos concluir que Shh promueve la regulación positiva de Ptc a las 24 horas en ausencia de EGF y que a pesar de esto no se logra detectar la expresión de Gli1. En vista de que en los sistemas estudiados hasta el momento existe una correlación positiva entre el aumento del RNAm de Ptc y el de Gli1 en respuesta a Shh, pensamos que la activación de Gli1 en nuestro sistema pudiera ser transitoria y debiera detectarse a tiempos más cortos dentro de las 24 horas aquí analizadas. Contrariamente a lo esperado y de manera similar a lo encontrado en la fig.2, Gli3 se expresa en la mayoría de las condiciones, pero de manera muy llamativa, la dosis alta de Shh (10 μ g/ml) reguló negativamente su expresión, igual que la de Shh. Por último se encontró que Hnf3 β es regulado por Shh en combinación con otros factores de crecimiento como EGF ó bFGF, y que estos dos factores pudieran estar promoviendo la regulación positiva de Ptc por mecanismos similares.



Fig.4 Efecto de Shh sobre los precursores neurales en ausencia de EGF. Se realizó un subcultivo de 10,000 células por pozo, se expandieron las células con EGF 100ng/ml por 6 días, se lavaron 3 veces y se agregaron los factores indicados por 24 horas, al término de las cuales se recolectaron las células, se purificó el RNA y se realizaron los RT-PCR tomando muestras a los 30, 35 y 40 ciclos. Cada muestra equivale a un carril y por lo tanto cada condición está representada por 3 carriles continuos. Se amplificó el RNAm de HPRT, Ptc, Gli1, Gli2, Gli3, Smo, Hnf3β y Shh. Para dicho efecto, se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos (ver métodos). Los amplificados fueron del tamaño esperado: HPRT 353pb, Ptc 587pb, Gli1 520pb, Gli2 613pb, Gli3 415pb, Smo 405pb, Hnf3β 400pb y Shh 395pb. En los carriles finales se muestran los controles negativo y positivo de

la reacción de PCR. Como molde para el control positivo se utilizó cDNA de cerebelo P4. Se muestra fotografía de un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. La figura representa datos de un sólo experimento.

La población de precursores neurales expandidos con EGF responde a Shh en un lapso corto de tiempo expresando Gli1, Ptc y Shh.

Basados en los resultados anteriores en donde se observa que los precursores neurales responden a Shh regulando positivamente la permanencia del RNAm de su receptor Ptc y no se logra detectar el RNAm de Gli1, se decidió evaluar la respuesta a intervalos menores de 24 horas con el objeto de determinar la cinética de activación de Gli1 con respecto al tiempo, además de conocer la regulación de la expresión de otros genes inducidos por Shh como Shh mismo y Ptc en estos mismos intervalos de tiempo.

Como sabemos que EGF regula Ptc en nuestro sistema y resulta difícil evaluar el efecto de Shh cuando está presente, se necesita evaluar el efecto de Shh cuando los precursores neurales no estén bajo la influencia de EGF. Por el experimento anterior sabemos que 24 horas después de haber eliminado el EGF del cultivo Ptc ya no se expresa (fig.4 carriles 4-6), pero no conocemos desde que momento se abate su expresión. Por tal motivo y para poder evaluar el efecto de Shh sobre los precursores en ausencia de EGF a tiempos menores a 24 horas, se decidió hacer una curva temporal eliminando la señal de EGF después de 6 días de subcultivo y recolectando las células a partir de 1 y hasta 24 horas después de haber eliminado la presencia de EGF. Paralelamente a esta curva se realizó otra similar manteniendo el estímulo de Shh a partir de la eliminación del EGF y hasta la recolección de la muestra.

En el análisis de las células recolectadas a los diferentes tiempos, se encontró que a partir de una hora de haber eliminado la señal proliferativa de EGF la expresión de Ptc se abate (fig.5a Ptc, carriles a partir del 1), resultado que corrobora una vez

más la regulación de *Ptc* por EGF. Por otro lado, en la curva temporal con Shh la expresión de *Ptc* se indujo (o se mantuvo) a una hora del estímulo con Shh (fig.5b carriles 1,2 y 3), disminuyó drásticamente a las 2 horas (fig.5b *Ptc* carriles 4, 5 y 6, 30, 35 y 40 ciclos respectivamente), y volvió a expresarse de las 4 horas en adelante, aunque en muy bajos niveles. Estos resultados demuestran que los precursores neurales presentes en nuestro sistema responden a Shh expresando *Ptc* de manera independiente a EGF (comparar fig.5a *Ptc*, con fig.5b *Ptc*). Además, Shh indujo la expresión de Shh endógeno generando un pico a las 4 horas de iniciado el estímulo (fig.5b Shh, carriles 7-9), mientras que en ausencia de N-Shh la producción de Shh endógeno se mantiene en un nivel bajo (comparar fig.5a y 5b, Shh). Lo más relevante de este experimento fue la inducción de la transcripción del gen *Gli1* en respuesta a Shh a la hora de comenzado el estímulo (fig.5b *Gli1* carriles 1-3) siendo que en ausencia de éste (fig.5a *Gli1*) no se detecta transcrito a ningún intervalo de tiempo. Lo anterior es de gran importancia ya que indica que nuestro sistema si es capaz de responder a Shh induciendo la expresión de *Gli1* en un intervalo muy corto de tiempo en la condiciones evaluadas. Es importante mencionar aquí que la detección transitoria del RNAm de *Gli1* no nos indica si está presente la proteína por el mismo período de tiempo y mucho menos nos habla de su actividad. Por tal motivo en un futuro será necesario detectar la presencia de la proteína de *Gli1* en nuestros cultivos. No se encontró la expresión de *Gli2* (figs.5a y 5b *Gli2*) y si la de *Gli3* (figs.5a y 5b) en presencia o ausencia del estímulo de Shh a todos los intervalos de tiempo evaluados. Al medir la presencia del mensajero de Smo se encontró que se expresa de manera abundante a todos los intervalos de tiempo en ausencia de N-Shh (fig.5a Smo), mientras que en presencia de N-Shh desaparece a partir de las 12 horas (fig.5b Smo). Este comportamiento pudiera deberse a variaciones del sistema ya que no es consistente con el resultado previo en donde detectamos la expresión de Smo a las 24 hrs de cultivo en presencia de N-Shh 5µg/ml (fig.4 carriles 7-9).

Dados los resultados anteriores concluimos que en ausencia de EGF la expresión de Ptc se abate a partir de una hora de haber eliminado el estímulo, lo que permite visualizar que Shh regula positivamente la permanencia del RNAm de Ptc de manera independiente a EGF, además de inducir la expresión de Gli1 y Shh. La temporalidad en la expresión de estas moléculas nos hace pensar que Gli1 pudiera estar mediando la inducción de la expresión de Ptc y Shh en respuesta a Shh-N en los precursores presentes en nuestro sistema.

Con el comportamiento observado en este cultivo, aunado a los resultados obtenidos en los experimentos previos podemos concluir que los precursores neurales expandidos con EGF presentes en nuestro sistema 'in vitro' expresan a la proteína transmembranal Smo, que es indispensable para la transducción de la señal inducida por Shh, y que en ausencia de EGF son capaces de responder a Shh induciendo, de acuerdo a lo esperado, su propio receptor Ptc, Shh mismo, y la expresión de Gli1 que se sabe es un factor transcripcional que activa positivamente la transcripción de sus genes blanco. Esta última consideración ha permitido proponer a Gli1 como un efector final de la cascada de Shh. También concluimos que Shh es capaz de inducir la expresión del marcador de diferenciación temprana de la placa del piso Hnf3 β en combinación con otros factores de crecimiento como EGF o bFGF. La activación de la cascada es posible a pesar de que Gli3, del que se conocen principalmente efectos regulatorios negativos de la cascada, se expresa de manera abundante en nuestro sistema.

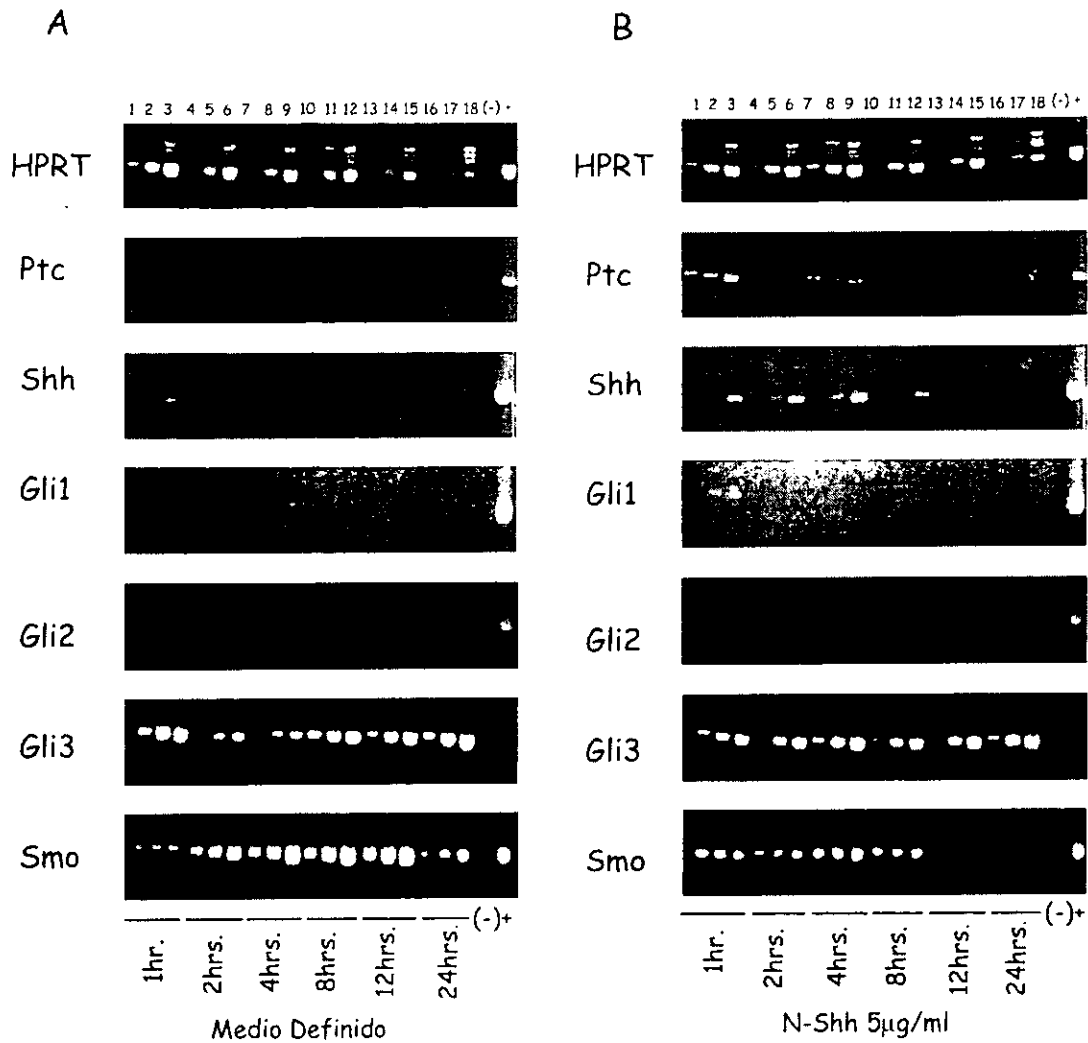


Fig. 5 *Curva temporal del efecto de Shh sobre precursores neurales en cultivo.* Se realizó un subcultivo de 10,000 células por pozo, se expandieron las células con EGF 100ng/ml por 6 días, se lavaron 3 veces y se pusieron las condiciones correspondientes (medio definido, fig.5a; ó Shh 5µg/ml, fig.5b) por los períodos de tiempo indicados, al término de los cuales se recolectaron las células, se purificó el RNA y se realizaron los RT-PCR tomando muestras a los 30, 35 y 40 ciclos. Cada muestra equivale a un carril y por lo tanto cada condición está representada por 3 carriles continuos. Se detectaron los RNAs de HPRT, Ptc, Gli1, Gli2, Gli3, Smo y Shh. Para dicho efecto, se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos (ver métodos). Los amplificados fueron del tamaño esperado, HPRT 353pb, Ptc 587pb, Gli1 520pb, Gli2 613pb, Gli3 415pb, Smo 405pb y Shh 395pb. En los carriles finales se muestran los controles negativo y positivo de la reacción de PCR. Como molde para el control positivo se utilizó cDNA de cerebelo P4. Se muestra fotografía de un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. La figura representa datos de un sólo experimento.

Activación de la cascada de señalización por Shh en el mesencéfalo ventral 'in vivo'.

Con el objeto de saber si la activación de los precursores neurales propagados con EGF presentes en nuestro sistema de cultivo 'in vitro', en respuesta a Shh refleja el comportamiento de los precursores neurales presentes en el mesencéfalo ventral 'in vivo', se midió la expresión de los distintos componentes de la cascada de Shh en el tejido mesencefálico ventral que se obtuvo de embriones de los diferentes estadios de desarrollo a partir de los 10.5 y hasta los 15.5dpc. La obtención del tejido se realizó a dichos estadios para abarcar la etapa de 13.5dpc, que fue la que se utilizó para realizar los cultivos primarios, y analizar temporalmente la respuesta 'in vivo'.

De esta manera, al medir la expresión de los genes de la cascada de Shh en el mesencéfalo ventral a los diferentes estadios se encontró que *gli1* se expresa más abundantemente a los 12.5dpc (fig.6 *Gli1*) que coincide con el inicio de la expresión del marcador *Hnf3 β* (fig.6 *Hnf3 β*). A los 13.5dpc, es decir 24 horas después, *gli1* desaparece drásticamente y *Hnf3 β* alcanza su máxima expresión para disminuir a los 14.5dpc y desaparecer completamente a los 15.5dpc (fig.6 *Hnf3 β*). *Ptc* presenta un pico máximo a los 13.5dpc (fig.6 *Ptc*). *Gli3* se expresa fuertemente en todos los estadios (fig.6 *Gli3*) mientras que *Smo* desaparece a partir de los 14.5dpc (fig.6 *Smo*). *Gli 2* se detecta a los 10.5 y 11.5dpc en el mesencéfalo completo y más específicamente en el MV a los 13.5 y 15.5dpc (fig.6 *Gli2*).

En los resultados anteriores se observa que la activación de la cascada de Shh 'in vivo' identificada por la expresión breve de *Gli1*, coincide con la inducción de la transcripción del gen responsivo a Shh que se expresa en el mesencéfalo ventral, *Hnf3 β* a los 12.5dpc. 24 horas después de la activación de la cascada, a los 13.5dpc, el pico máximo de expresión de *Ptc* coincide con la máxima expresión del marcador *Hnf3 β* . Este hecho es congruente con la expresión de *Ptc* y *Hnf3 β* 24 horas después

de la activación por Shh en nuestro sistema de precursores '*in vitro*'. Cabe recordar que este estadio (13.5dpc) fue el que se utilizó para obtener los precursores neurales en los cultivos primarios, y que la fuerte expresión de Gli3 no impidió la activación de la cascada '*in vivo*' . .

El hecho de encontrar encendida la cascada de señalización por Shh en el mesencéfalo ventral '*in vivo*' presentando un patrón temporal similar al inducido en los precursores neurales en respuesta a Shh, valida nuestro sistema para el estudio de la respuesta de los precursores neurales a Shh. Esto, además, nos brinda la oportunidad de analizar la temporalidad de la activación y los efectores que modulan la transducción por Shh '*in vitro*' .

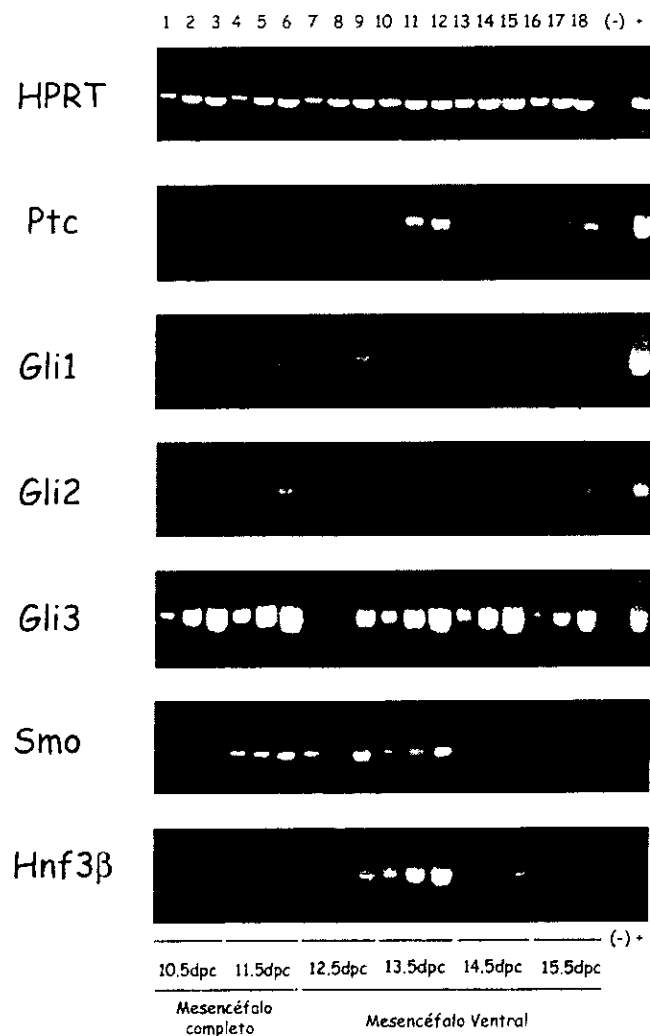


Fig.6 Ontogenia de las moléculas involucradas en la cascada de transducción de *Shh* en el mesencéfalo ventral 'in vivo'. Se obtuvieron embriones de los diferentes estadios de desarrollo indicados, se disectó el mesencéfalo ventral, se purificó el mRNA, se realizó RT-PCR de los diferentes marcadores tomando muestras a los 30, 35 y 40 ciclos. Cada muestra equivale a un carril y por lo tanto cada condición está representada por 3 carriles continuos. Se detectaron los RNAs de HPRT, Ptc, Gli1, Gli2, Gli3, Smo y Hnf3 β . Para dicho efecto, se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos (ver métodos). Los amplificados fueron del tamaño esperado, HPRT 353pb, Ptc 587pb, Gli1 520pb, Gli2 613pb, Gli3 415pb, Smo 405pb y Hnf3 β 400pb. En los carriles finales se muestran los controles negativo y positivo de la reacción de PCR. Como molde para el control positivo se utilizó cDNA de cerebelo P4. Se muestra fotografía de un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. La figura representa datos de un sólo experimento.

Producción de Shh activo por medio de transfección en células 293T.

Se ha descrito que Shh es una proteína que además de sufrir un corte autocatalítico adquiere dos modificaciones lipídicas postraduccionales que la mantienen principalmente anclada a la membrana: una molécula de colesterol en su extremo carboxilo y una de palmitato en el amino. A pesar de poseer estas modificaciones, se le atribuyen efectos a corta y larga distancia cuyo mecanismo de acción aun no se ha podido explicar. Lo anterior ha promovido la comparación de la actividad de las proteínas con y sin modificaciones para evidenciar diferencias importantes. En particular ya se describió que cuando la proteína N-Shh posee la molécula de palmitato en el extremo amino es 30 veces más potente que cuando carece de él, lo que sugiere que esta modificación pudiera jugar un papel importante en la función de Shh (Pepinsky et al., 1998). La actividad de Shh en estos ensayos fue evaluada haciendo uso de la propiedad específica de los osteoblastos de producir abundantemente la enzima fosfatasa alcalina (FA) (Katagiri et al., 1994), gracias a que Shh es capaz de hacer diferenciar a la línea celular pluripotente de fibroblastos, C3H10T1/2, en osteoblastos productores de FA (Kinto et al., 1997). Aprovechando lo anterior es común utilizar esta línea celular para medir la actividad biológica de Shh tan sólo midiendo actividad de FA en el cultivo (Pepinsky et al., 1998; Williams et al., 1999).

Dada la importancia que pudieran tener estas modificaciones postraduccionales en la actividad de Shh en nuestro sistema de precursores neurales, y que la proteína con ambas modificaciones no se puede obtener todavía en el mercado, nos dimos a la tarea de establecer las condiciones para producir Shh en una línea celular de mamífero. Esto lo logramos por medio de la transfección transitoria de un plásmido (pRK5-Shh) que posee la secuencia completa del cDNA de Shh bajo la regulación de un promotor de expresión constitutiva, en la línea celular 293T. A partir de estos cultivos obtuvimos la proteína Shh en el sobrenadante

recolectado a las 41 horas después de la transfección. Para corroborar la actividad de la proteína presente en el sobrenadante, establecimos un ensayo utilizando la línea celular C3H10T1/2 antes mencionada y cultivamos estas células a una densidad de 10,000 células por pozo (en cajas de 24 pozos) durante 6 días en ausencia o presencia de diferentes cantidades del sobrenadante recolectado de la transfección de las 293T. Al final de este tiempo las células se procesaron para detectar la actividad de la FA en el cultivo y poder así, determinar cualitativamente la actividad del sobrenadante con Shh .

De esta manera encontramos que 100 μ l del sobrenadante obtenido de una transfección del 69% de células 293T con 10 μ g de plásmido pRK5-Shh, presentó actividad biológica comparable, e incluso superior, a la actividad de N-Shh recombinante a 5 μ g/ml (fig. 7). Cuando se utilizaron 10 μ l del mismo sobrenadante la actividad de Shh disminuyó 10 veces aproximadamente, mientras que cuando se utilizó 1 μ l no se detectó actividad, a juzgar por la comparación con el sobrenadante control. Este último constituye la adición del sobrenadante recolectado del cultivo de las 293T transfectadas con el vector vacío (pRK5).

Gracias a la estandarización de estos protocolos ahora contamos con una manera de producir Shh en una línea celular de mamífero y también con un método para evaluar su actividad biológica. Y aunque por ahora la evaluación fue sólo cualitativa, existen formas de cuantificar la actividad de la FA que en un futuro se utilizarán en el laboratorio. Durante la recolección de los sobrenadantes no determinamos la cantidad de Shh presente en ellos pero estimamos que debe ser muy baja ya que, por las características antes mencionadas, la proteína secretada permanece preferentemente asociada a la membrana. Por lo tanto cuando observamos que la actividad de 100 μ l del sobrenadante producido es equivalente a la actividad de 5 μ g/ml de N-Shh recombinante, suponemos que el Shh producido por las 293T, transfectadas con pRK5-Shh, es más potente ya que difícilmente estarían presentes 5 μ g de Shh en 100 μ l. Esta hipótesis necesita ser corroborada pero por lo

pronto contamos con una metodología ya establecida para la producción y evaluación de Shh que presumiría tener las modificaciones postraduccionales que Shh sufre 'in vivo'.

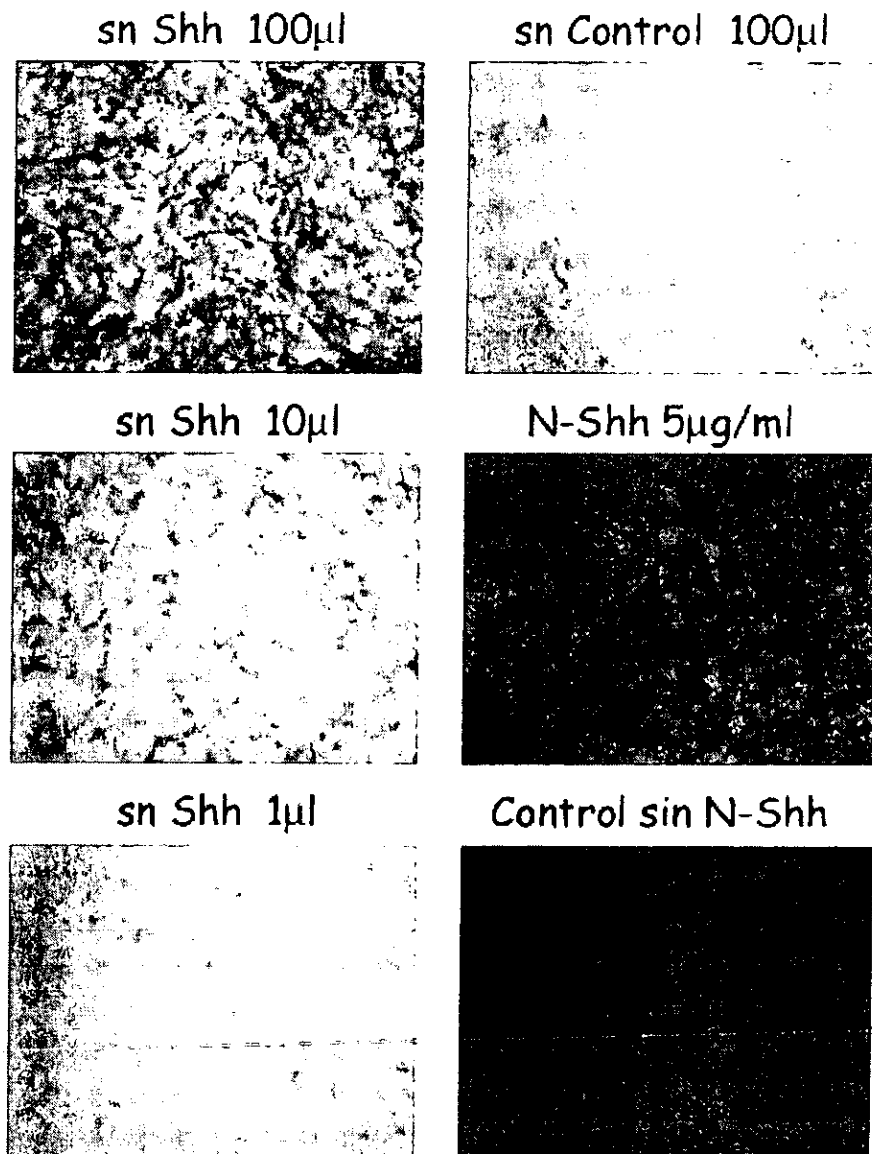


Fig.7 Actividad de diferenciación osteoblástica del sobrenadante de células 293T transfectadas con el plásmido que contiene Shh, pRK5-Shh. Las células 293T se transfectaron de manera transiente con pRK5-Shh o pRK5, el sobrenadante se recolectó a las 41 horas de la transfección (para detalles ver la sección de metodología) y se agregó en dosis de 1, 10 y 100 µl a un cultivo de células C3H10T1/2. Después de 6 días en cultivo se

tiñeron estas células para ver actividad de Fosfatasa Alcalina. El sobrenadante control es el medio condicionado de las células 293T transfectadas con el vector vacío (pRK5). En la condición con N-Shh, éste se agregó a la concentración indicada. La figura representa datos obtenidos de dos experimentos independientes.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo nuestro interés se centró principalmente en la caracterización de la respuesta al morfógeno Sonic Hedgehog (Shh) de precursores neurales expandidos en cultivo con la ayuda del factor de crecimiento EGF. Shh está identificada como una proteína clave en el establecimiento del patrón dorso-ventral durante el desarrollo embrionario del SNC y se le atribuye la inducción de los distintos fenotipos ventrales en todo el tubo neural a lo largo del eje antero-posterior, hecho que nos indica que una misma molécula es capaz de generar diferentes tipos celulares dependiendo de la célula sobre la que actúe y el contexto en el que esta última se encuentra. El sistema experimental de precursores neurales que utilizamos para investigar la respuesta a Shh fue caracterizado con anterioridad en nuestro laboratorio y sabemos que está constituido por una población enriquecida de precursores neurales, muy tempranos en el desarrollo, que conservan la capacidad de dar origen a los dos linajes del SNC que son el glial y el neuronal (Santa-Olalla, and Covarrubias, 1995a). Paralelamente se observó que estos precursores pueden generar distintos fenotipos neuronales terminales como el dopaminérgico, que resulta ser uno de los fenotipos ventrales inducidos por Shh *in vivo*. En nuestro sistema, la diferenciación hacia este tipo celular parece requerir una señal selectiva ya que el fenómeno es aleatorio (Santa-Olalla, and Covarrubias, 1995b). Estos datos constituyen la justificación principal de este trabajo para proponer de entrada que estas células precursoras responderían a Shh. Los resultados obtenidos del presente trabajo demuestran que estos precursores son capaces de responder a Shh induciendo la expresión temporal de moléculas blanco como Gli1, Ptc y Shh de manera congruente a lo que se ha caracterizado en otros sistemas. Nuestros resultados también muestran que estos precursores son capaces de diferenciar hacia células de la placa del piso, a juzgar por la inducción del factor nuclear de hepatocitos Hnf3 β que la caracteriza. La placa del piso es una estructura

que se encuentra presente en el tubo neural ventral y es de gran relevancia durante el desarrollo del SNC. Esta diferenciación fue generada en respuesta a la combinación de la proteína Shh con otros factores de crecimiento como bFGF y posiblemente también EGF. La respuesta temporal de los precursores neurales en cultivo refleja el comportamiento de las células presentes en el mesencéfalo ventral 'in vivo', lo que valida nuestro sistema como un modelo para el estudio de los efectos de Shh sobre las células precursoras neurales. De manera independiente a la inducción del receptor Ptc por Shh en nuestro sistema, identificamos una regulación positiva de dicho receptor por EGF. Este evento, que no ha sido descrito con anterioridad, puede ser de gran relevancia en el esclarecimiento del mecanismo de acción y transducción de la señal de Shh.

Los precursores que conforman la neuroesfera expresan Ptc y Smo: moléculas indispensables para la recepción y transducción de la señal.

Diversos grupos de trabajo han demostrado una correlación en el aumento de la expresión del receptor Ptc en respuesta al estímulo de Shh, su ligando (Marigo and Tabin, 1996; Oro, et al, 1997; Sang-Hun et al, 2000; Wechsler-Reya and Scott, 1999; Zhu, et al, 1999); por esto, actualmente el detectar un aumento en su expresión es indicio de que la vía de señalización por Shh está activa. Con ayuda de la técnica de RT-PCR logramos detectar la presencia del RNAm de Ptc en las células precursoras que conforman la neuroesfera en nuestro sistema (fig.1). Esto fue sin necesidad de estimularlas previamente con Shh recombinante (N-Shh) lo que en principio nos indica que las células expresan el receptor Ptc necesario para responder a Shh. Además, la presencia de los transcritos de Ptc en las células en cuestión, nos sugirió que Shh pudiera estar expresado de manera endógena en la neuroesfera, hecho que confirmamos posteriormente (datos no mostrados). También medimos la presencia de Smo en los precursores neurales (fig. 4), ya que como se

mostró por otros, este transductor membranal es indispensable para desatar una respuesta celular a Shh (Carpenter et al, 1998; Hynes, et al 2000; Stone et al, 1996; van den Heuvel et al, 1996; Xie, et al, 1998;). El hecho de encontrar que dentro del microambiente de la neuroesfera se expresa Shh, su receptor Ptc y el transductor Smo, indica que la vía de señalización por Shh pudiera jugar un rol importante en alguno o varios de los procesos que se llevan a cabo durante el desarrollo de la neuroesfera: la proliferación de precursores tempranos, la restricción del potencial de estos precursores tempranos dando origen a precursores más tardíos, la proliferación de estos precursores tardíos, la diferenciación terminal, o en la sobrevivencia de cualquiera de estos tipos celulares, entre otros. Existen ejemplos durante el desarrollo de otros tejidos en donde un mismo factor de crecimiento está involucrado en dos o más de estos procesos, como en el caso de la diferenciación de las células de la cresta neural en donde el factor SCF (stem cell factor) actúa como factor trófico sobre las células pluripotentes de la cresta neural, mientras que sobre las células melanogénicas comprometidas, actúa como factor trófico sólo con ayuda de neurotrofina. Aunado a lo anterior, SCF promueve la diferenciación de las células de la cresta neural al linaje neuronal sensorial (revisado por Sieber-Blum and Zhang, 1997). En nuestro sistema es necesario caracterizar en cual de estos procesos están involucradas las moléculas de la cascada de señalización de Shh, y dado esto, es necesario identificar a las células precursoras específicas que expresan estas moléculas para así poder proponer posibles respuestas al estímulo de Shh. Para lograr este objetivo es necesario realizar hibridaciones *'in situ'* o inmunocitoquímicas en la colonia completa, en cortes o en células disgregadas, por ejemplo. Muchos grupos han demostrado que células en explantes del tubo neural ventral son capaces de responder al estímulo de Shh generando diferenciación ventral específica de la zona (Ericson et al, 1995; Hargrave et al, 2000; Martí et al, 1995; Roelink et al, 1994; Wang et al, 1995); ahora nosotros somos capaces de aislar precursores muy

tempranos en el desarrollo del SNC que expresan los elementos indispensables para responder a Shh, y por lo tanto tenemos un sistema muy útil para estudiar la participación de los componentes de la cascada en la respuesta celular específica de la célula blanco.

Gli1, Gli2 y Gli3 se expresan diferencialmente en los precursores neurales que responden a EGF.

Dentro de la familia de los factores transcripcionales homólogos a *Ci* de *Drosophila*, en vertebrados, *Gli1* es el factor que originalmente se caracterizó como mediador del efecto de Shh. En un principio durante el desarrollo del sistema nervioso central se expresa en la línea media de la placa neural, (Lee, et al, 1997) cuando Shh todavía no se expresa en esa estructura pero ya se expresa en la notocorda. De hecho se demostró que la inducción de *Gli1* en la placa neural depende de la notocorda (Ruiz i Altaba, 1997). Cuando *Gli1* es expresado ectópicamente es capaz de inducir la expresión de los genes blancos de Shh como son f-spondina, *Hnf3 β* y Shh mismo (Ruiz i Altaba 1997). Se describió también que el gen de *Hnf3 β* posee secuencias de unión a *Gli1* en sus regiones regulatorias y se comprobó que es regulado por *Gli1* 'in vivo' (Ruiz i Altaba 1998; Sasaki et al, 1997). Además, está bastante bien documentado que la adición de N-Shh recombinante a explantes y cultivos celulares induce la expresión de *Gli1* (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Rowitch, et al, 1999; Sang-Hu Lee et al, 2000; Wechsler-Reya and Matthew, 1999). De manera consistente con lo anterior, nuestros resultados muestran que los precursores neurales expandidos con EGF expresan *Gli1* en respuesta al estímulo de N-Shh (fig. 5b). Esta respuesta es específica, temprana y transitoria. Esto último pudiera ser consecuencia de la concentración de N-Shh empleada durante los ensayos (5ug/ml) ya que pudimos observar que a concentraciones menores la expresión de *Gli1* se detecta hasta las 24 horas de estimulación (datos no

mostrados). Esto sugiere que la concentración de N-Shh es un factor determinante en la expresión temporal de Gli1, y que esto pudiera influir a su vez en la producción de las diferentes respuestas celulares a Shh, como las que ya han reportado otros grupos anteriormente (Marigo, and Tabin, 1996; Roelink, et al 1995). En nuestro caso pudiera estar actuando de manera inhibitoria en la cascada a concentraciones altas, ya que al mismo tiempo encontramos que a concentraciones aún mayores (10ug/ml), no sólo no detectamos Gli1 a las 24 horas del estímulo, sino que observamos una disminución en la expresión de Smo, y como discutiremos más adelante, también de Gli 3, comportamiento que no detectamos a N-Shh a 5ug/ml (Fig. 4).

Se ha descrito que Gli2 al igual que Gli1 es un gen blanco de Shh y su transcripción es inducida por este (Ruiz i Altaba 1998). Gli2 se expresa en zonas ventrales del tubo neural aunque, a diferencia de Gli1, también se detecta en áreas dorsales que sobrelapan con las zonas de expresión de Gli3 (Ruiz i Altaba 1997). La proteína completa de Gli2 constituye un activador débil de la transcripción (Sasaki et al 1999), pero a su vez está compuesta por dominios activadores y represores cuya formación está regulada postraduccionalmente por Shh (Qi Ding et al, 1998; Ruiz i Altaba, 1999; Sasaki et al 1999). Su forma activadora es capaz de inducir, al igual que Shh, la formación de la placa del piso cuando se expresa de manera ectópica (Michael et al 1998, Qi Ding et al, 1998). Se ha observado con sorpresa que los ratones mutantes que poseen los dos alelos mutados para Gli1 son completamente viables al nacer y que, contrariamente a esto, los ratones mutantes homocigotos de Gli2 muestran severas malformaciones óseas (Mo et al, 1997) y defectos en la formación del SNC en donde no se forma la placa del piso (Michael et al, 1998). Esto nos indica que la función de Gli2 es indispensable en la formación del SNC y por lo tanto más relevante que la de Gli1 *in vivo*. En nuestro sistema Gli2 no se expresa y no se induce por N-Shh, al menos a los tiempos evaluados y con las concentraciones de N-Shh empleadas (figs 4, 5a y 5b). Esto nos invita a pensar que Gli2 pudiera no

ser el mediador de los efectos de Shh en los precursores neurales presentes en la neuroesfera, de lo contrario, podría ser un regulador más temprano inducido en tiempos menores a 1 hora.

Finalmente Gli3 se ha caracterizado como un represor de los efectos de Shh. Es el único de los 3 Glis que es inhibido transcripcionalmente por Shh, y viceversa (Ruiz i Altaba 1998). Su localización exclusivamente dorsal dentro del tubo neural lo supone un factor antagonista de los efectos ventralizantes de Shh en el SNC (Ruiz i Altaba 1997), además de que ya se ha caracterizado bien su efecto represor durante el desarrollo de las extremidades de ratón (Baoli, et al 2000). Actualmente se descubrió que, al igual que Gli2, Gli3 sufre procesamientos postraduccionales que desenmascaran regiones activadoras y represoras específicas dentro de la misma proteína (Baoli, et al, 2000; Dahmann and Basterk, 2000; Dai, et al, 1999; Ruiz i Altaba 1999; Sasaki et al, 1999). En las células presentes en nuestro sistema se expresa Gli3 de manera muy importante en ausencia de la señal de Shh (Figs. 2, 4 y 5a), y cuando ésta está presente no se abate (figs. 4 y 5b), salvo en la condición en que se adiciona N-Shh a la concentración más alta utilizada en estos ensayos (10ug/ml) (fig. 4). Esto nos dice que para inhibir la transcripción de Gli3 en nuestros cultivos es necesaria una cantidad mayor de Shh recombinante. Con estos resultados no podemos saber cuál es la forma proteica de Gli3 que están produciendo las células, si la activadora o la represora, y por lo tanto desconocemos cual podría ser su participación en nuestro sistema.

Un modelo de acción de los Glis, propuesto paralela y complementariamente por dos grupos de trabajo (Dai, et al, 1999; Sasaki et al, 1999), postula que en ausencia de Shh, Gli3 y probablemente Gli2, se cortan generando un represor, de manera homóloga a como lo hace *Ci* en *Drosophila* (Aza-Blanc, et al, 1997). En presencia de Shh, se impide la proteólisis de la proteína y por lo tanto la producción del inhibidor, y se promueve la formación de la forma activadora de Gli 3, que entonces es capaz de unirse directamente al promotor de Gli1 y activar su

transcripción. Esto último provoca una acumulación de *Gli1* que entonces induce una ola secundaria de transcripción que involucra genes blanco de *Shh* como *Hnf3 β* , *Ptc*, *Shh* y *Gli* mismo. En nuestro sistema pudiera estar presente principalmente la forma represora de *Gli3* de manera tal que la expresión de *Gli1* en respuesta a *Shh* que detectamos es muy breve y no intensa. La actividad de *Gli3* pudiera, sin embargo, no llegar a ser completamente dominante de modo que aún en su presencia logramos activar la transcripción de *Gli1*. En este caso la forma activadora de *Gli3* podría ser la mediadora de la señal de *Shh* activando la transcripción de *Gli1*, *Ptc* y *Shh*. Por otra parte es importante considerar la posibilidad de que ambos *Gli*s se encuentren expresados en poblaciones celulares distintas dentro de la neuroesfera y que dado que *Gli3* se expresa de manera mucho mayor comparativamente a *Gli1*, pudiera ser que *Gli3* se esté expresando en una población grande mientras que *Gli1* en una población escasa, o ambas en poblaciones equivalentes y por lo tanto con diferencias de expresión bastante grandes. Para descartar alguna de estas posibilidades y poder establecer los roles de los diferentes *Gli*s en nuestro sistema será necesario identificar las poblaciones en las que cada uno se expresa así como, de manera esencial, determinar cual es la forma protéica que está presente, la activadora o la represora.

El precursor responde a Shh induciendo sus genes blanco.

Actualmente existe suficiente evidencia tanto genética, como celular y bioquímica para probar que *Ptc* es el receptor de *Shh* (Marigo and Tabin, 1996c; Marigo et al., 1996a; Stone et al., 1996). La función principal de *Ptc*, en ausencia del estímulo de *Shh*, consiste en mantener reprimida la expresión de genes localizados río abajo de la cascada (Goodrich et al., 1997). En el momento en el que *Shh* está presente y se une a *Ptc*, se elimina la represión de la cascada y se induce la transcripción de los genes blanco (Hidalgo and Ingham, 1990; Ingham et al., 1991)

como son *Shh*, *Gli1* y *Gli2*, *Ptc* mismo, así como *Hnf3-β* en algunos tejidos. Niveles bajos de transcripción de *Ptc* son un indicativo de que las células son capaces de responder a *Shh*, como ya se mencionó anteriormente. Se ha caracterizado que *Ptc* se expresa en todas las regiones que se sabe tienen la capacidad de responder a *Shh* (Marigo et al., 1996c), y que la expresión ectópica de *Shh* induce la expresión de *Ptc* en el tubo neural y durante el desarrollo de las extremidades (Marigo et al., 1996b). La conservación de la regulación de *Ptc* por *Shh* desde *Drosophila* hasta vertebrados ha permitido utilizarlo, de manera confiable, como marcador de la respuesta de *Shh* en distintos sistemas (Goodrich et al., 1995; Hynes et al., 2000; Lee et al., 2000; Rowitch et al., 1999; Wechsler-Reya et al., 1999; Zhu et al., 1999). De manera similar a lo encontrado por otros, nosotros identificamos la respuesta de los precursores neurales presentes en nuestro cultivo por medio de la inducción de la transcripción de los genes blanco de *Shh*: *Ptc*, *Shh* y *Gli1* (Fig. 5b). La respuesta encontrada es temprana y transitoria ya que la expresión de *Gli1* sólo la encontramos al intervalo de 1 hora después del estímulo. *Ptc* se expresa de manera intensa a la par de la inducción de *Gli1* y el inicio de la expresión de *Shh*. A partir de las 2 horas, *Ptc* disminuye su expresión para luego entrar en una meseta que permite detectarlo a niveles muy bajos aún a las 24 horas. La expresión de *Shh* continúa en aumento hasta alcanzar su pico máximo a las 4 horas. Este comportamiento es similar al encontrado en otros sistemas que responden a *Shh* con la diferencia de que la respuesta del nuestro es breve ya que otros detectan la expresión de *Ptc* y *Gli1* fuertemente a las 24 horas (Wechsler-Reya and Scott, 1999). Dado que *Gli3* se expresa fuertemente en los precursores que conforman la neuroesfera, es necesario responder cuál es su papel y qué tanto influye en la respuesta observada. Para tratar de responder a esta pregunta visualizamos al menos dos posibles explicaciones. En ambos casos la detección abundante del RNAm de *Gli3* parece representar principalmente la presencia de la proteína de *Gli3* con actividad represora, lo que origina que la respuesta de los precursores neurales a *Shh*, sea

breve y muy débil. La discrepancia radica en que en el primer caso *Gli3* actuaría en nuestro sistema solamente como represor y por lo tanto, la estrategia para incrementar la respuesta iría en el sentido de eliminar la expresión de *Gli3*; mientras que en el otro, en nuestro sistema la respuesta a *Shh* pudiera estar mediada por *Gli1* a través de la forma protéica activadora de *Gli3*, que estaría presente en muy baja cantidad, por lo que la estrategia se enfocaría en dirigir el equilibrio hacia la formación de la forma activadora de *Gli3*. Finalmente, cualquiera que sea el caso, es indispensable conocer la forma protéica de *Gli3* que está siendo producida por las células y caracterizar a las poblaciones celulares que están produciendo dichas moléculas, para así, poder especular en una sola dirección sobre el rol de los diferentes *Glis* en nuestro sistema.

Shh actúa en coordinación con otros factores de crecimiento para inducir el marcador de la placa del piso *HNF3 β* .

En nuestros ensayos logramos detectar la diferenciación de los precursores hacia células de la placa del piso a juzgar por la inducción de la expresión del gen *Hnf3 β* . La placa del piso es la estructura presente en la línea media ventral del tubo neural y está constituida por un grupo de células morfológicamente distinguible de las demás células que conforman el tubo neural. El modelo de formación de la placa del piso con mayores evidencias (Placzek, et al, 2000) indica que la expresión de *Hnf3 β* es inducida en la línea media de la placa neural por el *Shh* proveniente de la notocorda. Existen datos que ponen en evidencia lo anterior como transplantes de la notocorda en la parte dorsal del tubo neural que inducen la expresión de marcadores de la placa del piso de manera ectópica como *Hnf3 β* y *Shh* (Placzek et al, 1993; Yamada et al, 1991), y la adición de *Shh* recombinante a explantes de mesencéfalo 'in vitro' que induce el mismo fenotipo (Ericson et al, 1996; Roelink et al, 1994). Una vez que las células de la línea media ventral del tubo neural comienzan a

expresar Hnf3 β también expresan Shh y se restringe la expresión de Pax-3 y Pax-7 a la región dorsal (revisado en la introducción). La diferenciación hacia este fenotipo en nuestros cultivos solamente fue observado cuando Shh se encontraba en combinación con otros factores de crecimiento como bFGF (Fig. 4) y probablemente EGF (Fig. 2). Este resultado nos sugiere que la diferenciación hacia este tipo celular pudiera estar regulada por la acción sinergista entre Shh y alguno de estos 2 factores. Anteriormente otros grupos han reportado que Shh actúa en combinación con otros factores para inducir fenotipos celulares terminales. Por ejemplo se demostró que el Shh secretado por la notocorda junto con el FGF8 producido localmente en la frontera entre el cerebro medio y el cerebro anterior inducen la diferenciación de neuronas dopaminérgicas, y que cuando en la misma intersección esta expresión es precedida por la producción de FGF4, se genera el centro inductor de neuronas serotoninérgicas (Ye et al., 1998). Posteriormente a esta descripción, estos datos fueron apoyados por otro grupo de trabajo que logró inducir la producción de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas a partir de células troncales embrionarias con ayuda de la combinación de Shh + FGF8 (Lee et al., 2000). Cabe mencionar que las células dopaminérgicas producidas en estos cultivos expresan las moléculas características de la cascada de transducción por Shh (Ptc, Smo, Gli 1 y Shh) así como las de FGF8 (FGFR3 y FGF8b). Con los datos anteriores se puede proponer que para que Shh induzca un fenotipo particular se requieren factores de crecimiento adicionales. En este sentido nuestros resultados muestran que los precursores neurales obtenidos del mesencéfalo ventral y expandidos con EGF tienen la capacidad de diferenciar hacia células de la placa del piso expresando Hnf3 β en presencia de Shh con otros factores de crecimiento como EGF ó bFGF, lo que refuerza esta hipótesis.

EGF regula la expresión de Ptc en los precursores neurales expandidos 'in vitro' de manera independiente al estímulo de Shh.

De manera independiente a la regulación de Ptc por Shh, encontramos que EGF regula positivamente la transcripción de Ptc en los precursores neurales responsivos a EGF de manera dosis dependiente (Fig.2). La inducción de Ptc por EGF no correlaciona con la expresión de los factores transcripcionales Gli1 y Gli2 mientras que Gli3 si se expresa, al menos a las 24 horas del estímulo. Tomando en cuenta que la inducción de Gli1 por Shh en nuestro sistema se observó a 1 hora del estímulo, todavía queda la posibilidad de que la expresión de los genes Glis en respuesta a EGF, si es que fuera el caso, también sea transitoria. Este tipo de regulación no ha sido descrita con anterioridad y pudiera ser de gran relevancia ya que indica que la respuesta de los precursores neurales a Shh pudiera estar condicionada a la exposición previa a otros factores de crecimiento, en este caso EGF. Esta interacción (que pudiera ser indirecta) entre EGF y la expresión del receptor de Shh, Ptc, indica que este último puede ser regulado positivamente por otras señales distintas a Shh, y que por lo tanto la vía de señalización por Shh puede ser regulada por factores en principio, ajenos a esta. Este dato, si bien incrementa la complejidad en el estudio de los patrones de desarrollo y diferenciación atribuidos a Shh, nos muestra que existen más elementos que regulan esta vía a varios niveles. Estos datos apoyan la tendencia general actual, que dicta que las cascadas de transducción de señales, contrariamente a funcionar de manera lineal, convergen entre ellas formando una intrincada red de comunicación celular.

La respuesta a Shh de los precursores neurales expandidos con EGF 'in vitro', presenta un patrón de expresión semejante al encontrado en el tejido mesencefálico ventral 'in vivo'.

En general, los sistemas de análisis llamados 'in vitro', que abarcan todo aquel procedimiento que se realiza en una caja de cultivo fuera del organismo, han constituido una herramienta muy útil para el estudio y caracterización de los procesos que se llevan a cabo en el organismo completo. Muy en particular me refiero a la utilización de los cultivos celulares, los cuales constituyen una alternativa que presenta una menor complejidad que la que implica estudiar el proceso en el tejido completo. Sin embargo, toda ventaja conlleva desventajas, y una de estas es la de no poder extrapolar tan fácilmente los eventos caracterizados en una caja de cultivo hacia el organismo completo, y sólo poder hacer ciertas inferencias para proponer nuevas alternativas de estudio. Un paso importante en la selección del sistema es su validación, es decir, demostrar que el sistema elegido representa de una manera convincente el comportamiento de lo sucedido 'in vivo'. En el estudio de la especificación del linaje durante el desarrollo del sistema hematopoyético, por ejemplo, se han establecido varios modelos de estudio que representan en buena medida, los procesos que ocurren en el organismo completo (Anzai, et al, 1999; Douay, et al 1991).

Con el objeto de validar nuestro sistema para el estudio de la respuesta a Shh de los precursores neurales en cultivo, y como parte de la caracterización de la cascada de Shh en el mesencéfalo ventral del ratón, evaluamos la expresión de los distintos marcadores de la vía de señalización por Shh en el tejido mesencefálico ventral a diferentes estadios de desarrollo. Realizando dicho estudio encontramos que la transcripción de los genes blanco de Shh está activa de manera temporal y congruente a lo encontrado en el cultivo de precursores neurales a partir de la estimulación por Shh (Fig. 6). Gli1 presenta un pico máximo de expresión a los

12.5dpc al tiempo en el que el RNAm de Hnf3 β comienza a detectarse para alcanzar su expresión máxima a los 13.5dpc, momento en el que Ptc ya se expresa de manera importante. Es necesario mencionar aquí que es justo a los 13.5 días cuando se observa la posible respuesta a Shh en el tejido completo (a juzgar por la aparición de Hnf3 β), 24 horas después de la presencia del estímulo (estimado por la expresión de Gli1 a los 12.5dpc) y coincidentemente con lo que observamos en cultivo. En este análisis no medimos la presencia del mensajero de Shh pero sabemos, por reportes de otros grupos de trabajo, que Shh se expresa en el mesencéfalo ventral desde los 11.5dpc (Echelard et al., 1993; Ericson, et al, 1995). El factor Gli2, de manera similar a lo encontrado *in vitro* no se detecta en los estadios de 10 a 14.5dpc, y sólo aparece a los 15.5dpc en el tejido, lo que sugiere que los efectos de Shh más tardíos en el desarrollo del mesencéfalo ventral (MV) pudieran estar mediados a través de este factor pero no los tempranos. Descubrimos, con sorpresa, que Gli3 se expresa de manera intensa en los estadios de desarrollo evaluados comportándose de manera similar a lo encontrado *in vitro*. Los análisis reportados por otros grupos indican que este factor se expresa principalmente de manera dorsal, por lo tanto, este resultado nos hace pensar que los precursores analizados estuvieran comportándose como dorsales en nuestras condiciones de cultivo, o que Gli3 pudiera estar mediando los efectos de Shh en nuestro sistema. Para ampliar nuestra comprensión sobre los mecanismos de acción de Shh en los precursores neurales será necesario identificar la forma proteica de Gli3 que está presente, a manera de poder definir el papel que juega en nuestro sistema, así como evaluar la presencia de algunos marcadores dorsales como Pax-3, Pax-7 y BMP-4, entre otros. Por último pudimos observar que Smo presenta una regulación negativa en el MV a partir de los 14.5dpc (Fig.6), comportamiento que se asemeja al encontrado en la curva temporal de activación por Shh, en donde su expresión se apaga en períodos largos de exposición a Shh (a partir de las 12 horas) (Fig.5b) o cuando la concentración de Shh es alta (en este caso 10ug/ml) (Fig. 4).

Esta regulación negativa de Smo por Shh no ha sido reportada y pudiera ser de gran relevancia indicando que la concentración y los tiempos de exposición a Shh son críticos para su expresión óptima (hecho que ya ha sido documentado para otros genes blancos de Shh como Isl1, Isl2 y Hnf3 β (Ericson, et al, 1996)). Este dato apoya la hipótesis de un modelo dinámico espacio-temporal de diferenciación en el SNC por morfógenos difusibles como Shh. Finalmente, el corroborar que los precursores neurales que expandimos con EGF '*in vitro*' presentan un comportamiento similar al encontrado en la región mesencefálica ventral '*in vivo*' resulta de gran relevancia, ya que nos indica que en nuestro sistema, las células son capaces de conservar el patrón de comportamiento presente dentro de su ambiente natural en el tejido del organismo completo, y lo avala como un sistema para el estudio de los efectos de Shh sobre los precursores neurales.

CONCLUSIONES

En conclusión, en este trabajo demostramos que los precursores neurales expandidos con EGF obtenidos del mesencéfalo ventral son capaces de responder a Shh expresando moléculas blanco características y presentando un patrón similar a lo que ocurre en este tejido *in vivo*. Este comportamiento valida nuestro sistema como un modelo para el estudio de la diferenciación de dichos precursores neurales en cultivo. Observamos que las CPN cuentan con las moléculas necesarias para la recepción y la transducción de la señal de Shh, y que al ser estimuladas por éste expresan de manera temporal sus genes blanco: Ptc, Shh y Gli1, a semejanza de lo ocurrido en otros sistemas. Aunado a lo anterior estos precursores son capaces de diferenciar hacia el fenotipo temprano de células de la placa del piso bajo la señal inductiva de Shh en combinación con otros factores de crecimiento como EGF o bFGF. El hecho de que detectemos el RNAm de Gli3 expresado de manera abundante, nos obliga a investigar cuál es la molécula protéica de Gli3 que está siendo producida por los precursores para conocer el papel que juega en nuestro sistema, así como a investigar qué factores regulan su expresión. Finalmente y de manera independiente a la regulación de Ptc por Shh, EGF regula su expresión positivamente de manera dosis dependiente. Esta relación, que no ha sido reportada hasta el momento, es de gran relevancia en el estudio del mecanismo de acción de Shh sobre los precursores neurales.

APÉNDICES

APÉNDICE I

Reactivos y soluciones para cultivos primarios y subcultivos de precursores neurales.

Medio basal de EAGLE modificado por DULBECCO/ F-12 (D-MEM/F-12)

Nº de catálogo 430-2400EB

con L-glutamina

sin bicarbonato de sodio

con 15 mM HEPES

- Medir aproximadamente 5% menos del volumen deseado final de agua bidestilada (950ml para 1lt.), utilizando un vaso de precipitado de 1lt.
- Adicionar el medio en polvo al agua a temperatura ambiente (15 a 30°C) con agitación suave (no calentar el agua).
- Enjuagar el paquete que contenía el polvo para remover todas las trazas de los compuestos del medio.
- Añadir: 1.2gr de NaHCO₃ por litro de medio.
- Agitar hasta disolver (no sobre mezclar).
- Ajustar el pH del medio a 6.9, entre 0.2 y 0.3 unidades de pH por debajo del requerido durante el trabajo (el pH utilizado para el cultivo de neuronas dopaminérgicas es entre 7.0-7.2) ya que usualmente incrementan entre 0.1 y 0.3 con la filtración; utilizar 1N NaOH en agua bidestilada (adicionar lentamente con agitación aprox. 26 gotas).
- Después de ajustar el pH, aforar a 1 lt. en matríz de dilución, sellar con parafilm y mezclar por inversión.

- Esterilizar inmediatamente por filtración a través de membrana de 0.22 μ M.
- Guardar a 4°C y utilizar en un periodo máximo de 1 mes.

Solución Salina I estéril para disección

Reactivo	para 1 lt.	500ml	100ml
NaCl	8.1gr	4.05gr	810mg
KCl	402mg	201mg	40mg
Na ₂ HPO ₄	156mg	78mg	15mg
KH ₂ PO ₄	150mg	75mg	15mg
Dextrosa	4gr	2gr	400mg
H ₂ O °Cultivo	1000ml	500ml	100ml

Ajustar el pH a 7.2 con 1N de NaOH (aprox. 8 gotas de pipeta Pasteur para 500ml), filtrar por membrana de 0.22 μ m en campana de flujo laminar y almacenar a temperatura ambiente.

Medio D-MEM con suero 10%

Reactivo	para 50ml	10ml
Medio D-MEM/F12	44.1ml	8.8ml
Suero fetal de bovino	5ml	1ml
Glutamina 100X	500 μ l	100 μ l
Dextrosa Peni/estrepto	324 μ l	65 μ l

Medio Definido para efecto de factores de crecimiento

Reactivo	para 25ml	Concentración del stock
D-MEM/F12	23.84ml	
Glutamina 1X	250 μ l	100X
Insulina 4 μ g/ml	156 μ l	25 μ g/ml
Transferrina	625 μ l	100 μ g/ml
Progesterona 20nM	50 μ l	10 μ M
Putresina 60 μ M	15 μ l	100mM
Selenita de sodio 30nM	75 μ l	10 μ M
*Penicilina/estreptomicina	5 μ l	370U/ml
	0,074U/ μ g Xml	

**La solución utilizada es la preparada con sol. Glucosada al 50% 2.5ml más 200 μ l de un stock de 5,000U/ml penicilina y 5,000 μ g/ml estreptomicina.

Azul de tripano 0.4%

Disolver 4mg en 1ml de sol. Salina I, guardar a temperatura ambiente.

Poli-D lisina 10ug/ml

Del stock 1mg/ml tomar 500 μ l y llevar a 50ml, esterilizar por filtración a través de 0.22 μ m.

Tripsina 0.1% para cultivo primario

Llevar 0.4ml de tripsina al 2.5% en sol. Isotónica (Gibco) a 10ml con Verseno.

Tripsina 0.025% para subcultivo

Llevar 50 μ l de tripsina al 2.5% a 5ml con Verseno.

Inhibidor de tripsina

Disolver 10mg en 10ml de medio definido, filtrar y dejar equilibrando en la incubadora antes de usar.

Medio definido con albúmina para diluir factores de crecimiento

Disolver 10mg de albúmina en 10ml de medio definido, filtrar y dejar equilibrando.

APÉNDICE II

*Soluciones para la extracción de RNA de subcultivos de precursores neurales***Solución de UREA 6M/ LiCl 3M**

Reactivo	para 50ml	100ml
LiCl (P.M. 42.39)	6.35gr	12.7gr
Urea (P.M. 60)	18gr	36gr

Utilizando guantes pesar LiCl y disolver en del volumen final, una vez disuelto agregar la Urea, aforar al volumen requerido y filtrar por membrana de 0.22 μ m

Citrato de Sodio 1M

Para 100ml

Citrato de sodio (deshidratado) 29.4gr

Disolver en 50ml de agua bidestilada estéril, llevar a pH 7.0, aforar y filtrar por membrana de 0.22 μ m, utilizar guantes.

Sarcosil (n-Laurilsarcosina) 10%

Para 100ml

Sarcosil 10gr

Disolver en 70ml de agua bidestilada estéril, aforar y filtrar por membrana de 0.22 μ m, utilizar guantes.

Acetato de Sodio 2M pH 4

Para 100ml

Acetato de sodio (anhidro) 16.4gr

Disolver en 40ml de H₂O bidestilada estéril, llevar a pH4 con ácido acético grado buffer, aforar y filtrar por membrana de 0.22 μ m.

Solución D

	Para 50ml
Tiocianato de guanidina	23.62gr
Citrato de Sodio (stock 1M)	1.25ml
Sarcosil (stock 10%)	2.5ml

Para preparar colocar el tiocianato en un tubo de 50 ml estéril, agregar H₂O bidestilada estéril, citrato de sodio y sarcocil, aforar a 50ml, filtrar por membrana de 0.22 μ m.

Cuando se utilice agregar β -mercaptoetanol a una concentración final de 0.1M

Para	
5ml	36 μ l
1ml	7.2 μ l
0.5ml	3.6 μ l

Buffer DNAsa para DNAsa libre de RNAsa 10X

(500mM Tris pH7.5, MgCl 100mM)

	para 25ml
Tris pH 7.5 (1M)	12.5ml
MgCl (3M)	0.83ml
H ₂ O bidestilada estéril	11.6ml

Todas las soluciones stock se preparan con agua bidestilada estéril, se filtran por membrana de 0.22 μ m y se esterilizan durante 20 min a 120°C. El buffer ya preparado se filtra nuevamente con filtro desechable, se hacen alícuotas de 500 μ l y se almacenan a -70°C.

H₂O especial para RNA

Destilar agua desionizada dos veces, autoclavar. De manera opcional se puede agregar dietilpírocarbonato al 0.2%, se deja toda la noche agitando y se autoclavea.

Fenol ácido (saturado con agua)

Cloroformo/alcohol isoamílico (24/1)

Isopropanol frío (4°C)

Etanol al 70% (-20°C)

APÉNDICE III

Reactivos para cuantificar RNA con el reactivo RiboGreen.

TE 20X

200mM Tris-HCl

20mM EDTA, pH 7.5

Preparar con agua especial para RNA, filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

RNA estándar

- Obtener un RNA lo más limpio y lo menos degradado posible, cuya concentración se calcule midiendo la DO a 260nm.
- Resuspender dicho RNA en el TE preparado previamente.

- Hacer alícuotas pequeñas de éste y guardar a -70°C . Cada vez que se realice una curva estándar, será conveniente descongelar una y a partir de entonces guardarla a 4°C .

Reactivo RiboGreen

El reactivo RiboGreen se almacena a -20°C y protegido de la luz. Se descongela a temp. ambiente.

APÉNDICE IV

Soluciones para preparar geles de Urea Ácido.

Urea 10M

Para preparar 100ml agregar 60 gr a aproximadamente 50 ml de agua especial para RNA, se disuelve en aprox. 30 minutos, aforar a 100ml y filtrar por membrana de $0.45\mu\text{m}$. Colocar en frasco estéril.

Ácido Cítrico 0.25M pH 3.5 (buffer de corrida 10X)

Para preparar 100ml agregar 4.8gr de ácido cítrico y 0.6gr de hidróxido de sodio a aproximadamente 80ml de agua especial para RNA, llevar a pH 3.5 con hidróxido de sodio 10N (aprox. 69 gotas de pipeta pasteur) aforar a 100ml y filtrar.

APÉNDICE V

Soluciones para preparar geles de acrilamida para purificación de oligos.

TBE 10X

Reactivo	para 1lt	500ml
Tris base 0.89M	107.7gr	53.8gr
Ácido Bórico 0.89M	55gr	27.5gr
EDTA 2Na 2H ₂ O 20mM	7.4gr	3.7gr

Disolver en 700ml de agua desionizada, aforar a 1 lt. El pH se ajusta por si solo en aproximadamente 8.

Acrilamida 40%

Reactivo	para 1lt	100ml	50ml
Acrilamida	152gr	38gr	19gr
Bis-acrilamida	8gr	2gr	1gr

Al preparar esta solución utilizar guantes y tener mucho cuidado de no aspirar el polvo ya que es neurotóxico.

Acrilamida 20% / Urea 8M

Reactivo	para 100ml	50ml
----------	------------	------

Acrilamida al 40%	50ml	25ml
Urea	48gr	24gr
TBE 10X	10ml	5ml

El volumen final se encuentra muy cercano a la cantidad necesaria, filtrar con filtro de 0.45 μ m

Sample Buffer

Azul de bromofenol al 0.25% / Urea 10M

APÉNDICE VI

Soluciones para electroporar

MEDIO SOB

	Conc. final
Triptona	2%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	10mM
KCl	2.5mM
MgCl	10mM
MgSo4	10mM

Este medio se prepara con agua bidestilada y se esteriliza en autoclave.

Mg 2M

1M MgCl ₂	2.035gr
1M MgSO ₄	2.46gr

Disolver en 10 ml de H₂O, esterilizar por filtración.

Glucosa 2M

Disolver 3.6gr en 10 ml, esterilizar por filtración.

Medio Luria (LB)

	Para 1lt	500ml	250ml
Triptona	10gr	5gr	2.5gr
Extracto de levadura 5gr	2.5gr	1.25gr	0.625gr
NaCl	5gr	2.5gr	1.25gr
NaOH 10N	0.3gr	0.13gr	0.075gr
Tris pH8 1M	10ml	5ml	2.5ml

Para medio sólido agregar:

Bacto agar	15gr	7.5gr	3.75gr
------------	------	-------	--------

- Esterilizar en autoclave 15 psi, 15 min.
- Sacar y agitar suavemente el frasco.
- Para agregar el antibiótico o cualquier otra sustancia lábil al calor, esperar a que el medio se enfríe un poco (como a 50 o 60°C).
- Se agrega el antibiótico a que quede a una concentración de 100µg/ml
- Se vacía en las cajas, se dejan secar, se voltean, se dejan una noche a temp. ambiente y se guardan a 4°C.

APÉNDICE VII

Soluciones para purificar plásmido a gran escala

Medio Luria (LB) con antibiótico (ver apéndice VI)

BUFFER P1

Para 100ml:

50mM TRIS-HCl pH 8.0

5ml de Tris-HCl 1M pH 8.0

10mM EDTA

2ml de EDTA 0.5M pH 8.0

BUFFER P2

(Preparar en el momento)

Para 50ml:

200mM NaOH

1ml de NaOH 10N

1% SDS

5ml de SDS 10%

BUFFER P3

3M acetato de Potasio pH 5.5

Para 100ml pesar 29.44gr y ajustar pH con ácido acético.

Almacenar a 4°C.

RNAse 10mg/ml

TE 1X pH 7.4

10mM tris pH 7.4

1mM EDTA pH 8.6)

PEG (polietilenglicol al 30%)

NaCl 5M

APÉNDICE VIII

Medio para cultivo y subcultivo de líneas celulares 293T y 10T1/2

Medio basal de EAGLE modificado por DULBECCO (D-MEM)

N° de catálogo 12100-038

sin bicarbonato de sodio

sin piruvato de sodio

- Medir aproximadamente 80% del volumen final deseado de agua grado cultivo (800ml para 1lt.), utilizando un vaso de precipitado de 1 lt. enjuagado previamente con agua grado cultivo.
- Adicionar el medio en polvo al agua a temperatura ambiente (15 a 30°C) con agitación suave (no calentar el agua).
- Enjuagar el paquete que contenía el polvo para remover todas las trazas de compuesto del medio.
- Añadir 3.7gr de NaHCO₃ por litro de medio.
- Agitar hasta disolver (no sobre mezclar).
- Ajustar el pH del medio a 7, entre 0.2 y 0.3 unidades de pH por debajo del requerido durante las condiciones de trabajo ya que usualmente incrementan entre 0.1 y 0.3 con la filtración; se recomienda utilizar 1N de

HCl en agua para cultivo (adicionar lentamente por agitación aprox. 121 gotas).

- Después de ajustar el pH aforar a 1lt. en matríz volumétrico previamente enjuagado con agua de cultivo. Sellar con parafilm y mezclar por inversión.
- Esterilizar por filtración inmediatamente a través de membrana de 0.22 μ M.
- Guardar a 4°C y utilizar en un periodo máximo de 1 mes.

Medio Completo, SFB 10%

	Para 100ml
Medio D-MEM	88ml
Suero Fetal de Bovino inactivado	10ml
Piruvato de Sodio	1ml
GPS 100X (glutamina, penicilina, estreptomicina)	1ml

PBS 1X

	Para 500ml	1 lt
NaCl	4gr	8gr
KCl	0.1gr	0.2gr
Na ₂ HPO ₄	0.72gr	1.44gr
KH ₂ PO ₄	0.12gr	0.24gr

Disolver en 4/5 del volumen total de agua, ajustar el pH a 7.4, aforar y esterilizar por filtración.

Tripsina 0.1% para subcultivo de células 10T1/2

Llevar 0.4ml de tripsina al 2.5% en sol. Isotónica (Gibco) a 10ml con Verseno.

APÉNDICE IX

Reactivos para transfección de células 293T.

HBS 2X

1.6gr NaCl

0.074gr KCl

0.04gr Na₂HPO₄

0.2gr Dextrosa

1gr HEPES

Disolver en 90ml de ddH₂O grado cultivo. Ajustar el pH con NaOH 1N, aforar a 100ml, filtrar y almacenar en alícuotas de 1ml a -70°C (máximo 6 meses).

Cada que se cambie de solución, deberá hacerse una curva de distintos pH's (entre 6.90, 6.95, 7.00, 7.05, 7.10). Seleccionarse la solución que dé mayor porcentaje de transfección y guardarse en alícuotas a -70°C.

CaCl₂

Medio Completo (ver Apéndice VIII)

APÉNDICE X

Soluciones para teñir actividad de fosfatasa alcalina

PARAFORMALDEHÍDO 4%

Para preparar 100ml, calentar 100ml de PBS a 55°C aproximadamente, disolver 4gr de paraformaldehído con mucho cuidado y dejar que se enfríe. Filtrarlo, hacer alícuotas de 10ml y guardar a -20°C.

BUFFER PA

(preparar al momento)

	Para 25ml:
NaCl 5M	500 μ l
Tris pH 9.5	2.5ml
MgCl ₂	1.25ml
H ₂ O	20.7ml

SOLUCIÓN DE REVELADO

Por cada ml de buffer PA agregar 3.5 μ l de reactivo NBT + 3.5 μ l de BCIP

Preparar en la oscuridad y para manejar los reactivos usar guantes.

PBS 1X pH7.3 (ver Apéndice VIII)

REFERENCIAS

- Alexandre, C., Jacinto, A., and Ingham, P.W. (1996). Transcriptional activation of hedgehog targets genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* 10, 2003-2013.
- Anzai, H., Nagayoshi, M., Obata, M., Ikawa, Y., and Atsumi, T. (1999). Self-renewal and differentiation of basic fibroblast growth factor-dependent multipotent haematopoietic cell line derived from embryonic stem cells. *Dev Growth Differ* 41:1, 51-8
- Aza-Blanc, P., Ramirez-Weber, F.A., Laget, M.P. Schwartz, C., and Kornberg, T.B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043-1053.
- Bellusci, S., Furuta, Y., Rush, M.G., Henderson, R., Winnier, G., and Hogan, B.L. (1997). Involvement of sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* 124, 53-63.
- Bitgood, M.J., Shen, L., and McMahon, A.P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 6:3, 298-304.
- Carpenter, D., Stone, D.M., Brush, J., Ryan, A., Armanini, M., Frantz, G., Rosenthal, A., and de Sauvage, F.J. (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13630-13634.
- Chen, Y., and Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87, 553-563.
- Dahmane, N., and Ruiz i Altaba, A., (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126, 3089-3100.
- Dahmann C. and Basterk, K. (2000). Opposing transcriptional outputs of Hedgehog signaling and engrailed control compartmental cell sorting at the *Drosophila* A/P boundary. *Cell* 100:4, 411-422.
- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M., and Ishii, S.(1999). Sonic hedgehog-induced activation of the gli1 promoter is mediated by GLI3. *J.Biol.Chem.* 274, 8143-8152.

Dickinson, M.E., Sellek, M.A., McMahon, A.P., and Bronner-Fraser, M. (1995). Dorsalization of the neural tube by the non-neural ectoderm. *Development* 121:7, 2099-106.

Ding, Q., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J., and Hui, C.-C. (1998). Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in *Gli2* mutant mice. *Development* 125, 2533-2543.

Doniach, T. (1992). Planar and vertical induction of anteroposterior pattern during the development of the amphibian central nervous system. *J. Neurobiology* 24, 1256-1275.

Douay, L., Giarratana, M.C., Drouet, X., Bardinet, D., and Gorin, N.C. (1991). The role of recombinant haematopoietic growth factors in human long-term bone marrow culture in serum-free medium. *Br. J Haematol.* 79:1, 27-32

Duprez, D., Fournier-Thibault, C., and LeDourain, N. (1998). Sonic hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. *Development* 125, 495-505.

Dutton, R., Yamada, T., Turnley, A., Bartlett, P., and Murphy, M. (1999). Sonic Hedgehog promotes neuronal differentiation of murine spinal cord precursors and collaborates with neurotrophin 3 to induce *Islet-1*. *Journal of Neurosciences* 19, 2601-2608.

Echelard, Y., Epstein, D.J., St.-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative secreted signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.

Ekker, S.C., McGrew, L.L., Lai, C.J., Lee, J.J., von Kessler, D.P., Moon, R.T. and Beachy, P.A. (1995). Distinct expression and shared activities of members of the hedgehog gene family of *Xenopus laevis*. *Development* 121:8, 2337-2347.

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.

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

Fan, C.M. and Tessier-Lavigne, M. (1994). Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell* 79, 1175-1186.

Fisher, L.J. (1997). Neural precursor cells: applications for the study and repair of the central nervous system. *Neurobiol. Dis* 4, 1-22.

Forbes, A.J., Lin, H., Igham, P-W., and Spradling, A.C. (1996). Hedgehog is required for the proliferation and specification of ovarian somatic cells prior to egg chamber formation in *Drosophila*. *Development* 122, 1125-1135.

Gage, F.H., Ray, J., and Fisher, L.J. (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 159-192.

Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Milenkovic, L., McMahon, J.A., and Scott, M.P. (1996). Conservation of the *hedgehog/patched* signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse *patched* gene by hedgehog. *Genes and development* 10, 301-312.

Goodrich, L.V., Milenkovic, L., and Higgins, K.M., and Scott, M.P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse *patched* mutants. *Science* 277, 1109-1113.

Goodrich, L.V., and Scott, M.P. (1998). Hedgehog and *patched* in neural development and disease. *Neuron* 21, 1243-1257.

Goulding, M.D., Lumsden, A. and Gruss, P. (1993). Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development* 117:3, 1001-1016.

Graham, A. (1997). The origin of dorsoventral patterning of the vertebrate nervous system. *Trends Genet.* 13, 463-465.

Gruss, P., and Walter, C. (1992). Pax in Development. *Cell* 69, 719-722.

Hammerschmidt, M., Brook, A., and McMahon, A.P. (1997). The world according to hedgehog. *TIG* vol 13-1.

Hargrave, M., Karunaratne, A., Cox, L., Wood, S., Koopman, P. And Yamada, T. (2000). The HMG box transcription factor gene Sox14 marks a novel subset of

- ventral interneurons and is regulated by sonic hedgehog. *Dev. Biol.* 219:1, 142-53.
- Hidalgo A. and Ingham P. (1990). Cell patterning in the *Drosophila* segment: spatial regulation of the segment polarity gene *patched*. *Development* 110:1, 291-301.
- Hirano, S., Fuse, S., and Sohal, G.S. (1991). The effect of the floor plate on pattern and polarity in the developing central nervous system. *Science* 251:4991 310-3.
- Hooper, J.L., and Scott, M.P. (1989). The *Drosophila* *patched* gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* 59, 751-765.
- Hui C.-C., Slusarski, D., Platt, K.A., Holmgren, R., and Joyner, A.L. (1994). Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *Cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in the ectoderm -and mesoderm- derived tissues suggest multiple roles during postimplantation development. *Dev. Biology* 162, 402-413.
- Hynes, M., Porter, J.A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P.A., and Rosenthal, A. (1995a). Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic Hedgehog. *Neuron* 15, 35-44.
- Hynes, M., Poulsen, K., Tessier-Lavigne, M., and Rosenthal, A. (1995b). Control of neuronal diversity by the floor plate: contact-mediated induction of dopaminergic neurons. *Cell* 80, 95-101.
- Hynes, M., Stone, D.M., Dowd, M., Pitts-Meek, S, Goddard, A., Gurney, A., and Rosenthal, A. (1997). Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene *Gli-1*. *Neuron* 19, 15-26.
- Hynes, M., Ye, W., Wang, K., Stone, D., Murone, M., Sauvage, F. and Rosenthal, A. (2000). The seven-transmembrane receptor *smoothed cell* autonomously induces multiple ventral cell types. *Nat Neurosci* 3:1, 41-46.
- Ingham P.W., Taylor A.M., and Nakano Y. (1991). Role of the *Drosophila* *patched* in positional signaling. *Nature* 353:6340, 184-187.
- Ingham, P.W. (1998). Transducing Hedgehog: The story so far. *EMBO J.* 17, 3505-3511.
- Jensen, A.M. and Wallace, V.A. (1997). Expression of sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development* 124, 363-371.

- Jiang, J., and Struhl, G. (1995). Protein kinase A and hedgehog signaling in *Drosophila* limb development. *Cell* 80:4, 563-572.
- Johnson, R.L., and Tabin, C. (1995). The long and short of hedgehog signaling. *Cell* 81, 313-316.
- Katagiri T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J., Fujisawa-Sehara, A. and Suda, T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *Journal of cell biology* 127:6, 1755-1766.
- Kelly, O.G., and Melton, D.A. (1995). Induction and patterning of the vertebrate nervous system. *Trends Genet.* 11, 273-278.
- Kengaku, M., and Okamoto, H. (1995). bFGF as a possible morphogen for the anteroposterior axis of the central nervous system in *Xenopus*. *Development* 121, 3121-3130.
- Kilpatrick, T.J. and Bartlett, P.F. (1993). Cloning and growth of multipotential neural precursors: Requirements for proliferation and differentiation. *Neuron* 10, 255-265.
- Kilpatrick, T.J., Richards L.J., and Bartlett, P.F. (1995). The regulation of neural precursor cells within the mammalian brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 6, 2-15
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1990). The *GLI* gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol. Cell. Biol.* 10, 634-642.
- Kintner, C.R., and Dodd, J. (1991). Hensen's node induces neural tissue in *Xenopus* ectoderm. Implications for the action of the organizer in neural induction. *Development* 113, 1495-1505.
- Kinto, N., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., Noji, S., Ohuchi, H., Yoshioka, H., Kataoka, H., Wada, Y., Yuhao, G., Takahashi, H.E., Yoshiki, S., and Yamaguchi, A. (1997). Fibroblast expressing Sonic hedgehog induce osteoblast differentiation and ectopic bone formation. *FEBS Lett.* 404, 319-323.
- Kucera, J., Ernfors, P., Walro, J., and Jaenish, R. (1995). Reduction in the number of spinal motor neurons in nerotrophin-3-deficient mice. *Neuroscience* 69, 321-330.

- Lai, C.J., Ekker, S.C., Beachy, P.A., and Moon, R.T. (1995). Patterning of the neural ectoderm of *Xenopus laevis* by the amino-terminal product of hedgehog autoproteolytic cleavage. *Development* 121, 2349-2360. et al, 1995;
- Lamb, T.M., Knecht, A.K., Smith, W.C., Stachel, S.E., Economides, A.N., Stahl, N., Yancopolous, G.D., and Harland, R.M. (1993). Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* 262, 713-718.
- Lamb, T.M., and Harland, R. M. (1995). Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, wich combined with noggin generates antero-posterior naural pattern. *Development* 121, 3627-3636.
- Lee, J.J., Ekker, S.C., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Sun, B.I., and Beachy, P.A. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 266, 1528-1537.
- Lee, J., Platt, K.A., Censullo, P., and Ruiz i Altaba, A. (1997). *Gli1* is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124, 2537-2552.
- Lee, S., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J., and McKay, D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 18, 675-679.
- Li, W., Ohlmeyer, J.T., Lane, M. E., and Calderón, D. (1995). Function of protein kinase A in hedgehog signal transduction and *Drosophila* imaginal disc. *Cell* 80:4, 553-562.
- Liem, K.F. Jr., Tremml, G., Jessell, T.M. (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91:1 127-38.
- Liem, K. Jr. Tremml, G., Roelink, H., Jessell, T.M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969-979.
- McGrew, L.L., Lai, C.J., and Moon, R.J. (1995). Specification of the anteroposterior neural axis through synergistic interaction of the Wnt signaling cascade with noggin and follistatin. *Dev. Biol.* 172, 337-342.
- McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* 276, 66-77.

- McMahon, A.P. (2000). More surprises in the hedgehog signaling pathway. *Cell* 100, 185-188.
- Marigo, V., and Tabin, C. (1996c). Regulation of Patched by Sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9346-9351.
- Marigo, V., Davey, R.A., Zuo, Y., Cunningham, J.M., and Tabin, C.J. (1996a). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384, 176-179.
- Marigo, V., Johnson, R.L., Vortkamp, A., and Tabin, C.J. (1996b). Sonic hedgehog differentially regulates expression of *GLI* and *GLI3* during limb development. *Dev. Biol.* 180, 273-283.
- Martí, E., Bumcrot, D.A., Takada, R., and McMahon, A.P. (1995). Requirement of 19K form of Sonic Hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* 375, 322-325.
- Masouri, A., Hallonet, M., and Gruss P. (1996). Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Current opinion in Cell Biology* 8, 851-857.
- Matise, M.P., Epstein, D.J., Park, H.L., Platt, K.A. and Joyner, A.L. (1998). *Gli2* is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* 125, 2759-2770.
- Mo, R., Freer, A.M., Zinyk, D.L., Crackower, M.A., Michaud, J., Heng, H.H., Chik, K.W., Shi, X.M., Tsui, L.C., Cheng, S.H., Joyner, A.L., and Hui, C. (1997). Specific and redundant functions of *Gli2* and *Gli3* zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 124, 113-123.
- Monnier, V., Dussillol, F., Alves, G., Lamour-Isnard, C. And Plessis, A. (1998). Suppressor of fused links fused and *Cubitus interruptus* on the hedgehog signalling pathway. *Curr Biol* 8:10, 583-586.
- Motoyama, J., Takabatake, T., and Takeshima, K., and Hui, C. (1998). *Ptch2*, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. *Nat Genet* 18:2, 104-6.
- Murone, M., Rosenthal, A., de Sauvage, F.J. (1999). Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Exp. Cell Res.* 253, 25-33.
- Nakano, Y., Guerrero, I., Hidalgo, A., Taylor, A., Whittle, J.R.S., and Ingham, P.W. (1989). A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the *Drosophila* segment polarity gene patched. *Nature* 341, 508-513.

Nieuwkoop, P.D. (1952a). Activation and organization of the central nervous system in amphibian. Part I. Induction and activation. *J. Exp. Zool.* 120, 1-31.

Nieuwkoop, P.D. (1952b). Activation and organization of the central nervous system in amphibians. Part II. Differentiation and organization. *J. Exp. Zool.* 120, 33-81.

Noll, E., and Miller, R.H. (1993). Oligodendrocyte precursors originate at the ventral ventricular zone dorsal to the ventral midline region in the embryonic rat spinal cord. *Development* 118, 563-573.

Oro, A.E., Higgins, K.M., Hu, Z., Bonifas, J.M., Epstein Jr., E.H., and Scott, M.P. (1997). Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science* 276, 817-821.

Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., Taylor, F.R., Wang, E.A., and Galdes, A. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* 273, 14037-14045.

Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T., Jessell, T., and Dodd, J. (1990). Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord. *Science* 250, 985-988.

Placzek, M., Yamada, T., Tessier-Lavigne, M., Jessell, T., and Dodd, J. (1991). Control of dorsoventral pattern in vertebrate neural development: induction and polarizing properties of the floor plate. *Development* 2(suppl.), 105-122.

Placzek, M., Jessell, T.M., and Dodd, J. (1993). Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals. *Development* 117, 205-218.

Placzek, M., Dodd, J., and Jessell, T.M. (2000). Discussion point: The case for floor plate induction by the notochord. *Current Opinion in Neurobiology* 10, 15-22

Poncet, C., Soula, C., Trousse, F., Kan, P., Hirsinger, E., Pourquie, O., Duprat, A.M., and Cochard, P. (1996). Induction of oligodendrocyte progenitors in the trunk neural tube by ventralizing signals: effects of notochord and floor plate grafts, and of sonic hedgehog. *Mech. Dev.* 60, 13-32.

Porter, J.A., von Kessler, D.P., Ekker, S.C., Young, K.E., Lee, J.J., Moses, K., and Beachy, P.A. (1995). The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signaling. *Nature* 374, 363-366.

Porter, J.A., Ekker, S.C., Park, W.J., von Kessler, D.P., Young, K.E., Chen, C.H., Ma, Y., Woods, A.S., Cotter, R.J., Koonin, E.V., and Beachy, P.A. (1996). Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 86, 21-34.

Préat, T., Théron, P., Lamour-Isnard, C., Limbourg-Bouchon, B., Tricoire, H., Erk, I., Mariol, M.C. and Busson, D. (1990). A putative serine/threonine protein kinase encoded by the segment-polarity fused gene of *Drosophila*. *Nature* 347:6288 87-9

Pringle, N.P., Yu, W.P., Guthrie, S., Roelink, H., Lumsden, A., Peterson, A.C., and Richardson, W.D. (1996). Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev. Biol.* 177, 30-42.

Qi, D., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J., and Hui, Ch. (1998). Diminished hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in *Gli2* mutant mice. *Development* 125, 2533-2543.

Raffel, C., Jenkins, R.B., Frederick, L., Hebrink, D., Alderete, B., Fults, D.W., and James, C.D. (1997). Sporadic medulloblastomas contain *PTCH* mutations. *Cancer Res.* 57, 842-845.

Ramírez-Weber, F.A., and Kornberg, T.B. (1999). Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 97, 599-607.

Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., and Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 12, 4565-7574.

Robbins, D.J., Nybakken, K.E., Kobayashi, R., Sisson, J.C., Bishop, J.M., and Théron, P.P. (1997). Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein *costal2*. *Cell* 90:2, 225-234.

Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T.M., and Dodd, J. (1994). Floor plate and motor neuron induction by *vhh-1*, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761-775.

- Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.A., and Jessell, T.M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of Sonic Hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445-455.
- 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* 19:20, 8954-8965.
- Ruiz i Altaba, A., and Jessell, T.M. (1991). Retinoic acid modifies the pattern of cell differentiation in the central nervous system of neurula stage *Xenopus* embryos. *Development* 112, 945-958.
- Ruiz i Altaba, A. (1992). Induction and axial patterning of neural plate: planar and vertical signals. *J. Neurobiol.* 24, 1276-1304.
- Ruiz i Altaba, A. (1997). Catching a Gli-mouse of Hedgehog. *Cell* 90:2, 193-196.
- Ruiz i Altaba, A. (1998). Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* 125, 2203-2212.
- Ruiz i Altaba, A. (1999). Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: Implications for development and disease. *Development* 126, 3205-3216.
- Ruppert, J.M. Vogelstein, B., Arheden, k., and Kinzler, K.W. (1990). *GLI3* encodes a 190 kilodalton protein with multiple regions of *GLI* similarity. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5408-5415.
- Sang-Hun, L., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., and McKay, R.D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 18, 675-679.
- Santa-Olalla, J., and Covarrubias, L. (1995a). Epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-alpha (TGF-alpha), and basic fibroblast growth factor (bFGF) differentially influence neural precursor cells of mouse embryonic mesencephalon. *J. Neurosci. Res.* 42, 172-183.
- Santa-Olalla, J., and Covarrubias, L. (1995b). Random catecholaminergic differentiation of mesencephalic neural precursors. *Develop. Neurosci.* 6, 2394-2398.

- Sasai, Y., Lu, B., Steinbesser, H., De Robertis, E.M. (1995). Regulation of neural induction by the Chd and BMP-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 376, 333-336.
- Sasaki, H., Hui, C.-C., Nakafuku, M., and Kondoh, H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF3b floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124, 1313-1322.
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., and Kondoh, H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: Implications of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126, 3915-3924.
- Selleck, M.A., and Bronner-Fraser, M. (1995). Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development* 121:2, 525-38.
- Sieber-Blum, M., and Zhang, J.M. (1997). Growth factor action in neural crest cell diversification. *J Anat* 191(Pt4), 493-499
- Sisson, J.C., Ho, K.S., Suyama, K. And Scott, M.P. (1997). Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 90:2, 235-245.
- Sive, H. L., Draper, B.W., Harland, R.M., and Weintraub, H. (1990). Identification of a retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* 4, 932-942.
- Slack, J.M.W., and Tannahill, D. (1992). Mechanism of anteroposterior axis specification in vertebrate: lessons from the amphibians. *Development* 114, 285-302.
- Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., et al.(1996). The tumor-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384, 129-134.
- Tanabe, Y., and Jessell, T.M. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274, 1115-11233.
- The, I., Bellaiche, Y., and Perrimon, N. (1999). Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol. Cell* 4, 633-639.

- Theil, T., Kaesler, S., Grotewold, L., Bose, J., and Ruther, U. (1999). Gli genes and limb development. *Cell Tissue Res.* 296, 75-83.
- van den Heuvel, M., and Ingham, P.W. (1996). Smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signaling. *Nature* 382, 547-551.
- van Straaten, H.W., Hekking, J.W., Wiertz-Hoessels, E.J., Thors, F. and Drukker, J. (1988). Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* 177:4, 317-324.
- van Straaten, H.W., and Hekking, J.W. (1991). Development of floor plate, neurons and axonal outgrowth pattern in the early spinal cord of the notochord-deficient chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* 184: 55-63.
- Vescovi, A.L., Reynolds, B.A., Fraser, D.D., and Weiss, S. (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11, 951-966.
- von Mering, C., and Basler, K. (1999). Distinct and regulated activities of human Gli proteins in Drosophila. *Current Biology* 9, 1319-1322.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., and Tabin, C.J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273:5275, 613-22.
- Wang, B., Fallon, J. F., and Beachy, A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an A/P repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100, 423-434.
- Wang, M.Z., Jin, P., Bumcrot, D.A., Marigo, V., McMahon, A.P., Wang, E.A., Wolf, T., and Pang, K. (1995). Induction of dopaminergic neuron phenotype in the midbrain by Sonic Hedgehog protein. *Natural Medicine* vol.1, 1184-1188.
- Wang, B., Fallon, J., and Beachy, A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100, 423-434.
- Wechsler-Reya, R.J., and Scott, M.P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by sonic hedgehog. *Neuron* 22, 103-114.
- Williams, K., Rayhorn, P., Chi-Rosso, G., Garber, E., Strauch, K., Hornan, G., Reilly, J., Baker, D., Taylor, F., Koteliansky, V. And Pepinsky, B. (1999). Functional antagonists

- of sonic hedgehog reveal the importance of the N terminus for activity. *Journal of cell science* 112, 4405-4414.
- Wilson, P., and Kemmati-Brivanlou, A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by BMP-4. *Nature* 376, 331-333.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P., and Meyerowitz, E. PRINCIPLES OF DEVELOPMENT. *Current Biology/Oxford*, 1998.
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S.M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J.M., Lam, C.W., Hynes, M., Goddard, A., Rosenthal, A., Epstein, E.H. Jr., and de Sauvage, F.J. (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391:6662, 90-92.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, J., Dodd, J., and Jessell, T.M. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64, 635-647.
- Yamada, T., Pfaff, S.L., Edlund, T. And Jessell, T.M. (1993). Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* 73:4, 673-686.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J.L.R., Hynes, M.A., and Rosenthal, A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural palte. *Cell* 93, 755-766.
- Yu, W.-P., Collarini, E., Pringle, N., and Richardson, W.(1994). Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron* 12, 1353-1362.
- Zhou, X.F., and Rush, R.A. (1994). Localization of neruotrophin-3-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res.* 643, 162-172.
- Zhu, G., Mehler, M., Zhao, J., Yung, S., and Kessler, J. (1999). Shh and BMP2 exert opposing actions on proliferation and differentiation of embryonic neural progenitors cells. *Developmental Biology* 215, 118-129.