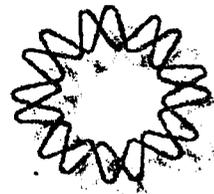


00562

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS PRECURSORAS
NEURALES A SONIC HEDGEHOG *IN VITRO*”

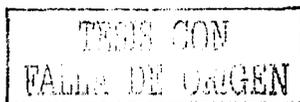
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

LIC. en IBB. MARIANA CONSUELO FREGOSO LOMAS

DIRECTOR DE TESIS
JESÚS SANTA-OLALLA TAPIA



CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2003

A



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.

Autoriza a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo profesional.

NOMBRE: MARIANA C. FREEDSC LOMAS

AGRADECIMIENTOS

FECHA: 27 Junio 2003

FIRMA: [Firma manuscrita]

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por brindarme tantas oportunidades de desarrollo desde muy pequeña. No cabe duda que me faltará vida para aprovecharlas todas.

Al INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA por brindarme la oportunidad de realizar la parte más importante de mi desarrollo profesional .

Al Dr. Luis Covarrubias Robles por confiar en mí, por aceptarme en su laboratorio y por brindarme sus asesorías durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia por las asesorías durante la realización de este trabajo, por las buenas críticas que tarde o temprano terminaron dándose durante este período y por la interacción siempre humana que hubo entre nosotros.

A la Dra. Hilda Lomelí Buyoli, el Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia, la Dra. Diana Escalante Alcalde, el Dr. Ernesto Méndez Salinas y la Dra. Claudia Treviño Santa Cruz por la revisión del manuscrito y por sus atinados comentarios.

A mis amigas Vero, Chío, Denhi, Lucy, Rayo, Laura, Gise, Diana y Roxana por hacer de esta etapa de mi vida una de las más plenas, enriquecedoras y divertidas de mi vida. Por supuesto también a Tonathiu, Eddie, Enrique, Marito y Tako por hacer de estas grandes personas unas mujeres felices y completas, también porque independientemente de lo anterior me parecen, en lo personal, de esos hombres de los que deberían de haber más en este mundo.

A mis papás Lupita y Enrique, a Choff y a mis más grandes ejemplos de mujer, mis abuelitas Chelo y Anita por apoyarme incondicionalmente, por confiar plenamente en que puedo lograrlo siempre que me lo proponga, por promover siempre mi desarrollo como persona y mujer de bien, por darme, desde un inicio, todas las herramientas necesarias para disfrutar plenamente ésta vida y desarrollarme con éxito, por quererme de una manera casi inexplicable y por esperarme SIEMPRE con los brazos bien abiertos .

De manera muy especial a Gina, Enrique, Ale y Enriquito, que han representado para mí desde que me aparecí en este paraíso primaveral, mi principal hogar, familia y nicho de amigos verdaderos, por todo el cariño incalculable que me han brindado y por todo aquel que han provocado que les profese.

A Rafa, por aparecerse en mi vida en el momento justo, de la manera más sorprendente y maravillosa posible, por hacer de estos últimos meses un período realmente agradable, por todo lo que nos resta por hacer, por los sueños, los planes y por las buenas e interminables pláticas, también por ayudarme de muy buena manera a tener este manuscrito a tiempo.

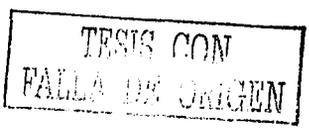
B



ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
• Desarrollo del Sistema Nervioso Central.....	3
• Participación de Sonic Hedgehog durante el desarrollo del SNC.....	9
• Biología de Sonic Hedgehog.....	11
• Vía de señalización por Sonic Hedgehog.....	13
• Precursores neurales.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
MATERIAL BIOLÓGICO.....	23
METODOLOGÍA.....	24
• Disección y cultivo de región mesencefálica rostral.....	24
• Subcultivo de precursores neurales.....	26
• Extracción de RNA de subcultivos de precursores neurales.....	27
• Procedimiento para realizar cDNA y RT-PCR de subcultivos.....	28
• Condiciones de amplificación para cada marcador.....	29
• Subcultivo de línea celular 293T.....	29
• Transfección de línea celular 293T.....	30
• Subcultivo de línea celular 10T1/2.....	31
• Tinción para ver actividad de fosfatasa alcalina en monocapa.....	31
• Hibridación <i>in situ</i> de mesencéfalo completo.....	32
MEDIOS Y SOLUCIONES.....	34
RESULTADOS.....	41
• N-Shh recombinante no es capaz de inducir la expresión de <i>Gli1</i> , <i>Ptc</i> y <i>Shh</i> en Células Precursoras Neurales.....	41
• BFGF y N-Shhr no cooperan para inducir la expresión de <i>Gli1</i> , <i>Ptc</i> y <i>Shh</i> en Células Precursoras Neurales.....	44
• El Shh procesado en células 293T es más activo que el N-Shh recombinante.....	46
• El medio condicionado que contiene Shh procesado no induce la expresión de <i>Gli1</i> , <i>Ptc</i> y <i>Shh</i> en las CPNs.....	49
• Un adenovirus que sobreexpresa Shh genera una actividad tres órdenes de magnitud más alta que la del medio condicionado con Shh procesado.....	51
• Las células del mesencéfalo ventral no responden a Shh.....	53
• A los 10.5 dpc existen células del mesencéfalo que responden a Shh endógeno cuando se encuentran en su entorno natural, efecto que se pierde cuando son disgregadas.....	56
DISCUSIÓN.....	60
• Shh no activa transcripcionalmente a <i>Gli1</i> en CPNs.....	61
• Shh requiere de moléculas adicionales para desencadenar una respuesta.....	66
• La señalización por Shh se complica: otros factores involucrados durante la producción, procesamiento y recepción de la señal.....	67
CONCLUSIONES.....	71
REFERENCIAS.....	72

ABREVIATURAS

AMP	adenosin mono phosphate (mono fosfato de adenosina)
A-P	antero-posterior
Ad. Shh	adenovirus capaz de sobreexpresar Shh
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)
BMPs	bone morphogenetic proteins
cDNA	complementary Desoxiribonucleic acid (Ácido desoxiribonucleico complementario)
Ci	cubitus interruptus
Ci-155	cubitus interruptus de 155Kd
Ci-75	cubitus interruptus de 75Kd
Cos2	costal2
CPNs	células precursoras neurales
C-terminal	carboxilo terminal
Cys	cisteína
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)
FP3	marcador de la placa del piso 3
FP4	marcador de la placa del piso 4
bFGF	basic fibroblast growth factor (factor de crecimiento básico de fibroblastos)
Fu	fused (cinasa de treonina-serina)
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 3β (factor nuclear de hepatocitos-3β)
Hox	homeobox-containing genes (genes con caja homeótica)
Hprt	hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa
HSPGs	heparan sulfato proteoglicanos
Ihh	Indian Hedgehog



Isl-1	Islet-1
Kd	kilo Daltons (kilodaltones)
Krox-20	Krüpel box gene-20 (gen con caja Krüpel-20)
Lim1	factor transcripcional-1 con homeodominio LIM
M-L	medio-lateral
MV	mesencéfalo ventral
Nkx2.2	gene con caja homeótica perteneciente a la familia de factores transcripcionales Nk
N-Shh	Sonic Hedgehog amino terminal
N-Shhr	Sonic Hedgehog amino terminal recombinante
N-terminal	amino terminal
NH2-	Terminal
NT3	neurotrofina 3
Otx2	orthodenticle-related gene 2
P4	día postnatal 4
P8	día postnatal 8
Pax-3	paired box containing protein-3 (Proteína con caja <i>paired-3</i>)
Pax-6	paired box containing protein-6
Pax-7	paired box containing protein-7
Pb	pares de bases
PKA	protein kinase A (proteína cinasa dependiente de AMP cíclico)
Ptc	(patched)
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)
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
Su(fu)	supresor de fused
SC1	glicoproteína de matriz extracelular relacionada a la proteína multifuncional SPARC
TH	tirosin hidroxilasa
Wg	Wingless
Wnt	homólogo de Wingless en vertebrados

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

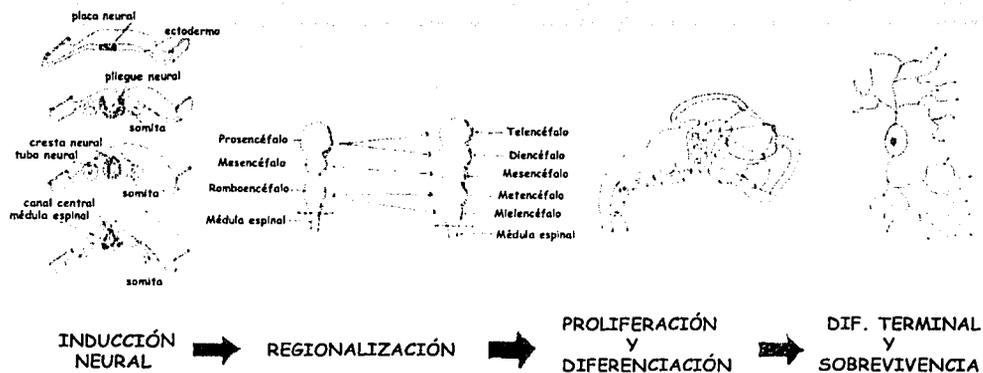
Sonic Hedgehog (Shh) es un morfógeno perteneciente a la familia de Hedgehog (Hh) por su homología al gen de polaridad de los segmentos identificado originalmente en *Drosophila* (Echelard et al., 1993; Roelink et al., 1994). Este factor de crecimiento de naturaleza protéica participa en el control de la proliferación, sobrevivencia, diferenciación y muerte celular durante la formación de diferentes órganos y tejidos en los organismos pluricelulares en desarrollo. En los vertebrados participa, entre otros procesos, en el establecimiento de los ejes Antero-Posterior (A-P) y Dorso-Ventral (D-V) durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) (Echelard et al, 1993).

Desarrollo del Sistema Nervioso Central

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 precursores del 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) (Figura 1a). 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 caracteriza por patrones de expresión específicos en el estadio de néurula, que establecen 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 que se establece controla la diferenciación a lo largo del eje antero-posterior. Esto es mediado por la expresión diferencial de genes que codifican para factores transcripcionales (i.e. *Bf1*, *Otx2*, *En-1*, *Hox*) que participan en la adquisición de la identidad posicional de las células en este eje (revisado por Tanabe and Jessell, 1996). El segundo patrón controla el desarrollo de la placa neural a lo largo del

eje medio-lateral (M-L), que más tarde será el eje dorso-ventral del tubo neural y en el que distintos factores transcripcionales identifican zonas de precursores comprometidos (revisado por Graham, 1997). La placa neural al ser especificada con la información de ambos ejes dará origen a distintos tipos celulares que eventualmente producirán diferentes neuronas y células gliales ocupando posiciones únicas (Briscoe et al., 2000). El patrón inicial a lo largo del eje M-L en el ectodermo dorsal, como también pasa con el eje A-P, ocurre aún antes que se haya fusionado la placa neural. En el momento en el que se forma el tubo neural, 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* (V2,V1) en una región más dorsal (Figura1b). Al mismo tiempo las células ubicadas más lateralmente 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 la identidad y la localización de estos tipos celulares en el eje D-V provienen de grupos celulares no neurales; medialmente de la notocorda y el tejido mesodérmico paraxial, y lateralmente del ectodermo epidermal que delimita la placa neural (revisado por Graham, 1997). La relevancia funcional de la notocorda en estos procesos se ha demostrado al transplantarla en la parte dorsal del tubo neural donde induce de manera ectópica placa del piso y motoneuronas (tipo celular característico de la región ventral) (Plackzec et al., 1990). Además, cuando la notocorda se elimina por completo 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.

A



B

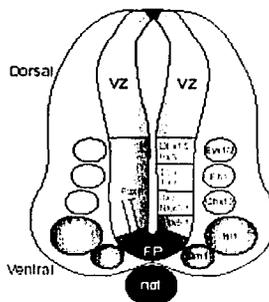


Fig.1 Desarrollo del Sistema Nervioso Central **A.** El patrón D-V se forma después de la inducción neural, al momento de la invaginación del tubo neural. El patrón A-P se establece más temprano en el desarrollo que el D-V, pero morfológicamente, las regiones que darán origen a las diferentes estructuras 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. **B.** Shh es el factor morfogénico involucrado en la generación de los fenotipos celulares ventrales en el tubo neural. El Shh secretado a partir de la notocorda (not) establece dominios de células progenitoras que expresan proteínas con homoeodominio características. Esto lo hace reprimiendo la expresión de los genes de clase I (Pax6, Irx3 y Dbx1/2) e induciendo a los de clase II (Nkx2.2 y Nkx6.1). Los dominios de expresión de Pax6 y Nkx2.2 que son mutuamente excluyentes se representan del lado izquierdo de la zona ventricular. Los pequeños óvalos representan cinco clases de neuronas que se originan en la médula espinal dorsal e indican la expresión de los genes que especifican cada subtipo neuronal. De ventral a dorsal los tipos neuronales se conocen como V3 (Sim1), MN (Isl1), V2 (Chx10), V1 (En1) y V0 (Evx1). MN, motoneuronas, V0-V3, interneuronas. Tomado de Bovolenta and Martí, 2002.

Se han identificado dos tipos de señales provenientes de la notocorda. Una 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 3-beta (Hnf3- β) (Roelink, et al, 1995). 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 producir los dos tipos de señales por si misma (Placzek et al., 1993). Se ha demostrado que los efectos ventralizantes de la notocorda, y los de la placa del piso, están mediados por la molécula secretable Shh (Echelard et al., 1993; Roelink et al., 1994). Shh se expresa inicialmente en la notocorda, y posteriormente en la placa del piso, (Roelink et al., 1995); además, cuando se expresa, o se colocan esferas impregnadas con la proteína en la parte dorsal del tubo neural se induce la expresión ectópica de marcadores de la placa del piso o motoneuronas (Roelink et al. 1995; Martí and Mc. Mahon, 1995). La expresión localizada y la difusión limitada Shh es determinante para crear un gradiente que actuando como morfógeno, induce diferentes fenotipos ventrales a diferentes umbrales. De mayor a menor concentración se favorece la diferenciación de la placa del piso, interneuronas V3, motoneuronas e Interneuronas V1-2 (Johnson and Tabin, 1995; Roelink et al., 1995). Durante el proceso de adquisición de la identidad ventral Shh regula la expresión de algunos genes de la familia Pax, factores transcripcionales que contienen homeodominio (revisado por Gruss and Walter, 1992; Másouri et al., 1996). Durante el desarrollo del sistema nervioso, la expresión de los genes Pax3, Pax6 y Pax7 es finamente regulada lo que permite identificar claramente diferentes dominios en él. En un inicio Pax3 y Pax7 se expresan en toda la placa neural a nivel caudal. En el momento en el que los pliegues del tubo neural comienzan a formarse, la expresión de Pax3 y Pax7 se limita a regiones más dorsales mientras que Pax6 comienza a expresarse en posiciones medio-laterales exceptuando la línea media (a los 10dpc.) (Goulding et al., 1993). Después del cierre del tubo neural, la expresión de Pax3 y Pax7 se restringe completamente a la mitad dorsal del tubo neural y Pax6 conserva una expresión más ventral (Goulding et al., 1993; Liem et al., 1995). La represión ventral de Pax3 y Pax7 está mediada por el Shh proveniente de la notocorda y parece ser un requisito para la

generación de los fenotipos celulares ventrales. Esto correlaciona en experimentos donde al transplantar la notocorda a regiones dorsales del tubo neural, se inhibe la expresión de Pax3 y Pax7 previo a la generación de los fenotipos ventrales (Goulding et al., 1993). De manera simultánea a la restricción de la expresión de los genes Pax3 y Pax7 a la región dorsal, las células de la línea media ventral del tubo comienzan a expresar Hnf3- β , FP3 y FP4 (Roelink et al., 1994). Una vez que estas células ventrales adquieren el fenotipo de la placa del piso comienzan a secretar Shh y a inducir la expresión de las moléculas involucradas en su cascada de transducción de señales como Patched-1 (Ptc-1) (Goodrich et al., 1996), y Gli1 en las células adyacentes (Lee et al, 1997, 1998; Hynes et al, 1997). 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 tres subpoblaciones de *interneuronas* inducidas por Shh (Ericson et al, 1997; Hargrave et al., 2000). La diferenciación de estos fenotipos se genera por un efecto morfogénico de Shh (Figura 1b). 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 desencadenar la generación de distintos tipos celulares. En la parte dorsal del tubo neural, señales provenientes de la epidermis determinan los destinos celulares dorsales (Liem et al., 1995). Los mediadores de esta señal ectodérmica son las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), pertenecientes a la familia de los factores de crecimiento transformantes beta (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 (Liem et al, 1997). 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). En estos experimentos se mostró también que los BMPs son capaces de actuar como morfógenos, activando a distintas concentraciones la expresión diferencial de ciertos genes (Timmer et al., 2002). De manera reciente se encontró que los BMPs regulan directamente la expresión de genes que dan identidad regional al tubo neural, así como la de aquellos que dividen dichas regiones en poblaciones celulares más discretas. Ejemplos de estos son aquellos que generan proteínas de la familia bHLH (Cath1) y proteínas con homeodominio (Pax, Msx1 y Dbx2) (Timmer et al., 2002). En un inicio los BMPs redefinen el área de expresión de los genes Pax en particular la de Pax7 y Pax6. Por lo tanto, el establecimiento de los límites de expresión de la mayoría de los genes Pax está dado por una acción combinada de las señales dorsales y ventrales representadas por los BMPs y Shh respectivamente. De esta manera las señales morfogenéticas secretadas a partir de dos centros organizadores opuestos contribuyen a determinar finamente la diferenciación terminal en el SNC en desarrollo (figura 2).

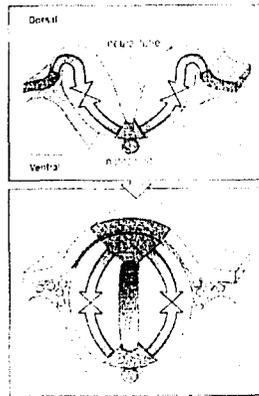


Fig. 2 Señales dorsales y ventrales. A. Durante la formación del tubo neural las señales dorsalizantes provienen del ectodermo epidermal que inicialmente delimita a la placa neural, mientras que las ventralizantes son secretadas por la notocorda y posteriormente también por la placa del piso (tejido ectodérmico que se encuentra sobre la notocorda). 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 resaltado 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).

Participación de 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 efecto ventralizante de Shh se describió inicialmente en la médula espinal en donde es el responsable de la diferenciación de los tres tipos celulares ventrales ya mencionados (placa del piso, motoneuronas e interneuronas ventrales) (Placzek et al., 1990, 1991; van Straaten et al., 1988; Yamada et al., 1991, 1993; Martí et al., 1995). De manera interesante efectos ventralizantes de este factor se han descrito en otras regiones. 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). Además cuando se utilizan explantes del romboencéfalo rostral ventral Shh induce la diferenciación de neuronas serotoninérgicas (Yamada et al., 1991). Es importante comentar que en estas dos últimas regiones es donde se encuentran enriquecidas de manera natural estas poblaciones neuronales *in vivo*. Así mismo en los explantes del mesencéfalo Shh induce un incremento en el área de expresión de Hnf3 β (Hynes et al., 1995b). Finalmente se ha descrito que Shh induce diferenciación neuronal ventral en tejido proveniente de regiones del cerebro anterior como el telencéfalo y diencéfalo. En estos sitios se provoca un aumento de las poblaciones celulares ventrales presentes en esas regiones *in vivo*. En explantes de la región basal del telencéfalo se favorecen células que expresan Isl1 pero no SC1 y Lim1, mientras que en los del diencéfalo se inducen células inmunopositivas para Isl1 y Lim1 pero no para SC1 (Ericson et al., 1995). Adicionalmente a los efectos de Shh como inductor de diferenciación neuronal, se le atribuye la generación de oligodendrocitos (Pringle et al., 1996; Poncet et al., 1996), que es otro linaje celular presente en el SNC cuyo sitio de origen en la médula espinal esta en una zona 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, el repertorio de destinos que puede asumir un progenitor en respuesta a Shh parece depender de moléculas adicionales presentes a lo largo del eje A-P. Apoyando ésta idea, 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. Mientras que en donde hay una intersección de la expresión de Shh con la del factor de crecimiento de fibroblastos-4 (FGF4), se generan 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. Además cuando se utiliza un anticuerpo neutralizante para NT3 la inducción de Isl-1 en explantes mediada por Shh se bloquea (Dutton, et al, 1999). Con anterioridad 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 nulos para NT3 (Kucera, J., et al, 1995). Estos datos indican que existe una cooperación de Shh con NT3 para la diferenciación de las motoneuronas en la médula espinal. 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 reporte de Lee y colaboradores, que lograron inducir la producción de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas a partir de células troncales embrionarias utilizando 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 tipos celulares característicos de cada región.

Además de su participación en el establecimiento de patrones de desarrollo y diferenciación neural en el SNC, cada vez más estudios han implicado a Shh en eventos de proliferación de células precursoras neurales (Rowitch et al., 1999). En el cerebelo se ha demostrado que incrementa la proliferación del precursor de las células granulares durante la embriogénesis tardía (día 10-12 en pollo ó E18 en ratón) (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999). De igual manera se regula positivamente la proliferación de células precursoras del hipocampo en el cerebro

adulto (Lai et al., 2003). Shh también regula el crecimiento embrionario del cerebro dorsal a nivel del diencéfalo y mesencéfalo a los 9.5dpc en el ratón (Ishibashi and McMahon, 2002). 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. Otro dato a favor se obtuvo cuando se analizaron ratones heterocigos para mutaciones de Patched en los que los genes blanco de Shh están sobreexpresados, lo cual promueve el desarrollo de tumores cerebelares (Goodrich et al 1997). Por otro lado se han observado efectos mitogénicos de Shh en diversos tejidos durante el desarrollo del ratón como el pulmón y la retina (Bellusci et al., 1997; Jensen and Wallace, 1997), en el músculo esquelético de la extremidad del pollo (Duprez et al, 1998) y en las células somáticas del ovario en *Drosophila* (Forbes et al., 1996). Además 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. Finalmente, se ha descrito que Shh participa como factor de sobrevivencia de las células de la cresta neural (Ahlgren and Bronner-Fraser, 1999), durante las etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso central a nivel de la médula espinal (Charrier et al., 2001) y como regulador de muerte celular programada durante el desarrollo normal del sistema nervioso (revisado por Oppenheim et al., 1999).

Biología de Sonic Hedgehog

Como se mencionó en un inicio, Hedgehog fue descrita originalmente 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 en el establecimiento del patrón de los discos imagales (Li et al, 1995 y revisado por Hammerschmidt et al, 1997). En mamíferos se han identificado 3 homólogos: *Desert Hedgehog* (Dhh), que se expresa principalmente en las células de Sertoli del 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), es el único involucrado en el desarrollo del SNC en su etapa embrionaria y el que nos ocupa en este trabajo.

Las proteínas pertenecientes a la familia de Hedgehog son codificadas por genes independientes, los cuales codifican para un precursor protéico, que posee un péptido señal, una región N-terminal altamente conservada (90% entre Shh e Ihh, y 80% entre Shh y Dhh y un dominio C-terminal más divergente (Echelard et al., 1993). Aunque sólo algunos miembros de la familia en vertebrados, como Shh de ratón y de pez-cebra se han estudiado 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 c-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 fragmento N-terminal permanece asociado a la superficie de las células que lo sintetizan, mientras que el C-terminal difunde libremente. El corte autocatalítico del precursor de Shh se da por la formación de un tioéster interno intermediario que después es cortado gracias a una sustitución nucleofílica catalizada por una molécula de colesterol en la membrana citoplásmica. Dicha molécula se une covalentemente al extremo C-terminal del péptido N-terminal favoreciendo su anclaje a la membrana celular (Porter et al., 1996), y ayudando a controlar la secreción de la proteína (Burke et al., 1999). Adicionalmente se demostró que en algunos sistemas el péptido NH₂⁺ posee una molécula de palmitato en un residuo de cisteína bastante conservado en su extremo NH₂⁺ que juega un papel crítico potenciando la actividad de la proteína (Porter et al., 1996; Pepinsky et al., 1998; Chamoun et al., 2001; Kohtz et al., 2001). Cuando se evalúa su actividad en un ensayo celular basado en la diferenciación de osteoblastos (Kinto et al., 1997), esta modificación le da 30 veces más potencia que el péptido recombinante sin modificaciones post-traduccionales (Pepinsky et al., 1998). Se esperaría que ambas modificaciones lipídicas provocaran principalmente la permanencia de Shh en la superficie de las células que lo producen, sin embargo el péptido N-terminal puede difundir en el medio extracelular y generar respuestas en

células alejadas de la célula productora. Cabe mencionar aquí, que es ésta 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 la de las motoneuronas, respectivamente (Lai et al, 1995; Martí et al, 1995; Porter et al, 1995; Roelink et al, 1995). Hasta el momento no se ha relacionado ninguna actividad al extremo carboxilo. La manera de llevar a cabo los efectos a larga distancia no se han podido explicar, sin embargo se postula que ambas modificaciones lipídicas pudieran estar jugando un papel importante en el transporte extracelular de Shh promoviendo la formación de micelas hidrosolubles (Zeng et al., 2001). Además existen datos experimentales que permiten postular moléculas adicionales 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), esto sugiere un papel importante de los proteoglicanos en el tránsito intercelular de Hedgehog modificado. Otro mecanismo que podría participar en el tránsito extracelular de Hh es la observación de prolongaciones celulares citoplasmáticas llamadas *citonemas*. Estas estructuras se generan en las células productoras de Shh y alcanzan la totalidad del área de influencia de Hh. Se propone 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).

Vía de señalización por Sonic Hedgehog

Por estudios genéticos realizados en *Drosophila Melanogaster* 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 sus receptores.

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 espermatocitos (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. En un inicio, su inducción, se consideró como un marcador de la activación de la cascada sólo en *Drosophila*, pero actualmente se ha descrito que este comportamiento se conserva en vertebrados (Goodrich et al., 1996 y 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 sobre-expresión de Smo en una línea celular que responde 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). Con base en 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 (Stone et al., 1996).

En *Drosophila melanogaster* se han encontrado moléculas adicionales intracelulares que juegan un papel muy importante en la transducción de la señal a partir de Smo. Existe un complejo multiproteico de alto peso molecular integrado por Costal2 (Cos2), Fused (Fu), Supresor de Fused (Su[Fu]) y Cubitus Interruptus (Ci) asociado a microtubulos. Cos2 codifica para una proteína parecida a las kinesinas (Robbins, D.J., et al, 1997; Sisson, J.C., et al, 1997); Fu es una serin-treonin cinasa (Préat, T., et al, 1990); Su(Fu) es una proteína adaptadora que une Fu y Ci (Monier, V., et al., 1998); mientras que Ci es un factor transcripcional de la familia de dedos de Zinc. Otras proteínas involucradas en la cascada de señalización son: Supernumerary limbs (Slmb), (Jiang, J., and Struhl, G., 1998) y la proteína cinasa A (pKA) (Jiang, J., and Struhl, G., 1995; Li, W., et al., 1995). En ausencia de Hh el complejo se encuentra unido a los microtubulos, lo cual permite la fosforilación de Ci por la pKA. Ci fosforilado es transportado al proteosoma a través de Slmb, en donde se procesa dando lugar a un fragmento amino denominado Ci75. Ci75 actúa a su vez como un represor transcripcional de los genes blanco de Hh en el núcleo. En presencia de Hh, a través de un mecanismo aún desconocido, se hiperfosforila Fu y Cos2 lo que permite la liberación del complejo de los microtúbulos, evitándose así la proteólisis de Ci, y estabilizandose la forma completa de Ci (Ci155). Una vez que se transloca al núcleo, ahora su actividad principal es la de un activador transcripcional. 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 Ci de *Drosophila* llamadas Glis, que representan los principales mediadores transcripcionales de la cascada de Shh. 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* y *wg* en *Drosophila*) que permite regular positivamente su transcripción (Alexandre et al., 1996; Sasaki et al., 1997 (Figura 3).

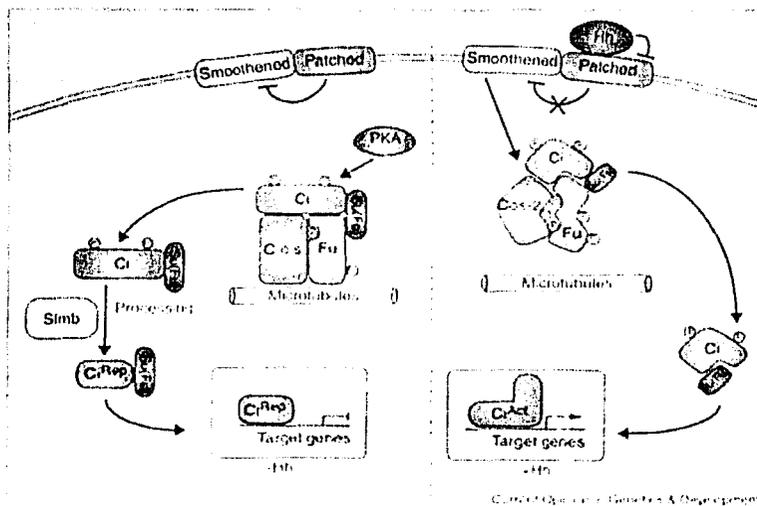


Fig. 3 **Transducción de Hh en *Drosophila***. (izq.) En ausencia de Hh, Ptc interactúa con el transductor transmembranal Smo previniendo la activación de los genes blancos de Hh. Por otro lado, el factor transcripcional Ci (ci-155Kd) forma un complejo unido a los microtúbulos con Cos-2, Fu y Su(Fu), y es convertido en su forma represora (ci-75Kd) al ser fosforilado por la PKA. Gracias a que Simb dirige a Ci al proteosoma, se genera Ci-75 que se transloca al núcleo y reprime los genes blanco de Hh. (der.) Cuando Hh se une a Ptc, se transduce la señal por medio de Smo. De esta manera Hh induce la hiperfosforilación de Cos-2 y Fu, promueve la disociación del complejo Cos-2/Fu/Su(fu)/ci-155 de los microtúbulos y por lo tanto inhibe la proteólisis de Ci. Ci-155 se convierte en un activador transcripcional e induce la transcripción de los genes blanco de Hh (Tomado de Nybakken, K. and Perrimon, N.).

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 (Ruppert et al, 1990) y Gli3 (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. En un inicio Gli1 se consideraba el principal mediador de la señal por Shh. En diversos sistemas experimentales basta la sobre-expresión de Gli1 para inducir la respuesta celular

TESIS CON
FALDA DE CANGREJO

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*, 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 y Gli3, a semejanza de Ci, son procesados post-traduccionalmente desenmascarando 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 se induce 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). Esta proteína es la más parecida en secuencia y comportamiento a Ci de *Drosophila* y 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 Gli1 activador 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 (Ruiz i Altaba, 1999), además de que Gli2 y Gli3 sufren proteólisis cuando son expresadas en *Drosophila* (Aza-Blanc et al.,2000) dando evidencias a favor de un modelo que postula que los Glis pudieran tener funciones activadoras o represoras dependiendo del entorno donde se encuentren las células que responden a Shh.

La expresión de los genes *Gli*s 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*, la expresión de *Gli1* se limita a las zonas adyacentes. Esto es consistente con la función 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, en principio es similar a la de *Gli3* pero existen algunas regiones en donde 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).

Ratones mutantes que no poseen alelos funcionales de *Gli1* son completamente viables y no poseen defectos obvios, lo que sugiere que este pudiera ser dispensable en la generación de la respuesta a *Shh* además de indicar que alguno de los otros *Gli*s podría jugar un papel redundante. 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 éste 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 participación durante los procesos de desarrollo en éstas estructuras en donde probablemente actúan de manera sinérgica. *Gli2* es un activador aunque más débil de la cascada de señalización de *Shh*, además de ser regulado transcripcionalmente de manera positiva en presencia de *Shh*, contrariamente a lo que sucede con *Gli3* que es inhibido por éste y constituye un potente represor de la cascada.

Precursores neurales

Las células que constituyen el 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 y por lo tanto pluripotentes capaces de generar ambos linajes neurales. Se ha observado que células precursoras con éstas características se conservan hasta la edad adulta (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Gage et al., 1998). En los últimos años se ha mostrado un gran interés por aislar, expandir y caracterizar a las CPN. La utilización de factores de crecimiento involucrados en la proliferación y sobrevivencia de las CPN han permitido establecer su cultivo de manera prolongada y en condiciones completamente definidas *'in vitro'* (Reynolds et al, 1992; Vescovi et al, 1993). 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 el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Santa-Olalla and Covarrubias, 1995a). Utilizando estos factores que promueven su proliferación se estableció un protocolo que permite la expansión de CPN en cultivo. Dicho sistema experimental está constituido por una población enriquecida de precursores neurales capaces de proliferar generando estructuras clonales conocidas como neuroesferas. 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. Los precursores propagados 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 sugirió en un inicio que pudieran ser necesarias señales inductivas o selectivas para la generación de este fenotipo (Santa-Olalla and Covarrubias, 1995b). De la información presente en la literatura uno de los posibles factores necesarios podría ser Shh por los efectos antes mencionados. Datos obtenidos en el laboratorio al trabajar con estas CPNs mostraron que expresan el RNA mensajero de las moléculas necesarias para la recepción y la transducción de la señal de Shh: Ptc y Smo. En algunos experimentos preliminares observamos que pudieran responder a Shh expresando el RNAm de Gli1 e identificamos una probable interacción de Shh y bFGF en la inducción de *Hnf3b*.

JUSTIFICACIÓN

Las CPNs que proliferan en respuesta a EGF en nuestras condiciones de cultivo son buenas candidatas a responder a Shh ya que son muy tempranas en el desarrollo independientemente del estadio del cual se aislen, expresan los RNAs mensajeros de *Smo* y *Ptc*, y son capaces de generar de manera aleatoria al menos un fenotipo neuronal cuya diferenciación se atribuye a Shh *in vivo*.

El contar con modelos experimentales que permitan la manipulación de las CPNs *in vitro* facilitará el estudio de la proliferación, determinación y diferenciación de los precursores del SNC. Además de que el utilizar condiciones libres de suero permite el estudio de los factores que participan en dichas respuestas celulares, nos permite mantener el mayor número de variables con valor constante mientras se manipula exclusivamente la que deseamos para dirigir su destino.

Por lo anteriormente expuesto creemos que este sistema experimental *in vitro* constituye una buena herramienta para estudiar el efecto de Shh sobre su célula blanco y nos permitirá contribuir de manera importante en la caracterización de la respuesta de las CPNs a Sonic Hedgehog.

HIPÓTESIS

Dados los efectos reportados por otros grupos de trabajo y los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, postulamos que las Células Precursoras Neurales expandidas *in vitro* con EGF son capaces de responder a Shh induciendo la expresión de sus genes blanco.

OBJETIVOS

Para analizar lo anterior cumpliremos con los siguientes objetivos:

- Caracterizar, a nivel molecular, la respuesta intracelular de CPNs a Shh.
- Evaluar si existe una interacción de Shh con factores de crecimiento adicionales para generar una respuesta celular específica.

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
- 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-AAG-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
Pax6-1	5 'AGA CTC GGA TGA AGC TCA GAT GCG	24 bases
Pax6-2	5 'ACT GGT ACT GAA GCT GCT GCT GAT	24 bases
Nkx2.2-1	5 'AGG AGG ACT CGA TCC TTA CCA CGG T	25 bases
Nkx2.2-2	5 'ATT TGC CAC CAG TTG TCA GAA CGT GTA	27 bases

METODOLOGÍA

DISECCIÓN Y CULTIVO DE REGIÓN MESENCEFÁLICA ROSTRAL

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 (10 µg/ml) 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/F12.
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 se puede lesionar a la flexura pontina que 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 endodimario (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.

NOTA: En caso de realizar explantes, el tejido se deja intacto en este paso y se cultiva flotando en medio OPTIMIX con las condiciones desadas.

7. Colocar dentro de tubos falcon de 15 ml el tejido disectado en 3 ml de sol. de tripsina 0.1 % 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 0.4 % (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, contar cinco cuadrantes, sacar promedio, 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 1 mg/ml. Incubar en las mismas condiciones durante todo el cultivo.
13. Cambiar el medio cada 3 días.
14. En el caso de la infección del cultivo con adenovirus, después de sembrar las células se espera 1 hora para que se adhieran al plato, después de este tiempo se retira el medio y se agrega el volumen de adenovirus deseado en un vol. total de medio definido de 200 μ l. Se incuba por 1 hora a 37 grados con agitación ocasional. Al término de esta incubación se afora el volumen a 500 μ l con el mismo medio y se agrega EGF a la concentración deseada.

SUBCULTIVO DE PRECURSORES NEURALES

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 (10 µg/ml) 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 100µl 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, una por una 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 20µl y colocarlas en una gota de 100µl de tripsina (0.025 %) en la misma caja. Incubarlas a 37°C durante 10 minutos.
5. Agregar 100µl de inhibidor de tripsina (1 mg/ml), 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 400µl 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 300µl de medio fresco. Subir y bajar 20 veces.
9. Tomar 10µl y agregar a un tubo con 10µl de colorante (azul de tripano, 0.4%) a temperatura ambiente. Tomar 10 de los 20µl 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 ó 50,000 células en un volumen final de 500µl de medio por pozo. Agregar factores de crecimiento deseados e incubar a 37°C con 5% de CO₂. Cambiar el medio cada 4 días.

EXTRACCIÓN DE RNA DE SUBCULTIVOS DE PRECURSORES NEURALES

1. 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 microcentrifuga de 1.5ml previamente enfriado, repetir el procedimiento con 500µl más de sol. Urea/LiCl realizando 15 pases. Dar vortex durante 2 minutos.
2. Incubar a -20°C durante toda la noche.
3. 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.
4. 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 (10µg/µl, sólo cuando no se pueda cuantificar el RNA); dar vortex 5", agregar 500µl de fenol ácido (saturado en agua); dar vortex 2', agregar 2/10 del vol. inicial (100µl) 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 µl de buffer 1X para DNAsa que contenga 10U de DNAsa libre de RNAsa. Por reacción son 43.87ul de agua para RNA, 5µl de buffer para DNAsa 10X y 0.25µl de DNAsa libre de RNAsa (Boheringer 40 U/µl). Dar vortex dos pulsos de 30".
13. Incubar durante 30'a 37°C.
14. Inactivar reacción agregando 450µl de sol. D más 50 µl de acetato de Sodio. Dar vortex 5'' y precipitar con 500µl 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 500µl 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 20µl 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 1µl de muestra +59µl H₂O en celda de cuarzo de 50µl. Leer DO260.
 $DO260/16.66 \times 40\mu g/\mu l = \text{concentración } \mu g/\mu l.$

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

PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR cDNA y RT-PCR de SUBCULTIVOS

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

H ₂ O 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	20µl

2. Resuspender el RNA en 20µl 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 10µl y agregar a los 20µl 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 10µl). Cuando se cuenta con RNA suficiente se toma 1µg.
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	37.5µl
Buffer Taq DNA polimerasa 10X	5µl
DNTPs 5mM	2µl
Oligonucleótido 1 (0.1µg/ml)	1µl
Oligonucleótido 2 (0.1µg/ml)	1µl
Taq DNA polimerasa 5 U/µl	0.5µl
Volumen total de mezcla por reacción	47µl

10. Tomar 3µl de cDNA (de los 30µl finales, paso 6) y agregar a los 47µl de mezcla para PCR.
11. Cubrir con 50µl 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 10µl de muestra + 2µl colorante azul bromofenol 0.25 % en Urea 10 M en gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X teñido con bromuro de etidio al 0.5µg/ml.

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA CADA MARCADOR

Marcador	Par de oligos	Temperatura de amplificación	Tamaño del producto de amplificación
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
Nkx2.2	Nkx2.2-1, Nkx2.2-2	92°x1', 64°x1', 72°x1'. 72°x10'	483 pb
Pax6	Pax6-1, Pax6-2	92°x1', 60°x1', 72°x1'. 72°x10'	298 pb

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

SUBCULTIVO DE LÍNEA CELULAR 293T

- Aspirar el medio viejo ayudándose con la bomba de vacío.
- 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.
- Subir y bajar la suspensión de células 20 veces con una pipeta de 10ml estéril cuidando de no hacer espuma.
- Centrifugar a 400g en la centrifuga de mesa durante 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante con todo y la espuma que se haya formado. Usar bomba de vacío.
- 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.

- Tomar 10 μ l, agregar 10 μ l de colorante azul de tripano 0.4 % a temperatura ambiente y contar en la cámara de Neubauer.
- Calcular total de células: contar los 5 cuadrantes, dividir entre 5 y multiplicar por 20,000 = células/ml
- Diluirlas a 1X10⁶ células por ml.
- Poner 9 ml de medio fresco en una caja de 10mm + 1ml de suspensión de células para subcultivar.
- 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.
- Subcultivar cada tercer día.

TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS 293T

Día 1 Sembrar 1X10⁶ 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 CaCl₂ 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 μ l de CaCl₂ 2M
 - 25 μ g totales de DNA (10 μ g de DNA total por caja, en caso de poner plásmido control poner 5 μ g de c/u).
 - H₂O estéril grado cultivo cbp 250 μ l
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 250 μ l de HBS 2X y mezclar con la pipeta.
- Incubar 2 minutos a 37°C.
- Agregar 200 μ l 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% de CO₂.

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

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 0.4 % 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)

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.

HIBRIDACION IN SITU DE MESENCÉFALO COMPLETO

La disección del mesencéfalo se realizó como se describió anteriormente y se fijó inmediatamente en paraformaldehído al 4% durante aproximadamente 11 horas a 4°C. Los tejidos se lavaron dos veces durante 5 min. a 4°C con PBT durante 5 minutos a temperatura ambiente con metanol (25%, 50% y 75%) en PBT, durante 5 minutos en metanol al 100% y se guardaron a -20°C en metanol hasta que se realizó la hibridación.

Preparación de la sonda

A temperatura ambiente se realizó la siguiente mezcla:

- 10 ml de agua destilada
- 4 ml de solución de transcripción 5 x
- 2 ml de DTT 0.1 M
- 2 ml de la mezcla de nucleótidos
- 1 mg de plásmido linearizado
- 0.5 ml de RNasin (100 u/ml)
- T3 RNA polimerasa (10 u/ml)

Se incubó durante 2 h a 37°C. para precipitar se agregó 100µl de TE, 10 µl de cloruro de litio 4M y 300µl de etanol absoluto, se dejó a -20°C durante media hora. Se centrifugó por 10 min y se lavó la pastilla con etanol al 70% y se dejó secar. Una vez secó la pastilla se disolvió en TE para obtener una concentración final de 0.1 mg/ml.

Se tomaron 5 µl de cada una de las muestras para analizarlas en gel. Una vez hecho el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se lavó con SSC 2X y se fijó mediante cross linking.

Posteriormente se lavó en la solución DIG I por 15 minutos. Después se bloqueó durante 30 minutos en agitación con la solución de bloqueo (Boehringer) al 0.5% Durante 30 minutos se colocó en la solución con el anticuerpo anti DIG (DIG 2). Se lavó dos veces el anticuerpo con DIG I y se coloreó con DIG 3 más NBT y BCPI.

Hibridación

Se rehidrataron con tratamientos de metanol en PBT (75%, 50% Y 25%) durante 5 minutos, después se lavó dos veces con PBT por 5 minutos.

Se trataron con PBT-H₂O₂ 6% (V/V) durante 1 hora. Se lavaron 3 veces con PBT durante 5 minutos cada una. Se trató con proteinasa K durante 7 minutos, se lavó con glicina (2mg/ml) en PBT y con 2 lavados de PBT durante 5 minutos. Se volvió a fijar con glutaraldehído/paraformaldehído 0.2%/4% y tween al 0.01% durante 20 minutos. Se lavaron con PBT durante 5 minutos. Se incubaron a 70°C durante 1 hora en la solución de prehibridación con 10µl de la sonda marcada.

Se lavaron 2 veces durante 30 minutos a 70°C con la solución 1. Se lavaron con una solución 1:1 de, solución 1: solución 2 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 4 veces con la solución 2 por 5 minutos, a temperatura ambiente con la solución 3, y 2 lavados más a 65°C con la solución 3. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBST.

Los tejidos se bloquearon con suero de borrego al 10% en TBST, después de 2 ó 3 horas se quitó la solución, se agregó el anticuerpo y se dejó durante 14 h a 4°C. se

lavaron con TBST 3 veces durante 5 minutos y 4 veces más durante 1 hora, finalmente se dejó durante 14 horas en TBST.

Para revelar el anticuerpo se lavó 3 veces con NTMT durante 10 minutos. Se incubaron posteriormente durante 20 minutos en agitación y cubierto para evitar la luz con NBT (3.5ml/ml) y BCIP (3.5ML/ML). Una vez que se observa la señal (5 horas aproximadamente) se lavó 2 veces con PBT por 15 minutos, una vez con glicerol 50% en PBT y se guardaron en glicerol 80% en PBT.

MEDIOS Y SOLUCIONES

.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 0.22µM.
- 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, estreptomycin)	1ml

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

N° 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 0.22µm.
- 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 0.22µm 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	500µl	100µl
Dextrosa Peni/estrepto	324µl	65µl

.Medio Definido para efecto de factores de crecimiento

Reactivo	para 25ml	Concentración del stock
D-MEM/F12	23.84ml	
Glutamina 1X	250µl	100X
Insulina 4µg/ml	156µl	25µg/ml
Transferrina	625µl	100µg/ml
Progesterona 20nM	50µl	10µM
Putresina 60µM	15µl	100mM
Selenita de sodio 30nM	75µl	10µM

*Penicilina/estreptomicina 5µl 370U/ml
0,074U/µg Xml

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

.Azul de tripano 0.4%

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

.Poli-D lisina 10µg/ml

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

.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 50µl 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.

.Medio OPTIMIX

Para preparar 50ml (aprox.)

40ml de OPTIMEM con Glutamax

12.5 ml de DMEM/F12

1ml de glucosa 2M

0.5ml de GPS del stock 100X

.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 0.22µm

.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 l1ml 7.2 μ l0.5ml 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

H₂O 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 dietilpircarbonato al 0.2%, se deja toda la noche agitando y se autoclavea.

.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.

.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.

.Buffer PA

(preparar al momento)

	Para 25ml:
NaCl 5M	500µl
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 3.5µl de reactivo NBT + 3.5µl de BCIP
Preparar en la oscuridad y para manejar los reactivos usar guantes.

.Paraformaldehído al 4%

Para 100ml de paraformaldehído. Se preparó en un matríz de 500ml y se agregaron 86 ml de agua bidestilada se calentó hasta llegar a 70°C y se agregaron de 2 a 3 gotas de NaOH 5M hasta obtener una solución transparente. Una vez fría la solución se le agregaron 10ml de PBS-DEPC 10X y se aforó con agua a 100ml finales los cuales se almacenaron en alícuotas de 5 ml y se guardaron a -20°C.

. PBT

PBS con tween -20 0.1%.

. Mezcla de ribonucleótidos para preparar la sonda de RNA.

GTP 10 mM

ATP 10 mM

CTP 10 mM

UTP 6.5 mM

UTP digoxigenina 3.5 Mm

. TE

Tris 10mM pH 7.5 y EDTA 1 mM Ph 7.5

.SSC 20X

175.3g NaCl, 88.2g de citrato de sodio, se ajusto el pH a 7 con NaOH (ION) y se aforó a un litro con agua.

.DIG 1

Tris 100mM pH 7.5 y NaCl 150mM

.DIG 2

Se disolvió 1 ml de anticuerpo anti-DIG en 5 ml de DIG 1

.DIG 3

Tris 100mM Ph 9.5

NaCl 100Mm

MgCl₂ 50mM

Solución coloadora

Por cada ml de DIG 3 se agrego 3.37ml de NBT y 3.5ml de BCPI

.Proteinasa K

10mg/ml de proteinasa K disuelta en PBT.

.solución de prehibridación

formamida 50%,SSC 5X pH5, RNA de levadura 50 mg/ml, SDS 1% y heparina 50mg/ml

.solución 1

formamida 50%. SSC 5X Ph 4.5 y SDS 1%

.solución 2

NaCl 0.5M, Tris-HCl 10mM Ph7.5 tween-20 10%

.solución 3

formamida 50%, SSC 2X pH 4.5

.TBST 10X

8g NaCl, 0.2g KCl, ml de Tris-HCl 1 M ph 7.5, 10ml de tween-20 en 100ml de agua bidestilada esteril. Se autoclaveó.

Para utilizar se diluyó a 1X y se agregó levamisol a una concentración final de 2Mm.

.Preparación del anticuerpo anti-DIG

A 500 μ l de TBST se agregaron 3 mg de polvo de embrión se dejo disolver durante 30min a 70°C en agitación. Una vez transcurrió este tiempo se enfrió en hielo y se agregaron 5ml de suero de borrego y 1ml de anticuerpo anti-DIG dejando disolver para 1 hora a 4°C. se centrifugó 5 segundos para obtener el sobrenadante que se diluyó con 2ml de TBST/suero 1%

.NTMT

NaCl 100mM, Tris-HCl 100mM pH 9.5 MgCl₂ 50Mm, Tween-20 0.1% y levamisol 2Mm.

RESULTADOS

N-Shh recombinante no es capaz de inducir la expresión de *Gli1*, *Ptc* y *Shh* en CPNs

Trabajo previo en nuestro laboratorio demostró que las células precursoras neurales (CPNs) capaces de generar neuroesferas en presencia de EGF *in vitro*, expresan *Ptc* y *Smo*, moléculas identificadas como necesarias para recibir y transducir la señal de Shh. Esto sugería que, en principio, las células podrían responder a Shh induciendo la expresión de algunos de sus genes blanco, generando a su vez una respuesta celular específica. Resultados preliminares en estas células mostraron indicios de que podían responder promoviendo la expresión, aunque muy breve, de genes como *Gli1* y *Hnf3b*. Sin embargo restaba por hacer un análisis más riguroso de dicha respuesta transcripcional.

Para tal efecto realizamos un subcultivo de CPNs que nos permitiera evaluar la respuesta celular a Shh de manera temporal. Éste se realizó a partir de neuroesferas generadas en un cultivo primario de mesencéfalo ventral de ratón de 13.5 dpc. Las células que conforman la neuroesfera se disgregaron y se sembraron a una densidad de 50,000 ó 10,000 células por pozo en presencia de EGF, por 1 ó 6 días respectivamente. Al término de dicho período de tiempo, se eliminó el factor y se agregó N-Shh recombinante (N-Shhr) a 5 ug/ml ó en el caso de la curva control sólo medio definido. A partir de ese momento considerado tiempo cero (t0) se tomaron muestras a las 1, 2, 4, 8 y 24 horas. En la condición de 50,000 células pudimos evaluar únicamente la respuesta de la población de células que conforman la neuroesfera, mientras que en la de 10,000 evaluamos la respuesta tanto de las células de la neuroesfera como de la población que diferencia y migra sobre el plato de cultivo generando una monocapa. Esta última condición nos permitió contar con una población más diversa de células, que incluye aquellas que proliferan en respuesta a EGF y las que diferencian en esa misma situación.

Al evaluar la presencia del mensajero de las diferentes moléculas involucradas en la transducción de la señal de Shh encontramos que *Smo* se expresa en todas las condiciones, mientras que *Ptc* se encuentra enriquecido sólo en aquellas en las que la población se conforma por células de la neuroesfera y de la monocapa (Figura 1). En ambos casos N-Shhr no logra inducir la expresión del *Shh* endógeno, ni de *Ptc* ni de *Gli1*,

todos considerados blancos transcripcionales de la cascada activada por Shh. Es importante mencionar aquí que pudimos detectar una expresión basal muy tenue y aleatoria de estos genes en algunas de nuestras condiciones de cultivo que no corresponde con la respuesta esperada. Este resultado se contrapone a nuestro dato inicial en donde observamos una inducción por parte del factor exógeno. Esta vez el experimento fue realizado por duplicado y en dos diferentes ocasiones obteniéndose el mismo resultado, lo que indica que representa el comportamiento más reproducible. Al mismo tiempo observamos que *Gli3* se expresa en la mayoría de las condiciones mientras que *Gli2* no se encuentra. Esto último coincide con lo observado anteriormente en el laboratorio. Es necesario mencionar aquí que la actividad biológica del N-Shh recombinante la corroboramos previamente (datos no mostrados) por medio de un bioensayo que se describe más adelante.

Con éste experimento concluimos que las CPNs propagadas en presencia de EGF no son capaces de responder a N-Shhr induciendo la expresión de sus genes blanco. Este resultado pudiera deberse a que Shh requiriera de factores adicionales para generar una respuesta como se ha descrito con anterioridad en otros sistemas experimentales (Ye et al., 1998; Lee et al., 2000). Datos previos en el laboratorio indicaban que pudiera existir una cooperación entre N-Shhr y bFGF para inducir la expresión del gen *Hnf3b*.

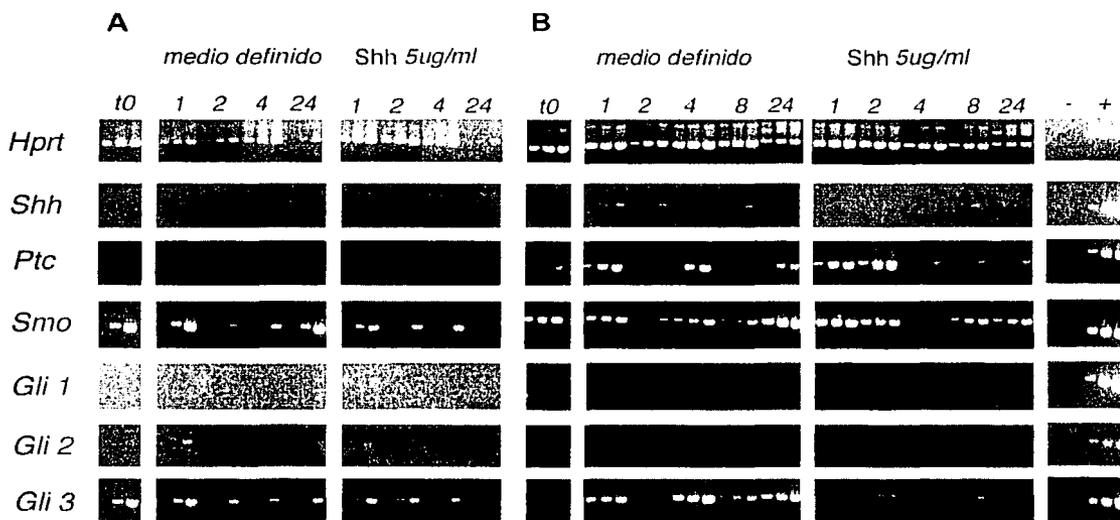


Fig. 1 Curva temporal de Shh sobre precursores neurales en cultivo. Se realizaron subcultivos de mesencéfalo ventral de 13.5 dpc, con 50,000 (A) y 10,000 (B) células por pozo, se mantuvieron con EGF 100ng/ml por 1 ó 6 días respectivamente, se realizaron 3 lavados y se pusieron las condiciones correspondientes (medio definido ó N-Shh 5ug/ml) por los períodos de tiempo indicados (hrs), 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. El tiempo cero (t0) representa a las células después del período con EGF y antes de las diferentes condiciones. Cada muestra equivale a un carril y por lo tanto cada condición está representada por 3 carriles continuos. Se detectaron los RNAMs de Hprt, Shh, Ptc, Smo, Gli1, Gli2, y Gli3. En los carriles finales se muestran los controles negativo y positivo de la reacción de PCR. 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 es representativa de dos experimentos independientes.

TESIS CON
FUNDAMENTO DE ORIGEN

bFGF y N-Shhr no cooperan para inducir la expresión de *Gli1*, *Ptc* y *Shh* en CPNs.

Para evaluar de manera más exhaustiva la probable interacción de bFGF en la inducción transcripcional de los genes de respuesta de Shh, realizamos un subcultivo usando condiciones similares a las anteriormente expuestas. Las células de la neuroesfera se disgregaron y se sembraron a una densidad de 50,000 ó 10,000 células por pozo en presencia de EGF por 1 ó 6 días respectivamente. Al término de dicho período de tiempo se eliminó el factor y se agregó bFGF 10 ng/ml + N-Shhr a 5ug/ml ó en el caso de la curva control sólo bFGF 10 ng/ml. A partir de ese momento considerado tiempo cero (t0) se tomaron muestras a las 1, 2, 4, 8 y 24 horas. Al analizar la presencia del RNAm de los diferentes genes blanco de Shh, encontramos que al igual que en el experimento anterior *Smo* se expresa de manera constitutiva en casi todos los casos, con excepción de la condición de bFGF + Shh, comportamiento similar para la expresión de *Gli3* (figura 2). Así mismo *Ptc* se expresa de manera más enriquecida en la condición en donde se promovió la generación de monocapa. Sin embargo, no logramos inducir la expresión de *Gli1*, *Gli2* ni de *Shh* en ningún caso (Figura 2).

Lo anterior nos indica que la combinación de bFGF y N-Shhr en las CPNs en nuestras condiciones de cultivo no promueve la inducción de *Gli1*, factor considerado como uno de los principales mediadores de la respuesta a Shh y que se ha reportado es inducido transcripcionalmente por éste. Tampoco se observó la inducción de la expresión de *Shh* y *Ptc*, otros dos marcadores de la activación de la vía de transducción mediada por Shh, inequívoco éste último hasta el momento. Otras posibilidades por las que no pudiéramos estar observando una inducción es porque el N-Shhr no fuera lo suficientemente activo o no se estuviera presentando de la manera correcta a las células hipotéticamente responsivas.

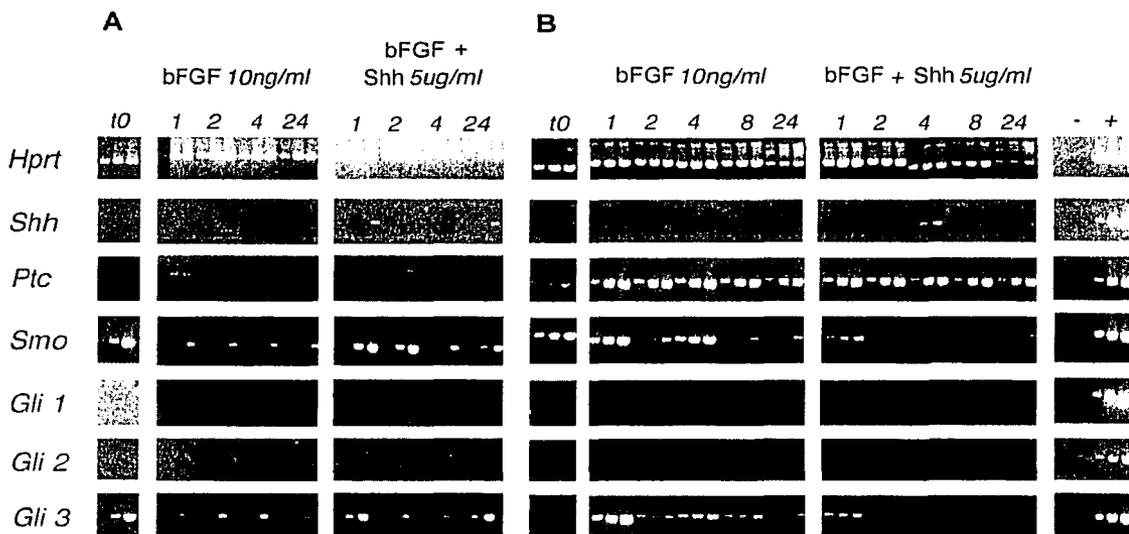


Fig. 2 *Curva temporal de Shh + bFGF sobre precursores neurales en cultivo.* Se realizaron subcultivos de mesencéfalo ventral de 13.5 dpc, con 50,000 (A) y 10,000 (B) células por pozo, se mantuvieron con EGF 100ng/ml por 1 ó 6 días respectivamente, se realizaron 3 lavados y se pusieron las condiciones correspondientes (bFGF 10ng/ml ó bFGF 10ng/ml + N-Shh 5ug/ml) por los períodos de tiempo indicados (hrs), 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. El tiempo cero (t0) representa a las células después del período con EGF y antes de las diferentes condiciones. Cada condición está representada por 3 carriles continuos. Se detectaron los RNAs de Hprt, Shh, Ptc, Smo, Gli1, Gli2, y Gli3. En los carriles finales se muestran los controles negativo y positivo de la reacción de PCR. 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 es representativa de dos experimentos independientes.

El Shh procesado en células 273T es más activo que el N-Shh recombinante.

Con anterioridad se ha descrito que durante el procesamiento que se lleva a cabo para generar el fragmento N-Shh biológicamente activo, la proteína sufre dos modificaciones post-traduccionales que le dan propiedades particulares de localización y actividad. Ambas consisten en la adición de moléculas hidrofóbicas que promueven el anclaje de la proteína a la membrana extracelular. La primera de ellas es el colesterol que al momento de realizarse el autocorte se une al extremo carboxilo del fragmento amino liberado. La otra es un ácido palmítico que se incorpora después del autoprocesamiento en el extremo amino del mismo fragmento amino. Estas características hacen que una buena parte de la proteína quede asociada a la membrana muy probablemente en zonas lipídicas específicas (Porter et al., 1996). Sin embargo todos los efectos a distancia conocidos son atribuidos a cierta cantidad de Shh soluble secretado al medio extracelular. Actualmente se postula que las mismas modificaciones lipídicas pudieran estar involucradas en el transporte extracelular de Shh promoviendo la formación de micelas (Zeng et al., 2001). Al mismo tiempo las proteínas que permanecen en la membrana pudieran estar siendo presentadas a las células blanco de una manera específica para la generación de respuestas celulares dependientes de contacto. De manera adicional se ha descrito que la molécula de palmitato está involucrada en aumentar la actividad de la proteína hasta 30 veces más (Pepinsky et al., 1998). Todo lo anterior resalta la relevancia del procesamiento postraducciona l de la proteína para la generación de algunas respuestas específicas.

El fragmento amino de Shh utilizado hasta este momento en nuestros experimentos, es obtenido como proteína recombinante a partir de construcciones que solo tienen el fragmento de cDNA que lo codifica. De tal manera que el N-Shh producido no posee las modificaciones postraduccionales. Para evaluar si estas modificaciones son determinantes en generar una respuesta celular, empleamos un sistema de producción de Shh que consiste en la recolección de medio condicionado de células de mamífero (línea celular 293T) que fueron previamente transfectadas con un plásmido que contiene la región codificadora completa de Shh bajo un promotor constitutivo. En este sobrenadante se encuentra presente el fragmento amino de la proteína con las modificaciones postraduccionales que lo vuelven más activo. Para evaluar la actividad

biológica del sobrenadante y compararla a su vez con la actividad del N-Shhr, utilizamos un bioensayo en el que se emplea una línea celular de osteoblastos (10T1/2) que diferencia a osteocitos en presencia de Shh. Dicho evento se acompaña de la expresión de la fosfatasa alcalina. La actividad enzimática de esta proteína nos permite evaluar la respuesta inducida por el Shh al que fueron expuestas las células mediante una reacción enzimática colorida. De esta manera obtuvimos sobrenadante de células 293T transfectadas con pRK5-Shh y sobrenadante control de células transfectadas con el vector pRK5. Para estimar su actividad 100 μ l del sobrenadante se agregaron a un volumen total de 500 μ l sobre 10,000 células 10T1/2, y al mismo tiempo se agregaron distintas concentraciones de N-Shhr en pozos paralelos bajo las mismas condiciones de cultivo. Al término de 6 días las células se fijaron y se procesaron para revelar la actividad de fosfatasa alcalina. Así determinamos que la actividad del Shh procesado presente en 100 μ l de medio condicionado es mucho mayor que usando el factor recombinante a una concentración de 5 mg/ml (Figura 3). Esto nos sugiere que en nuestro sistema se está produciendo el Shh modificado adecuadamente para tener una actividad biológica mayor que el recombinante, y que por lo tanto contamos con un procedimiento para producir un Shh más activo.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

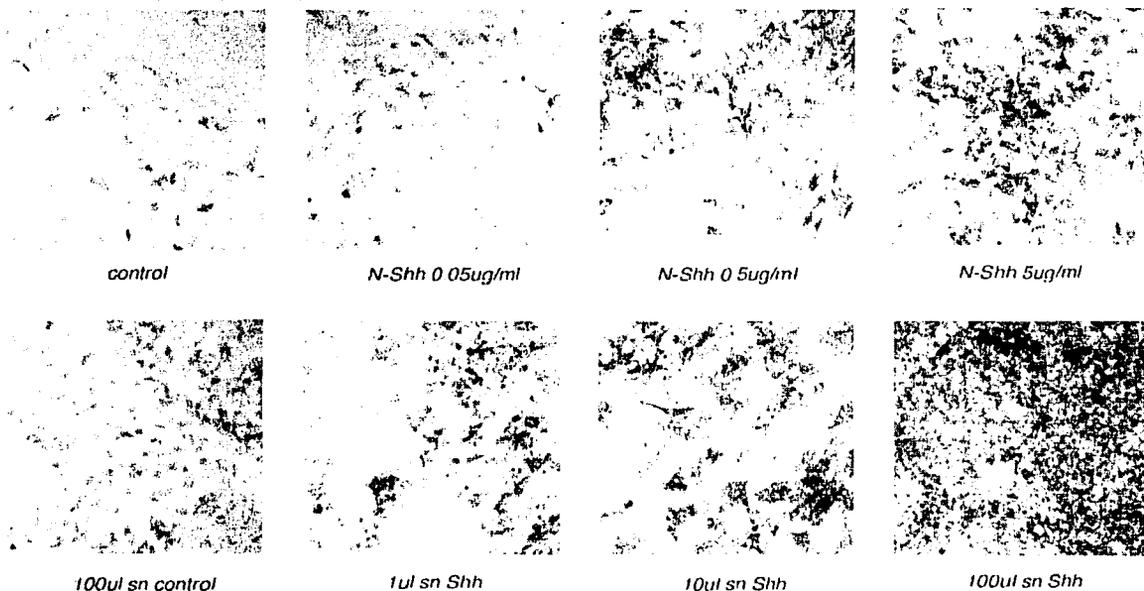


Fig. 3 Comparación de la actividad biológica de N-Shh recombinante y del medio condicionado con Shh. Se obtuvo medio condicionado de las células 293T transfectadas de manera transitoria con los plásmidos pRK5-Shh ó pRK5 (plásmido control). Dicho sobrenadante se agregó a un cultivo de células C3H10T1/2 en proporción de 1:500 (1ul), 1:50 (10ul) y 1:5 (100ul). En pozos paralelos se agregó el N-Shh recombinante a una concentración de 0ug/ml (condición control), 0.05ug/ml, 0.5ug/ml y 5ug/ml. Al término de 6 días de cultivo las células se tiñeron para revelar la actividad de fosfatasa alcalina. La figura es representativa de tres experimentos independientes.

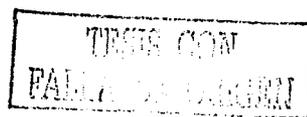
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El medio condicionado que contiene Shh procesado no induce la expresión de *Gli1*, *Ptc* y *Shh* en las CPNs.

Una vez que se contó con una preparación de Shh que indujo una diferenciación eficiente de la línea 10T1/2 se evaluó en nuestro sistema experimental. Para tal efecto se llevó a cabo un subcultivo similar a los descritos previamente. Este cultivo se mantuvo 6 días en presencia de EGF para permitir el crecimiento y la diversificación de la población, al término de los cuales se retiró el factor y se agregaron 100 ml de medio condicionado con Shh ó medio condicionado control y por otro lado N-Shhr 5 mg/ml ó medio definido. Después de 24 horas de cultivo las células de todas las condiciones se recolectaron para su evaluación posterior por medio de RT-PCR.

En este cultivo *Smo* y *Ptc* se expresaron de manera importante en todas las condiciones (Figura 4). Sin embargo, no logramos inducir de manera significativa la expresión de *Shh* y *Gli1* en ninguna de las condiciones en donde agregamos Shh. Es importante señalar que logramos detectar una expresión basal tenue de ambos RNAm en las condiciones controles con medio definido y con EGF, lo que hace notar que en ambas condiciones con medio condicionado pudiera haber incluso una inhibición de esta expresión basal. La producción del medio condicionado se realiza en presencia de suero fetal de bovino al 10%, lo que resulta en un 2% final de suero sobre los precursores neurales al momento del cultivo. Varios grupos de investigación han utilizado esta concentración de suero para inducir la diferenciación de CPNs, por lo tanto el efecto anterior observado pudiera deberse a la acción del suero más que al Shh agregado.

Por lo tanto de este experimento concluimos que las células precursoras neurales capaces de generar neuroesferas en presencia de EGF, y la población celular que se diferencia a partir de éstas, no son capaces de responder al N-Shhr, ni al Shh procesado en células de mamífero. Como se mencionó con anterioridad, cabe la posibilidad de que la respuesta fuera dependiente de contacto, y que por lo tanto la presentación de Shh a la célula blanco y la concentración local pudieran ser relevantes para la generación de la misma. Por este motivo se decidió emplear un vector adenoviral capaz de inducir la sobreexpresión de Shh en las CPNs.



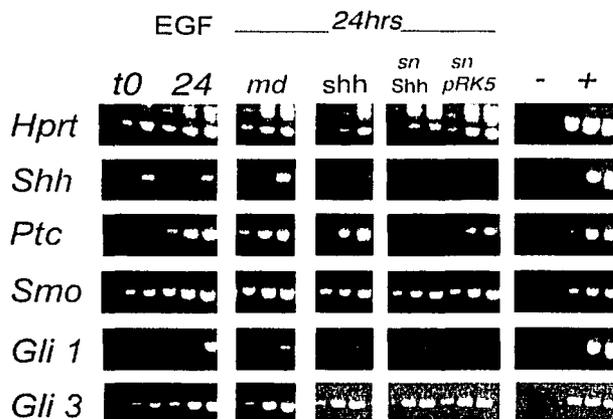


Fig. 4 Cultivo de CPNs de MV 13.5 dpc en presencia de medio condicionado. Se realizó un subcultivo de mesencéfalo ventral de 13.5 dpc, con 10,000 células por pozo, se expandieron las células con EGF 100ng/ml por 6 días, se lavaron 3 veces y se pusieron las condiciones correspondientes: EGF (24 hrs), medio definido (md), N-Shh 5ug/ml (shh), medio condicionado con Shh (sn Shh) ó medio condicionado control (sn pRK5) 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. El tiempo cero (t0) representa a las células después del período con EGF y antes de las diferentes condiciones. Cada condición está representada por 3 carriles continuos. Se detectaron los RNAs de *Hprt*, *Shh*, *Ptc*, *Smo*, *Gli 1* y *Gli 3*. 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 experimento.

TESIS CON
FALSA ORIGEN

Un adenovirus que sobreexpresa Shh genera una actividad tres ordenes de magnitud más alta que la del medio condicionado con Shh procesado.

Como se mencionó anteriormente, las modificaciones hidrofóbicas que posee el factor producido *in vivo* lo mantienen principalmente asociado a la membrana, probablemente en zonas lipídicas específicas. Esta ubicación es posible que influya en la manera de cómo es presentado Shh a la célula blanco, y pudiera ser relevante para la generación de una respuesta celular específica. Durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central el Shh producido en la notocorda genera respuestas específicas en el mesencéfalo ventral, algunas de ellas dependientes de contacto (Echelard et al., 1993; Roelink et al., 1994, 1995; Ericson et al., 1996). Para evaluar esta posibilidad, empleamos un adenovirus capaz de sobreexpresar Shh de manera endógena en el cultivo. De esta manera las células se encontrarían expuestas a una concentración óptima del factor producido, y presentado por ellas mismas a sus células vecinas.

Al analizar la actividad biológica del adenovirus y comparándola con la del medio condicionado en el bioensayo sobre la línea celular de osteoblastos 10T1/2, determinamos que el adenovirus posee una actividad/volumen, de 3 órdenes de magnitud por encima de la del sobrenadante (Figura 5), lo que resultó ventajoso además para disminuir el efecto del suero fetal de bovino sobre las CPNs.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

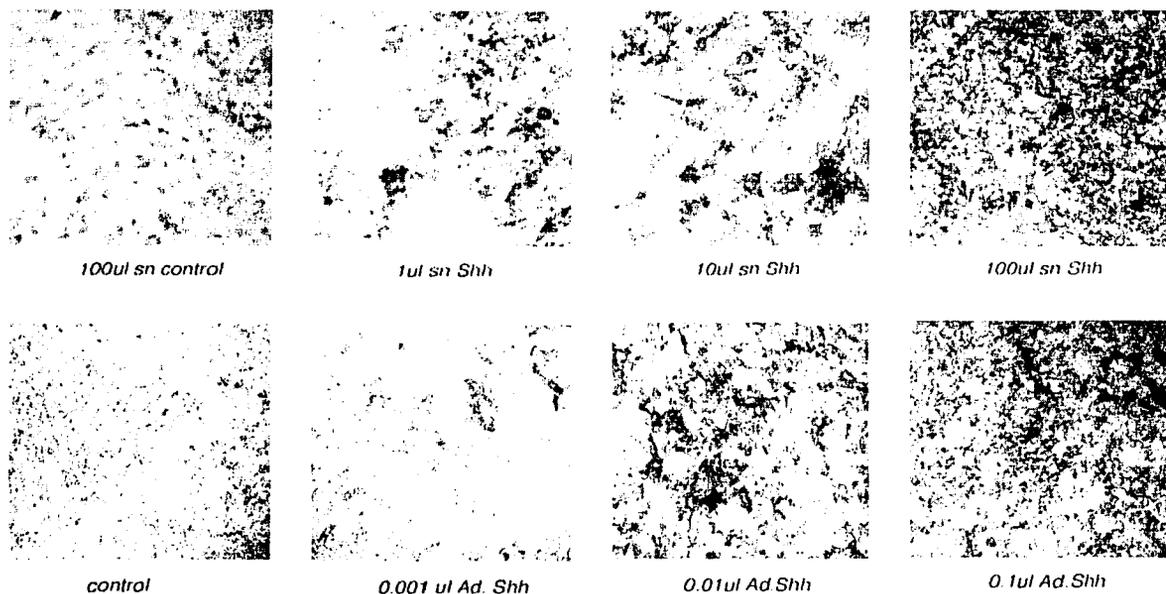


Fig. 5 Comparación de la actividad biológica del Ad. Shh y el medio condicionado con Shh. Se sembraron 10,000 células C3H10T1/2 por pozo y se infectaron con las siguientes cantidades de Adenovirus-Shh: 0ul (control), 0.001ul, 0.01ul y 0.1ul por 1hora en un volumen de 200ul de medio completo, después de dicho tiempo se completó el volumen a 500ul totales. Pozos paralelos se cultivaron en presencia de diferentes volúmenes de medio condicionado con Shh (1, 10 ó 100ul) ó con medio condicionado control (100ul). Al término de 6 días de cultivo las células se tiñeron para revelar la actividad de fosfatasa alcalina. La figura representa datos experimentales de cuatro experimentos independientes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las células del mesencéfalo ventral no responden a Shh.

Ya que corroboramos la actividad biológica del adenovirus lo ensayamos en nuestro sistema experimental. En esta ocasión nuestra aproximación a la búsqueda de las células que responden a Shh fué realizada en un cultivo primario de mesencéfalo ventral de 13.5 dpc. Reportes previos por otros grupos de investigación demostraron que en el mesencéfalo existe una población celular que responde a Shh induciendo la expresión de algunos genes de diferenciación neural como TH, FP3/FP4 y *Hnf3b*, marcador de neuronas dopaminérgicas el primero y de células de la placa del piso los últimos (Hynes et al, 1995; Ericson et al, 1995, 1996). Por esta razón era de esperarse que en el mesencéfalo ventral se encontrara presente la población celular que en respuesta a Shh activara la expresión de los genes de la cascada de señalización intracelular conocidos. Esta población celular pudiera no ser la que estamos amplificando con EGF. Por tal motivo decidimos evaluar la respuesta de las células del mesencéfalo ventral en un cultivo primario, con la idea de mantener todos los tipos celulares que están en el tejido intacto. Consideramos que en este cultivo están presentes tanto las células que proliferan con EGF, así como las que no responden a este factor pero que coexisten con ellas en el mesencéfalo. Estas últimas pudieran ser las que responden o median la respuesta de Shh.

El cultivo primario del mesencéfalo ventral se llevó a cabo a una densidad de 500,000 células por pozo. Al momento del sembrado, las células fueron expuestas a las siguientes condiciones experimentales: infectadas con el Adenovirus (Ad) productor de Shh, Shh con o sin ciclopamina (inhibidor específico de la cascada de Shh); con un Ad. Control; sólo, ó con ciclopamina; con el vehículo de la ciclopamina (etanol) ó sólo con EGF. Las células se mantuvieron en esas condiciones por 24 horas. Al término de dicho tiempo se recolectaron las muestras para evaluar por medio de RT-PCR la expresión de los diferentes genes involucrados en la cascada de Shh.

En este cultivo logramos sobreexpresar Shh en las condiciones que fueron infectadas con el Ad.Shh (Ad.Shh sólo o con ciclopamina) (Figura 6). Sin embargo no logramos inducir la expresión de los genes de respuesta esperados como son *Gli1* y *Ptc*. Al mismo tiempo pudimos ver que *Gli2* no se expresa mientras que *Gli3* lo hace en todas las condiciones, aunque en esta ocasión de manera muy baja, ambos comportamientos

equivalentes a los observados en los experimentos descritos previamente con las CPNs. De manera paralela a la detección de estos marcadores, medimos la expresión de dos genes que determinan el eje dorsoventral en el tubo neural *in vivo* y cuya expresión es regulada por Shh positiva (*Nkx2.2*) o negativamente (*Pax6*). Como se puede apreciar en la figura 6, los niveles de expresión de ambos genes en nuestro sistema son muy altos. Lo más relevante fue que la sobreexpresión de Shh o el uso de ciclopamina no modifica los niveles de expresión en ninguna dirección. En el caso de ciclopamina esto sucede a pesar de que el nivel de expresión de Ptc y Shh endógeno disminuye.

Del experimento anterior pudimos concluir que las células presentes en el mesencéfalo ventral de 13.5 dpc cultivadas en forma disgregada no responden a Shh. Esto puede deberse a que es necesaria la integridad del tejido en donde pudieran estar presentes microambientes que modulen o participen en desencadenar la respuesta a Shh. Por este motivo decidimos realizar explantes del tejido completo. Sistema experimental utilizado por varios grupos de investigación donde se han reportado efectos de diferenciación inducidos por Shh. Al mismo tiempo, teniendo en consideración los efectos de ciclopamina al disminuir los niveles de Ptc y de Shh endógeno y no afectar los de *Pax6* y *Nkx2.2* es posible sugerir que las células se encuentran en un estado avanzado de diferenciación. Por eso consideramos conveniente hacer el siguiente análisis en un estadio más temprano de desarrollo.

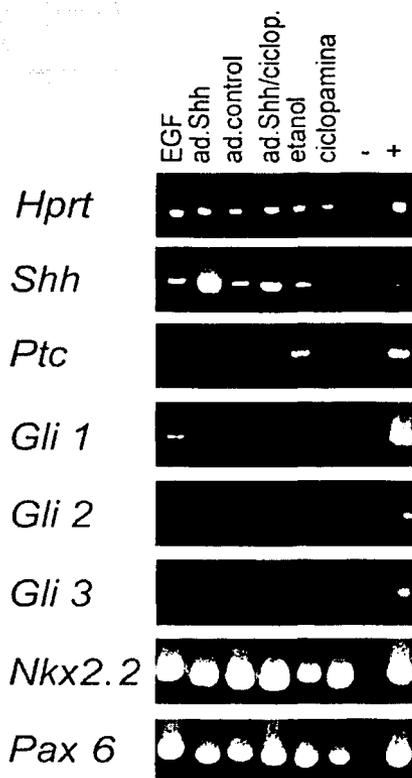


Fig. 6 **Sobreexpresión de Shh en células primarias de Mesencéfalo Ventral de 13.5 dpc.** Se realizó un cultivo primario de 500,000 células por pozo. Pozos independientes se sometieron a diferentes condiciones de cultivo todas en presencia de EGF 100ng/ml por 24 horas. La condición control permaneció sólo con EGF. Se infectó un pozo con 30ul del Ad. Shh sólo ó con ciclopamina, otro con 30ul del Ad. Control, otro sólo con ciclopamina y finalmente otro permaneció con el vehículo (etanol). Al término del cultivo se recolectaron las células, se purificó el RNA y se realizaron los RT-PCR tomando muestras sólo a los 40 ciclos. Se detectaron los RNAs de Hprt, Shh, Ptc, Smo, Gli1, Gli2, Gli3, Nkx2.2 y Pax6. En los carriles finales se muestran los controles negativo y positivo de la reacción de PCR. 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 experimento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

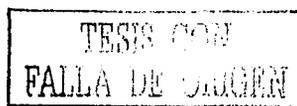
A los 10.5 dpc existen células del mesencéfalo que responden a Shh endógeno cuando se encuentran en su entorno natural, efecto que se pierde cuando son disgregadas.

Reportes previos realizados por otros grupos de investigación muestran que en etapas tempranas del desarrollo del Sistema Nervioso Central están presentes las células capaces de responder a Shh generando la expresión de diferentes genes de respuesta como son *Nkx2.1* y *Gsh2* (Rallu, M. et al, 2002) o aumentando la expresión de marcadores neuronales específicos como *Isl 1* (Dutton, R. et al, 1999). Lo anterior indica que las células que responden a Shh pudieran ser precursores enriquecidos en etapas tempranas del desarrollo. Tomando en cuenta lo anterior, las evaluaciones subsecuentes las realizamos con mesencéfalos obtenidos de embriones de 10.5 d pc.

Al mismo tiempo, y con la idea de evaluar si la integridad del tejido es determinante para la activación de la cascada de señalización por Shh en el mesencéfalo cultivamos explantes de tejido de la misma etapa de desarrollo. Cabe mencionar aquí que la mayoría de los reportes experimentales donde se describen efectos producidos por Shh han sido evaluados en tejidos cultivados (Dutton, R. et al, 1999; Dahmane et al, 1999; Dahmane et al, 2001) o en el individuo completo (Rowitch, D. et al, 1999; Rallu, M. et al, 2002) lo que apoya la idea ya planteada con anterioridad también por otros grupos de trabajo, de la necesidad de señales adicionales al estímulo de Shh en la generación de respuestas celulares específicas. En este punto nuestro interés se centró en evaluar la expresión de los transductores de Shh: *Gli1* y *Gli2* principalmente.

Para cumplir con el objetivo anterior realizamos un cultivo primario de mesencéfalo completo de 10.5 d. pc al tiempo que cultivamos explantes de tejido equivalentes en las mismas condiciones. Para el cultivo primario se sembraron 500,000 células por pozo que se mantuvieron por 24 horas en presencia de EGF. En el caso de los explantes se cultivaron por el mismo período de tiempo en las mismas condiciones (con EGF) además de que evaluamos el efecto de la ciclopamina en una condición, y en otra la del vehículo (etanol). Al término del cultivo se recolectaron las muestras para su análisis por RT-PCR.

El resultado obtenido en el cultivo primario fue similar al generado con células de 13.5 dpc. Los niveles de expresión son altos para *Shh*, *Ptc*, *Nkx2.2* y *Pax 6* (Figura 7A). No logramos detectar la expresión de *Gli1* y como en los cultivos anteriores, *Gli2*



tampoco está presente. En el caso de los explantes es de gran relevancia señalar la expresión importante de todos los marcadores evaluados: *Shh*, *Ptc*, y el más relevante *Gli1*, en el control con EGF y en la condición con etanol vehículo de la ciclopamina. En este último se evaluaron además *Gli2*, *Nkx2.2* y *Pax6* que se expresan también de manera abundante (Figura 7B). En la figura 8 se muestra que el patrón de expresión de *Shh* y *Gli1* (detectado por hibridación *in situ*) se conserva aún después de cultivar los explantes por 24 horas, contrariamente a lo que ocurre al cultivar las células disgregadas por el mismo período de tiempo. En este mismo experimento observamos que la ciclopamina tuvo un efecto negativo sobre la expresión endógena de *Gli1* y *Ptc*, lo que va de acuerdo con los efectos reportados de la ciclopamina como un inhibidor de la vía de transducción de Shh (Figura 7B). Este resultado fue reproducido en dos muestras independientes adicionales no mostradas y nos indica que Shh endógeno regula positivamente la expresión de *Gli1* y *Ptc* y por lo tanto la activación de la cascada.

Analizando estos resultados en conjunto con los experimentos realizados en cultivos primarios donde la expresión de *Gli1* se abate. Es posible sugerir que existe la participación de elementos adicionales indispensables, como podría ser el contacto celular o factores tróficos particulares, para la activación de la cascada de señalización por Shh y por lo tanto la expresión de *Gli1* y *Ptc*.

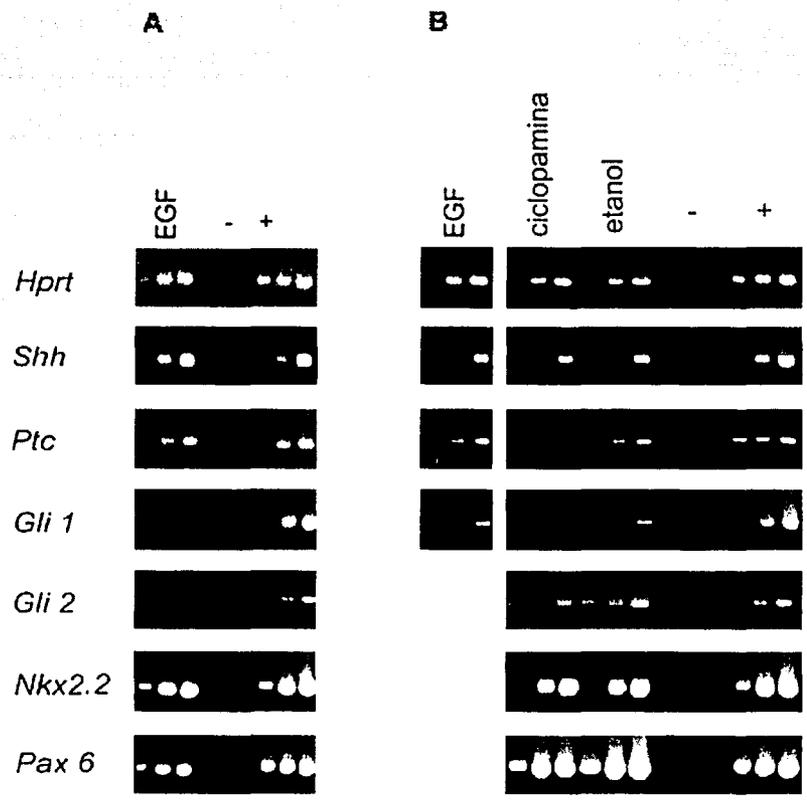


Fig. 7 Cascada de señalización por Shh en células primarias de Mesencéfalo de 10.5 dpc en cultivo primario y en explantes. Se realizó un cultivo primario de 500,000 células por pozo en presencia de EGF 100ng/ml por 24 horas (A) al mismo tiempo que se cultivaron explantes de mesencéfalo completo de 10.5 dpc (B) con EGF 100ng/ml por 24 hrs, con ciclopamina ó sólo con el vehículo de la ciclopamina (etanol). Al término del cultivo se recolectaron las células ó tejidos, se purificó el RNA y se realizaron los RT-PCR tomando muestras a los 30,35 y 40 ciclos. Cada condición está representada por 3 carriles continuos. Se detectaron los RNAs de Hprt, Shh, Ptc, Gli1, Gli2, Nkx2.2 y Pax6. En los carriles finales se muestran los controles negativo y positivo de la reacción de PCR. Ppara 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 dos experimentos independientes.

TRUSTED COPY
FALL 2000

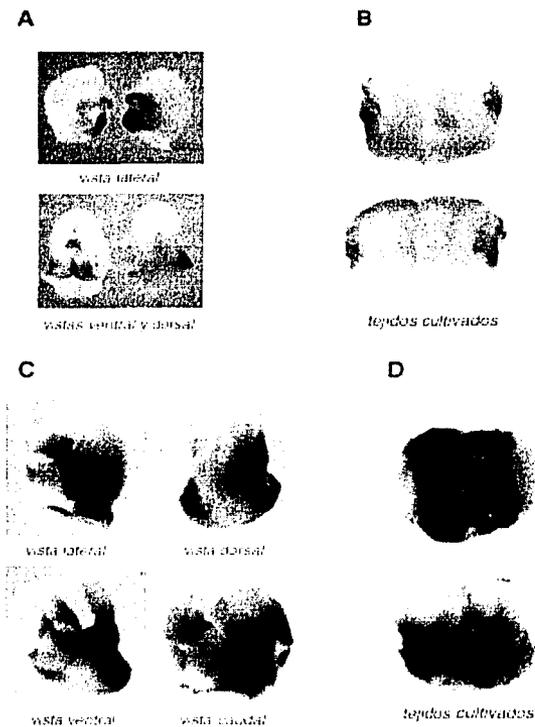


Fig. 8 *Patrón de expresión de Gli1 y Shh en tejido sin cultivar y en explantes de 10.5 dpc.* Hibridación *in situ* contra Shh (A y B) y Gli1 (C y D) de mesencéfalo completo de 10.5 dpc en piezas de tejido sin cultivar (A y C) y en explantes cultivados por 24 horas (B y D). Los tejidos usados para los explantes fueron abiertos por la región ventral (partes laterales en la fotografía mostrada).

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

DISCUSIÓN

En el presente trabajo nuestro interés se centró principalmente en evaluar la respuesta de CPNs a Sonic Hedgehog (Shh). Shh es una proteína cuya actividad morfogenética es indispensable para el establecimiento del patrón D-V durante el desarrollo embrionario del SNC, además, se le atribuye la inducción de los distintos fenotipos ventrales a lo largo del tubo neural. Lo anterior nos indica que una misma molécula es capaz de inducir la generación de diferentes tipos celulares dependiendo del contexto celular en el que actúe y resalta la importancia de conocer su mecanismo de acción celular.

Experimentos obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que las CPNs multipotentes expandidas *in vitro* con ayuda del factor de crecimiento epidérmico EGF son muy tempranas en el desarrollo y conservan la capacidad de dar origen a los dos linajes del SNC; el glial y el neuronal (Santa-Olalla, and Covarrubias, 1995a). Al mismo tiempo se observó que estas CPNs pueden generar fenotipos neuronales terminales tal es el caso del dopaminérgico, que resulta ser uno de los inducidos por Shh *in vivo*. En nuestro sistema, la diferenciación hacia este tipo celular parece requerir de señales adicionales, una de las cuales podría ser Shh ya que el fenómeno es aleatorio (Santa-Olalla, and Covarrubias, 1995b). Un análisis posterior también realizado por nuestro grupo de trabajo demostró que estas células expresan el RNA mensajero de Ptc y Smo, ambas moléculas transmembranales involucradas en la recepción y transducción de la señal de Shh. Lo anterior nos hizo proponer que las CPNs podrían responder a Shh regulando la expresión de sus genes blanco como los factores transcripcionales Glis.

Dentro de las estrategias utilizadas para exponer las células en cultivo al estímulo de Shh se incluyeron tres preparaciones de N-Shh biológicamente activo que han sido empleadas. La primera de ellas consistió en usar el péptido N-Shh recombinante cuya actividad biológica ha sido comprobada en algunos sistemas biológicos como por ejemplo, la inducción del establecimiento del patrón D-V de las somitas en explantes de mesodermo de ratón (Fan et al., 1995), la generación de la placa del piso y motoneuronas Islet 1+ en explantes de placa neural de pollo (Martí et al, 1995, Roelink et al, 1995) y el establecimiento del patrón A-P en las extremidades de pollo (López-Martínez et al., 1995), entre otros. Alternativamente se obtuvo medio condicionado con N-Shh en una línea celular de mamífero que lo expresa de manera transitoria, éste procedimiento ha sido utilizado para inducir neuronas TH+ en explantes de rata (Hynes

et al., 1995) y para inducir marcadores ventrales como Nkx2.1, Nkx2.2 y Isl-1 en una línea de células neuroepiteliales de ratón (Nakagawa et al., 1996). El N-Shh que posee dicho sobrenadante contiene las modificaciones lipídicas que lo hacen hasta 30 veces más activo (Pepinsky et al., 1998). La actividad de nuestro sobrenadante fué corroborada previamente en el laboratorio utilizando un bioensayo de diferenciación. Como última estrategia, empleamos un adenovirus que permite sobreexpresar Shh biológicamente activo en nuestro sistema. Este vector adenoviral se utilizó previamente para inducir la expresión local transitoria de Shh en la piel de ratones posnatales y se observó la inducción de la fase de crecimiento del folículo piloso en respuesta a Shh, acompañada de un incremento en el RNA mensajero de Ptc y Gli1 (Sato et al., 1999).

Después de un análisis exhaustivo del efecto de Shh en las CPNs del mesencéfalo utilizando las herramientas antes mencionadas, observamos que N-Shh no induce la expresión de Gli1 ni de Gli2 en células disgregadas, o la represión de Gli3 y Pax6. Sin embargo, logramos demostrar que la expresión de algunos marcadores de la vía de transducción de Shh es regulada por Shh endógeno cuando la medimos en explantes de tejido completo. Esto nos hace proponer que en el tejido íntegro están presentes moléculas adicionales necesarias para la generación de una respuesta celular y que muy probablemente se están perdiendo en nuestras condiciones de cultivo.

Shh no induce la expresión de los Glis en CPNs

Los efectos de Shh durante el desarrollo del SNC se han caracterizado por el aumento en la expresión de proteínas de diferenciación de la placa del piso como HNF3b, FP3 y FP4 (Roelink et al., 1994; Hynes et al., 1995; Ericson et al., 1995) o de motoneuronas como Isl-1 y Isl-2 (Roelink et al. 1994; Ericson et al., 1995). La evidencia más sólida de la participación de Shh en el SNC se ha obtenido del estudio del ratón con la mutación nula. Los estudios revelaron que en ausencia de Shh se evita la generación de la placa del piso y se afecta de manera importante la diferenciación de los fenotipos ventrales a lo largo de todo el tubo neural, siendo los efectos más dramáticos en la región del telencéfalo (Chiang et al., 1996). Estos cambios son acompañados de la reducción en la expresión de Gli1 y Ptc (Litingtung and Chiang, 2000). Así mismo se ha reportado la inducción de la expresión del RNAm de Gli1 por Shh en experimentos de sobreexpresión

ectópica en una línea celular neuronal de rata (Sasaki et al., 1997), en el tubo neural dorsal de un ratón transgénico que sobreexpresa N-Shh en el día E14 (Hynes et al., 1997) o cuando se sobre expresa la región codificadora completa de Shh a partir de los 10 d. pc en el tubo neural dorsal a nivel de la médula (Rowitch et al., 1999), así como en embriones de rana en el estadio de placa neural (Lee et al., 1997). También se ha descrito que el péptido recombinante N-Shh es capaz de inducir la sobre expresión del mensajero de Gli1 en células cerebelares de ratón posnatal (P8) en cultivo (Wechsler-Reya and Scott, 1999); en explantes cultivados del mesencéfalo dorsal de ratón P3 (Dahmane et al., 2001) y del cerebelo de ratón y pollo (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Dahmane et al., 2001). De manera relevante se demostró que la expresión ectópica de Gli1 en el mesencéfalo dorsal puede desencadenar las mismas respuestas que la aplicación de Shh (Hynes et al., 1997). Las evidencias anteriores llevaron a concluir que Gli1 es el principal efector intracelular de la cascada activada por Shh y nos llevan a postular que dado que las CPNs cultivadas *in vitro* en nuestro sistema expresan las moléculas receptoras de la señal debían responder a Shh induciendo la expresión de Gli1.

Shh es capaz de regular la actividad de los tres Glis de manera distinta y a diferentes niveles, produciendo factores transcripcionales con diferentes funciones, algunas de ellas no intercambiables. A nivel transcripcional Shh induce la expresión de Gli1 (Lee et al., 1997) y la de Gli2 (Ruiz i Altaba, 1998), mientras que reprime la de Gli3 (Ruiz i Altaba, 1998; Marigo et al., 1996). Por otro lado, a nivel postraducciona Gli2 y Gli3, pero no Gli1 pueden ser procesados para generar una proteína represora. El procesamiento para generar la forma activadora de Gli2 y la represora de Gli3 depende de Shh, mientras que la generación de la forma represora de Gli2 no requiere de shh (Aza-Blanc et al., 2000; Dai et al., 1999; Wang et al., 2000). El hecho de que los Glis sean regulados diferencialmente por Shh brinda la oportunidad de que una sola molécula señalizadora pueda desencadenar distintas respuestas celulares ya sea en el mismo o diferente tejido. Nosotros detectamos una expresión diferencial de los RNAm que codifican para los Glis en las CPNs. En las condiciones de referencia se expresa normalmente el mensajero de Gli3 pero no los de Gli1 y Gli2. En presencia de Shh no logramos inducir la expresión del mensajero de Gli1 y Gli2 mientras que el de Gli3 lo encontramos en la mayoría de las condiciones sin lograr reprimirlo. A este respecto

cabe la posibilidad de que Shh esté regulando de manera postraducciona a la molécula proteica de Gli3 generando principalmente la molécula represora como ya ha sido reportado (Dai et al 1999), manteniendo de ésta manera inhibida la cascada de señalización en éstas células. Algo muy importante es que se encontró que Gli1 no resulta ser un factor indispensable para la señalización por Shh durante el desarrollo del SNC como era de esperarse dados todos los datos comentados a lo largo de esta discusión. Por un lado se sabe que con sólo expresarlo ectópicamente es capaz de reproducir las respuestas celulares atribuidas a Shh (Lee et al., 1997), pero por el otro se encontró que el ratón mutante que carece de la función de Gli1 es fenotípicamente normal (Park et al., 2000). Este dato en un inicio rompió con el esquema bastante aceptado hasta entonces de que Gli1 era el principal efector de Shh, y se amplió el panorama de manera que se empezó a aceptar que Gli2 pudiera ser el factor más relevante durante la respuesta a Shh en algunos sistemas. Apoyando ésta idea se encontró que los mutantes para Gli2 mueren al nacer y tienen severos defectos en el desarrollo de la placa del piso y de las interneuronas aunque las motoneuronas, localizadas en la parte ventral del tubo neural, se desarrollan aún en ausencia de placa del piso (Ding et al., 1998; Matise et al., 1998). Esto muestra que Gli2 se requiere para mediar la actividad de Shh en algunas regiones donde actúa a altas concentraciones. Los ratones mutantes de Gli2 también presentan otros defectos en estructuras cuyo desarrollo también se le atribuye en gran medida a la acción de Shh, como el esqueleto y los pulmones (Mo et al., 1997; Park et al., 2000). La falta de placa del piso en los mutantes de Gli2 indica que éste pudiera estar actuando abajo de la cascada de Shh generando al menos algunos de los fenotipos ventrales atribuidos a la acción de Shh. Teniendo en consideración la información anterior es posible sugerir que existe una redundancia en la actividad de Gli1 y Gli2 como por ejemplo, durante la generación de algunos fenotipos ventrales como el de la placa del piso y participación diferencial en otros como cuando Gli2 actúa como un represor de los blancos de Shh. Nosotros no logramos identificar una activación transcripcional de Gli2 que nos sugiera una activación por Shh en las CPNs. En tal caso podríamos pensar que estas células estarían respondiendo a Shh a través de este efector intracelular. En lo que respecta a la función de Gli3, los resultados han fortalecido la idea de que presenta una actividad que antagoniza la función de Shh y viceversa. Se ha descrito que la sobreexpresión de Shh

reprime la expresión del mensajero de Gli3 mientras que en ausencia de Gli3, Shh se expresa ectópicamente (Ruiz i Altaba, 1998). En el mismo sentido, los defectos observados en el mutante de Gli3 se asemejan principalmente a los de ganancia de función de Shh, lo cual indica que la función de Gli3 es principalmente la de reprimir la acción de Shh y evidencia una acción antagónica entre ambos (Rallu et al., 2000; Litingtung and Chiang, 2000). De manera interesante los dobles mutantes para Shh;Gli3 reestablecen la mayoría de estructuras afectadas en cualquiera de las dos mutaciones por separado (Litingtung and Chiang, 2000).

Para analizar de una manera más amplia la respuesta a Shh evaluamos la posible regulación transcripcional sobre *Nkx2.2* y *Pax6*, dos genes que son regulados transcripcionalmente por Shh de manera positiva el primero y de manera negativa el segundo. Encontramos que Shh no logra alterar la expresión del mensajero de estos genes en nuestras condiciones de cultivo. En vista de que tampoco se activa la expresión de Gli1 y Gli2 ni se reprime la de Gli3, podemos concluir que las CPNs no responden a Shh, ya sea activando genes como *Gli1-2*, *Nkx2.2*, o reprimiendo *Gli3* y *Pax6*. Lo anterior a pesar de que existen evidencias en el SN (Hynes et al., 1997) de que es posible activar la vía de señalización por Shh de manera ectópica. Así se pone en evidencia la complejidad con que la cascada de Shh es regulada durante el desarrollo. Lo que en un inicio parecía ser una relación causal entre algunos genes de respuesta como los Glis resulta ser una red más compleja de regulación a distintos niveles. En este sentido, se han descrito vías alternas que regulan respuestas originalmente descritas como dependientes de Shh. Dentro de estas se ha descrito que el ácido retinóico participa en la generación de interneuronas en la parte ventral del tubo neural *in vivo* (Pierani et al., 1999). Por otro lado, al caracterizar al mutante *talpid3* en pollo, el cual codifica para un componente más de la vía de Shh, se demostró que este gen es indispensable para que las células del mesénquima en la extremidad respondan a Shh. En las células que poseen ésta mutación, Shh no induce la expresión de *Ptc* y *Gli1* al mismo tiempo que no reprime la de *Gli3*. Además, en éste mismo mutante Shh induce la expresión de manera normal de *Fgf-4*, *Bmp* y *HoxD*, genes cuya expresión es modulada positivamente por Shh. Esto indica que muy probablemente Shh actúe sobre dos grupos de moléculas regulando su expresión de manera independiente. Es decir para el caso de *Ptc*, *Gli1* y *Gli3* a través de *talpid3*, mientras que la regulación de *Fgf-4*, *Bmp* y *HoxD* sería por una vía alternativa

(Lewis et al., 1999). Otro ejemplo en el mismo sentido, constituye el hecho de que la expresión del factor de transcripción *Id*, que pertenece a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas (COUP-TFII), no parece estar mediada por *Gli1*, a pesar de que *Shh* induce su expresión. La región promotora de este factor posee un elemento de respuesta que une un factor distinto a *Gli1* que media la acción de *Shh*. Aunque la unión de este factor a dicho elemento de respuesta es estimulada específicamente por *Shh*, puede ser substituída por un tratamiento con fosfatasas, esto indica por lo tanto, que *Shh*-N induce la defosforilación de un factor que se requiere para la activación de COUP-TFII, identificando de esta manera una bifurcación en la vía de transducción tradicional de *Shh* (Krishnan, et al., 1997). Otros grupos de trabajo han caracterizado efectos como la generación de meduloblastomas en el cerebelo de ratones de 13.5 d pc al sobreexpresar *Shh* en ratones mutantes nulos para *Gli1*. Al caracterizar los tumores generados en estos ratones se encontró que se expresa el mensajero de *Gli2* de manera similar a como se expresa en los tumores inducidos en el ratón silvestre. Esto demuestra que *Gli1* no se requiere para la formación de meduloblastomas en respuesta a *Shh* y que probablemente *Gli2* sea el factor involucrado (Weiner et al., 2002). También se ha descrito que *Shh* inhibe la adhesión y migración de las células de la cresta neural. Esta inhibición se lleva a cabo en cuestión de minutos, es reversible y no es antagonizada por forskolina ni ciclopamina (inhibidores de la vía de *Shh*) lo cual indica que *Shh* actúa de manera independiente a la vía de *Ptc-Smo-Gli1*. Durante este proceso, *Shh* pudiera estar actuando a través de una interacción directa con moléculas transmembranales en el espacio extracelular involucradas en los procesos de adhesión y migración celular como las integrinas (Testaz et al., 2001) La idea de que las CPNs respondan a *Shh* por un mecanismo independiente a *Gli1* es apoyada también por datos obtenidos en el laboratorio en donde se observó que la expresión ectópica de *Shh* en las extremidades de ratón inhibe la muerte celular sin inducir la expresión de *Gli1* (Hernández and Covarrubias, 2003, datos no publicados). Aunado a esto, grupos de trabajo como el de Watanabe (Watanabe et al. 2000) y el de Rallu (Rallu et al. 2002) han encontrado que la inducción de *Ptc* durante el desarrollo del SNC medio y anterior respectivamente correlaciona con la expresión escasa o nula de *Gli1* cuando *Shh* es sobreexpresado de manera ectópica en estas regiones. Todos estos datos apoyan de manera importante nuestro resultado de no inducción de *Gli1* por *Shh* en las CPNs.

Dado lo anterior no podemos descartar totalmente que nuestro sistema de células precursoras del mesencéfalo sea capaz de responder a Shh, porque podría hacerlo a través de vías alternas a la de los Glis. Para lo cual sería primordial evaluar la expresión de genes de diferenciación como Hnf3 β , FP3, FP4 y TH, que otros grupos han utilizado para medir la respuesta a Shh de células neurales. También es necesario evaluar respuestas celulares específicas como proliferación, sobrevivencia y muerte celular.

Shh requiere de moléculas adicionales para desencadenar una respuesta en las CPNs.

Otro dato importante encontrado durante la realización de éste trabajo experimental es la relevancia de la integridad del tejido para la generación de una respuesta celular a Shh. Este hecho es de gran relevancia ya que aunado a la posibilidad de que las CPNs pudieran estar respondiendo a Shh por una vía alterna observamos que son necesarias otras señales presentes en el tejido para la expresión de los transductores más conocidos como Gli1 y Gli2. En estos experimentos es posible detectar la expresión de los genes de la cascada de Shh en el mesencéfalo completo cultivado como Shh, Ptc, Gli1 y Gli2, mientras que cultivos en paralelo en donde una población celular equivalente se disgrega pierde la expresión de dichos genes. Además, en el tejido intacto, la ciclopamina inhibe la expresión de Ptc, Gli1 e incluso la de Gli2, lo que nos demuestra que existe una población celular que responde a Shh aún después de 24 hrs de cultivo y que se encuentra reaccionando ante el estímulo de Shh endógeno. Este resultado nos sugiere que pudieran estar jugando un papel muy importante moléculas involucradas en mantener la integridad del tejido como las proteínas de la matriz extracelular por ejemplo. En este sentido y de manera reciente se describió la colaboración de Shh con moléculas de la matriz extracelular como la vitronectina. Se sabía que la vitronectina era capaz de unirse a Shh y cooperar en la inducción de motoneuronas en la médula espinal (Martínez-Morales et al., 1997; Pons and Martí, 2000). En el cerebelo se demostró que participa durante el reposo de las células precursoras de la granulosa para dar inicio al proceso de diferenciación de las células de la capa germinal externa (Pons et al, 2001). Por otro lado, otros grupos de trabajo han observado que la integridad del tejido puede ser determinante para la generación de fenotipos neuronales específicos en respuesta a

Shh cuando no logran inducirlos en células precursoras aisladas de la médula espinal (Dutton et al, 1999).

De manera adicional es posible que factores de crecimiento sean requeridos para la generación de una respuesta específica a Shh, y que se estuvieran perdiendo durante la disgregación o que la adhesión celular fuera crítica para el desarrollo óptimo del tejido. Existen reportes donde se ha demostrado que Shh actúa en combinación con otros factores de crecimiento para inducir fenotipos celulares terminales. Por ejemplo 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 cuando en la misma intersección esta expresión es precedida por la producción de FGF4, se genera una zona inductora de neuronas serotoninérgicas (Ye et al., 1998). Posteriormente, estos datos fueron apoyados por un trabajo con células troncales embrionarias en el que la combinación de Shh + FGF8 logró inducir la producción de neuronas dopaminérgicas (Lee et al., 2000). Por otro lado, se describió que Shh actúa en combinación con Neurotrofina 3 (NT3) para generar motoneuronas Isl1+ en cultivos de precursores de médula espinal (Dutton, et al, 1999) lo que sugiere que existe una cooperación de Shh con NT3 durante la diferenciación de las motoneuronas *in vivo*. Estos datos apoyan la propuesta de que para que Shh induzca una respuesta se requieren factores de crecimiento adicionales presentes en el tejido.

La señalización por Shh se complica: otros factores involucrados durante la producción, procesamiento y recepción de la señal.

De manera reciente se han esclarecido aspectos importantes de la cascada de señalización por Hh; se han caracterizado en mayor detalle las modificaciones lipídicas que le ocurren durante su procesamiento e identificado moléculas involucradas en el tránsito intracelular de Ptc y Smo.

Reportes recientes destacan la relevancia que podrían tener el colesterol y el ácido palmítico presentes en el péptido de Hh. Se ha descrito que la molécula de colesterol anclada a Shh en vertebrados tiene un papel muy importante durante su tránsito extracelular (Lewis et al., 2001). En este sentido se ha propuesto que dicha modificación lipídica participa en la formación de micelas en multímeros de 6 proteínas para transitar de manera extracelular y generar respuestas a larga distancia (Zeng et al.,

2001). Se sabe que estos complejos lipoprotéicos se encuentran en muy baja proporción y que la mayoría del Shh con colesterol queda asociado a la membrana, muy probablemente para generar respuestas de corto alcance. Por otro lado se ha descrito que la adición de la molécula de ácido palmítico aumenta la actividad de la proteína hasta 30 veces al medirla en un bioensayo sobre la línea celular de fibroblastos de ratón 10T1/2 (Pepinsky et al., 1997)). De igual manera se identificó que la acilación de la proteína es esencial para la inducción de tipos celulares neuronales específicos en el cerebro anterior del ratón (Kohtz et al., 2001), mientras que la ausencia de esta modificación no afecta la actividad de la proteína durante el desarrollo de las extremidades (Lee et al., 2001). Esto pudiera estar reflejando variaciones en el grado de actividad necesaria para su participación en diferentes procesos. En *Drosophila* se caracterizó el gene *Rasp*, que codifica para una aciltransferasa transmembranal involucrada específicamente en la transducción de Hh. Se encontró que la ausencia de ésta proteína no afecta la transcripción, los niveles de proteína ni la localización intracelular de Hh si no que su actividad se limita únicamente a la célula que lo produce (Craig et al., 2002). Finalmente al ensayar la actividad del Shh de humano con diversos residuos hidrofóbicos en la cisteína del extremo NH₂-terminal mediante ensayos *in vivo* o *in vitro* se observó que hay un incremento de la misma de manera considerable en presencia de estas modificaciones, lo que sugiere que es el grado de hidrofobicidad más que la naturaleza química de la proteína lo que determina su actividad (Taylor et al., 2001). Con los datos anteriores podemos concluir que ambas moléculas lipídicas tienen una función específica dentro de la proteína, ya sea regulando su secreción y movimiento en el caso del colesterol o potenciando su actividad en el caso del ácido palmítico. En particular nosotros ensayamos varias preparaciones que consideramos poseen dichas modificaciones, esto sólo pudimos inferirlo al evaluar su actividad en el ensayo sobre la línea 10T1/2, y con ninguna de ellas logramos inducir una respuesta celular en las CPNs. A pesar de ello consideramos que los diferentes procedimientos de producción de Shh utilizados en este trabajo representan muy buenas alternativas de uso para el estudio de los efectos de Shh.

Recientemente se han caracterizado otras proteínas involucradas en limitar el rango de acción de Hh como Hip (Hedgehog interacting protein), glicoproteína unida a la membrana identificada como un inhibidor de Hh en *Drosophila* (Chuang and McMahon,

1999). Otra de ellas es GAS-1 (growth arrest specific 1), una proteína unida a glicofosfatidil-inositol que también fue identificada como de unión a Shh e inhibidora de su vía de señalización (Lee et al., 2001). La proteína Megalina también se une a Shh, ésta molécula de la superfamilia de receptores a las lipoproteínas de baja densidad está involucrada principalmente en la regulación de la endocitosis, por lo que se postula que pudiera estar actuando como correceptor de Shh regulando su presentación a Ptc. En esta propuesta se considera que el encuentro de Shh y Ptc pudiera darse gracias a la fusión de vesículas intracelulares que transportan a ambas moléculas por separado. Por un lado el Shh recibido en la membrana plasmática y gracias a su unión con megalina estaría siendo endocitado, mientras que Ptc se encontraría en tránsito vesicular de golgi al espacio extracelular. Es durante este transporte cuando se propone que ambos tipos de vesículas se encuentran y se lleva a cabo la fusión y la presentación de Shh a Ptc. (Bellaiche et al., 1998). En los últimos años se ha caracterizado también con mayor detalle el comportamiento de las moléculas transmembranales receptoras de la señal de Hh. Ahora se sabe que Ptc regula negativamente los niveles de expresión de la proteína Smo (Ingham et al., 2000). También se ha descrito que su tránsito por la membrana celular es dinámico, por ejemplo que los niveles de Smo se incrementan en la superficie celular en respuesta al estímulo de Hh, mientras que los de Ptc disminuyen (Denef et al., 2000). Lo anterior pone en duda la relevancia de la interacción física entre Ptc y Smo reportada por Marigo et al (Marigo et al, 1996a) y demanda un mayor análisis de la regulación de ambas moléculas. Por otra parte, el transporte vesicular se ha implicado en la vía de señalización por Shh en vista que se ha identificado a Rab23, un miembro de la superfamilia de proteínas de transporte vesicular que actúa como un regulador negativo esencial de la cascada de Shh durante la especificación de los tipos celulares dorsales en el tubo neural del ratón (Eggenchwiler et al., 2001). Finalmente se identificó un sitio de unión de Shh a heparan en su extremo amino terminal como importante para la unión de Shh a HSPGs (proteoglicano de heparan sulfato) en las células granulares durante el desarrollo del cerebelo de ratón. La interacción de Shh con HSPGs es requerida para la proliferación tardía del cerebelo (Rubin et al., 2002).

La información recopilada en el párrafo anterior representa un breve panorama de algunas de las moléculas involucradas en el procesamiento y presentación de Shh a su célula blanco descritas de manera reciente. Ahora será necesario reconsiderar a aquellas

que participen durante el desarrollo del SNC particularmente durante la proliferación y diferenciación de las CPNs para poder hacer un análisis más amplio de la respuesta de estas células a Shh. Con base en análisis realizado durante la elaboración de este trabajo podemos proponer que este sistema de cultivo de CPNs *in vitro* con ayuda del factor de crecimiento EGF no es el adecuado para investigar la respuesta a Shh, por lo tanto habrá que abordar el problema de manera más integrativa utilizando herramientas que mantengan las condiciones idóneas para el desarrollo y diferenciación de las CPNs, como el empleo de tejidos íntegros en cultivo o de organismos completos.

CONCLUSIONES

En conclusión, en este trabajo demostramos que las Células Precursoras Neurales expandidas con EGF obtenidas del mesencéfalo ventral no son capaces de responder a Shh expresando sus moléculas blanco más caracterizadas como Gli1 y Ptc a pesar de que expresan el RNAm de las moléculas transmembranales identificadas como necesarias para la recepción y la transducción de la señal de Shh; Ptc y Smo.

Para llevar a cabo la evaluación de la respuesta de éstas células a Shh empleamos 3 estrategias de aplicación. En los tres casos no logramos inducir la expresión del RNAm de Gli1, sin embargo consideramos que dichas herramientas constituyen buenas opciones para evaluar los efectos de Shh en otros sistemas.

A la par pudimos observar que la disgregación del tejido abate la expresión endógena de *Gli1* y *Gli2*. Con ayuda de un inhibidor específico de la cascada comprobamos que en el tejido se encuentran presentes células capaces de responder a Shh endógeno de manera específica. Estos datos invitan a pensar que la integridad del tejido es indispensable para la activación de la cascada de transducción de Shh y que la disminución de la expresión pudiera deberse a la pérdida de señales específicas durante la disgregación del tejido.

En este punto no podemos descartar la posibilidad de que las células pudieran estar respondiendo a Shh por un mecanismo independiente a Gli1 generando respuestas específicas que será necesario evaluar posteriormente. Como por ejemplo, la inducción de la expresión de marcadores específicos de la placa del piso o de diferenciación neuronal, así como eventos de muerte o proliferación celular.

Finalmente proponemos que las evaluaciones posteriores de la respuesta de éstas células a Shh deberán realizarse en sistemas integrales en donde se conserve el entorno celular de manera lo más similar posible a cómo se encuentran en el organismo completo en desarrollo. Sólo así será posible contar con todas las señales necesarias para la generación de las respuestas celulares específicas.

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.

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.

Aza-Blanc, P., Lin, H. Y., Ruiz i Altaba A., Kornberg, T. B. (2000). Expression of the vertebrate Gli proteins in *Drosophila* reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development* 127, 4293-4301

Bellaiche, Y., The, I. And Perrimon, N. (1998). Tout-velu is a *Drosophila* homologue of the putative tumor suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* 394, 85-88.

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.

Bovolenta, P. and Marti, E. (2002). Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends in Neurosciences* 25, 89-96.

Brian, B.C., and Joyner, L.A (2001). Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. *Development* 128, 5161-5172

Brian, B.C., Auerbach, w., lee, J. S., Stephen, D., Joyner, A, L., et al., (2002) Gli2, but not Gli1, is required for initial shh signaling and ectopic activation of the shh pathway. *Development* 129, 4753-4761

Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M. and Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435-445.

Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, M., and Struhl, G. (2001). A Hedgehog-Insensitive Form of Patched Provides Evidence for Direct Long-Range Morphogen Activity of Sonic Hedgehog in the Neural tube. *Molecular Cell* 7, 1279-1291.

Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K., Dickson, B., and Basler, K. (1999). Dispatched, a Novel Sterol-Sensing Domain Protein Dedicated to the Release of Cholesterol-Modified Hedgehog from Signaling Cells. *Cell* 99, 803-815.

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.

Chamoun, Z., Mann, R., Nellen, D., von Kessler, D., Bellotto, M., Beachy, P., and Basler, K. (2001). Skinny Hedgehog, an acyltransferase required for Palmitoylation and Activity of the Hedgehog Signal. *Science* 293, 2080-2083.

Charrier, J., Lapointe, F., Le Douarin, N., and Teillet, M. (2001). Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at early stages of nervous system organogenesis. *Development* 128, 4011-4020.

Chen, Y., and Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87, 553-563.

Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K., Corden, J., Westphal, H., and Beachy, P. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.

Chuang, P., and McMahon, A. (1999). Vertebrate hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617-621.

Dahmane, N., and Ruiz i Altaba, A., (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126, 3089-3100.

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

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.

Denef, N., Neubuser, D., Perez, L., and Cohen, S. (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell* 102, 521-531.

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.

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.

Eggenchwiler, J., Espinoza, E., and Anderson, K. (2001). Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature* 412, 194-198.

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.

Gage, F.H., Kempermann, G., Palmer, T.D., Peterson, D.A. and ray, J. (1998). Multipotent progenitors cells in the adult dentate gyrus. *J. Neurobiol.* 36, 249-266.

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. *Developmental Biology* 219, 142-153.

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* 18 251:4991 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., 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.

Ingham, P., Nystedt, S., Nakano, Y., Brown, W., Stark, D., van den Heuvel, M and Taylor, A. (2000). Patched represses the Hedgehog signalling pathway by promoting modification of the Smoothed protein. *Curr Biol* 10, 1315-1318.

Ishibashi, M., and McMahon, P.A., (2002) A sonic hedgehog-dependent signaling really regulates growth of diencephalic and mesencephalic primordia in the early mouse embryo. *Development* 129, 4807-4819.

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.

Jiang, J., and Struhl, G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein *Slimb*. *Nature* 391, 493-496.

Johnson, R.L., and Tabin, C. (1995). The long and short of hedgehog signaling. *Cell* 81, 313-316.

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

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.

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.

Kohtz, J., Lee, H., Gaiano, N., Segal, J., Ng, E., Larson, T., Baker, D., Garber, E., Williams, K., and Fishell, G. (2001). N-terminal fatty-acylation of sonic hedgehog enhances the induction of rodent ventral forebrain neurons. *Development* 128, 2351-2363.

Krishnan, V., Pereira, F., Qiu, Y., Chen, C., Beachy, S., Tsai, Y. and Tsai, M. (1997). Mediation of Sonic Hedgehog-Induced Expression of COUP-TFII by a protein Phosphatase. *Science* 278, 1947-1950.

Kucera, J., Ernfors, P., Walro, J., and Jaenisch, 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.

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

Lee, C., Buttitta, L., and Fan, C. (2001). Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc Natl Acad Sci* 98, 11347-11352.

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.

Lewis, K., Drossopoulou, G., Paton, I., Morrice, D., Robertson, K., Burt, D., Ingham, P., and Tickle, C. (1999). Expression of *ptc* and *gli* genes in *talpid3* suggest bifurcation in Shh pathway. *Development* 126, 2397-2407.

Lewis, P.M., Dunn, M.P., McMahon, J.A., Logan, M., Martin, J.F., St-Jacques, B. and McMahon A.P. (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 105, 599-612.

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. 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.

Liem, K.F. Jr., Tremml, G., and 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, 127-138.

Litingtung, Y., and Chiang, C. (2000) Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between *shh* and *Gli3*. *Nature neuroscience*, volume 3 no 10 979-985.

- Lois, C. and Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2074-2077.
- López-Martínez A., Chang, D., Chiang, Ch., Porter, J., Ros, M., Simandl, B., Beachy, P., and Fallon, J. (1995). Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage. *Current Biology* 5, 791-796.
- 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.
- Martínez-Morales et al. (1997). Vitronectina is expressed in the ventral region of the neural tube and promotes the differentiation of motor neurons. *Development* 124, 5239-5147.
- 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.
- 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.
- 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.
- Nakagawa, Y., Kaneko, T., Ogura, T., Suzuki, T., Torii, M., Kaibuchi, K., Arai, K., Nakamura, S., and Nakafuku, M. (1996). Roles of cell-autonomous mechanisms for differential expression of regionspecific transcription factors in neuroepithelial cells. *Development* 122 (2449-2464).
- 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.
- 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.

Oppenheim, R.W., Homma, S., Martí, E., Prevet, D., Wang, S., Yaginuma, H., and McMahon, A.P. (1999). Modulation of early but not later stages of programmed cell death in embryonic avian spinal cord by Sonic Hedgehog. *Mol. Cell Neuroscience* 13, 348-361.

Park, H.L., Bai, C., Platt, K.A., Matise, M.P., Beeghly, A., Hui, C.C., Nakashima, M. and Joyner, A.L. (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 127, 1593-1605.

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.

Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., and Jessell, T. (1999). A Sonic Hedgehog-Independent, Retinoid-Activated Pathway of Neurogenesis in the Ventral Spinal Cord. *Cell* 97, 903-915.

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.

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.

Pons, S., and Marti, E. (2000). Sonic Hedgehog synergizes with the extracellular matrix protein vitronectin to induce spinal motor neuron differentiation. *Development* 127, 333-342.

Pons, S., et al. (2001). Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development* 128, 1482-1492.

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.

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. Rallu et al., 2000

Rallu, M., Machold, R., Gaiano, N., Corbin, G.J., McMahon, A.P., and Fishell, G. (2002). Dorsal patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both Gli3 and Hedgehog signaling. *Development* 129, 4963-4974.

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.

Rubin, J., Choi, Y and Segal, R. (2002). Cerebellar proteoglycans regulate sonic hedgehog responses during development. *Development* 129, 2223-2232.

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.

Sakurada, K., Sakurada-O.M., Palmer, T.D., and Gage, F.H., (1999) Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* 126 (4017-4026).

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.

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.

Sato, N., Leopold, L.L., Crytal R. G., (1999). Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of sonic hedgehog. *The Journal of clinical investigation*, October, volumen 104 ,855-864.

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.

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.

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.

Taylor, F., Wen, D., Garber, E., Carmillo, A., Baker, D., Arduini, R., Williams, K., Weinreb, P., Rayhorn, P., Hronowski, X., et al. (2001). Enhanced potency of human Sonic Hedgehog by hydrophobic modification. *Biochemistry* 40, 4359-4371.

Testaz, S., Jarov, A., Williams, K. P., Ling, L. E., Koteliansky, V. E., Fournier-Thibault, C., Duband, J. L.,(2001). Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the patched-Smoothed-Gli signaling pathway. *PNAS* 98, 12521-12526.

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.

Timmer, J., Wang, Ch., and Niswander, L. (2002). BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factor. *Development* 129, 2459-2472.

- 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* 177:4, 317-324.
- 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 Gli 3 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.
- Watanabe, Y., and Nakamura, H., (2000) Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by sonic hedgehog. *Development* 127, 1131-1140.
- Wechsler-Reya, R.J., and Scott, M.P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by sonic hedgehog. *Neuron* 22, 103-114.
- Weiner, L.H., Bakst, R., Hurlbert M. C., Ruggiero, J., Ahn, E., Lee, W, S., Stephen, D., Zagzag, D., Joyner, A, L., Turnbull, D, H. (2002) Induction of Medulloblastomas in Mice by Sonic Hedgehog, Independent of Gli1. *Cancer research* 62,6385-6389.
- Yamada, T., Plackzek, M., Tanaka, H., 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 plate. *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.

Zeng, X., Goetz, J., Suber, L., Scott Jr., W., Schreiner, C., and Robbins, D. (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 411, 716-720.

Zhou, X.F., and Rush, R.A. (1994). Localization of neurotrophin-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.