

UCH-FC
DOC-BMCN2
R364
c.1



CONTRIBUCIÓN DE LA VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE SONIC HEDGEHOG (Shh) Y DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF) EN EL DESARROLLO DE ESTRUCTURAS DORSALES DEL CEREBRO, DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE RATÓN.

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
En cumplimiento de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencia con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

Gisela Reinchisi

Marzo, 2008

Tutor de Tesis: Dra Verónica Palma
Co-tutor de tesis: Dr Alfonso González

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Gisela Eliana Reinchisi Ambrosio

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias en el examen de defensa de Tesis rendido el 30 de Enero de 2008 (fecha del examen privado)

Director de Tesis:

Dra Verónica Palma

Co-Tutor de Tesis:

Dr. Alfonso González

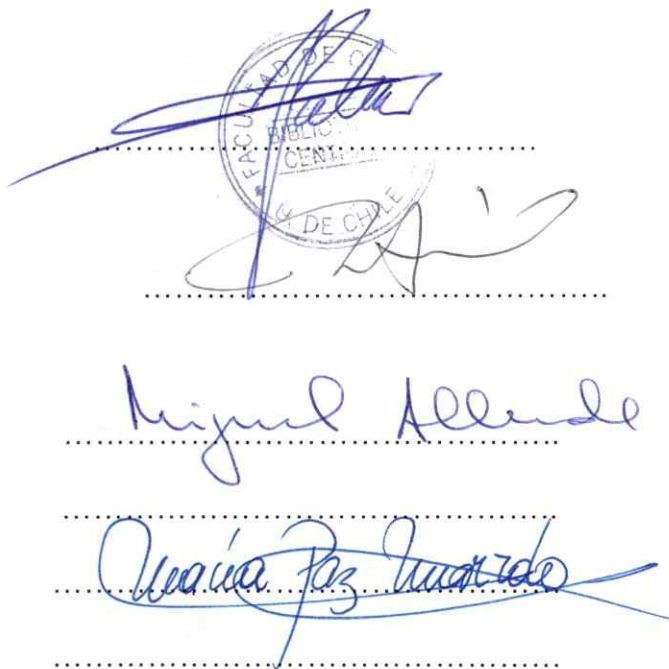
Comisión de Evaluación de Tesis:

Dr. Miguel Allende (Presidente)

Dr. Miguel Concha

Dra. Maria Paz Marzolo

Dra. Cecilia Rojas



The image shows handwritten signatures in blue ink over official stamps. The top stamp is circular and partially obscured by a signature, with the text 'FACULTAD DE CIENCIAS' and 'UNIVERSIDAD DE CHILE' visible. Below it is another signature. Further down, there are two more signatures, one of which is 'Miguel Allende' and the other is 'Maria Paz Marzolo'. Each signature is written over a dotted line.

AGRADECIMIENTOS.

A mi co- tutor Dr Alfonso González, gracias por su ayuda, discusiones y comentarios que fueron de gran importancia en el desarrollo de mi tesis.

Al Dr Andrés Norambuena, gracias por su ayuda en este trabajo de tesis, por su colaboración en el diseño de experimentos, aporte en la discusión de los resultados y por su disposición para escucharme.

A los integrantes de la comisión de tesis por su apoyo y guía durante el desarrollo de mi tesis.

Es difícil encontrar las palabras correctas para expresar mi gratitud al Dr Miguel Allende, en el encontré un gran apoyo, un ejemplo como académico, pero sobre todo una gran persona que siempre se preocupa por sus alumnos no solo en lo que respecta a nivel académico, sino a nivel personal. A él, y a los integrantes de su laboratorio: Carmen Gloria Feijoó, Catalina Lafourcade, Viviana Gallardo, Leonardo Valdivia, Rosario Villegas, Javiera De la Paz, Claudia D'Alencón, Pedro Hernández, Cristián Undurraga, Pablo Cabrera, Pablo Sandoval, Francisco Olivari, Andrés Sarrazín, Viviana Nuñez, Juan Silva, les agradezco su apoyo y los buenos momentos compartidos.

A la Dra. Meng Li, por permitirme realizar una estadía en su laboratorio.

A Gustavo Cerda con quién compartimos experimentos y momentos gratos.

Quiero agradecer especialmente a mi gran amigo Florencio Espinoza, gracias por estar siempre, soportándome en los momentos más duros, que se, no fue tarea fácil. Por preocuparse por mí como un padre, por las largas conversaciones y consejos, por estar siempre incondicionalmente tratando de facilitarme las cosas.

A Lorena Saragoni y Francisco, por su ayuda en un momento muy difícil en mi vida, especialmente quiero agradecer a Lorena por ser una gran persona y amiga por estar siempre incondicionalmente, por sus consejos, su ayuda en la revisión de mi tesis y por su soporte técnico en microscopía confocal.

A Ariadna y Pavel, por estar presentes a pesar de la distancia.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, a mis padres Pablo y Susana por compartir conmigo momentos buenos y malos, por apoyarme en esta etapa de mi vida, a mis hermanos, Juan Pablo y Anabel por darme fuerzas en momentos difíciles.

ÍNDICE DE MATERIAS

	<i>Página</i>
ÍNDICE DE MATERIAS	vi-viii
ÍNDICE DE IMÁGENES, FIGURAS Y TABLA	ix-x
ABREVIATURAS	xi-xiv
1. RESUMEN	xv-xvii
1.1 SUMMARY	xviii-xx
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 <i>La vía de señalización Sonic Hedgehog-Gli (Shh-Gli)</i>	2
2.1.1 <i>Shh y el desarrollo del cerebro dorsal</i>	5
2.2 <i>EGF y sus receptores en el SNC</i>	8
2.2.1 <i>EGFR y señalización celular</i>	12
2.2.2 <i>Transmodulación del EGFR</i>	14
2.3 <i>Células troncales, progenitores celulares del SNC y su nicho</i>	15
2.3.1 <i>El linaje de las células madre o troncales del SNC</i>	19
2.3.2 <i>Marcadores moleculares</i>	24
2.4 <i>Formación de la corteza cerebral</i>	26
2.4.1 <i>Neurogénesis cortical</i>	27
2.4.2 <i>Dos poblaciones de NSCs durante la embriogénesis</i>	31
2.5 <i>EGF y el desarrollo del linaje astrocítico</i>	35
2.6 <i>Cross-talk entre Shh y EGF?</i>	38
3. HIPÓTESIS	40
3.1 OBJETIVO GENERAL	40
3.1.1 <i>Objetivos Específicos</i>	40
4. MATERIALES Y MÉTODOS	42
4.1. MATERIALES	
4.1.1 <i>Material Biológico</i>	42
4.1.2 <i>Reactivos químicos y de cultivo celular</i>	42
4.1.3 <i>Anticuerpos</i>	43

4.2	MÉTODOS	
4.2.1	Cultivo de Neuroesferas (nsp)	44
4.2.2	Cultivo de líneas celulares	46
4.2.3	Explantos de tejido	46
4.2.4	Ensayos proliferación y diferenciación celular	47
4.2.5	Inmunofluorescencia	48
4.2.6	RT-PCR	49
4.2.7	Hibridación <i>in situ</i>	50
4.2.8	Electroforesis en geles SDS-poliacrilamida y análisis por Western blot (WB)	50
4.2.9	Análisis estadístico	51
5.	RESULTADOS	52
5.1	OBJETIVO 1	
5.1.1	Efecto de <i>Shh</i> sobre la proliferación en explantes corticales E18.5	53
5.1.2	Efecto de ciclopamina en neuroesferas corticales E18.5	57
5.1.3	Inhibición de la vía de señalización de EGF en cultivo de nsp corticales E 18.5	58
5.2	<i>Shh</i> modula la expresión de EGFR	59
5.2.1	<i>Shh</i> modula la actividad de la vía de EGF	62
5.2.2	La proliferación celular inducida por <i>Shh</i> requiere de la transactivación de EGFR	67
5.3	OBJETIVO 2	
5.3.1	EGFR y destino celular	70
5.3.2	Estudio de la participación de la vía de <i>Shh</i> -Gli en la determinación del linaje astrocítico	73
5.3.3	Efecto de ciclopamina sobre la expresión de GFAP	74
6.	DISCUSIÓN	81
6.1	<i>Shh</i>, EGF y proliferación celular en la formación del cerebro dorsal	82
6.1.1	El efecto proliferativo de <i>Shh</i> en NPCs requiere de la activación de EGFR	86
6.2	EGFR y astrogénesis cortical	87

6.2.1 <i>SOX2 y astrogénesis cortical</i>	89
7. CONCLUSIONES	94
8. REFERENCIAS	96

ÍNDICE DE IMÁGENES, FIGURAS Y TABLA.

	<i>Página</i>
<i>Imagen 1. Esquema de la vía de señalización Shh-Gli.</i>	<i>6</i>
<i>Imagen 2. Modelo de expresión de Shh en el cerebro dorsal de ratón.....</i>	<i>10</i>
<i>Imagen 3. Diversidad de las vías de señalización activadas por el receptor de EGF (EGFR).</i>	<i>13</i>
<i>Imagen 4. Localización de las células troncales neurales (NSCs).....</i>	<i>18</i>
<i>Imagen 5. Clases de células troncales (SC) definidas por sus potenciales fenotípicos y mitóticos.....</i>	<i>20</i>
<i>Imagen 6. Organización y tipos celulares de la zona subventricular (svz) en el ratón adulto.....</i>	<i>23</i>
<i>Imagen 7. Modelo del linaje de las células madre (SC) desde la embriogénesis al adulto.....</i>	<i>25</i>
<i>Imagen 8. Ensayo de neuroesferas (nsp).....</i>	<i>28</i>
<i>Imagen 9. Histogénesis de la corteza cerebral.....</i>	<i>30</i>
<i>Imagen 10. Desarrollo de las células troncales (SC) o stem cell en el SNC.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 1. Shh aumenta la proliferación celular.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 2. Shh modula la proliferación celular de los NPCs de la vz/svz.</i>	<i>61</i>
<i>Figura 3. Efecto de cyc sobre la proliferación de los NPCs.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 4. Efecto de cyc y tirfostina (AG1478) en la proliferación celular.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 5. Cyc disminuye la expresión de EGFR.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 6. Shh aumenta la expresión de EGFR.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 7. Shh regula la expresión de EGFR en células C3H10T1/2.....</i>	<i>69</i>

Figura 8.	<i>Shh modula la actividad de la vía de EGF.....</i>	<i>71</i>
Figura 9.	<i>Shh induce transactivación de EGFR.....</i>	<i>72</i>
Figura 10.	<i>Shh aumenta la expresión de GFAP.....</i>	<i>76</i>
Figura 11.	<i>Efecto de cyc sobre la expresión de GFAP.....</i>	<i>77</i>
Figura 12.	<i>Cyc disminuye la expresión de GFAP y EGFR.....</i>	<i>78</i>
Figura 13.	<i>La vía de señalización de Shh no induce cambios en el número de neuronas</i> <i>.....</i>	<i>79</i>
Figura 14.	<i>La vía de señalización de Shh no induce cambios en el número</i> <i>de oligodendrocitos.....</i>	<i>80</i>
Tabla 1.	<i>Diferencias entre las NSCs derivadas de la vz y de la svz.....</i>	<i>34</i>

LISTA DE ABREVIATURAS.

AR	Amphiregulina
BTC	Betacelulina
BMP	Proteína morfogénica del hueso
bHLH	Factor de transcripción básico hélice-vuelta-hélice
<i>ci</i>	<i>Cubitus interruptus</i>
cyc	Ciclopamina
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
DER	Homólogo del EGFR en <i>Drosophila melanogaster</i>
ES cell	Células troncales embrionarias.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EPR	Epiregulina
EPI	Epigen
ERK	Proteína quinasa activada por mitógeno
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico 2

GR	Glía Radial
GFAP	Proteína Acídica Fibrilar Glial
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
HB-EGF	Factor de crecimiento de unión a heparina like EGF
Hh	Hedgehog
HER1	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
IGF	Factor de crecimiento insulina
LIF	Factor inhibidor de leucemia
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MMP	Metaloproteasas
NE	Neuroepitelio
ngn1	Factor de transcripción neurogenina 1
ngn 2	Factor de transcripción neurogenina 2
NPCs	Progenitores celulares neurales
NSCs	Células madre o troncales del Sistema Nervioso Central
PBT	Unión a fosfotirosina
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PKC	Proteína Quinasa C
PLC γ	Fosfolipasa C- γ
RTKs	Receptores Tirosina Quinasas
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa
SC	Célula madre o troncal
SGL	Capa Subgranular
Shh	Sonic hedgehog
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
STAT	Señal transductora y activadora de transcripción
svz	Zona subventricular
TGF- α	Factor de crecimiento transformante- α
uPAR	Receptor activador plasminógeno tipo- urokinasa
vz	Zona ventricular
vn	vein

wg

wingless

1. RESUMEN.

La vía de señalización Sonic Hedgehog (Shh)-Gli cumple diversas funciones durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC), controlando aspectos relacionados con diferenciación, proliferación y supervivencia celular. En estadios tempranos del desarrollo de ratón, Shh producido por dos centros de señalización de la línea media ventral, la notocorda y la placa del piso, actúa como morfógeno, especificando tipos celulares ventrales en tubo neural. Sin embargo, en estadios tardíos del desarrollo, Shh comienza a expresarse a nivel dorsal y actúa como mitógeno regulando la proliferación de precursores celulares (NPCs), modulando de esta manera el crecimiento de cerebro dorsal.

En el cerebro anterior de los vertebrados, ha sido determinado que existe una subpoblación de NPCs con potenciales proliferativos (respuesta a mitógenos) y fenotípicos que varían durante el desarrollo. Su representación tiende a reflejar los tipos celulares generados en un estadio del desarrollo específico. Por ejemplo, la neocorteza se origina a partir de dos zonas proliferativas que se generan secuencialmente, la zona ventricular (vz) y la zona subventricular (svz), los NPCs presentes en la vz proliferan para dar origen a la svz, la cual comienza a aumentar de tamaño y finalmente es la única zona proliferativa que persiste en cerebro adulto.

Durante el desarrollo de la neocorteza ocurre un cambio tanto en la especificación de tipos celulares, como en la respuesta a mitógenos. En estadios embrionarios tempranos predomina la neurogénesis, los NPCs presentes en la vz dan origen a

neuronas y responden al factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF) como mitógeno, mientras que en estadios embrionarios tardíos, cuando más glía comienza a desarrollarse, los NPCs de la svz restringidos al linaje glial son más abundantes. A diferencia de lo que ocurre en estadios embrionarios tempranos, los NPCs de la svz responden al factor de crecimiento epidérmico (EGF) como mitógeno.

Datos recientes de nuestro laboratorio demuestran que Shh ejerce su función mitogénica sobre los NPCs de la neocorteza cooperando con EGF, modulando la expresión de receptores de EGF (EGFRs). La adquisición de una respuesta proliferativa en respuesta a EGF, durante la embriogénesis tardía, está asociada a la aparición de una subpoblación de NPCs que expresan progresivamente mayor número de receptores para EGF (EGFRs). Además, ha sido demostrado que el número de EGFRs es un factor limitante para proliferación y/o diferenciación de los NPCs.

En este trabajo se estudió si *la vía de señalización Shh-Gli podría especificar a ésta subpoblación de NPCs a proliferar en respuesta a EGF, modulando la expresión de EGFRs. Esta habilidad de responder a EGF, estaría dada en un grupo de precursores celulares que forman parte de un linaje glial.* Mediante experimentos de pérdida y ganancia de función en cultivo de neuroesferas (nsp) y explantes de tejido obtenidos de la corteza parietal de ratón, demostramos que existe una interacción entre las vías de señalización de Shh y EGF, que ambas vías son importantes en la regulación de la proliferación de los NPCs y que Shh modula la expresión de EGFR e

induce transactivación del EGFR a través de un mecanismo que involucra actividad de metaloproteasas (MMP).

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos plantear que Shh podría modular la expresión de EGFR, lo que se vería reflejado en el número de receptores en la membrana plasmática y en consecuencia en el número final de células gliales, es decir cambios en la proliferación que se reflejan finalmente en la diferenciación celular.

Este trabajo tiene un alto impacto en el estudio de interacciones entre vías de señalización y enfatiza la importancia de Shh en la regulación de la homeostasis de la vía de señalización de EGF. Nuestras observaciones son importantes no solamente en el contexto del desarrollo embrionario, sino que también pueden ser relevantes en el contexto del desarrollo del cáncer.

La comprensión de estos fenómenos puede por ende ser crucial para el desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de tumores.

1. 1 SUMMARY.

The Sonic Hedgehog (Shh)-Gli pathway plays diverse functions during the development of the central nervous system (CNS) controlling aspects related to differentiation, proliferation and cellular survival. In early stages of mouse embryonic development, Shh is produced by two signaling centers in the ventral midline. In the notochord and the floor plate it acts as a morphogen, specifying ventral cellular types in the neural tube. However, during late development, expression of Shh begins dorsally and acts as a mitogen, regulating proliferation of neural progenitor cells (NPCs) modulating thereby the growth of dorsal brain.

In the vertebrate forebrain, subsets of NPCs with distinct properties have been described. The relative representation of these subsets, that differ in their proliferative (responsiveness to mitogens) and phenotypic potentials, varies during development. Their relative representation tends to reflect the types of cells generated at specific stages of development. For example, the neocortex is originated from two proliferative zones that are sequentially generated, the ventricular zone (vz) and the subventricular zone (svz). The NPCs presents in the vz proliferates to give rise to the svz, which begins to increase in size and finally is the only proliferative zone that persists in the adult brain.

At earlier embryonic stages, when more neurons are generated, the NPCs present in the vz which give rise to neurons are mitotically responsive to the fibroblastic growth factor 2 (FGF). At later embryonic stages, when more glia begins to develop, the NPCs of svz restricted to glial fate are more abundant. In contrast to

early embryonic stages, at later stages the NPCs of svz become responsive to the epidermic growth factor (EGF) as mitogen.

We have shown recently that Shh regulates the proliferation of the neocortical cells with stem cells properties (NPCs) in cooperation with EGF signaling, regulating expression of the Epidermal growth factor receptor (EGFR). The acquisition of mitotic responsiveness to EGF is associated with the appearance of a subpopulation of NPCs that expresses relatively high levels of EGFRs. Also, it has been demonstrated that the EGFRs levels are limiting for proliferation and/or differentiation of the NPCs.

This thesis proposes the current work proposes that *the Shh-Gli signaling pathway could specify this one subpopulation of NPCs to proliferate in response to EGF, modulating the expression of EGFRs. This ability to respond to EGF would occur be given in a group of NPCs that comprise of a glial lineage.* Through experiments gain and loss of function in neurosphere (nsp) cultures and tissue explants obtained from mouse parietal neocortex we demonstrate that there is an interaction between Shh and EGF signaling and both are important for regulating the proliferation of NPCs. Shh modulates the expression of EGFR and we show that Shh induces EGFR transactivation through a mechanism that involves metalloproteinases (MMP) activity.

The present work has a major impact in the study of cross-talk between signaling pathway and emphasizes the importance of Shh in the regulation of the homeostasis of the EGF signaling pathways. Our observations are important not only with respect to embryonic development but may also be relevant to tumorigenesis.

This is crucial for the development of futures therapeutic strategies for the treatment of cancer.

2. INTRODUCCIÓN.

El Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados es una estructura organizada, compuesta por diferentes tipos celulares que generan circuitos funcionales dependientes de sus múltiples interacciones célula-célula. Las células neuronales y las células gliales que componen el SNC se originan a partir de una única población de progenitores celulares (NPCs) llamadas células neuroepiteliales del tubo neural embrionario. Durante el desarrollo embrionario el tubo neural sufre múltiples procesos de crecimiento, subdivisión y especificación de territorios (patterning), que en combinación con movimientos morfogénicos dan origen a la estructura tridimensional altamente organizada y compleja, característica del SNC de los vertebrados.

En el SNC, un programa de desarrollo define la generación de tipos celulares que alcanzan un número determinado, en un tiempo definido y en una posición específica. El mecanismo molecular de este programa involucra una gran variedad de señales inductivas que llevan a la adquisición de identidades celulares específicas. Factores tales como, el factor de crecimiento Insulínico (IGF), la familia de factores de crecimiento fibroblásticos (FGF's), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFs), la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), Sonic Hedgehog (Shh) y la proteína morfogénica del hueso (BMP), entre otros, participan en el desarrollo del SNC.

Podría considerarse que las células del cerebro se encuentran inmersas en un mar de factores secretados que controlan la proliferación y diferenciación celular, así como también otros aspectos del desarrollo. Los factores de crecimiento se unen a receptores específicos y gatillan sistemas de transducción de señales que convergen en la función de factores de transcripción y modifican así la expresión génica.

Uno de los factores más intensamente estudiados en la última década ha sido Shh, un miembro de la familia Hedgehog (Hh) de glicoproteínas secretadas que cumple diversas funciones durante el desarrollo del SNC. Shh controla aspectos tan diversos como patterning, proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Además, sus acciones específicas cambian o son reguladas en espacio y tiempo. En esta tesis estudiamos la relación entre la función de Shh y la del EGF, ambos relacionados con la regulación de la proliferación celular de los NPCs.

A continuación se describen las etapas y conceptos del desarrollo del SNC y luego se describen los sistemas de regulación dependientes de Shh y de EGF.

2.1 La vía de señalización Sonic Hedgehog-Gli (Shh-Gli).

Shh es un miembro de la familia de morfógenos Hedgehog, identificado

por homología con la proteína Hh en *Drosophila*. La proteína precursora de Shh es cortada proteolíticamente, produciendo dos proteínas que se secretan: un fragmento aminoterminal (N-Shh) de 19 KDa que es el morfógeno propiamente tal en invertebrados y vertebrados (Hammerschmidt y col., 1997) y un fragmento carboxilo terminal (C-Shh) de 25 Kda con actividad proteolítica (Porter y col., 1995). La compleja cascada de señalización gatillada por Shh ha sido parcialmente dilucidada a través de una combinación de estudios genéticos, bioquímicos y moleculares realizados en insectos y vertebrados. Estos estudios han permitido proponer un modelo que conecta el evento inicial de reconocimiento por un receptor con los eventos nucleares de expresión génica (*Imagen 1*). En breve, este modelo incluye el complejo del receptor en la membrana compuesto por **patched (Ptc1)** y **smoothened (Smo)**, una proteína de siete dominios transmembrana con topología similar a receptores acoplados a proteína G. Cuando Shh se une a Ptc1, se libera la represión que este último ejerce sobre Smo, lo que permite la posterior señalización y activación de factores de transcripción con motivos dedos de zinc, de la familia cubitus interruptus Ci/Gli, mediadores finales de la vía de señalización de Shh. La disponibilidad de Ci/Gli en el núcleo, depende de un complejo citoplasmático multiproteico asociado al citoesqueleto formado por **costal-2**, una proteína con homología con la familia de proteínas quinesinas, **Fused**, una serina treonina

quinasa, una **proteína supresora de Fused** y **proteína quinasa A (PKA)** entre otras (Alexandre y cols., 1996; Von Ohlen y cols., 1997., Aza-blanc y cols., 1997).

Hasta el momento se han descrito tres genes *gli* en vertebrados (*gli1*, *gli2*, *gli3*). Al igual que *Ci*, todos ellos codifican para factores de transcripción de alto peso molecular (más de 1000 aminoácidos) que reconocen una secuencia específica en el ADN (Kinzler y cols., 1989, Vortkamp y cols., 1991) mediante dedos de zinc. También al igual que *Ci*, los genes *gli*, en particular *gli2* y *gli3*, poseen dominios de activación y de represión que les dan la potencialidad de actuar como factores de transcripción duales (Ruiz i Altaba., 1999c, Dai y cols., 1999, Sasaki y cols., 1999), sufriendo un procesamiento proteolítico que dependería del contexto celular. En diferentes sistemas estos tres factores de transcripción pueden producir formas truncadas en su dominio C-terminal que actúan como represores (Ruiz i Altaba., 1999c). Los diferentes genes *gli* poseen tanto funciones redundantes como distintivas en la vía de señalización de Shh. Por ejemplo, en anfibios, tan solo Gli1 induce diferenciación de la placa del piso (Lee y cols., 1997, Hynes y cols., 1997, Ruiz i Altaba 1998). Los tres Glis son capaces de inducir desarrollo neural, pero cada uno podría estar induciendo diferentes grupos de neuronas (Brewster y cols., 1998, Ruiz i Altaba., 1998). La lectura total de las diferentes isoformas de las proteínas Glis parece ser lo que determina la respuesta celular final.

Muchos aspectos de la vía de señalización Hh se han conservado evolutivamente entre moscas y vertebrados. Posiblemente la actividad de Gli en vertebrados sea regulada por un complejo multiproteico de componentes similares a los identificados en *Drosophila* (Marigo y cols., 1996, Hynes y cols., 1997, Ruiz i Altaba., 1998, Ruiz i Altaba., 1999^a, Jan y cols., 1997).

Las diferencias a nivel funcional entre los diferentes factores Glis, concuerdan con divergencias en sus patrones de expresión. La distribución celular de los tres genes *gli*, tanto en ratones como en anfibios, indica que *gli1* se expresa cerca de las células secretoras de Shh, mientras que *gli2* y *gli3* parecen tener una distribución más distal (Hui y cols., 1994, Marigo y cols., 1996, Lee y cols., 1997, Boryki y cols., 1998), sugiriendo que podrían tener funciones independientes de Shh. Por lo tanto, una manera de detectar la vía activa de Hh es analizando el aumento en la expresión de *ci/gli1* (feedback positivo) y de *ptc1* (feedback negativo).

2.1.1 *Shh* y el desarrollo del cerebro dorsal.

En mamíferos y aves, el desarrollo del aspecto dorsal del cerebro comienza en etapas medianas del desarrollo embrionario. Durante este período, tres de las principales estructuras del cerebro dorsal: la corteza cerebral, el cerebelo y el tectum (colículo superior e inferior en mamíferos), experimentan una rápida ex-

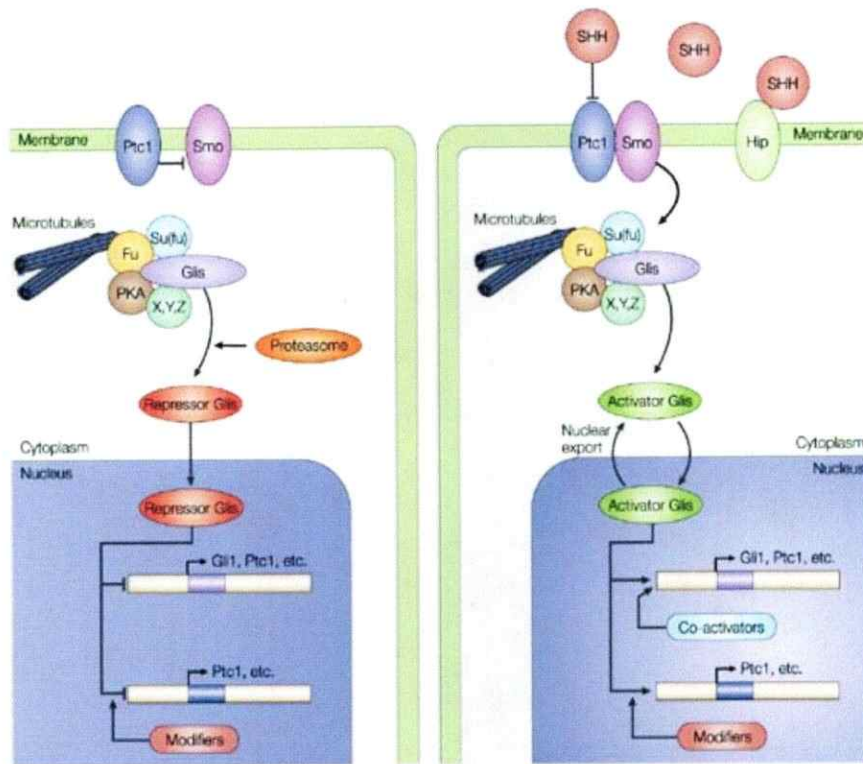


Imagen 1. Esquema de la vía de señalización Shh-Gli. La unión de Shh a Patched (Ptc1) libera la inhibición que Ptc1 ejerce sobre Smoothened (Smo), gatillando una cascada de eventos que activan a los efectores de la vía, las proteínas Gli. Estas proteínas entran al núcleo y regulan (activan o inhiben) la expresión de genes blanco de la vía (Extraído de Ruiz i Altaba y cols., 2002).

pansión. Como consecuencia de este crecimiento las estructuras dorsales adquieren mayor tamaño que sus contrapartes ventrales. El tamaño relativo de estos componentes varía en las diferentes clases de vertebrados. Por ejemplo, la corteza cerebral constituye la mayor parte del cerebro dorsal en mamíferos, a diferencia de lo que ocurre en peces, donde el cerebelo es por lo general el derivado más grande, mientras que en aves lo es el tectum óptico (Kriegstein y cols., 2006). ¿Cómo se regula el tamaño de las estructuras del cerebro dorsal entre las especies? El análisis de linaje y parámetros de proliferación de NPCs en la neocorteza indica que estos precursores, algunos de los cuales son células troncales (stem cells), determinan el número final de neuronas y células gliales y en consecuencia el tamaño de la corteza cerebral. Esto plantea la pregunta sobre cómo se regula la función de los NPCs.

Durante mucho tiempo se pensó que Shh cumplía un rol estrictamente como morfógeno. Sin embargo, también actúa como mitógeno, al menos en ciertas etapas del desarrollo. Abundante evidencia indica que, en estadios tempranos del desarrollo del SNC, Shh es producido por dos centros de señalización de la línea media ventral: la notocorda y la placa del piso. Aquí, actúa como morfógeno especificando tipos celulares en el tubo neural ventral (Jessell., 2000, Hynes y cols., 2000, Wijgerde y cols., 2002., Chiang y cols., 1996). En contraste, a nivel del tubo neural dorsal se requiere ausencia de Shh para el desarrollo de futuras estructuras dorsales, tales como corteza cerebral y

tectum. En estadios tempranos de desarrollo, la expresión ectópica de Shh a nivel dorsal ventraliza estructuras dorsales (Watanabe y Nakamura., 2000, Agarwala y cols., 2001) induciendo la expresión de marcadores ventrales tales como *HNF3 β* y *Patched (Ptc1)* y de tipos celulares ventrales, como por ejemplo *Islet 1* (característico de motoneuronas).

En estadios tardíos del desarrollo se produce un cambio en la respuesta a Shh. Este morfógeno comienza a expresarse a nivel dorsal y controla el crecimiento del cerebro dorsal (*Imagen 2*). En estadios tardíos de desarrollo y en el cerebro adulto, Shh actúa como mitógeno sobre NPCs de estructuras de cerebro dorsal como cerebelo, tectum, hipocampo y corteza (Dahmane y cols., 1999, Dahmane y cols., 2001, Lai y cols., 2003, Palma y Ruiz i Altaba., 2004). Por lo tanto, en estas etapas del desarrollo y en determinadas poblaciones celulares Shh podría funcionar estrictamente como mitógeno.

2.2 EGF y sus receptores en el SNC.

La señalización a través de la familia de receptores tirosina quinasa (RTKs) regula un amplio rango de fenómenos biológicos. Los RTKs poseen un único dominio de transmembrana que separa un dominio intracelular, donde se aloja el dominio tirosina-quinasa, de un dominio extracelular donde se conforma el bolsillo de unión de ligando. Estos receptores son los mediadores primarios de una gran variedad de estímulos (Sefton y cols., 1984, Thompson y cols., 1985).

La familia del receptor de EGF (EGFR) incluye a éste receptor, denominado también HER1 (receptor de EGF humano) o ErbB1, y a los miembros Her2-neu o ErbB2, ErbB3 y ErbB4. Los receptores ErbB se expresan en una gran variedad de tejidos de origen epitelial, mesenquimal y neuronal. La sobre expresión o activación constitutiva de los receptores ErbB, ha sido implicada en el desarrollo de numerosos cánceres humanos malignos (Salomón y cols., 1995).

Durante el desarrollo del SNC regulan procesos de migración, proliferación y diferenciación celular (Brown y cols., 1997, Casalini y cols., 2004). La expresión del EGFR en neuronas fue inicialmente descrita por Faúndez y cols (1992). La localización celular y aparición del EGFR durante el desarrollo evidencia el rol del EGF en el SNC. El EGFR se expresa en regiones de neurogénesis activa, tales como la zona subventricular (svz), la capa granular del cerebelo y giro dentado (hipocampo) (Cameron y cols., 1998).

La importancia de la función del EGFR se refleja en su conservación evolutiva, desde *C.elegans* hasta mamíferos. En general, el tamaño del receptor así como también la estructura de los dominios extracelular, transmembrana y citoplasmático se ha conservado durante la evolución (Aroain y cols., 1990, Schweitzer y cols., 1997).

El número de ligandos que pueden activar el EGFR se ha incrementado durante la evolución. Hay un solo ligando en *C.elegans*, cuatro en *Drosophila* y

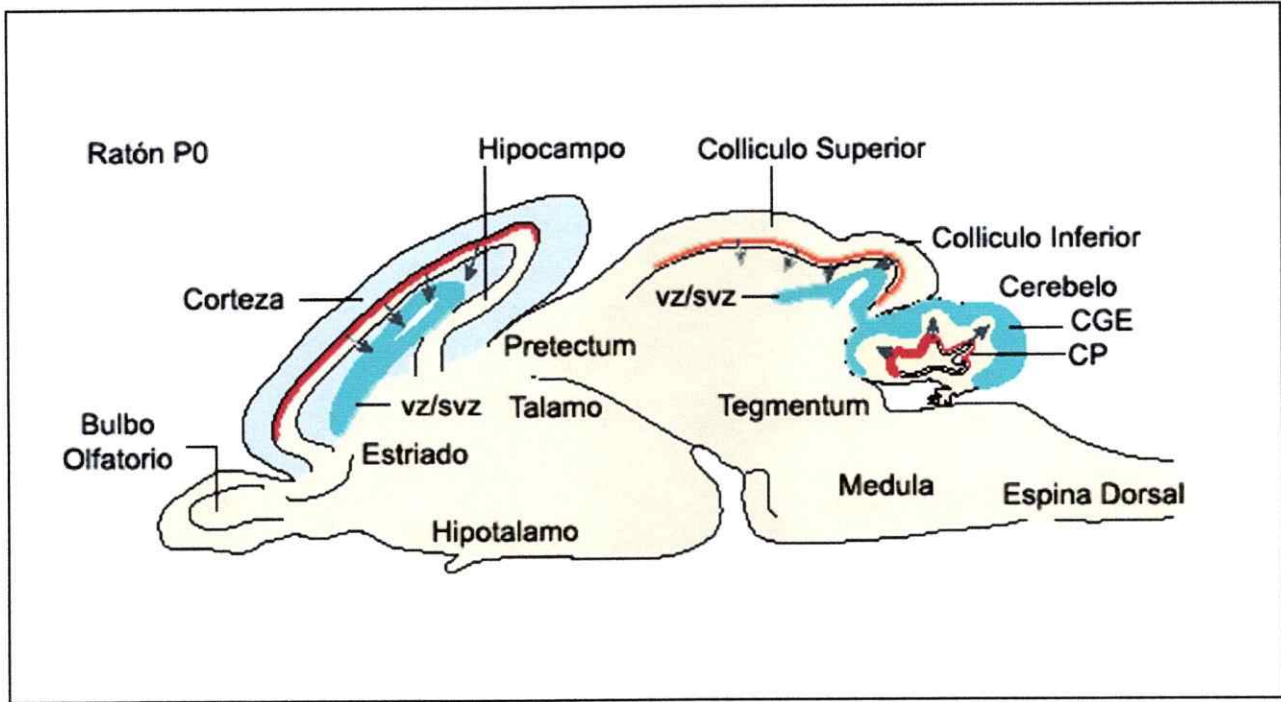


Imagen 2. Modelo de expresión de Shh en el cerebro dorsal de ratón. Corte sagital de un cerebro de ratón postnatal día 0 (P0). Las flechas indican el sitio de acción de Shh. Las células que producen Shh (rojo) se localizan a nivel de la placa cortical y tectal y en la Capa de Purkinje (CP). Las células que responden a Shh (azul) se localizan en las zonas ventricular/subventricular (vz/svz) de corteza y tectum y en la Capa Germinal Externa en cerebelo (Extraído de Ruiz i Altaba y cols., 2002).

siete ligandos han sido identificados en vertebrados (Chang y cols., 1999., Slamon y cols., 1987). En animales, los ligandos que activan EGFR incluyen: EGF, factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), factor de crecimiento de unión a heparina tipo EGF (HB-EGF), amphiregulina (AR), betacelulina (BTC), epiregulina (EPR), y epigen (EPI). Cada uno de estos ligandos presenta una secuencia consenso denominado "motivo EGF" formado por seis residuos de cisteína espacialmente conservados. Este motivo es crucial para la unión a los miembros de la familia de RTKs. El RNAm del *EGF* se expresa en varias regiones del cerebro, incluyendo neocorteza, cerebelo, hipocampo, hipotálamo basal, bulbo olfatorio, estriado y tálamo. El RNAm del *EGF* es detectado en etapas tempranas del desarrollo embrionario (E14.5) y continúa siendo detectado en el periodo postnatal en todo el cerebro (Yamada y cols., 1997; Schaudies y cols., 1989).

Todos los ligandos del EGFR son sintetizados como proteínas precursoras integrales de membrana (Massaqué y cols., 1993). Algunos ligandos tales como HB-EGF, AR y BTC son biológicamente activos como proteínas de membrana, sugiriendo que son capaces de funcionar como factores juxtacrinos capaces de activar al EGFR sin necesidad de liberarse de la membrana (Iwamoto y cols., 2002). Otros ligandos funcionan como factores solubles y son liberados de la superficie celular por metaloproteasas (MMP) (Dong y cols., 2005).

2.2.1 EGFR y señalización celular.

El EGFR es una proteína de transmembrana de 170 KDa, que posee un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular tirosina quinasa (Schlessinger y cols., 2000). El dominio extracelular está compuesto por cuatro subdominios que contienen dos dominios ricos en cisteína y un dominio de unión al ligando (Thompson y cols., 1985, Burgess y cols., 2003). La otra parte del dominio extracelular media la dimerización y la interacción con otras proteínas de membrana. El dominio juxtamembrana sirve como sitio de atenuación por retroalimentación por parte de la Proteína Quinasa C (PKC), entre otras proteínas. El dominio intracelular posee cinco motivos de autofosforilación que unen proteínas que contienen dominios SH2 o dominios de unión a fosfotirosinas (PBT), tres motivos de internalización, sitios de transfosforilación, activación proteolítica y degradación (Carpenter y cols., 1990, Wells y cols., 1999).

Luego de la unión del ligando, el receptor se dimeriza y su dominio intracelular se activa, resultando en la fosforilación de varios residuos de tirosina del receptor que sirven como sitio de unión para elementos de señalización (Schlessinger., 2000, 2002). La activación del dominio tirosina quinasa del EGFR conduce a la activación de numerosas vías de señalización, que incluyen la vía de Ras/Raf/MEK/MAPK, PI3K, Fosfolipasa C- γ , y STAT (**Imagen 3**).

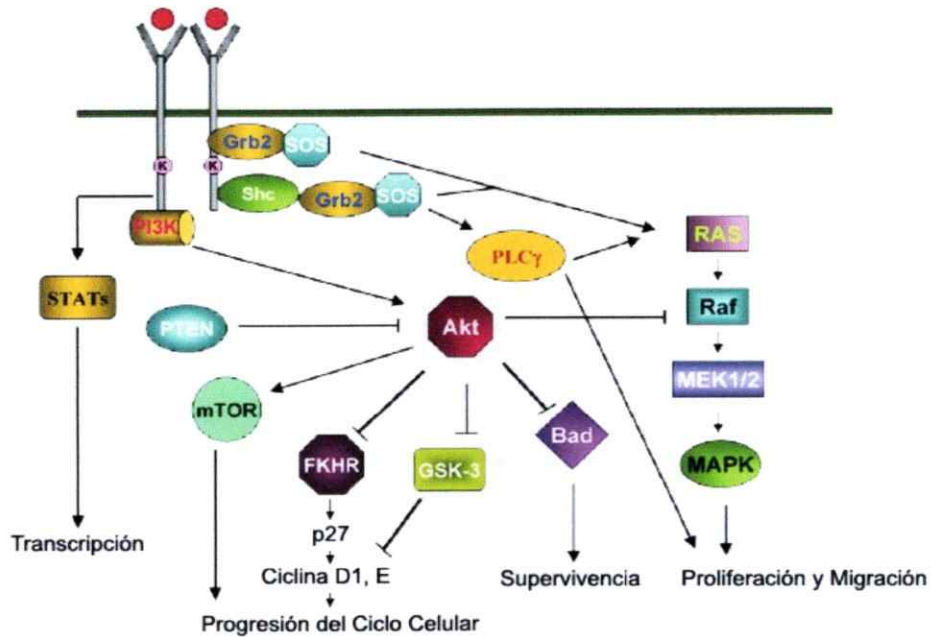


Imagen 3. Diversidad de las vías de señalización activadas por el receptor de EGF (EGFR). La unión del ligando induce la homo o heterodimerización del EGFR, resultando en la fosforilación de residuos de tirosina de la cola citoplasmática del EGFR y la activación de diferentes cascadas de señalización (Extraído de Singh 2005).



El EGFR activado transduce señales mitogénicas principalmente a través de la vía Ras-Raf-MEK-MAPK (Marmor y cols., 2004, Schlessinger., 2002).

La unión de EGF al EGFR induce una rápida internalización del receptor mediada por clatrina, seguida generalmente de destinación a la ruta degradativa en lisosomas. En este sentido, la endocitosis sirve como mecanismo de atenuación de la señal por regulación negativa (down regulation). Sin embargo, el receptor internalizado puede reciclar en grados variables dependientes del tipo de dímero que se forma y del ligando que se une. Por esto, se considera la endocitosis también como parte del sistema de transducción de señales, puesto que cambia el sitio celular desde donde el receptor emite las señales (Carpenter y cols., 1976, Haigler y cols., 1979). El proceso de endocitosis constituye uno de los mecanismos principales de regulación de la función del EGFR, determinando la generación de señales específicas en distintos sitios celulares, así como también su potencia y duración.

2.2.2 Transmodulación del EGFR.

El EGFR no sólo es activado por unión de ligandos específicos (Dong y cols., 2005, Yarden y Sliwkowski., 2001). También puede ser activado por una variedad de estímulos fisiológicos y no fisiológicos, y señales indirectas provenientes de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Carpenter., 1999,

2000, Geschwind y cols., 2001, Wetzker and Bohmer 2003). Este fenómeno se denomina "transmodulación o transactivación del EGFR". El mecanismo de transactivación del EGFR no ha sido aclarado completamente. Se sabe que involucra la activación de MMP de superficie celular que liberan ligandos del EGFR por corte proteolítico de sus precursores (Fischer y cols., 2003). Este proceso incluye la activación de Src, PKC y Ca^{2+} (Tsai y cols., 1997, Kodama y cols., 2002). En algunos casos la activación de Src puede fosforilar directamente el dominio citoplasmático del EGFR (Biscardi y cols., 1999).

Evidencias recientes indican que el receptor ampliamente distribuido de nucleótidos extracelulares $P2Y_1$ ($P2Y_1R$) del tipo GPCRs, regula la señal mitogénica del EGFR (Buvinic y cols., 2007), abriendo la posibilidad de que este sistema participe en la transmodulación del EGFR en diversos tejidos.

2.3 Células troncales, progenitores celulares del SNC y su nicho.

Las células madre o troncales (SC) del SNC (NSCs) son células progenitoras que poseen la capacidad de auto replicarse indefinidamente (capacidad de "self renewal") y diferenciarse hacia los tres tipos celulares principales del SNC: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (lo que en la literatura se define como multipotencialidad). Las NSCs han sido aisladas de diferentes regiones del SNC embrionario y del sistema nervioso periférico (SNP).

También se han aislado de dos regiones neurogénicas del sistema nervioso

adulto, el giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (svz) de la pared del ventrículo lateral, así como también de algunas regiones no neurogénicas, tales como la médula espinal dorsal (McKay., 1997, Gage 2000) (*Imagen 4*).

Existen diferentes clases de SC dependiendo de donde se obtienen y de su potencial de diferenciación (*Imagen 5*). Las NSCs pueden derivar de células más primitivas (SC totipotentes) con capacidad de generar NSCs y SC de otros tejidos (Pevny y cols., 2003).

Una **SC totipotente** es aquella que puede dar origen a todos los tipos celulares en un organismo particular. En mamíferos, sólo el oocito fertilizado y las blastómeras en estadio de clivaje temprano (hasta 8 células) son realmente totipotentes. Una **SC pluripotente** es aquella que puede originar todos los tipos celulares de un organismo, exceptuando las células germinales, o todos los tipos celulares del embrión, exceptuando el tejido extraembrionario (linaje trofoectodérmico). Dentro de la categoría de células pluripotentes se encuentran las células troncales embrionarias (ES cells), que se pueden aislar del macizo celular interno de un blastocisto. Estas células actualmente son utilizadas para crear animales transgénicos y para una amplia variedad de aplicaciones clínicas y comerciales. Muchas SC se encuentran en la categoría de **SC multipotentes**, caracterizadas así porque pueden dar origen a más de un tipo alternativo, pero restringido a un mismo linaje. La supervivencia, proliferación y diferenciación de las SC parecen ser reguladas tanto por mecanismos intrínsecos (célula-autónomo-

mo) como por señales del ambiente (Watt y cols., 2000; Morrison y cols., 1997). Entre los reguladores intrínsecos se encuentran proteínas involucradas en la división celular asimétrica, factores nucleares que regulan la expresión de determinados genes y modificaciones epigenéticas. *In vivo*, las señales externas que controlan el destino de las SC colectivamente constituyen el entorno celular o **nicho** donde residen estas células (Li y cols., 2005, Fuchs y cols., 2004). En estos nichos se mantiene un balance entre la quiescencia celular, la autorreplicación ("self renewal") y el compromiso hacia un determinado linaje en las SC residentes. Las señales presentes en los nichos incluyen una amplia variedad de factores secretados, interacciones célula-célula mediadas por proteínas de membrana y de matriz extracelular. Los NPCs linaje restringido derivan de NSCs multipotenciales (Mayer-Proschel y cols., 1997). Se ha sugerido que señales extrínsecas que actúan instructivamente para promover la diferenciación de NSCs a neuronas o tipos específicos de glía, son también responsables de la generación de NPCs linaje restringido. Sin embargo, hasta el momento no está claro si la generación de tipos específicos de células diferenciadas normalmente involucra intermediarios linaje restringido, o puede ocurrir directamente a partir de las NSCs.

Las NSCs aisladas del SNC también se distinguen por su capacidad para dividirse y formar "neuroesferas" (nsp) "*in vitro*". Las nsp son agregados multicelulares formados por NSCs, NPCs comprometidos hacia un determinado linaje y células diferenciadas. (**Imagen 8**). Cuando se cultivan neuroesferas, se

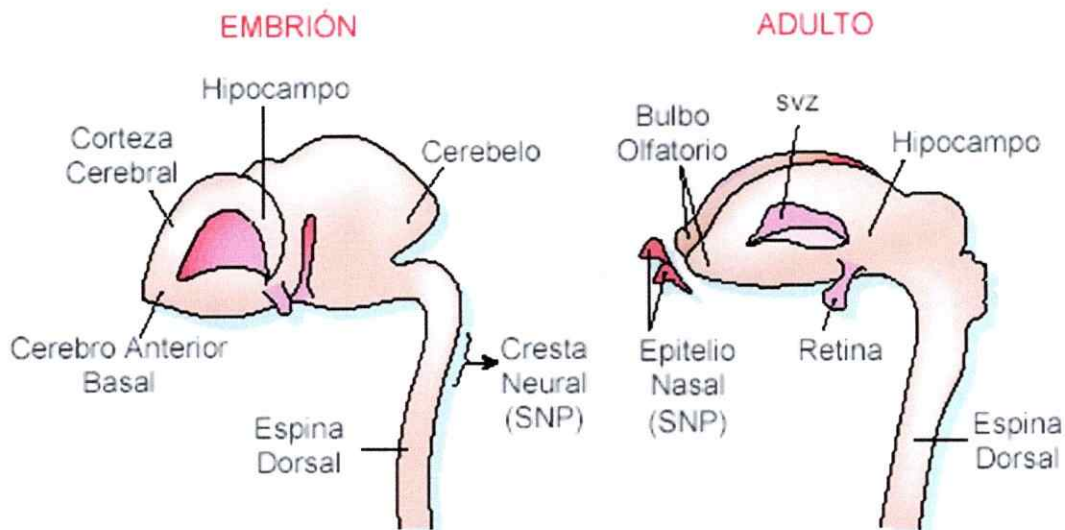


Imagen 4. Localización de las células troncales neurales (NSCs). Principales regiones del Sistema Nervioso embrionario y adulto de las cuales han sido aisladas las NSCs (Adaptado de Temple 2001).

define: la proliferación, como la habilidad para generar una colonia clon flotante en respuesta a un factor de crecimiento; la multipotencialidad, como la habilidad para generar tres principales linajes de células neuronales (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) y la auto-renovación, como la capacidad para generar colonias secundarias.

Este ambiente celular provee un nicho capaz de sostener un pequeño número de SC (Garcion y cols., 2004). Mediante análisis clonales realizados a partir de nsp disociadas hasta el nivel de célula única, se ha demostrado que solamente un pequeño porcentaje (3-4%) de células dentro de la nsp son verdaderas SC (Gritti y cols., 1999, Tropepe y cols., 1999).

Las nsp proliferan en presencia de mitógenos tales como FGF2 y EGF, mientras que en ausencia de estos factores se diferencian a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Reynolds y cols., 1992, 1996).

2.3.1 El linaje de las células madre o troncales del SNC (NSCs).

Investigaciones recientes sugieren que existen múltiples clases de SC durante el desarrollo del SNC embrionario temprano y en el organismo adulto. Al menos un tipo celular residente en la svz y otras células presentes en otras regiones del cerebro, tales como células de la glía radial (GR) y astrocitos, pueden ser SC (Pevny y cols., 2003).

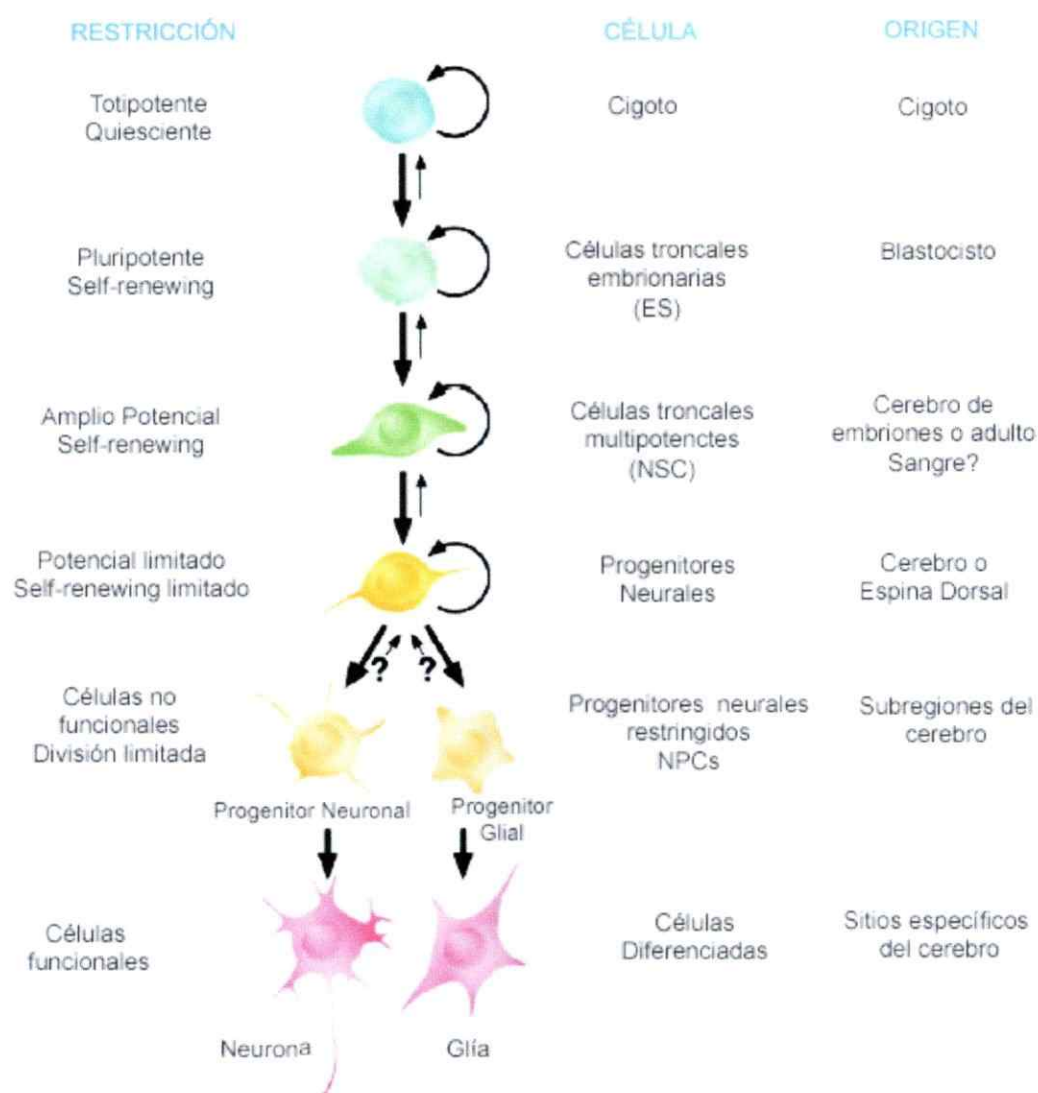


Imagen 5. Clases de células troncales (SC) definidas por sus potenciales fenotípicos y mitóticos. Las SC son representadas en jerarquía comenzando con las células más primitivas y multipotentes y progresando hacia células más restringidas en su capacidad de diferenciación a diferentes linajes. Las restricciones de destino en cada paso y los ejemplos del origen tisular se describen en este esquema (Adaptado de Gage 2000).

Históricamente se pensaba que las neuronas y la glía del SNC de los vertebrados se originaban a partir de dos poblaciones separadas de NPCs gliales y neuronales, producidas por las células neuroepiteliales (NE) en el tubo neural temprano. Esta teoría se basa en la idea que la neurogénesis y la gliogénesis ocurren durante períodos diferentes del desarrollo embrionario y que la neurogénesis cesa perinatalmente.

Por otra parte, también se ha propuesto un modelo en el cual las células NE producen o se transforman en GR y estas células se dividen en forma asimétrica para producir neuronas, glía y quizás otros tipos celulares. Las células de la GR aparecen durante el desarrollo embrionario temprano, se ubican a nivel de la zona ventricular (vz) y poseen largos procesos que contactan con la superficie pial, sirviendo de guía para los neuroblastos que migran hacia sus destinos finales. Una vez que finaliza la neurogénesis las células de la GR se diferencian a astrocitos (Schmechel y cols., 1979, Voigt., 1989). Se ha postulado también, que la GR posiblemente son las SC que forman nsp (Conti y cols., 2003).

Las células de la GR comparten múltiples características con las células NE. En el tubo neural primitivo, las células NE contactan con el ventrículo lateral y la superficie pial. A medida que avanza el desarrollo, la pared del tubo neural se vuelve más fina y las células NE se transforman en GR, manteniendo el contacto con el ventrículo y la superficie pial. Ambos tipos celulares expresan

nestina, (una proteína de filamentos intermedios que es característica de células nerviosas indiferenciadas) durante el desarrollo cortical (Lendahl y cols., 1990, Mckay., 1997).

Actualmente se sabe que las NSCs persisten en la capa subgranular (SGL) del giro dentado del hipocampo (Kaplan y cols., 1984, Gage y cols., 1998) y la svz de ventrículo lateral (García-Verdugo y cols., 1998) dos regiones neurogénicas descritas en cerebro adulto. A diferencia de la SGL, la composición celular y arquitectura de la svz ha sido descrita (Doetsch y cols., 1997) (*Imagen 6*).

En el adulto, las NSCs presentes en la svz expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) marcador del linaje astrocítico y comparten varias características con las células NE del tubo neural embrionario tales como la expresión de nestina y presencia de un cilio que contacta con el lumen del ventrículo lateral.

De acuerdo con los antecedentes mencionados, actualmente se ha propuesto que las NSCs estarían contenidas dentro del linaje glial y dependiendo del estadio del desarrollo las células dentro de este linaje presentarían características de NE, GR o astrocitos (*Imagen 7*). Si bien éstas células presentan morfología diferente y pueden expresar distintos marcadores, todas comparten alguna característica como la presencia de un único cilio o la expresión de nestina (Alvarez-Buylla y cols., 2001).

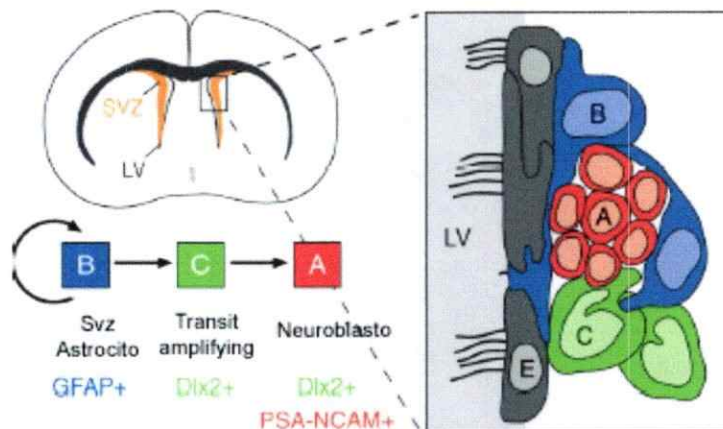


Imagen 6. Organización y tipos celulares de la zona subventricular (svz) en el ratón adulto. Esquema frontal de un cerebro de ratón adulto mostrando la svz (naranja) adyacente al ventrículo lateral (VL) y los tipos celulares de la svz. Células ependimales multiciliadas (E, gris). Cadenas de neuroblastos (A, rojo), que migran por los tuneles gliales formados por astrocitos de la svz (B, azul). Células de división rápida: transit amplifying cells (C, verde). Los astrocitos de la svz (GFAP+) son células troncales (stem cell) y dan origen a neuroblastos (GFAP-/Dlx2+/PSA-NCAM+) vía células C (GFAP-/Dlx2+/PSA-NCAM-) (Adaptado de Doetsch 2003).

De acuerdo al modelo actual propuesto, durante el desarrollo las NSCs transitan desde células NE hacia GR y astrocitos. Si bien éstas SC no son precisamente equivalentes las mismas pueden continuar autoreplicándose y generando múltiples tipos celulares (Doetsch., 2003). Sin embargo, hasta el momento no se conocen las consecuencias funcionales de este cambio en la identidad de las SC.

2.3.2 Marcadores moleculares.

El estudio de la biología de las NSCs se encuentra obstaculizado debido a la ausencia de marcadores definidos para NSC y NPCs. Sin la posibilidad de identificar éstas células resulta muy difícil entender cómo se generan los diferentes tipos celulares que componen el SNC. El uso de marcadores moleculares es importante porque permite distinguir no solamente células diferenciadas si no también NSCs y NPCs. Una proteína que es utilizada comúnmente como marcador en el estudio de las NSCs es nestina. Sin embargo debido a que nestina es expresada por otros tipos celulares tales como NPCs de astrocitos, astrocitos reactivos y células musculares, no puede ser utilizada como único criterio para determinar si una célula en particular es una NSC. Sox2 pertenece a la familia de factores de transcripción Sox expresados tempranamente por NPCs en SNC; en la actualidad existe un consenso para uti-

Multipotencialidad

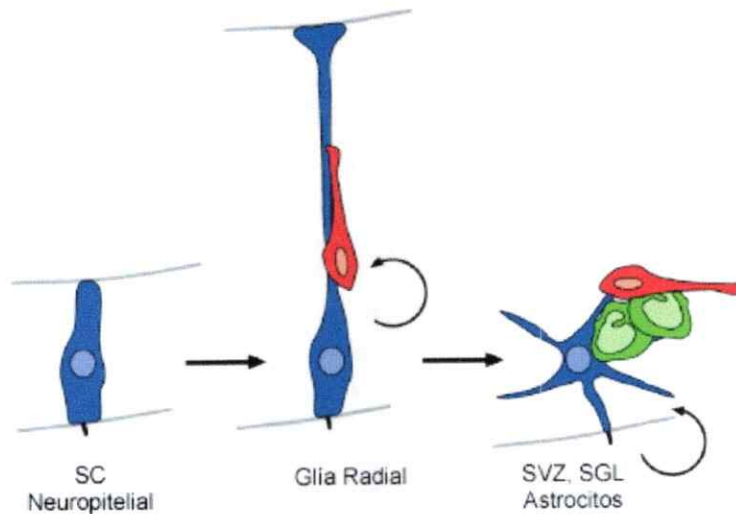


Imagen 7. Modelo del linaje de las células madre (SC) desde la embriogénesis al adulto. Las SC están contenidas dentro del linaje neuroepitelial-glia radial-astrocito. La glía radial da origen a neuronas (rojo) y sirve como guía para la migración de las mismas. Los astrocitos de la SVZ y la SGL (azul) son SC en el cerebro adulto y dan origen a neuronas vía un progenitor intermediario (verde.) La multipotencialidad de las SC disminuye con el tiempo debido al progresivo silenciamiento génico (Adaptado de Doetsch 2003).

izar esta proteína como marcador de células troncales del sistema nervioso (Gubbay y cols., 1990, Laudet y cols., 1993, Koopman., 1999, Sasai., 2001).

Actualmente muchos laboratorios han comenzado a hacer análisis a gran escala utilizando una combinación de diferentes metodologías tales como microarray y substracción de DNAC que permiten identificar genes expresados diferencialmente por NSCs y NPCs, los cuales pueden ser estudiados posteriormente como marcadores potenciales (Cheng y cols., 2005). Debido a la falta de marcadores definitivos, las SC han sido caracterizadas en base a un criterio funcional. Por sobre una variedad de técnicas inicialmente utilizadas, el ensayo de nsp se ha convertido en una herramienta para aislar y entender la biología de la SC embrionarias y adultas del SNC (*Imagen 8*) (Reynolds y col., 1992, 1996, Marshall y col., 2007).

2.4 Formación de la corteza cerebral.

La corteza cerebral se origina a partir de la región más rostral del tubo neural embrionario, el prosencéfalo, que da origen al telencéfalo y diencéfalo. El telencéfalo a nivel dorsal originará la neocorteza cerebral así como el hipocampo y el bulbo olfativo, en tanto a nivel ventral, formará una serie de ganglios basales. Inicialmente la corteza está compuesta por la *vz* y la primer capa neuronal que aparece durante la histogénesis cortical es la preplaca, que se for-

ma por encima de la vz, subsecuentemente, entre la vz y la preplaca se forma la svz. Durante la neurogénesis, las neuronas migran radialmente desde las zonas proliferativas a la preplaca dividiendo esta estructura en una capa superficial denominada zona marginal (MZ) y una capa más profunda, la subplaca (SP). Finalmente entre la MZ y la SP se formó la placa cortical (CP) (*Imagen 9*).

La CP aumenta de tamaño a medida que las nuevas neuronas generadas migran progresivamente hacia las capas más superficiales, dando origen finalmente a la corteza cerebral formada por seis capas. La posición de las neuronas dentro de cada lámina depende del momento en que salen de la mitosis. A medida que transcurre la neurogénesis, la vz se vuelve cada vez más pequeña, siendo reemplazada al final de la neurogénesis por una fina capa de células endodiales que tapizan el ventrículo lateral. La svz persiste durante la embriogénesis tardía y desaparece post natalmente en muchas regiones corticales, excepto a lo largo de la pared lateral del ventrículo lateral, donde persiste y continúa proveyendo neuronas al bulbo olfatorio en el cerebro adulto.

2.4.1 Neurogénesis cortical.

En estadios tempranos del desarrollo embrionario (E8 en ratón), los NPCs presentes en la vz se dividen simétricamente (produciendo dos NPCs en cada división celular), para expandir la población de células que finalmente formarán

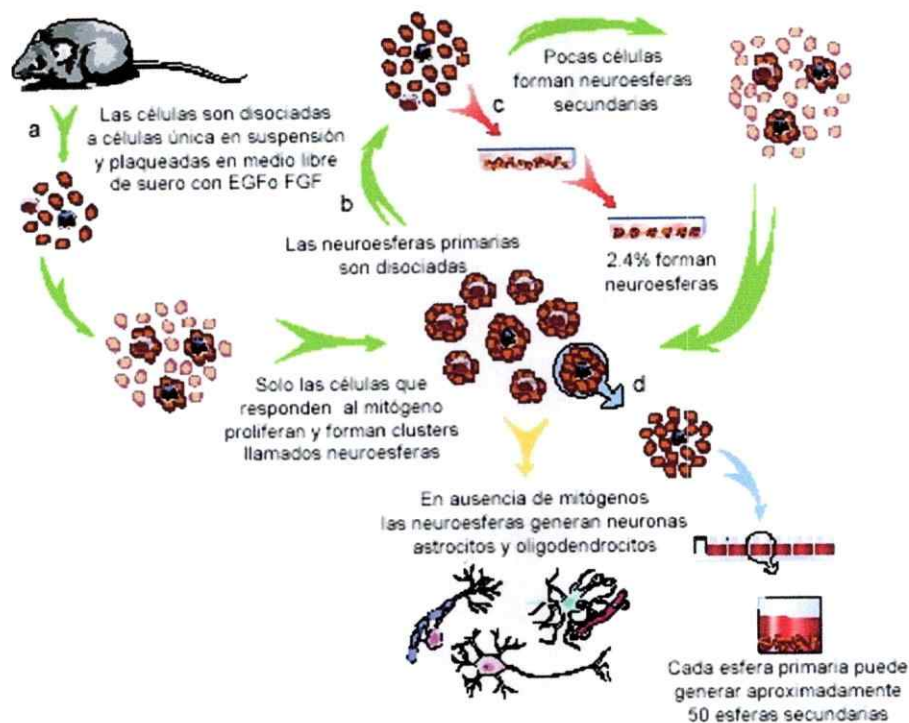


Imagen 8. Ensayo de neuroesferas (nsp). (a) Cuando tejidos del SNC de ratón son cultivados en condiciones que favorecen la formación de nsp es decir en presencia de mitógenos EGF y/o FGF2, tanto las células troncales (stem cell neurales (NSCs) como células progenitoras neurales (NPCs) sobreviven. (b) Luego de la disociación y siembra las NSCs y NPCs proliferan para dar origen a nsp secundarias. (c) Cuando las células se siembran a densidad clonal (ensayo clonal) aproximadamente el 2,4% de las células generan nuevas nsp. (d) Cuando nsp derivadas de ensayos clonales son disociadas mecánicamente a célula única y sembradas en un pocillo (una célula por pocillo) cada célula puede generar alrededor de 50 nsp secundarias (Adaptado de Reynolds y cols., 2005).

la neocorteza. Los NPCs de la vz pueden dar origen a cuatro poblaciones celulares: GR, SC de la cresta neural, neuronas y células de la svz.

A medida que progresa el desarrollo, inicialmente ocurre una fase neurogénica debido a divisiones celulares simétricas (*Imagen 10, A*), la diferenciación temprana de neuronas y glía radial da origen a la MZ. Dentro de la MZ las neuronas migran cuando salen de la vz.

En estadíos medios de la embriogénesis (E13.5) los NPCs presentes en la vz proliferan para dar origen a una segunda capa proliferativa, la svz, la cual comienza a aumentar de tamaño y finalmente es la única zona proliferativa que persiste en el cerebro adulto. Durante esta etapa del desarrollo, termina la fase neurogénica para dar comienzo a la fase gliogénica.

Cada una de las zonas proliferativas que dan origen a la neocorteza, contiene NPCs linaje restringido y NSCs multipotenciales; sin embargo, en estadíos tempranos del desarrollo, cuando más neuronas son generadas, los NPCs restringidos al linaje neuronal son encontrados predominantemente en la vz, mientras que en estadíos tardíos de desarrollo, cuando comienza a generarse más progenie glial, los progenitores celulares restringidos a este linaje, se encuentran predominantemente en la svz. Una excepción la constituye la porción anterior de la svz, que contiene una subpoblación distinta de NPCs, que normalmente migra al bulbo olfatorio y genera neuronas, aún cuando son expuestas a señales que promueven el desarrollo glial (Khun y cols., 1997).

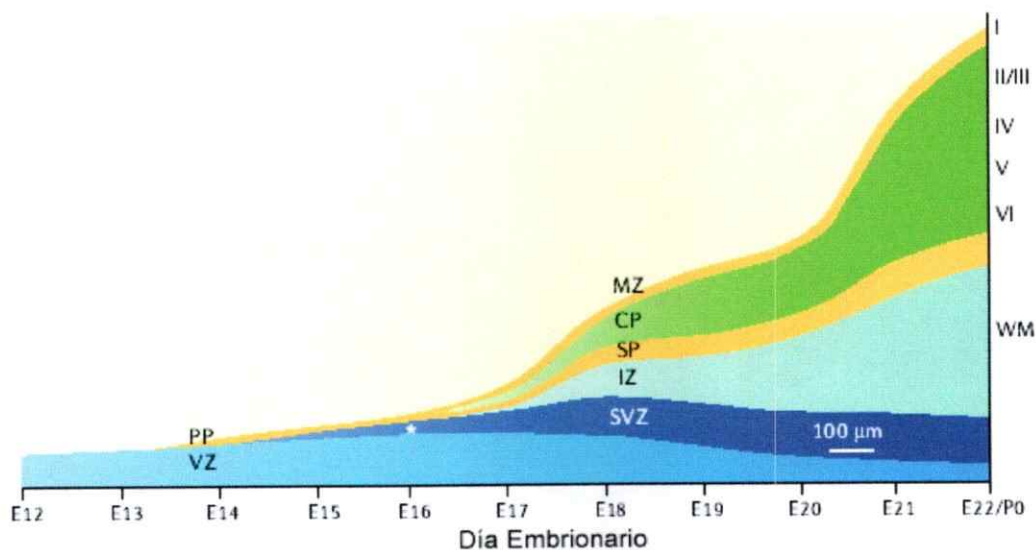


Imagen 9. Histogénesis de la corteza cerebral. Diagrama esquemático representando la aparición y tamaño relativo de las estructuras corticales entre el día embrionario E12 y E22 en rata. La preplaca (PP, amarillo) se origina a partir de la zona ventricular (VZ, azul) entre el día embrionario E13 y E14. La zona subventricular (SVZ, azul oscuro) se origina entre la VZ y la PP después de E14. Luego de E16, las neuronas de la placa cortical migran hacia la PP y dividen esta estructura en una capa superficial, la zona marginal (MZ) y una capa más profunda, la subplaca (SP), entre estas capas se ubica la placa cortical (CP, verde). Elementos de la zona intermedia (IZ, celeste) invaden la corteza cerebral en E16. El asterisco indica los estadios embrionarios en los que la SVZ y la IZ se entremezclan en la misma capa. Las capas corticales I-VI y la materia blanca (WM), se muestran en el margen derecho del esquema. Día postnatal 0 (P0) (Extraído de Kriegstein y cols., 2006).

La secuencia temporal observada durante el desarrollo embrionario, puede ser recapitulada *in vitro* utilizando el cultivo de nsp como modelo de estudio (*Imagen 10,B*).

2.4.2 Dos poblaciones de NSCs durante la embriogénesis.

Como ya señalamos, las células de la vz se diferencian secuencialmente en neuronas y luego en glía, sugiriendo que las capacidades neurogénicas y gliogénicas cambian intrínsecamente en el tiempo. Además, las células aisladas en estadios tempranos del desarrollo se diferencian a neuronas mientras que aquellas aisladas en estadios tardíos dan origen a glía, esta respuesta diferencial puede reflejar la exposición de estas células a señales del ambiente o entorno celular que comprometen su destino antes de la disección (Qian y cols., 2000).

Las NSCs de la vz y la svz pueden distinguirse en base a su respuesta a factores de crecimiento y en los tipos celulares que generan *in vivo* (Tabla 1), las principales diferencias entre estas poblaciones parece ser su respuesta a mitógenos, (las NSCs de la vz responden a FGF2 mientras que las de la svz proliferan en respuesta EGF), expresión de marcadores posicionales y los subtipos de neuronas que ellas generan. Sin embargo, ambas poblaciones expresan nestina, poseen la capacidad de formar neuroesferas y no expresan marcadores característicos de células diferenciadas (Pevny y cols., 2003).

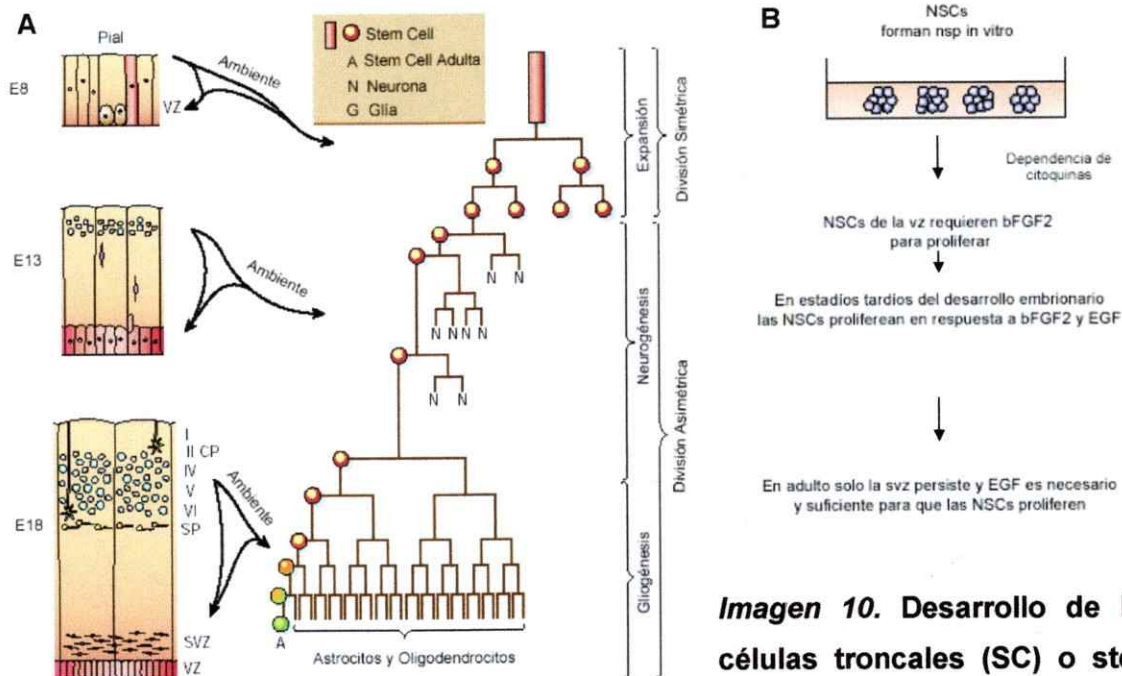


Imagen 10. Desarrollo de las células troncales (SC) o stem cell en el SNC. (A). Estudios de

eventos del desarrollo *in vivo* y el comportamiento de las SC derivadas del cerebro anterior *in vitro* permitieron dilucidar el concepto: como cambian las SC en el tiempo. Las células neuroepiteliales tempranas son columnares y se adhieren al ventrículo y a la superficie pial durante el ciclo celular. En estadios medios de la embriogénesis las neuronas migran desde la zona ventricular (vz) para dar origen a una segunda capa proliferativa, la zona subventricular (svz), durante este proceso la glía radial continúa en contacto con el ventrículo y la superficie pial, esto sirve de guía a las neuronas en migración. En etapa postnatal la glía radial se transforma en astrocitos y la vz desaparece, sin embargo la svz permanece en algunas áreas en adulto. En etapas tempranas del desarrollo la SC presentes en el neuroepitelio se dividen primero simétricamente y luego asimétricamente para dar origen a progenie diferenciada. Las neuronas son producidas primero, luego del período neurogénico, las SC originan progenitores gliales que proliferan en la svz. **(B).** La secuencia temporal en la producción de distintos tipos de células observada *in vivo* puede ser recapitulada *in vitro* utilizando el cultivo de neuroesferas como modelo de estudio (Adaptado de Temple 2001).

Durante el desarrollo, existe un cambio en la respuesta a mitógenos en los NPCs. En estadios embrionarios tardíos y en adulto los NPCs de la svz, responden a EGF (Reynolds y Weiss., 1992), a diferencia de lo que ocurre en estadios tempranos del desarrollo, en donde los NPCs de la vz, incluidas las NSCs, responden a FGF2 pero no a EGF (Kilpatrick y Bartlett., 1993, 1995, Ferri y Levitt, 1995, Ghosh y Greenberg., 1995, Gage y cols., 1995, Ferri y cols., 1996, Johe y cols., 1996, Quian y cols., 1997, Burrows y cols., 1997, Nakagawa y cols., 1996, Hitoshi y cols., 2002).

La adquisición de una respuesta mitótica a EGF, está asociada con la aparición de una subpoblación de NPCs que expresan un número relativamente elevado de receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGFRs) (Burrows y cols., 1997, Kornblum y cols., 1997).

La heterogeneidad en los niveles de expresión de EGFRs, ha sido observada en NPCs en diferentes estadios de maduración tanto en retina como en cerebro anterior. Los NPCs tempranos expresan bajos niveles de EGFRs, a diferencia de lo observado en progenitores celulares tardíos. Además, estudios realizados en NPCs multipotenciales en retina han mostrado que el número/densidad de EGFRs, expresado por los NPCs, aumenta durante el desarrollo embrionario, y que los niveles del receptor son limitantes para la proliferación y/o diferenciación, dependiendo del estadio embrionario en el que se encuentran los NPCs (Lillien y cols., 1995, Lillien y Wancio., 1998).

Tabla 1. Diferencias entre las NSCs derivadas de la vz y de la svz.

Propiedades	NSCs de la vz	NSCs de la svz
Expresión de receptor de EGF	Bajo o no detectable	Alto, esencial para aislarlas
Dependencia de citoquinas	FGF2 para proliferar	EGF para proliferar
Presencia de un único cilio	Ausente	Presente en una subpoblación
Respuesta a neurotransmisores	Glutamato, estimula la proliferación	Glutamato, inhibe la proliferación
Expresión de GFAP	Ausente	Define una población de NSCs <i>in vivo</i>
Tipo de neuronas generadas	Neuronas de proyección	Primariamente interneuronas
Diferenciación a cresta neural	Demostrado <i>in vivo</i> e <i>in Vitro</i>	No se conoce
Marcadores posicionales	Difieren entre la vz y la svz	Difieren entre la vz y la svz

En neocorteza, tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha descrito que se requiere de la expresión de un nivel umbral de EGFR para que los NPCs respondan a la estimulación, ya sea proliferando como células multipotenciales o desarrollándose hacia el linaje glial. La ocurrencia de una u otra respuesta depende del umbral de estimulación de los EGFR.

Parece posible, entonces, que los cambios en la expresión de EGFRs que ocurren en los NPCs durante el desarrollo regulen los umbrales de estimulación y ayuden a determinar como las células interpretan determinadas señales en diferentes tiempos.

2.5 EGF y el desarrollo del linaje astrocítico.

Como se mencionó anteriormente, durante estadios tardíos del desarrollo embrionario se produce un cambio en la especificación de tipos celulares desde neurogénicos a gliogénicos, debido a la adquisición de diferencias en los NPCs reguladas tanto por mecanismos intrínsecos como extrínsecos.

Algunas de estas señales actúan instructivamente para alterar el potencial de los NPCs. Por ejemplo, la aparición de NPCs restringidos al linaje oligodendrocítico en la médula espinal dorsal ventral tempranamente ha sido reportado que depende de Shh (Orentas y cols., 1996, Pringle y cols., 1996).

Otras señales instructivas reguladas temporalmente que promueven el desarrollo de astrocitos han sido identificadas, entre ellas se encuentran: factor inhibidor de leuquemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), BMPs y la familia de ligandos de EGF (Gross y cols., 1996, Johe y cols., 1996, Burrow y cols., 1997). Estas señales pueden actuar restringiendo la competencia de los NPCs, antes de especificar el tipo celular y regulando selectivamente el número de subpoblaciones de NPCs, promoviendo su proliferación o supervivencia.

El desarrollo de los astrocitos es regulado por cambios en la expresión de ligandos que promueven su desarrollo (Lillien y cols., 1988, Stockli y cols., 1991) y cambios en la competencia de los progenitores celulares para responder a estos ligandos de manera específica (Mehler y cols., 2000, Molne y cols., 2000).

La competencia de los NPCs para interpretar estas señales como inductoras de astrocitos coincide con el aumento de EGFRs en estadios tardíos del desarrollo embrionario. Varias líneas de evidencia implican a los EGFRs en la generación de astrocitos. Por ejemplo, ratones *ko* para *EGFR*, presentan un desarrollo anormal de astrocitos (Kornblum y cols., 1998) y la sobre-expresión de EGFRs en estadios tempranos del desarrollo promueve el desarrollo de astrocitos prematuramente (Burrows y cols., 1997).

Viti y cols (2003), investigaron la posible relación entre el aumento de EGFRs y la adquisición de competencia para interpretar señales inductoras de astrocitos en NPCs corticales. Ellos demostraron que un aumento en el número de EGFRs en NPCs corticales tempranos, confiere competencia prematura para responder anticipadamente a señales inductoras de astrocitos. Estos datos indican que quizás, un aumento en el número de EGFRs, podría ser uno de los mecanismos moleculares involucrados en la adquisición de competencia para responder a señales que, a su vez, promueven el desarrollo de astrocitos.

Cabe recordar que las diferencias entre los progenitores celulares son reguladas también por mecanismos intrínsecos. Un tipo de mecanismo celular intrínseco para generar diferencias entre los NPCs, que ha sido observado tanto en vertebrados como en invertebrados, involucra la herencia asimétrica de factores intrínsecos, denominados *determinantes celulares asimétricos* que controlan el destino de los NPCs (Hammerle y cols., 2002).

Dos buenos ejemplos de tales determinantes son Numb y Prospero. Numb, se localiza asimétricamente en NPCs en la división del sistema nervioso de *Drosophila*, y se requiere para la especificación de células nerviosas (Uemura y cols., 1998, Rhyu y cols., 1994, Knoblich y cols., 1995, Spana y cols., 1995). Prospero se expresa durante las divisiones celulares asimétricas de precursores neuronales en *Drosophila*, y es segregado a las células hijas (Hirata y cols., 1995; Knoblich y cols., 1995; Spana y cols., 1995).

A su vez, ha sido clonado y caracterizado el gen *Minibrain (Mnb)* en *Drosophila*, el cual codifica una proteína quinasa involucrada en proliferación celular (Tejedor y cols., 1995). Genes homólogos a *Mnb* han sido clonados en vertebrados, y son denominados *Dyrk1A* (Kentrup y cols., 1996; Guimerá y cols., 1996; Shindoh cols., 1996). Los mutantes *Mnb* presentan un tamaño reducido de regiones definidas del cerebro como resultado de un defecto en la neurogénesis (Tejedor y cols., 1995). Por último, el RNAm de *Mnb* se localiza asimétricamente durante la mitosis de NPCs en proliferación y se postula que actúa como determinante celular asimétrico en la transición de los NPCs desde proliferación a divisiones neurogénicas (Hammerle y cols., 2002). Además, evidencias recientes demuestran que *Dyrk1A* puede ser distribuido asimétricamente durante la mitosis de los NSCs en adulto y modular tanto la distribución como los niveles de EGFR (Ferrón y cols, datos no publicados).

Por lo tanto, parece probable que durante el desarrollo embrionario, una compleja interacción entre señales extrínsecas y mecanismos intrínsecos pueda

generar diferencias entre los NPCs, especificando distintas subpoblaciones de NPCs, con potenciales restringidos hacia un linaje celular determinado.

2.6 Cross-talk entre Shh y EGF?

La transducción de señales celulares sirve para coordinar la gran cantidad de estímulos extracelulares y convertir este evento en una respuesta celular, la comunicación o "cross-talk" constituye un mecanismo de señalización generalizado capaz de diversificar y combinar diferentes vías de transducción de señales. Un componente clave en este mecanismo son los receptores de superficie celular que transducen señales extracelulares al interior de la célula.

El EGFR parece ser un factor importante tanto para la proliferación como para la diferenciación de los NPCs. La activación del EGFR promueve la estimulación de diferentes vías de señalización río abajo tales como Ras-MAPK y fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3-K) responsables del crecimiento y muerte celular.

Datos previos de nuestro laboratorio demuestran que, durante la embriogénesis tardía, el desarrollo del cerebro dorsal y en particular la proliferación de los NPCs es regulada por Shh en cooperación con la vía de EGF. Además, mediante análisis de RT-PCR realizados en neocorteza proveniente de embriones de ratón control y embriones tratados con ciclopamina (inhibidor de la vía de Shh) demostramos que en presencia de esta droga los ni-

veles de expresión de *EGFR* disminuyen *in vitro* e *in vivo* (Palma y Ruiz i Altaba., 2004).

Hasta el momento se sabe que la expresión endógena de *EGFR* es regulada por *PKC* y por el *EGFR* mismo (Bjorge and Kudlow., 1987, Bjorge y cols., 1989, Earp y cols., 1988). Recientemente se ha descrito que *P2Y₁R* aumenta la expresión de *EGFR*, un fenómeno nunca antes descrito para otro *GPCR* (Buvinic y cols., 2007).

Por otra parte, ha sido reportado que en células epidermales la señalización mediada por *EGFR* modula la expresión de genes blanco de *Gli* (Kasper y cols., 2006). Además, *Shh* regula la señalización de *EGF* en queratinocitos (Bigelow y cols., 2005). Todas estas evidencias sugieren una posible interacción entre *Shh* y la vía de *EGF*. Resulta interesante estudiar si *Shh* modula la expresión y función del *EGFR* en el contexto del desarrollo del SNC.

De acuerdo a los antecedentes anteriormente mencionados, planteamos la siguiente hipótesis.

3. HIPÓTESIS.

En el cerebro dorsal anterior de ratón, la vía de señalización Shh-Gli induce a una subpoblación de progenitores celulares a proliferar en respuesta a EGF, al modular la expresión de receptores para EGF. Esta capacidad de responder a EGF, está dada en un grupo de precursores celulares que forman parte de un linaje glial.

3.1 OBJETIVO GENERAL

Investigar si en cerebro dorsal anterior de ratón, las vías de señalización de Shh-Gli y de EGF interactúan, generando cambios en la expresión de receptores para EGF espacial y temporalmente regulados.

3.1.1 Objetivos Específicos

- 1- Evaluar si, en la neocorteza, Shh produce cambios en la expresión de receptores para EGF en células progenitoras y determinar si estos cambios se relacionan con la conducta proliferativa de estas células.**

2- Determinar si los posibles cambios en la expresión de receptores para EGF se relacionan con el destino que las células progenitoras adquieren durante la embriogénesis tardía.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 MATERIALES.



4.1.1. Material biológico.

Como modelo experimental se utilizaron embriones de ratón (*Mus musculus*) de cepas C57 BL/6 y Balb C en diferentes etapas de desarrollo embrionario (E18.5, considerando el día post coito como E=0.5). Hembras en edad fértil se cruzaron con machos de fertilidad comprobada. A la mañana siguiente, se verificó la cópula mediante la presencia del tapón vaginal, asignándolo como el día del desarrollo embrionario E= 0.5.

4.1.2. Reactivos químicos y de cultivo celular.

Glucosa, poli-L-ornitina, azul de tripán, borato de sodio provenientes de Sigma. De Invitrogen-GIBCO BRL Life Technologies Inc: Buffer Hepes, L-glutamina, penicilina-estreptomina, medio Neurobasal, DMEM/F-12, L15, B27,N2, laminina, EGF, FGF2, marcador 180 pb (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder). Provenientes de MERCK: sales comunes, reactivos analíticos, ácidos, bases y alcoholes. Ciclopamina (Toronto Research Chemicals). Tirofostina (AG1478) (Calbiochem). Sonic Hedgehog (2 fuentes: Curies concentración de uso 10nM y R&D Systems concentración de uso 3µg/ml, equivalente aproxima-



damente a 25 nM), se utilizó este ligando provenientes de diferentes compañías, debido a que el Shh de R&D Systems carece de una modificación lipídica en el extremo amino terminal y por ende posee una actividad biológica menor, por esta razón es recomendado usarlo a una concentración más elevada. Papaína, desoxiribonucleasa (Dnasa), Inhibidor de papaína, ácido ovomucoide provenientes de Worthington Biochemical Corp. Mito C (BD Biosciences). Microesferas de agarosa embebidas en BSA o Shh (Affigel-Blue, Bio-Rad), gentilmente proporcionado por el Dr Rolf Karlstrom (University of Massachusetts). Kit para detección de muerte celular "*In situ* cell death Detection Kit, POD" (Roche Applied Science). Reactivo de quimioluminiscencia Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer). Placas para cultivo celular (NUNC). De Millipore insertos de membrana de policarbonato y membranas de PVDF. Inhibidor de metaloproteasas GM6001, donado gentilmente por el Dr Alfonso González (Pontificia Universidad Católica de Chile).

4.1.3. Anticuerpos.

Anticuerpo monoclonal anti-Marcador Oligodendrocítico IgM (O4) y policlonal anti-Sox2 (marcador de células troncales) provenientes de Chemicon. Anticuerpo policlonal anti- Proteína Ácida Fibrilar Glial IgG goat (GFAP), monoclonal anti- β Tubulina III IgG2b mouse (Tuj1), monoclonal anti- Proteína Ácida Fibrilar Glial IgG1 mouse conjugado a Cy3 fueron adquiridos de Sigma. Anticuerpo monoclonal anti-BrdU IgG1 mouse (Dako). Anticuerpo policlonal anti-

Receptor de EGF IgG goat (EGFR) (Upstate). Anticuerpo policlonal anti-Gli1 (Santa Cruz). Anticuerpo policlonal anti Caspasa-3 (Cell Signaling). Anticuerpo policlonal anti-receptor de EGF (EGFR) (Western Blot), donado gentilmente por el Dr Alfonso González (Pontificia Universidad Católica de Chile).

Los siguientes anticuerpos secundarios fueron utilizados: anti-mouse y anti-rabbit ambos conjugados a HRP (Jackson ImmunoResearch). Anti-rabbit IgG y anti-mouse IgG conjugados a fluoresceína (FITC), provenientes de Jackson ImmunoResearch. Anti-rabbit IgG y anti-mouse IgG ambos conjugados a Rodamina (TRITC), provenientes de Jackson ImmunoResearch. Anti-goat IgG conjugado a Rodamina (TRITC) y anti-mouse IgM Alexa Fluo 488, provenientes de Molecular Probe. Anti-goat IgM conjugado a Cy2, de Upstate. Anticuerpos monoclonales anti-actina y tubulina, de Sigma.

4.2 MÉTODOS.

4.2.1 Cultivo de Neuroesferas (nsp).

Cuando se aíslan las NSCs y son mantenidas en cultivo en ausencia de un substrato que facilite adhesión se convierten en nsp. Las nsp mantienen una población homogénea de NSCs que se auto-renuevan en respuesta a factores de crecimiento. Los cultivos de nsp se prepararon según el protocolo descrito por Doetsch y col (2002) con algunas modificaciones. Se colectaron embriones de ratón en estadio embrionario E18.5 y se colocaron en medio L15 (Invitrogen).

Las nsp se obtuvieron a partir de explantes de corteza parietal del embrión de ratón. Las meninges se extrajeron en forma mecánica. El tejido resultante se incubó durante 20 min a 37° C, con agitación suave en medio de disociación de tejido [1,1 mM EDTA (Sigma), 5,5 mM L-cisteína/HCl (Sigma), penicilina/estreptomicina 1000 Unidades/ ml (Invitrogen)] conteniendo 0,3% p/v Papaína (Worthington Biochemical Corp) en buffer fosfato salino (PBS). Posteriormente, se adicionó 0,007% p/v ácido ovomucoide y 0.1% p/v de Dnasa (Worthington Biochemical Corp) y el tejido se disoció mecánicamente con pipeta Pasteur hasta obtener una suspensión de células única.

El número total de células viables se determinó por tinción con azul de tripán (Sigma) mediante recuento en cámara de Neubauer.

El cultivo de nsp se inició sembrando las células en medio para nsp [Medio Neurobasal (Invitrogen), conteniendo N2, 2 mM L- glutamina, 0,6 % p/v glucosa, 0,02 mg/ml insulina, antibióticos y 15 mM HEPES (Invitrogen)] suplementado con 10 ng/ml de EGF (Factor de crecimiento epidérmico recombinante humano, Invitrogen). Los cultivos se mantuvieron entre 5 y 7 días en un incubador humidificado a 37° C y 5% de CO₂. Se comenzó con cultivo primario de células, el cual se mantuvo en medio para nsp cortical (medios de cultivo) en presencia de EGF 10 ng/mL en una botella de 75 cm². Al cabo de 5 a 7 días, cuando las nsp alcanzaron el tamaño adecuado, se llevó a cabo el denominado "Pasaje" de nsp.

Para llevar a cabo el Pasaje nsp se colectaron las células y luego se centrifugaron a 800 rpm por 5 minutos. El sedimento se resuspendió en PBS tibio y las células se centrifugaron nuevamente, mediante este proceso se eliminaron las células muertas. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de medio para nsp y se determinó el número total de células. Se sembraron alrededor de 4000 células por cm^2 . Solamente, se utilizaron cultivos entre pasaje 1 y 5.

4.2.2. Cultivo de líneas celulares.

Se trabajó con células C3H10T1/2 y células HeLa donadas gentilmente por el Dr Juan Larraín y por el Dr Alfonso González (Pontificia Universidad Católica de Chile). Las células fueron cultivadas en medio DMEM-F12 más 10% de suero fetal bovino. Los cultivos se mantuvieron 37°C en un incubador humidificado y 5% de CO_2 .

4.2.3. Explantes de tejido.

Se prepararon explantes de tejido, obtenidos de la región parietal de la neocorteza de ratones en diferentes etapas del desarrollo embrionario (E15.5 y E18.5).

Luego de remover las meninges, los explantes se colocaron con la zona ventricular hacia abajo sobre filtros flotantes (FalconTM cell culture inserts), en medio libre de suero (CMSF) [DMEN-F12 (Invitrogen), conteniendo Mito C (BD

Biosciences), N2, B27, 200 mM L-glutamina y antibióticos (Invitrogen)]. Posteriormente, se adicionó al medio de cultivo diferentes factores de crecimiento, como Shh (3ug/ml), EGF (10ng/ml), FGF (10ng/ml), o ciclopamina (10uM) y los explantes se incubaron durante dos días a 37⁰ C y 5% de CO₂.

Explantos con Microesferas: Los explantes se prepararon como se mencionó anteriormente; en este caso se usaron microesferas de Heparina (Sigma 80 μm), para la aplicación exógena de proteínas. Las microesferas fueron embebidas en una solución con BSA (control) o proteína recombinante humana Shh (1μg/ml) por una hora a temperatura ambiente antes de ser utilizadas.

Las microesferas fueron colocadas en la región dorsal de los explantes y los mismos se incubaron durante dos días sobre filtros flotantes (Falcon™ cell culture inserts), en medio libre de suero (CMSF). Tres horas antes de su fijación, se dio un pulso de BrdU (20 μg/ml). Posteriormente, los explantes fueron fijados en paraformaldehído al 4% y procesados para hibridación *in situ*, inmunofluorescencia o Western Blot.

4.2.4. Ensayos de proliferación y diferenciación celular.

Luego de realizado el primer Pasaje de las nsp, las células fueron sembradas para experimentos de diferenciación o proliferación. Para los experimentos de diferenciación se sembraron 600.000 células y se incubaron en presencia de diferentes estímulos (por ej. Shh 10 nM, Ciclopamina 10 uM)

deprivadas de factores de crecimiento en una placa de 60mm de diámetro con 11 cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro tratados previamente con poliornitina/laminina para permitir adhesión de las células. Se cultivaron durante 5 a 7 días y luego se fijaron en frío con PFA al 4%. Para experimentos de proliferación se sembraron 80000 células frente a diferentes estímulos en presencia de factor de crecimiento EGF durante 7 días.

Los tejidos y cultivos celulares fueron tratados con BrdU (20 μ g/ml y 10 μ g/ml, respectivamente) durante 1 a 3 horas; posteriormente, fueron fijados por 20 min a 4⁰C con paraformaldehído al 4%, seguido por un tratamiento con 2N HCl por 30 min (tejido) y 15 min (células) a 37⁰C y posterior neutralización con 0,1 M pH 8.5 Borato de Sodio por 10 min a temperatura ambiente, antes de realizar la inmunofluorescencia con anticuerpo anti BrdU.

4.2.5. Inmunofluorescencia.

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, durante 10 min. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 min con PBS y se permeabilizó con PBS-Tritón al 0,1 % por 5 min. El bloqueo se realizó con PBS-Suero al 10%, por 1 hora. Pasado ese tiempo, las células fueron incubadas con los respectivos anticuerpos primarios durante toda la noche, a 4⁰C en cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 min. con PBS-Tritón al 0,1 % y las células fueron incubadas durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a TRITC o a FITC. Finalmente, los núcleos

celulares fueron teñidos con Dapi y el análisis posterior se llevó a cabo utilizando técnicas de microscopía confocal (LSM 510, Zeiss) y fluorescencia (Axiovert 200, Zeiss).

4.2.6. RT-PCR.

El RNA se extrajo a partir de explantes de corteza parietal utilizando "Trizol Reagent" según instrucciones del fabricante. El cDNA se sintetizó a partir de 1µg de RNA utilizando Transcriptasa Reversa SuperScript (GIBCO BRL).

Las variaciones en la expresión de los genes se analizaron utilizando cantidades iguales de muestra normalizadas según los niveles de expresión de *Hprt*. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 94⁰C, 3 min; , 94⁰C, 1 min; , 57⁰C 1 min; 72⁰C, 1 min, 94⁰C, 7 min.

Las secuencias de los partidores (Forward= F, Reverse= R) utilizados se describen a continuación:

Gli1 - F-5'-GCTGCCTATAGCCAGTGTC-3'
R-5'-GAAGCAGGTGCAAAGCCAG-3'

Shh - F-5'-TCTGTGATGAACCAAGTGGCC-3'
R-5'-GCCACGGAGTTCTCTGCTTT-3'

Egfr - F- 5' - CTGCTGCCACAACCAATGATGTGC-3'
R-5'- GGCCACTGGCAGGATGTGAAGGTC-3'

Hprt - F-5'-CCTGCTGGATTACATTAAGCACTG-3'
R-5'-GTCAAGGGCATATCCAACAACAAAC-3'

Los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 2%.

4.2.7. Hibridación *in situ*.

Se utilizó el protocolo descrito por Dahmane y cols (2001) con algunas modificaciones. A partir de secciones en criostato de ~20 µm de espesor de cerebro dorsal se analizó la expresión de los diferentes genes utilizando las correspondientes sondas de RNA antisentido marcadas con digoxigenina. También se realizó esta técnica en explantes completos para el gen *gli1*.

4.2.8. Electroforesis en geles SDS- poliacrilamida y análisis por Western blot (WB).

Explantes de tejido y cultivo de neuroesferas fueron homogeneizados en solución tampón RIPA: (Tris-HCl 50 mM pH: 7,5; NaCl 150 mM; NP-40 al 1%, deoxicolato de sodio al 0,5 %; SDS al 0.1%; PMSF 100 µg/ml ; Aprotinina 2 µg/ml ; Leupeptina 2 µg/ml; Pepstatina 1 µg/ml ; Ortovanadato de sodio 1 mM ; fluoruro de sodio 10 mM) durante 30 min. en hielo.

Los homogeneizados fueron centrifugados a 15.000g, 30 min. a 4⁰C. Las proteínas contenidas en el sobrenadante fueron determinadas por el método de BioRad y una curva estándar con albúmina de suero bovino (BSA).

Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10% y 12.5 % de acuerdo al tamaño de la proteína en estudio y posteriormente se transfirieron a una de membrana de PVDF activada

previamente con metanol. Las membranas se bloquearon por una hora con leche descremada al 5% p/v.

Los *blots* fueron incubados toda la noche con los respectivos anticuerpos primarios a 4°C, y por una hora con los anticuerpos secundarios conjugados a *peroxidasa de rábano* (HRP) a temperatura ambiente.

La visualización de los complejos antígeno-anticuerpo en las membranas, se realizó utilizando procedimientos de quimioluminiscencia (Perkin Elmer).

4.2.9. Análisis Estadístico.

Para el caso de las comparaciones entre un estado y otro, se llevo a cabo un análisis de t-Student, utilizando el programa Microsoft Excel 2000 (9.0.2520).

Los valores de p de los análisis estadísticos aparecen en las figuras. Se consideraron diferencias significativas partiendo de valores de $p \geq 0,05$., las cuales se graficaron con un asterisco para $p < 0.05$; dos asteriscos $p < 0.01$ y tres asteriscos $p < 0,005$).

5. RESULTADOS.

Para abordar los objetivos planteados en el presente trabajo nuestro diseño experimental se basó en la utilización de cultivos de neuroesferas (nsp) y explantes de tejido obtenidos a partir de cerebro dorsal de embriones de ratón como modelos de estudio. Aspectos relacionados con proliferación y diferenciación celular, así como también análisis de expresión de EGFRs, fueron estudiados en cultivo de nps. Como se mencionó en la introducción el uso de esta metodología es ampliamente aceptada en el estudio de NPCs. Una de las principales ventajas en su utilización es que permite contar con un sistema *in vitro* en el que las hipótesis experimentales pueden ser ensayadas múltiples veces.

Por otro lado los explantes de tejido poseen la ventaja de mantener el "microambiente celular" y las interacciones célula-célula que ocurren normalmente durante el desarrollo.

Para la realización de algunos protocolos experimentales se utilizaron las líneas celulares C3H10T1/2 y HeLa:

Las células C3H10T1/2 de fibroblastos de ratón expresan todos los componentes de la vía de señalización de Shh y por ende, se consideran una línea celular modelo para el estudio de la cascada Shh/Gli, razón por la cual se usaron en este trabajo como un modelo alternativo.

Las células HeLa derivadas de adenocarcinoma cérvico epitelial, en tanto, se consideran una línea celular tipo para estudiar la vía de EGF, debido a que las mismas expresan una gran cantidad de EGFR, se utilizaron en este trabajo como control positivo experimental

La exposición de los resultados llevará un orden lógico de acuerdo a los objetivos planteados.

5.1 OBJETIVO 1.

5.1.1 Efecto de Shh sobre la proliferación en explantes corticales E18.5.

Como se mencionó en la introducción, datos recientes de la literatura avalan que Shh actúa como mitógeno sobre NPCs de la neocorteza. De acuerdo a este antecedente, inicialmente analizamos el efecto mitogénico de Shh en explantes de corteza parietal de ratones en estadios tardíos del desarrollo embrionario (E18.5). En estos explantes se implantaron microesferas embebidas con BSA (Control) o Shh (3ug/ml). Posteriormente en un área alrededor de la microesfera, se cuantificó el número de células BrdU+ obteniéndose una mayor proliferación de los NPCs en respuesta al ligando (**Figura 1**).

Como control interno de actividad de la vía de Shh, realizamos hibridación *in situ* para *gli1* (uno de los genes blanco considerado "read out" de la vía Shh-Gli) en estos explantes, observándose un aumento en la expresión

de *gli1* alrededor de la microesfera embebida con Shh. Dado que la vía de Shh regula la proliferación de NPCs en forma dependiente de concentración en cooperación con EGF (Palma y Ruiz i Altaba, 2004), investigamos a continuación si el gradiente de Shh se correlacionaba con un gradiente en la expresión de EGFR. Sin embargo, no fuimos capaces de detectar la expresión de EGFR mediante inmunofluorescencia debido a problemas técnicos (probablemente problemas de accesibilidad de anticuerpo o saturación de explante debido a elevadas concentraciones de Shh).

Una característica distintiva de los NPCs es la expresión del marcador de linaje neural Sox2, que es usado actualmente para identificar NPCs y NSCs tanto en el sistema nervioso adulto, como durante el desarrollo embrionario. Resulta importante destacar que no existen marcadores exclusivos para las NSCs y por ende, la expresión de proteínas tales como Sox2 y nestina, entre otras, es por ahora la manera más aceptada y para caracterizar poblaciones celulares que tienen la habilidad de autoreplicarse (self-renew) y generar células diferenciadas de múltiples fenotipos (Doetsch y cols., 1997).

Dado estos antecedentes, analizamos la expresión de Sox2 por western blot (WB) en explantes corticales tratados por 48 horas con el inhibidor (cyc) 10uM. Cyc inhibe la señal de Shh (Incardona y cols., 1998; Cooper y cols., 1998) debido a que actúa sobre el complejo de receptores de membrana compuesto por Ptc1-Smo, específicamente a nivel de Smo (Taipale y cols., 2000). En la **Figura 1 (I,J)** se observa una disminución significativa en la

expresión de Sox2 en presencia del inhibidor; nótese que los niveles de proteína fueron normalizados respecto a los niveles totales de β -tubulina.

Estos hallazgos evidencian una vez más el rol de la vía de señalización de Shh modulando el comportamiento proliferativo de los NPCs.

Alternativamente, cultivamos explantes de corteza por 48 horas en condiciones control o en presencia de Shh. Estos explantes recibieron un pulso de BrdU 2 horas antes de su fijación. En la **Figura 2** se muestra una inmunofluorescencia en cortes de explantes de 20 μ m, en donde se observa que Shh induce un aumento en la incorporación de BrdU de los NPCs presentes en las zonas proliferativas (vz-svz) (**Figura 2 B**, panel izquierdo) comparado con el control (**Figura 2 A**, panel izquierdo).

Para corroborar el rol de Shh en estos resultados, la vía de señalización de Shh fue bloqueada mediante el tratamiento con cyc. El tratamiento con 10 μ M de cyc resulta en una disminución en la proliferación celular (**Figura 2 C**, panel izquierdo).

Habiendo verificado la implicancia de Shh en el aumento en la proliferación celular y dado que la vía de Shh regula la proliferación de NPCs en forma dependiente de concentración en cooperación con EGF (Palma y Ruiz i Altaba, 2004), investigamos a continuación la posible interacción entre ambas vías de señalización.

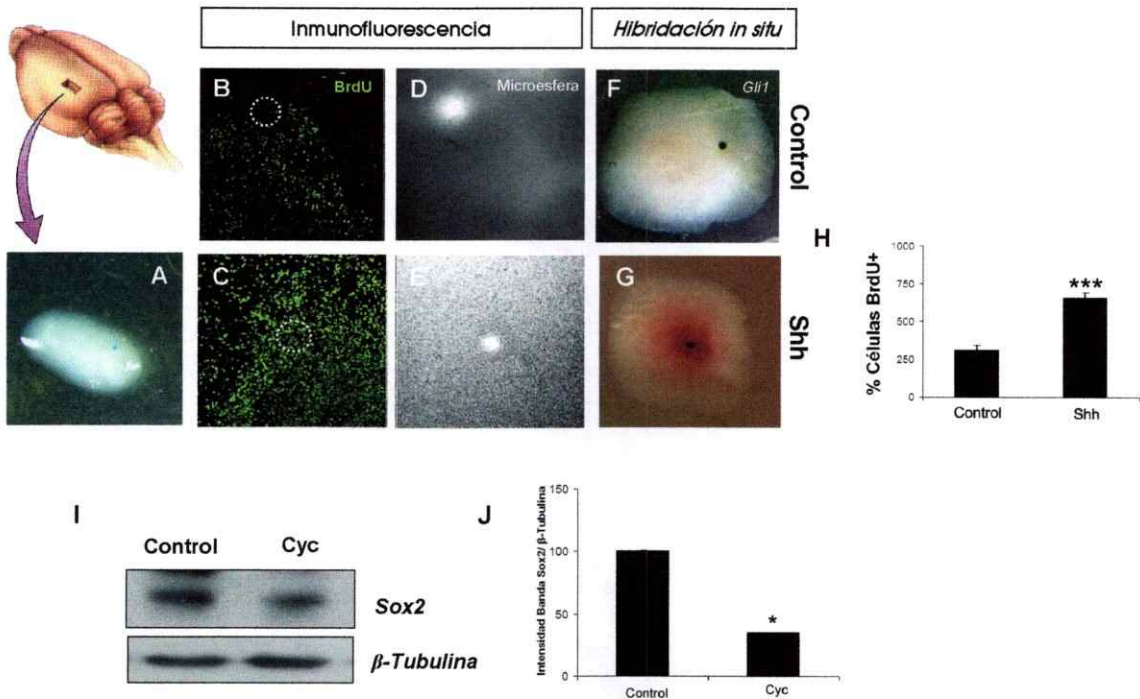


FIGURA 1. Shh aumenta la proliferación celular. (A) Esquema mostrando la obtención de explantes de corteza parietal **(B,C)** Inmunofluorescencia en explantes de corteza (E18.5) con microesferas embebidas en BSA (control) o Shh (1mg/ml), mostrando el efecto de Shh en la proliferación celular. **(D,E)** se muestran las fotografías de contraste de fase indicando la posición de la microesfera en el explante. Hibridación *in situ* para Gli1 (gen blanco de la vía de Shh-Gli) en explantes con microesferas control **(F)** y Shh **(G)** mostrando una expansión en la expresión de Gli1 alrededor de la microesfera. **(H)** Gráfica representativa de tres experimentos independientes mostrando el porcentaje de células BrdU+ en un área determinada alrededor de la microesfera. Los valores son expresados como \pm SD (n=3), ***p < 0.005. **(I)** WB mostrando la expresión de Sox2 en explantes de corteza tratados por 48 horas con con cyc 10 μ M. **(J)** Análisis densitométrico mostrando que el tratamiento con cyc induce una disminución significativa en la expresión de Sox2. ((n=3), *p < 0.05).

Para ello, procedimos a analizar la expresión de EGFR en explantes neocorticales. En presencia de Shh observamos más células EGFR+ (**Figura 2 B**, panel derecho), mientras que cyc (**Figura 2 C**, panel derecho) induce una disminución comparado con el control (**Figura 2 A**, panel derecho).

Mediante análisis por RT-PCR del RNA aislado de explantes tratados con Shh o cyc versus control, determinamos que Shh induce un aumento tanto en la expresión del RNAm de *egfr* como en la expresión de *gli1*, comparado con la condición control.

Estos resultados confirman el rol mitogénico descrito para Shh e indican que existiría una relación entre la expresión de EGFR y la vía de señalización de Shh.

5.1.2 Efecto de ciclopamina en neuroferas corticales E18.5.

Con el fin de determinar la relación entre proliferación inducida por Shh y expresión de EGFR, analizamos el efecto de cyc mediante inmunofluorescencia doble con anticuerpos anti-BrdU y anti-EGFR sobre la proliferación celular en cultivos de nsp corticales. Observamos que el inhibidor induce una disminución significativa en el número de células BrdU+ (**Figura 3C, 3D**) comparado con el control (**Figura 3A, B**) Esta disminución en la proliferación observada en presencia de cyc podría deberse a un aumento en la muerte celular, por lo que realizamos un ensayo Tunel (utilizando un kit comercial que detecta muerte celular por apoptosis) en nuestros cultivos y

encontramos que no existen diferencias significativas en el número de células apoptóticas al comparar cultivos control o en presencia de cyc.

Posteriormente, analizamos si esta disminución en la proliferación observada en presencia del inhibidor se correlaciona con la expresión de EGFR, y verificamos que coincidentemente con la disminución en la proliferación de los NPCs se observan menos células EGFR+ (**Figura 3C, 3D**).

Estos datos en combinación con los resultados obtenidos en explantes no sólo nos permitieron corroborar el rol de Shh como mitógeno ya descrito, si no que también nos muestran que la disminución en la expresión de EGFR observada en presencia de cyc sugiere que EGFR es un blanco clave para el efecto modulador que ejerce la vía de Shh sobre la proliferación de los NPCs.

5.1.3 Inhibición de la vía de señalización de EGF en cultivo de nsp corticales E18.5.

Como se mencionó en un principio, en estadios tardíos del desarrollo embrionario las nsp responden a EGF como mitógeno.

Para indagar respecto a la relación entre las vías de EGF y Shh manifestada a través de la regulación de la expresión de EGFR se trataron cultivos de nsp con el inhibidor de EGFR, Tirfostina (AG1478). AG1478 se une selectivamente al bolsillo de unión a ATP del EGFR inhibiendo su habilidad para autofosforilarse (Bigelow y cols., 2005).

Las nsp fueron disociadas y cultivadas durante 48 horas en EGF (10ng/ml), posteriormente se privaron del factor de crecimiento durante 12

horas y se trataron por 5 horas con AG1478 (3nM), cyc (10uM) o AG1478 mas cyc. En todas las condiciones experimentales las células se incubaron con BrdU (1ug/ml) y EGF (10ng/ml) durante las 5 horas de tratamiento con los inhibidores (**Figura 4A**).

Posteriormente, las células fueron fijadas y la proliferación celular se determinó mediante inmunofluorescencia con anticuerpo anti-BrdU. La **Figura 4C** muestra que cyc disminuye el porcentaje de células BrdU+ en un 20% mientras que AG1478 disminuye la proliferación en un 50% respecto al control (**Figura 4D, B**). Interesantemente, en presencia de ambos inhibidores la proliferación celular es tan sólo de un 10% (**Figura 4E**) de la observada en el control.

Estos datos sugieren que ambas vías modulan la proliferación de los NPCs. Cyc inhibe la proliferación celular inducida por EGF, es decir actúa sobre el efecto proliferativo ejercido por EGF, sugiriendo que posiblemente existe una interacción entre ambas cascadas de señalización.

5.2 Shh modula la expresión de EGFR.

Con el objetivo de determinar si el efecto en la proliferación celular inducido por Shh podría ser mediado vía cambios en la expresión de EGFR analizamos la expresión de EGFR por WB tanto en explantes de tejido como en cultivo de nsp.

Inicialmente analizamos el efecto de cyc en la expresión de EGFR en cultivo de nsp corticales E18.5 (**Figura 5A**), encontrando que a las 24 horas

(Figura 5B) el tratamiento con cyc 10 μ M se observa una tendencia en la disminución de la expresión de EGFR, esta disminución en la expresión de EGFR es estadísticamente significativa a las 48 horas de tratamiento **(Figura 5C)**. La **Figura 6C,E** muestra el efecto de cyc en explantes corticales E18.5, en donde se observa una disminución en la expresión de EGFR cuando lo comparamos con la situación control.

Tal como se aprecia en la **Figura 6 (B,D)** el tratamiento con Shh 10 nM en tanto provoca un aumento estadísticamente significativo en la expresión de EGFR comparado con el control. Como control positivo experimental se analizó el efecto de otros factores de crecimiento previamente descritos por Lilien y cols (2000), que regulan la expresión de EGFR, tales como EGF.

Dado que tanto en explantes de corteza parietal como en cultivo de nsp observamos una regulación en la expresión de EGFR mediada por Shh, a continuación, también evaluamos el efecto de la vía de señalización de Shh-Gli en la línea celular C3H10T1/2.

En este diseño experimental evaluamos dos concentraciones de cyc., luego de la exposición a cyc 5 y 10 μ M o Shh 10 nM por 48 horas analizamos la expresión de EGFR mediante RT-PCR **(Figura 7 A)** y WB **(Figura 7 B)** observando el mismo efecto encontrado en cultivo de nsp y explantes corticales.

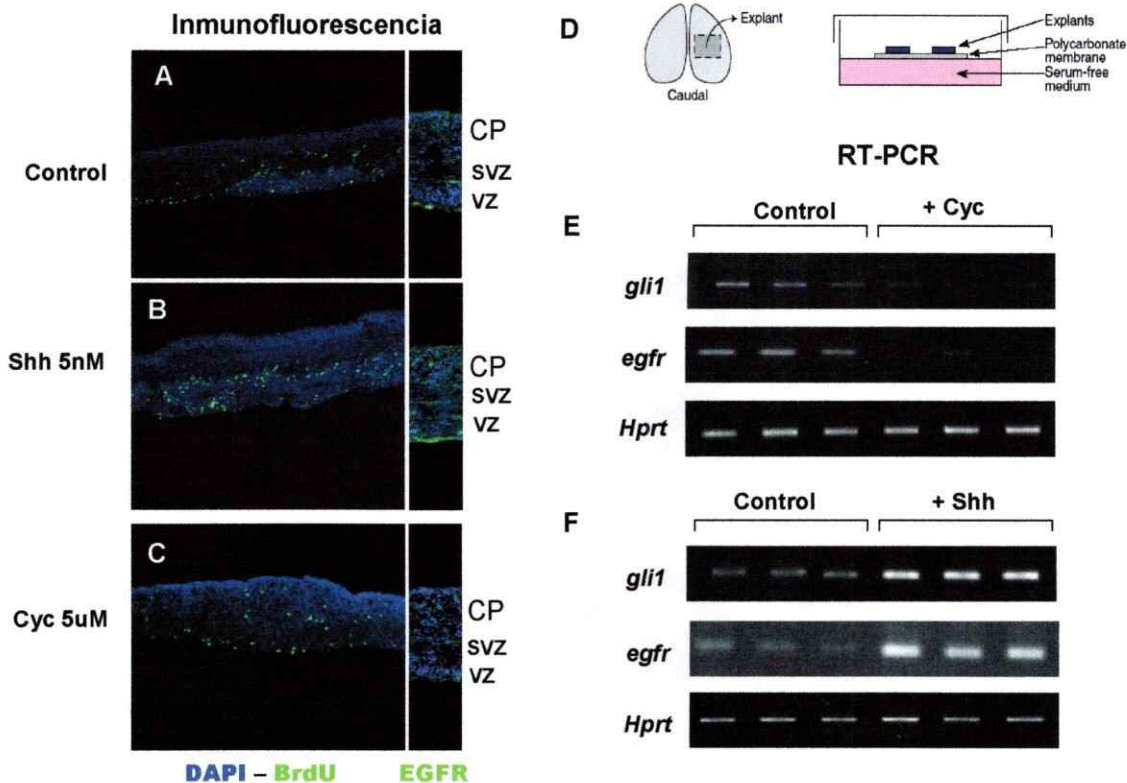


Figura 2. Shh modula la proliferación celular de los NPCs de la vz/svz. Localización de células BrdU+ y EGFR+ en la vz/svz de explantes corticales de ratones en estadio embrionario E18.5 control (A) tratados con Shh 5 nM (B) o cyc 5 uM (C). Análisis por RT – PCR de la expresión de genes *gli1* y *egfr* en explantes neocorticales de embriones (E18.5) control, tratados con cyc 5 uM (E) o Shh 5 nM (F). *Hprt* se incluye como control de carga, los geles mostrados en E y F son representativos de tres experimentos independientes. En D se esquematiza una vista frontal de un cerebro de ratón señalando la posición del explante de tejido y condiciones de cultivo.

Estos hallazgos evidencian una vez más la implicancia de Shh en la regulación de la expresión de EGFR y apoyan los datos obtenidos mediante inmunofluorescencia (**Figura 3**), indicando que la vía de señalización Shh-Gli modularía la expresión de EGFR no solamente a nivel transcripcional, sino también a nivel de proteína

5.2.1 Shh modula la actividad de la vía de EGF.

Los resultados anteriormente mencionados indican que tanto la vía de señalización de Shh como la de EGF modulan la proliferación de los NPCs y que cyc inhibe el efecto proliferativo ejercido por el ligando EGF. Por otra parte, determinamos que la vía de Shh regula la expresión de EGFR. La activación de EGFR la autofosforilación del dominio TK intracelular del receptor y este evento, a su vez, conduce a la activación de varios blancos de la vía de EGF, uno de los cuales es la vía de señalización de las MAPKs.

De acuerdo con estos antecedentes, decidimos evaluar si Shh es capaz de regular la actividad de la vía de EGF, para ello analizamos niveles de EGFR y ERK fosforilado, en extractos proteicos obtenidos a partir de explantes corticales incubados durante 48 horas con el inhibidor cyc 10 uM, utilizando anticuerpos que reconocen un residuo de tirosina fosforilado en la posición 1173 (pTyr-1173) del EGFR y la forma fosforilada de la proteína quinasa activada por mitógeno ERK (pERK 1,2).

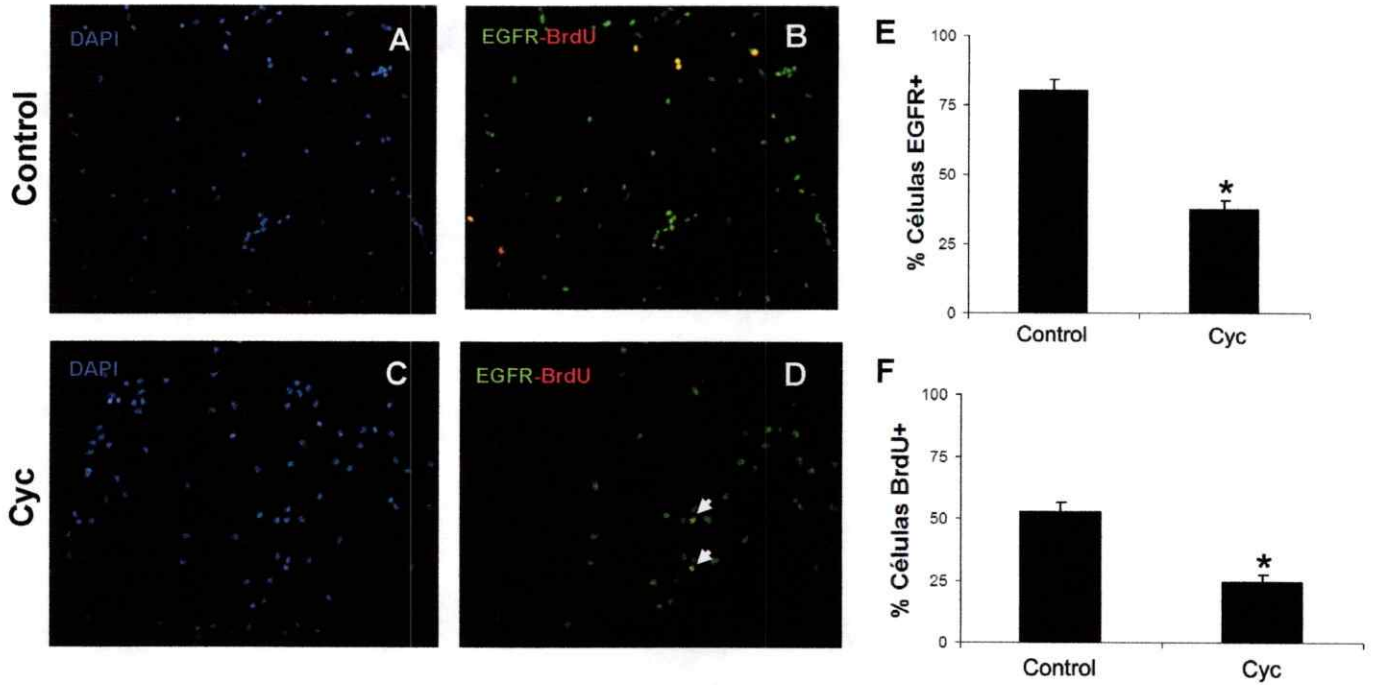


Figura 3. Efecto de cyc sobre la proliferación de los NPCs. Expresión de EGFR y BrdU (B,D) analizada mediante inmunofluorescencia doble en nsp corticales E18.5, en condiciones control y tratadas con cyc 10 uM por 48 horas. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (A,C). Las flechas en D indican células BrdU+/EGFR+. Gráficas representativas de tres experimentos independientes, representando el porcentaje de células EGFR+ (E) y BrdU+ (F). Los valores son expresados como \pm SD (n=3), *p < 0.05.

En presencia de cyc se observa una aparente disminución en la fosforilación de EGFR y en la activación de ERK (**Figura 8A**). Ciertamente, esta disminución tanto en la fosforilación de EGFR como en la activación de ERK podría ser consecuencia de una disminución de la masa total de EGFR (**Figura 6**).

Para descartar esta hipótesis analizamos entonces la cinética de activación de ERK a tiempos cortos en presencia de Shh mediante WB.

Tal como se aprecia en la **Figura 8B**, el estímulo con Shh permite la activación de la vía de las Maps. Shh ejerce una máxima respuesta entre los 15 y 30 minutos de incubación decayendo luego de 1 hora de tratamiento los niveles de pERK. Como control positivo del experimento analizamos la activación de ERK en presencia de concentraciones saturantes de EGF (50ng/ml).

Estos resultados permiten concluir que Shh por sí sólo es capaz de activar la vía de señalización de EGF, este efecto es evidenciado por los niveles de fosforilación de ERK a tiempos cortos.

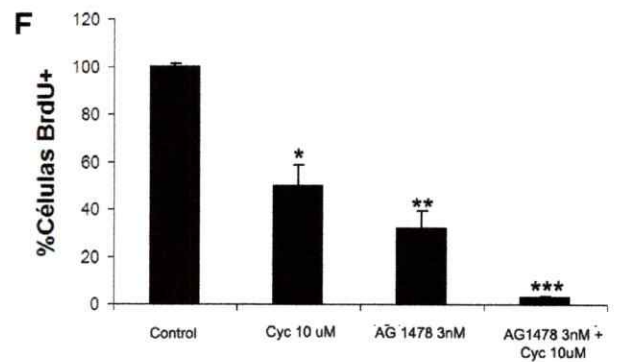
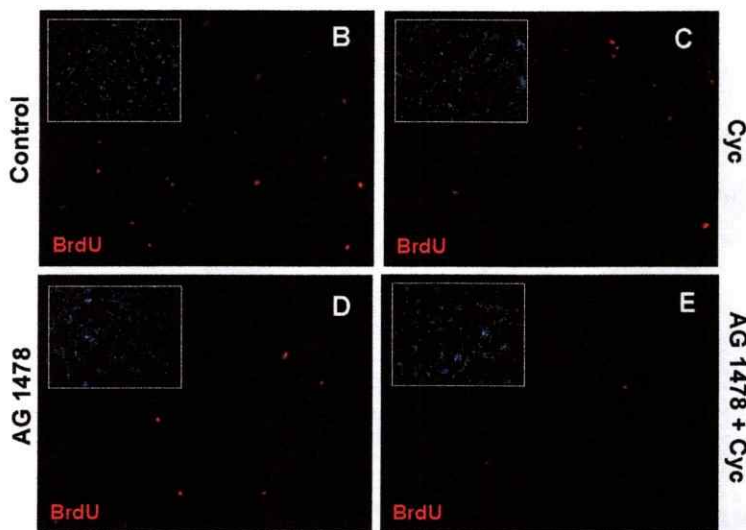
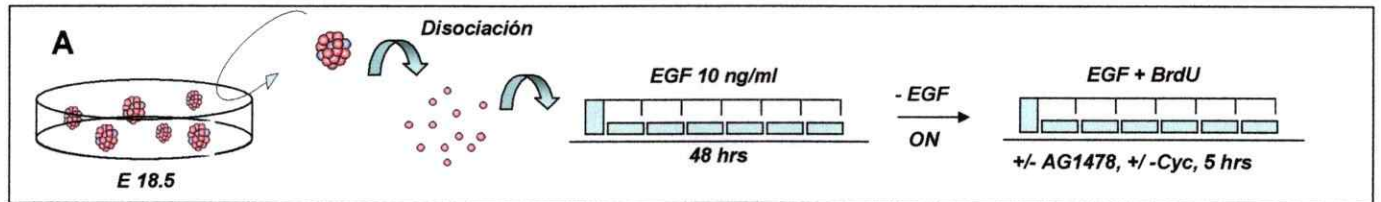


Figura 4. Efecto de cyc y tirfostina (AG1478) en la proliferación celular. (A) Esquema experimental. La inmunofluorescencia muestra que luego de 5 horas de tratamiento tanto cyc **(C)** como AG1478 **(D)** disminuyen la proliferación celular respecto al control **(B)**. El efecto inhibitorio es más marcado en presencia de ambos inhibidores **(E)**. **(F)** Cuantificación de células BrdU+, gráfica representativa de tres experimentos independientes ((n=3), *p < 0.03, **p < 0.01, ***p < 0.001). Los inset en B,C,D y E denotan la tinción con DAPI de los núcleos celulares correspondientes a cada uno de los campos mostrados.

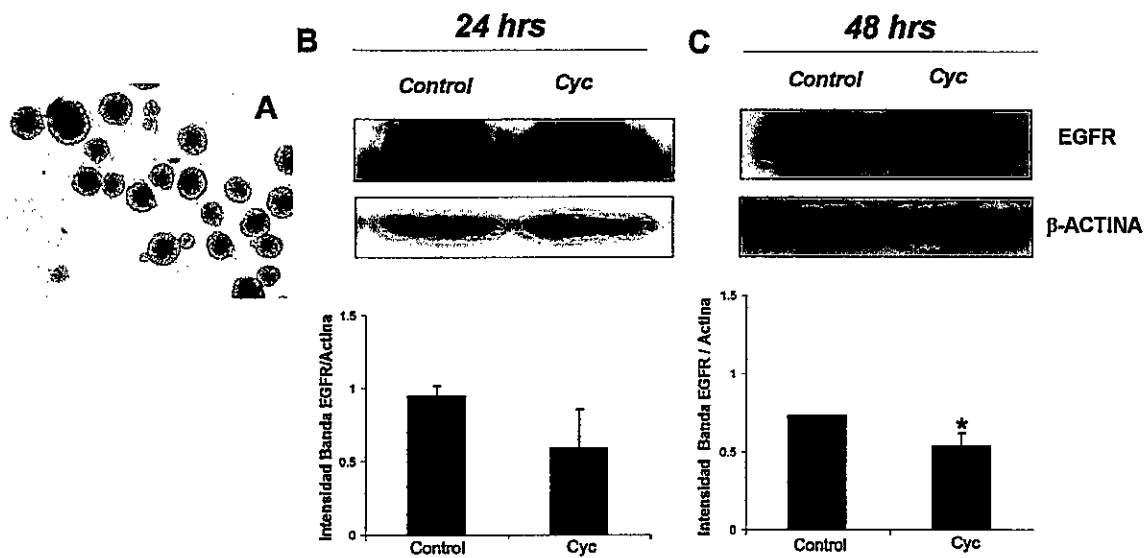


Figura 5. Cyc disminuye la expresión de EGFR. (A) Cultivo de nsp E18.5 generado a partir de la siembra de células disociadas obtenidas de la corteza parietal. Análisis de expresión de EGFR por WB, en cultivo de nsp corticales control o tratadas con cyc 10 uM por 24 (B) y 48 (C). En B y C se muestran análisis densitométricos de los WB correspondientes. Los valores son expresados como la media \pm SD (n=3), *p < 0.05.

5.2.2 La proliferación celular inducida por Shh requiere de la transactivación de EGFR.

Existen evidencias recientes que indican que el EGFR puede ser transactivado vía receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Shh actúa a través de un complejo receptor de membrana Ptc-Smo, e interesantemente, Smo pertenece a la familia de GPCRs. Es posible plantear entonces la hipótesis que la activación de ERK a tiempos cortos observada en presencia de Shh podría indicar una transactivación de EGFR a través de vía de Shh. Por otro lado, ha sido determinado que al menos para los GPCRs el mecanismo de transactivación de EGFR involucra actividad de MMP que causan la liberación de ligandos de EGFR desde la superficie celular.

Debido a que la activación de EGFR vía estímulo de GPCRs es sensible a inhibidores de MMP (Prenzel y cols., 1999) analizamos el efecto del inhibidor de MMP GM6001 en la activación de la vía de EGF inducida por Shh.

Mediante un ensayo de proliferación celular demostramos que tanto GM6001 (*Figura 9B*) como AG1478 (*Figura 9C*), inducen diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular inducida exclusivamente por la liberación de ligandos de la superficie celular mediada por MMP y sugieren que las MMP son mediadoras de la trans-activación de la señal de EGFR inducida por Shh.



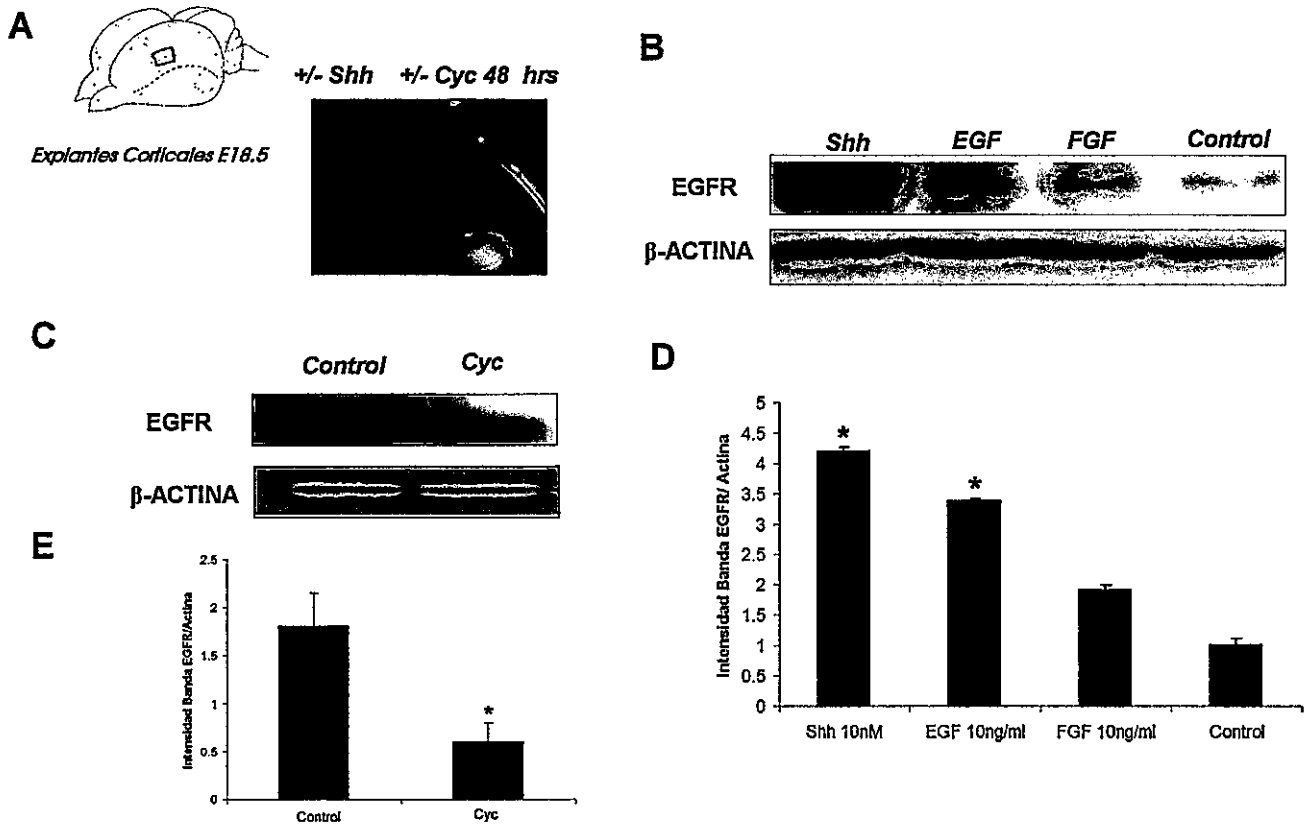


Figura 6. Shh aumenta la expresión de EGFR. (A) Esquema mostrando la obtención de explantes de corteza parietal de ratón (E18.5). En B y C se muestra análisis de expresión por WB de EGFR en explantes control y estimulados con FGF (10 ng/ml), EGF (10 ng/ml), Shh 10 nM (B) o cyc 10 uM (C) por 48 horas. Las gráficas en D y E representan el análisis por densitometría de tres experimentos independientes, las diferencias fueron analizadas mediante test de student (n=3), * p < 0.05).

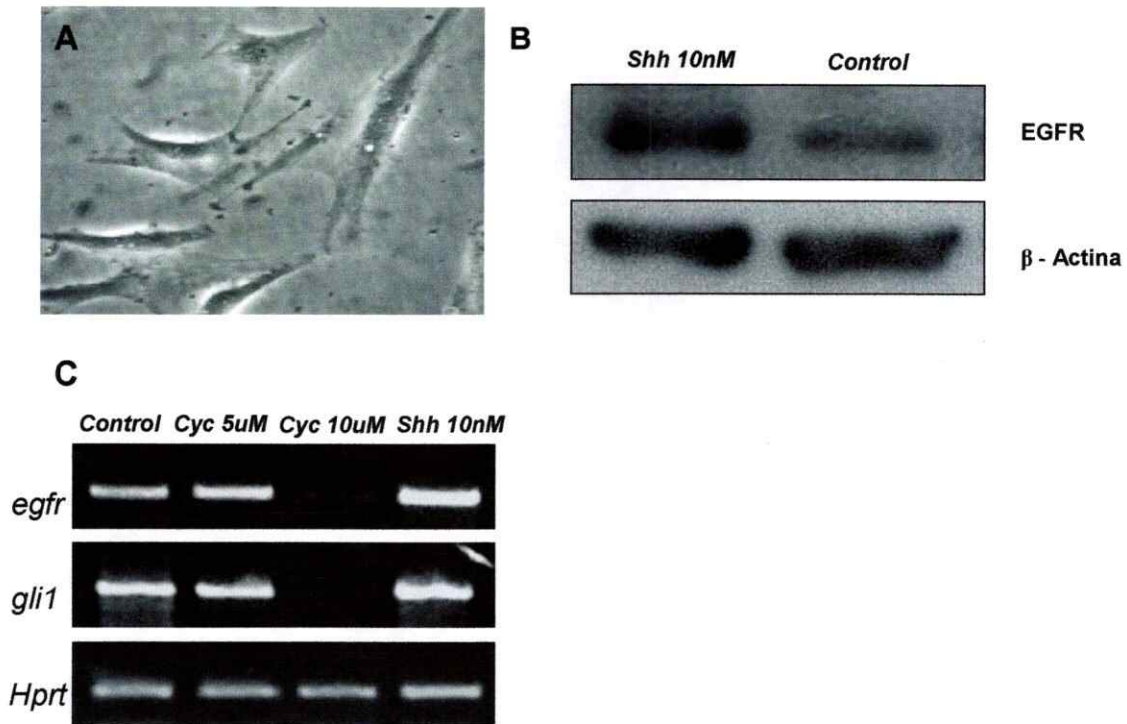


Figura 7. Shh regula la expresión de EGFR en células C3H10T1/2. (A) Contraste de fase de un cultivo de células C3H10T1/2. **(C)** Análisis por RT – PCR de la expresión de genes *gli1* y *egfr* en células C3H10T1/2 control y tratadas por 48 horas con cyc 5 uM, cyc 10 uM o Shh 10 nM, *Hprt* se indica como control de carga. **(B)** WB mostrando la expresión de EGFR.

5.3 Objetivo 2.

5.3.1. EGFR y destino celular.

Durante estadios tardíos del desarrollo embrionario se produce un cambio en la especificación de tipos celulares desde neurogénicos a gliogénicos en la neocorteza, debido a cambios en la competencia celular de los NPCs, regulados tanto por mecanismos intrínsecos como extrínsecos.

La competencia de los NPCs para interpretar señales inductoras de astrocitos coincide con el aumento en la expresión de EGFRs en estadios tardíos del desarrollo embrionario y existen diversas evidencias en la literatura que implican a los EGFRs en la generación de astrocitos. EGFR regula la habilidad de los NPCs de interpretar señales que promueven la diferenciación a astrocitos (Viti y cols., 2003).

De acuerdo con estos antecedentes en la segunda parte de este trabajo de tesis evaluamos si la modulación en la expresión del EGFR mediada por la vía de Shh-Gli se relaciona con el destino de los NPCs. Para ello preparamos explantes y cultivo de nsp de corteza parietal como se describió en la sección de materiales y métodos y posteriormente, se realizaron ensayos de diferenciación celular analizando la expresión de diferentes marcadores de diferenciación celular tales como GFAP (marcador del linaje astrocítico), β III-tubulina (marcador del linaje neuronal) y O4 (marcador de oligodendrocitos).

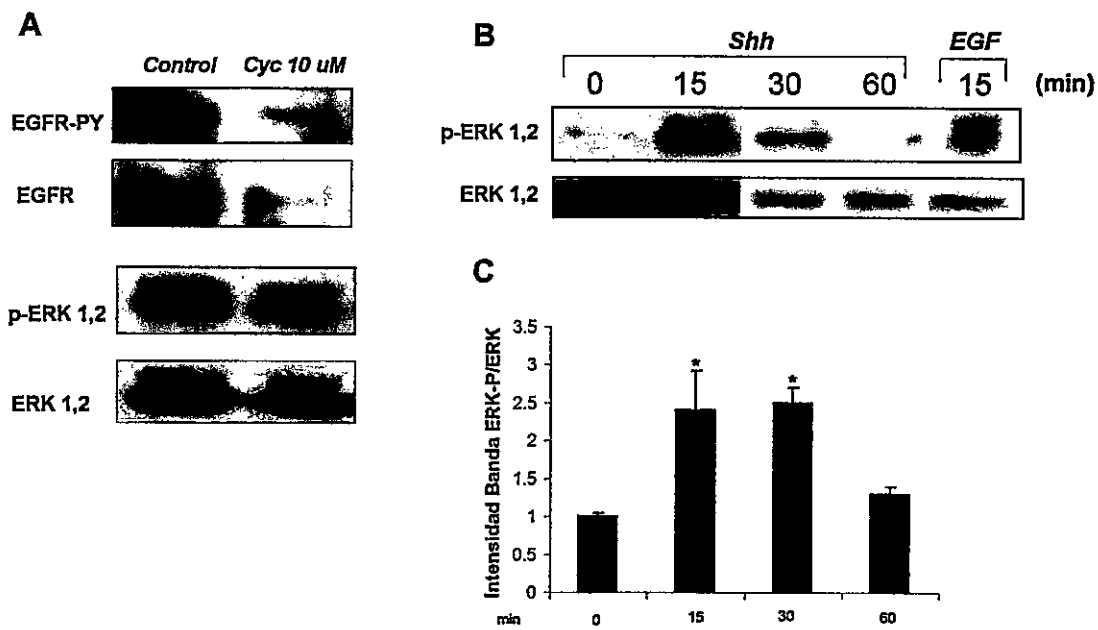


Figura 8. Shh modula la actividad de la vía de EGF. (A) Análisis por WB en explantes de corteza parietal, mostrando que el tratamiento con cyc 10 μ M disminuye la fosforilación de EGFR (EGFR-Y) y pERK 1,2. **(B)** Extractos proteicos de nsp corticales E18.5 incubados con Shh por los tiempos indicados fueron resueltos mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida. Como control positivo se analizó la activación de ERK (pERK 1,2) en presencia de concentraciones saturantes de EGF. **(C)** Gráfica representativa de tres experimentos independientes (n=3), * $p < 0.05$.

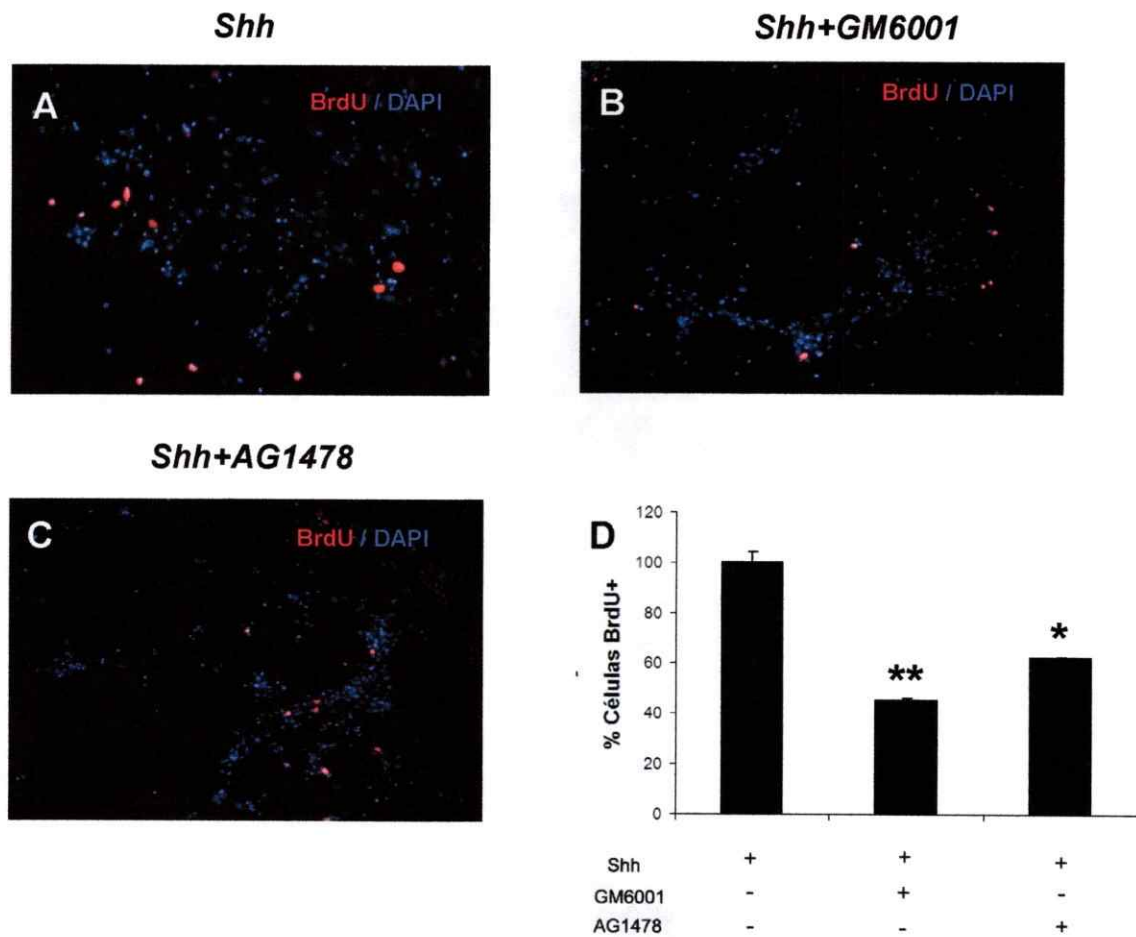


Figura 9. Shh induce transactivación de EGFR. Ensayo de proliferación celular mostrando que tanto el inhibidor de metaloproteasas, GM6001 (**B**) como el inhibidor del EGFR, AG1487 (**C**) inducen una disminución en el porcentaje de células BrdU+ comparado con el control (**A**). (**D**) Gráfica representativa de tres experimentos independientes mostrando el porcentaje de células BrdU+. Las diferencias son indicadas por valores de p determinados mediante test de student (**p < 0.01, *p < 0.03).

5.3.2 Estudio de la participación de la vía Shh-Gli en la determinación del linaje astrocítico.

Con el objetivo de determinar si la exposición a Shh ejerce algún efecto en la gliogénesis, inicialmente analizamos mediante WB la expresión de GFAP en explantes de tejido cultivados durante 48 horas con Shh.

La **Figura 10D** muestra la expresión de GFAP en explantes control y tratados con Shh. Los niveles totales de proteína fueron normalizados respecto los niveles de actina. El análisis densitométrico (**Figura 10E**) reveló un aumento en la expresión de GFAP de aproximadamente un 30% el cual fue significativamente diferente a la condición control.

Adicionalmente, la **Figura 10** muestra imágenes representativas de un ensayo de diferenciación realizado en cultivo de nsp E18.5. Nsp de pasaje 1 fueron sembradas y cultivadas sobre una matriz de poliornitina/laminina e incubadas durante 5 a 7 días en presencia (**Figura 10A**) o ausencia (**Figura 10B**) de Shh.

Posteriormente, las células fueron fijadas y sometidas a inmunofluorescencia con anticuerpo anti GFAP para determinar el número de astrocitos. El análisis cuantitativo revela que Shh induce un aumento de aproximadamente un 50% en el número de astrocitos respecto al control (**Figura 10 C**).

5.3.3 Efecto de ciclopamina sobre la expresión de GFAP.

Los resultados mencionados anteriormente sugieren que la vía de Shh estaría implicada en la regulación de la expresión de GFAP, quisimos estudiar entonces el efecto de cyc en nuestros cultivos.

En la **Figura 11** se observa que cyc induce una disminución significativa en el número de astrocitos (**Figura 11B**), comparado con el control (**Figura 11A**). El gráfico en la **Figura 11H** revela una disminución de aproximadamente un 50% en la expresión de GFAP determinada por WB (**Figura 11G**) en explantes tratados durante 48 horas con cyc 10 uM.

Al mismo tiempo resulta importante destacar que no se observaron cambios significativos en el índice de muerte celular evaluado a través de la tinción con anticuerpo anti caspasa-3 (**Figura 11C,D**).

Estudios anteriores asocian a EGFR con el cambio de especificación desde neurogénesis a gliogénesis (Burrows y cols., 1997), lo que nos motivó a analizar mediante citometría de flujo la expresión de GFAP y EGFR en explantes expuestos a cyc 10 uM. El tratamiento con el inhibidor induce una disminución en la expresión de ambas proteínas (**Figura 12**) luego de 48 horas de incubación. Como control positivo del experimento se analizó la expresión de EGFR mediante WB a partir de extractos proteicos obtenidos del mismo pull de explantes utilizados para el análisis de citometría de flujo.

Estos hallazgos confirman los resultados obtenidos anteriormente mediante inmunofluorescencia y muestran que la vía de Shh-Gli estaría involucrada en la regulación del número de astrocitos. Con el objetivo de determinar si Shh ejerce algún efecto sobre otros marcadores de linaje neural, se realizaron a continuación ensayos de diferenciación celular en cultivo de nsp E18.5, posteriormente las células fueron fijadas y sometidas a inmunofluorescencia con anticuerpos β III-tubulina y O4. Las **Figuras 13 y 14** revelan que tanto en condiciones de pérdida como ganancia de función de Shh, no existen diferencias significativas ya que el porcentaje de neuronas y oligodendrocitos fueron comparables al control en ambas condiciones experimentales.

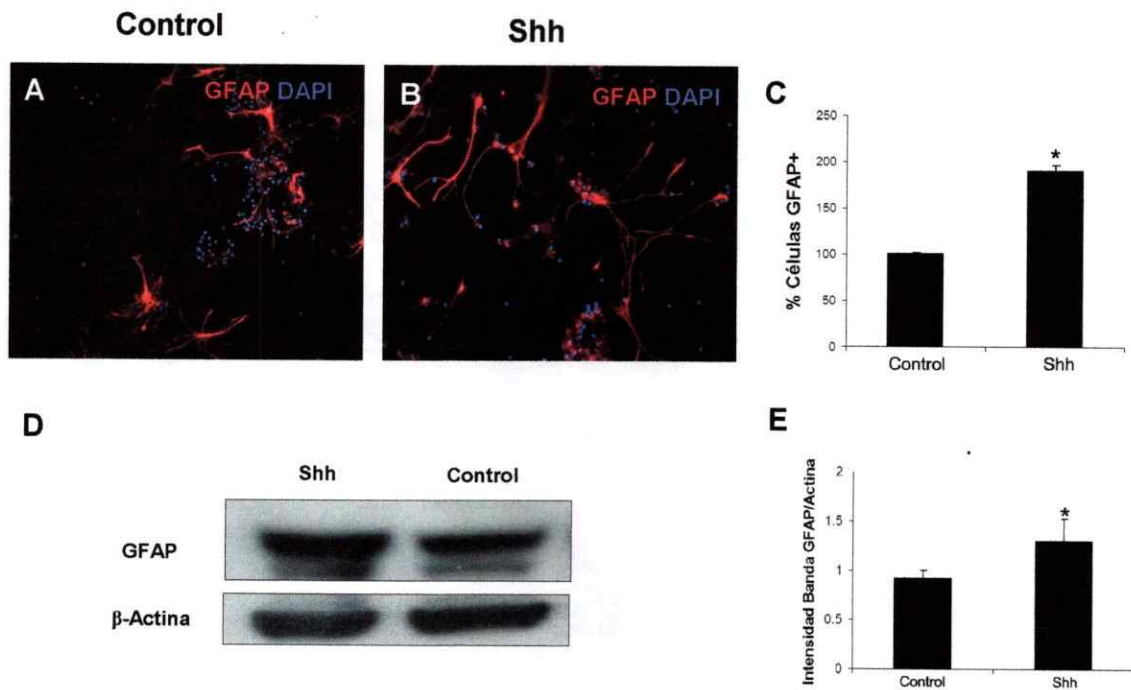


Figura 10. Shh aumenta la expresión de GFAP. Ensayo de diferenciación celular en nsp corticales E18.5 mostrando la expresión de GFAP. La inmunofluorescencia revela que Shh (**B**) induce un aumento en el número de astrocitos respecto al control (**A**), los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. (**C**) Cuantificación del porcentaje de células GFAP+, los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0.05$) en el porcentaje de células DAPI/GFAP+. (**D**) Extractos proteicos obtenidos a partir de explantes de corteza incubados en presencia o ausencia de Shh (3 μ g/ml) durante 48 horas fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 10% y posteriormente se analizó la expresión de GFAP por WB (**E**) Análisis densitométrico mostrando que el tratamiento con Shh induce un aumento significativo en la expresión de GFAP. (($n=3$), * $p < 0.05$).

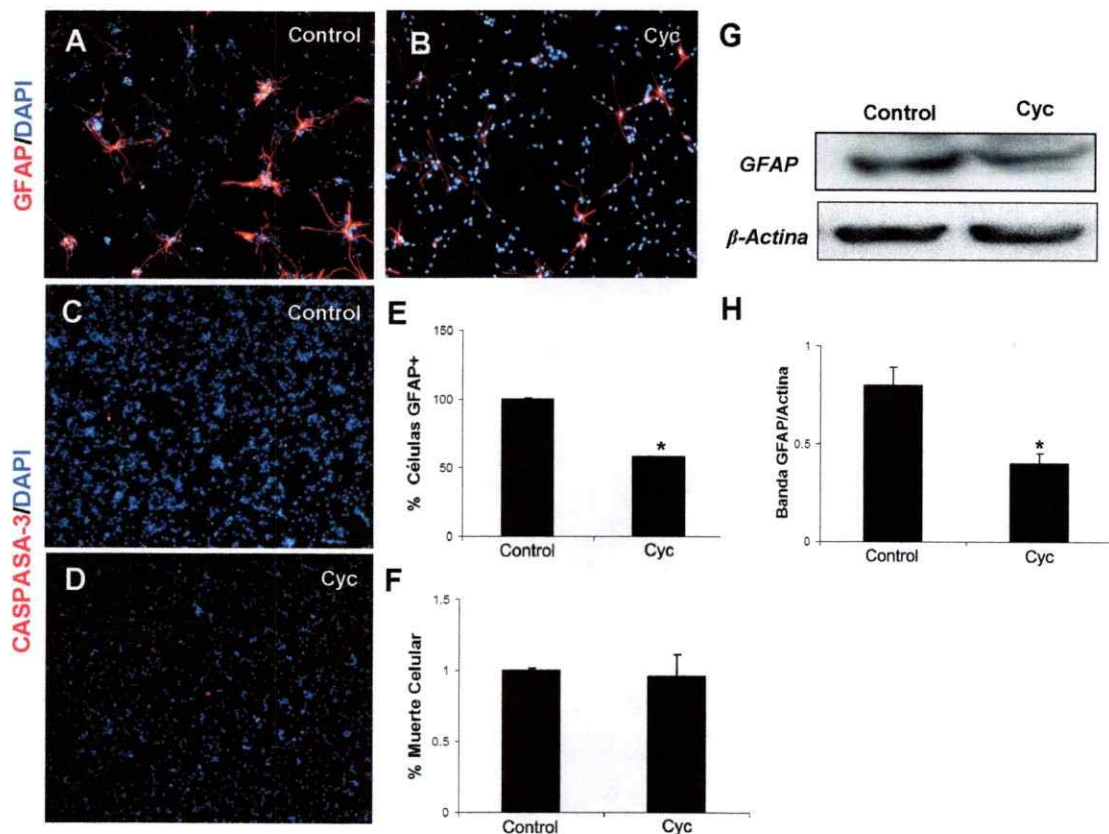


Figura 11. Efecto de cyc sobre la expresión de GFAP. Nsp corticales E18.5 fueron sembradas en ausencia de factores de crecimiento para favorecer su diferenciación. La inmunofluorescencia revela que cyc disminuye el número de astrocitos (comparar **B** con **A**). **(E)** Cuantificación del porcentaje de células GFAP+. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0.05$) en el porcentaje de células DAPI/GFAP+. Luego de 48 horas en cultivo se determinó índice de muerte celular mediante inmunotinción con anticuerpo anti caspasa-3 (**C,D**) en **(F)** se muestra que no se observan diferencias significativas en el índice de muerte celular. **(G)** Análisis de expresión de GFAP por WB en extractos proteicos obtenidos de explantes de corteza incubados durante 48 horas en ausencia o presencia de cyc 10 μ M. **(H)** Densitometría del WB mostrado en **G**, las diferencias son sustentadas por valores de p : * $p < 0.05$.

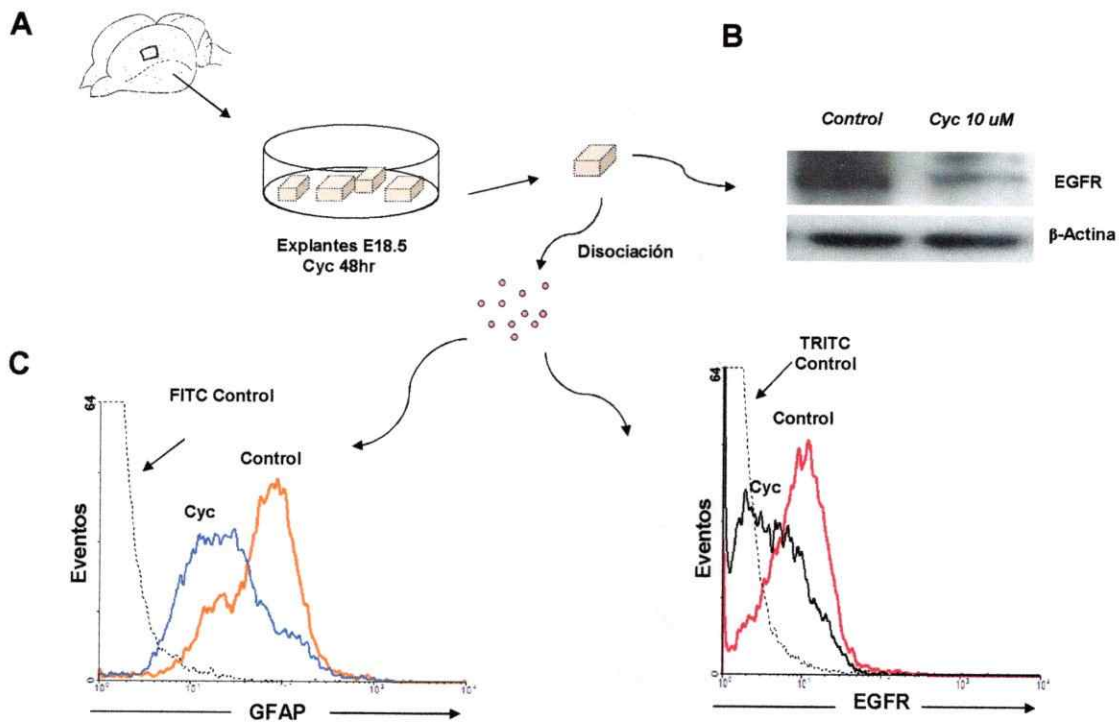


Figura 12. Cyc disminuye la expresión de GFAP y EGFR. (A) Explantes de corteza parietal E18.5 fueron cultivados durante 48 horas en presencia o ausencia de cyc 10 uM sobre membranas de policarbonato en medio definido libre de suero. (C) Detección de la expresión de EGFR y GFAP mediante citometría de flujo mostrando que cyc disminuye la expresión de ambas proteínas. Esta disminución en la expresión de EGFR fue confirmada por WB (B) realizado a partir de extractos proteicos obtenidos del mismo pull de explantes utilizado para el análisis por citometría de flujo mostrado en (C).

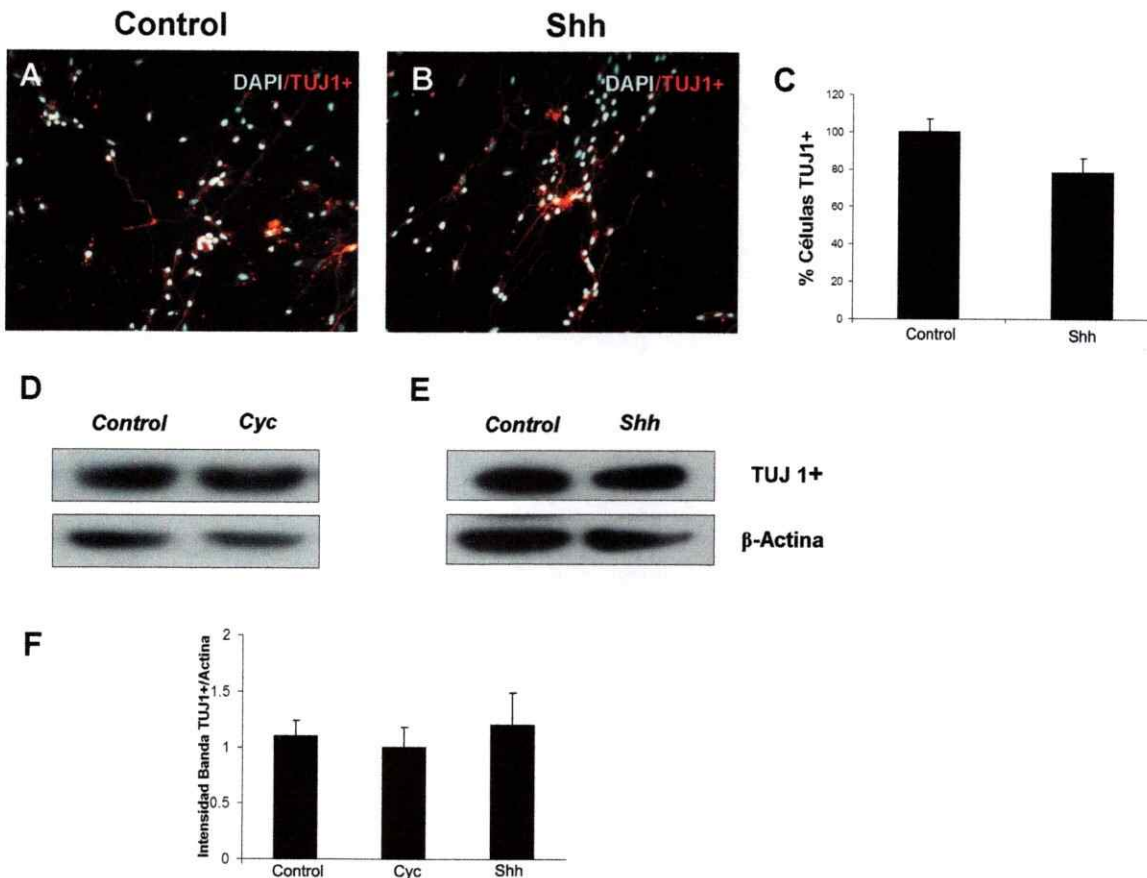


Figura 13. La vía de señalización de Shh no induce cambios en el número de neuronas. Nsp corticales E.18.5 fueron cultivadas durante 5 días en ausencia de factores de crecimiento en presencia (B) o ausencia (A) de Shh. Posteriormente se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpo anti- β III-tubulina (Tuj1+). (C) Gráfica representativa de tres experimentos independientes (n=3), mostrando que no existen diferencias significativas en el porcentaje de células TUJ1+ entre las condiciones A y B. (D,E) WB mostrando la expresión de Tuj1 en explantes control y tratados con cyc 10 μ M o Shh (3 μ g/ml) durante 48 horas. (F) El análisis por densitometría de los WB mostrados en D y E revela que no existen diferencias significativas en la expresión de Tuj1.

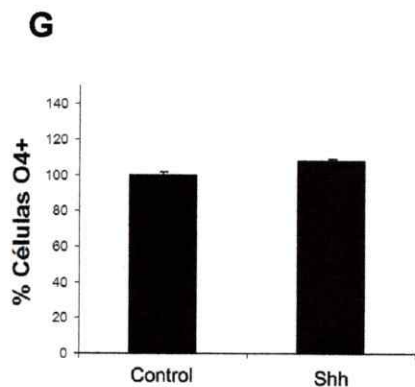
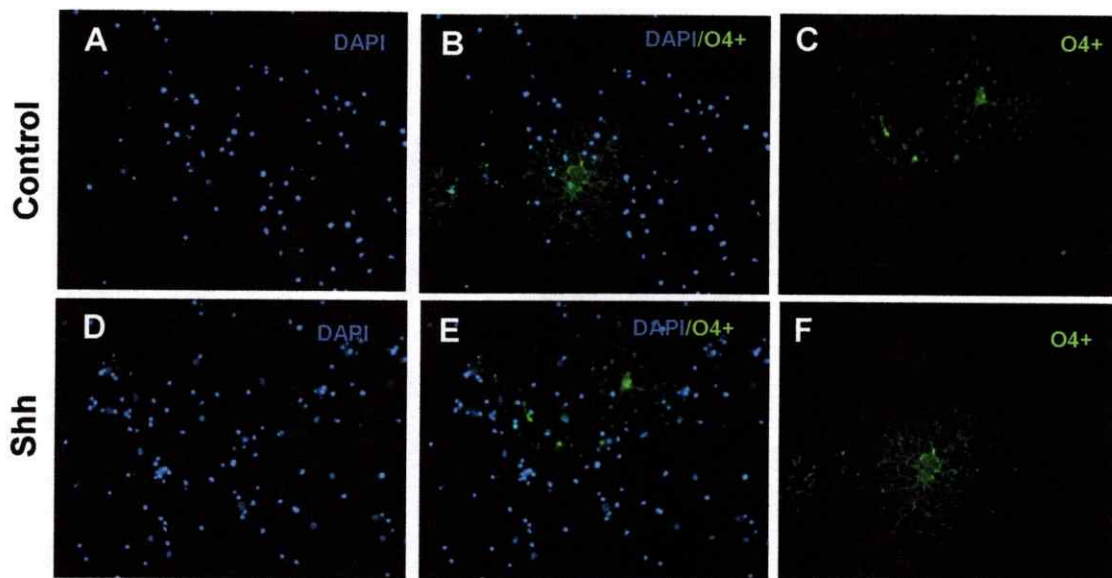


Figura 14. La vía de señalización de Shh no induce cambios en el número de oligodendrocitos. Nsp corticales E.18.5 fueron cultivadas durante 5 días en ausencia de factores de crecimiento en presencia (D,E,F) o ausencia (A,B,C) de Shh. Posteriormente se realizó una inmunofluorescencia con anticuero anti-O4+ (O4+). (G) Gráfica representativa de tres experimentos independientes (n=3), mostrando que no existen diferencias significativas en el porcentaje de células O4+ entre ambas condiciones experimentales

6. DISCUSIÓN.

Las vías de señalización de Shh y EGF cumplen un papel fundamental en "patterning" y proliferación celular tanto en vertebrados como en invertebrados. Como se mencionó anteriormente, Shh regula el número de células neocorticales con propiedades de células troncales (SC) y controla la proliferación de NPCs en forma dependiente de su concentración en cooperación con EGF. Concentraciones elevadas de EGF, no inducen eficientemente cultivos de nsp a partir de NPCs obtenidos de ratones nulos para *Shh*, lo que indica que Shh actúa sobre células que responden a EGF (Palma y Ruiz i Altaba, 2004). Para evidenciar el papel mitogénico de Shh en nsp se necesitan concentraciones mínimas de este factor de crecimiento en el medio de cultivo de nsp. Esto se correlaciona con datos previos de nuestro laboratorio que indican que la vía de señalización de Shh modula la expresión del mensajero de *egfr* "in vitro" e "in vivo" (Palma y Ruiz i Altaba, 2004). Sin embargo, a la fecha aún no está claro como interactúan ambas vías de señalización.

El presente trabajo de tesis doctoral tuvo el propósito de aportar nuevas evidencias que ayuden a esclarecer el mecanismo a través del cual ocurre la interacción entre las vías de señalización de Shh y EGF.

6.1 *Shh, EGF y proliferación celular en la formación del cerebro dorsal.*

La comunicación entre las células dentro del campo del desarrollo, ocurre a través de la liberación de ligandos específicos producidos por determinadas células y requiere de la presencia de receptores de membrana. Las vías de transducción de señales asociadas se conocen con gran detalle, uno de los aspectos que queda por dilucidar se refiere a los mecanismos de interacción entre ellas en relación a procesos específicos, tales como proliferación y diferenciación celular. Tales interacciones pueden ocurrir entre vías de señalización que actúan secuencialmente o en paralelo. En el primer caso, la señal recibida por una célula a través de una vía de señalización activa o inhibe la señal de una vía río abajo. En el caso de vías de señalización paralelas las mismas interactúan en forma directa o convergen a nivel de una proteína clave en la transducción de la señal.

El EGF es un potente mitógeno al cual responden los NPCs en estadios más tardíos del desarrollo de la neocorteza (a partir de E14.5). Cyc contrarresta el efecto proliferativo ejercido por EGF de manera similar a lo que ocurre en ratones nulos para *Shh*. Por sí sólo, *Shh* no es capaz de iniciar un cultivo de nsp, indicando que *Shh* es necesario pero no suficiente para mantener la proliferación celular en NPCs.

Mediante ensayos de proliferación celular en nsp demostramos que tanto cyc como AG1478 disminuyen el efecto proliferativo de EGF (**Figura 4**). Sin embargo, la combinación de ambos inhibidores resulta en un efecto inhibitorio mayor que la presencia de cada uno de ellos por separado. Por lo tanto, *Shh* podría actuar como



un cofactor regulando la proliferación de los NPCs a través de una interacción con la función del EGFR, aunque no podemos descartar un efecto mediado sólo a través de la vía de Shh.

En estudios realizados en *Drosophila melanogaster* se ha demostrado una interacción directa entre las vías de *Hh* y EGF. Durante el desarrollo de la cabeza, *Hh* y *vein (vn)*, que codifica el ligando DER, el homólogo del EGFR en *droshopila* (Schnepp y cols., 1996), se expresan en dominios adyacentes. Experimentos de pérdida y ganancia de función demuestran que *Hh* estimula la expresión de *vn*, a través del dominio carboxilo terminal del efector transcripcional *ci*. Por otra parte, *wingless (wg)* reprime la expresión de *vn* limitando el dominio de señalización de EGFR (Aim y cols., 1999). Además, *Hh* es transportado a través de los axones retinales e induce a los precursores post-sinápticos a expresar DER, los cuales se vuelven competentes para diferenciarse a neuronas (Huang y cols., 1998).

Estos antecedentes nos llevaron a investigar la modulación de la expresión de EGFR mediada por Shh. Encontramos que el mitógeno no solamente regula la expresión del RNAm de *egfr*, como había sido reportado (Palma y Ruiz i Altaba, 2004), sino que ésta regulación también se ve reflejada a nivel de proteína (**Figuras 5 y 6**). Esta modulación en la expresión de EGFR mediada por Shh no solamente fue observada en NPCs corticales. Los datos recopilados en cuanto al papel de Shh en el desarrollo del cerebro medio dorsal (tectum) de ratón, así como experimentos realizados en la línea celular de fibroblastos de ratón C3H10T1/2 (**Figura 7**), permiten concluir que la vía Shh-Gli tiene un papel central en modular la expresión del EGFR.

Más aún, nuestros resultados sugieren que la vía de señalización de Shh por sí sola es capaz de activar la vía de EGF que conduce a la activación de ERK (**Figura 8**). Sin embargo, no descartamos que Shh pueda activar ERK a través de un mecanismo independiente de EGFR.

Durante el desarrollo de la tesis han aparecido algunas publicaciones que validan y complementan de manera importante nuestros resultados realizados en el cerebro embrionario en el contexto de la embriogénesis. En el desarrollo y mantención de la epidermis (en particular las células troncales epiteliales, los queratinocitos), se mostró que la desregulación conjunta de las vías de EGF y Shh conduce al desarrollo de carcinoma de células basales (BCC). Además, describen que la vía de EGF puede modificar la expresión de genes blanco de Gli1 (efector principal de la vía de Shh en mamíferos), cruciales para la progresión del ciclo celular, incluyendo *ciclina D1*, un blanco directo de la vía de Shh-Gli (Kasper y cols., 2006). En el estudio los autores demostraron que en queratinocitos humanos:

- EGF modifica la actividad transcripcional de *gli1*, potenciando la expresión de sólo algunos genes blanco de Gli1, la expresión de *Patched1* (receptor de Shh) y de otros genes que se sabe son blancos directos de Gli1 no se vio afectada por EGF.
- Gli1 regula la proliferación de queratinocitos humanos, por un mecanismo dependiente de la activación de la señal de EGFR.
- La activación de la señal de EGFR es esencial para la progresión a través del ciclo celular inducida por Gli1, lo que indica que la acción combinada de ambas vías (EGF y Shh), promueve la proliferación de queratinocitos mediante la inducción cooperativa de genes de progresión del ciclo celular.

Por otra parte, en una línea celular de queratinocitos (HaCaT) que sobreexpresa Shh, se demostró que Shh induce un aumento en la fosforilación de EGFR llevando al desarrollo de carcinoma de células basales (BCC) (Bigelow y cols., 2005). En tanto, en células parietales gástricas caninas ha sido determinado que EGF regula la expresión y liberación de Shh (resultado que aparentemente no se observa en el cerebro dorsal en desarrollo, datos no mostrados). Además, en este estudio demostraron que Shh regula la expresión del gen de la subunidad *alfa* de la ATPasa H⁺/K⁺, el cual es co-regulado por EGF. La regulación de la expresión de este gen mediada por Shh ocurre a través de elementos respuesta a EGF (ERE), lo que indica que esta regulación ocurre por un mecanismo indirecto. Estos últimos datos indican que Shh parece ser un importante mediador de la acción de EGF en el estómago (Stepan y cols., 2005). Por último, en otro estudio reciente se ha demostrado que las vías de EGF y Shh actúan en forma sinérgica regulando la proliferación de células troncales en la epidermis fetal humana (Zhou y cols., 2006).

Estas evidencias sugieren que el sinergismo entre las vías de EGF y Shh que nosotros encontramos a nivel de cerebro dorsal podría ser más bien un fenómeno generalizado en distintos sistemas celulares.

Mediante un análisis *in silico* del promotor del EGFR no encontramos sitios de unión putativos para las proteínas Gli (GACCACCCA), lo que indicaría que el mecanismo de interacción entre ambas vías de señalización podría ser indirecto. Es posible que Shh induzca la transcripción de otras proteínas o factores de transcripción

responsables de la regulación directa de la expresión de *EGFR* o simplemente, que las proteínas Gli formen parte de un complejo proteico que regula la expresión de *EGFR*.

6.1.1 El efecto proliferativo de *Shh* en NPCs requiere de la activación de *EGFR*.

Los resultados observados en la **Figura 9** demuestran que *Shh* por si sólo es capaz de activar la vía de las MAPK. Esta observación podría ser explicada si *Shh* a través de SMO, su receptor acoplado a proteína G, transactiva a *EGFR* entre otras alternativas.

Un aspecto importante en la regulación de la función del *EGFR*, es el control de la activación del receptor por la disponibilidad de ligando (Dong y cols., 2005). Diferentes ligandos, ya sea como proteínas integrales de membrana o ligandos solubles liberados de la superficie celular por MMP, pueden unirse y activar al *EGFR*.

El proceso de liberación de ligandos de la superficie celular, puede ser regulado por elementos de señalización tales como *Src*, influjo de calcio y PKC (Goishi y cols., 1995, Geschwind y cols., 2001, Izumi y cols., 1998, Soltoff., 1998, Tsai y cols., 1997, Zwich y cols., 1999). Esta propiedad pone al *EGFR*, como un elemento de señalización río abajo de una variedad de receptores de superficie celular (Carpenter., 1999, Guerrero., 2004), principalmente de GPCRs acoplados a Gi o Gq (Carpenter., 1999, Daub y cols., 1997, Daub y cols., 1996, Geschwind y cols., 2001, Hackel y cols., 1999, Wetzker y Bohmer., 2003).

Abundantes evidencias sugieren que los GPCRs pueden ser reguladores importantes del crecimiento celular y bajo ciertas circunstancias pueden actuar como oncoproteínas (Marin y Chen., 2004, Marinissen y Gutkind., 2001, Parnot y cols., 2002)

El efecto inhibitorio en la proliferación celular observado en presencia de GM6001 indica que la respuesta mitogénica de Shh requiere de la transactivación de EGFR y que la proliferación celular inducida por Shh requiere de la actividad de MMP (**Figura 9**). Posiblemente, el mecanismo involucre también, la participación de Src y PKC tal como ha sido descrito en células mamarias MCF-7 (Guerrero y cols., 2004).

Los resultados obtenidos mediante el uso de GM6001 indican que posiblemente la actividad de MMP constituye un elemento río arriba en la señal de Shh mediada por EGFR, debido a que el inhibidor disminuye la respuesta proliferativa de Shh. Sorprendentemente, en este estudio encontramos que la proliferación celular inducida por Shh no fue completamente inhibida en presencia de AG1478 (**Figura 9C**) sugiriendo que Shh también podría inducir proliferación celular a través de un mecanismo independiente de EGFR. Dado que los ligandos EGF y Shh inducen proliferación celular es posible pensar que ambas vías de señalización convergen en algún punto río abajo de EGFR

6.2. EGFR y astrogénesis cortical.

Durante el desarrollo embrionario los NPCs de la neocorteza inicialmente proliferan en la vz para formar luego la svz. Esta transición coincide con el cambio en la generación de tipos celulares de neurogénesis a gliogénesis. Este fenómeno es

acompañado por un incremento sustancial en la expresión de EGFR (Eagleson y cols., 1996, Kornblum y cols., 1997).

Por otra parte, ha sido determinado que la sobreexpresión temprana de EGFR en NPCs de la vz, los cuales expresan bajos niveles de EGFR y dan origen a neuronas que migran a capas específicas de la CP, induce a los mismos a comportarse como NPCs tardíos de la svz que normalmente dan origen a astrocitos .

Bajo condiciones de cultivo apropiadas, la sobre-expresión de EGFR en NPCs de la vz confiere otra propiedad característica de los NPCs de la svz; es decir, la capacidad de formar nsp en respuesta a EGF como mitógeno (Burrows y cols., 1997).

Estas observaciones sugieren que cambios temporales en la expresión (número/densidad) de EGFR en la neocorteza, pueden representar un mecanismo general para modular el comportamiento de los NPCs durante el desarrollo. Estos cambios en la expresión de EGFR no solo determinan si las células responden a una señal extracelular específica en un tiempo determinado durante el desarrollo, si no que también contribuyen a la especificación de su respuestas a estas señales pleiotrópicas (Traverse y cols., 1994).

En la actualidad han sido identificadas varias moléculas intrínsecas que controlan la encrucijada entre neurogénesis y gliogénesis, tales como los factores de transcripción PAX6, hélice-vuelta-hélice básico (bHLH), neurogenina 1 (ngn1) y neurogenina 2 (ngn2), los cuales promueven destino neuronal e inhiben el desarrollo de astrocitos (Sun y cols., 2001, Heins y cols., 2002). Los ngns antagonizan la acción de los transductores y activadores de transcripción de señal (STATs) (Sun y cols., 2001),

los cuales promueven el desarrollo de astrocitos (Bonni y cols., 1997, Rajan y McKay., 1998). Por otra parte, entre las señales extrínsecas que inducen el desarrollo de astrocitos se encuentran: factor inhibidor de leuquemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) y la familia de ligandos de EGF (Gross y cols., 1996, Johe y cols., 1996, Burrow y cols., 1997).

La competencia de los NPCs para interpretar señales inductoras de astrocitos puede ser observada aproximadamente en estadio embrionario E14.5, en el cual los NPCs comienzan a expresar mayores niveles de EGFR.

Considerando la estrecha relación entre la expresión de EGFR y el cambio entre neurogénesis y gliogénesis y teniendo en cuenta que nuestros resultados anteriores muestran que la vía de señalización de Shh modula la expresión de EGFR analizamos el destino de los NPCs activando o inhibiendo la vía de señalización de Shh.

Nuestros resultados indican que Shh tendría un efecto específico sobre el linaje astrocítico en la neocorteza embrionaria murina (**Figuras 10, 11 y 12**) debido a que no se observaron cambios en el porcentaje de neuronas y oligodendrocitos en nuestros experimentos (**Figuras 13 y 14**).

6.2.1 SOX2 y astrogénesis cortical.

En el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados, varios estudios han mostrado que los genes de la familia SoxB1 (Sox1, Sox2 y Sox3), son co-expresados en los neuroepitelios o futuros tejidos neurales y funcionan manteniendo un amplio potencial en el desarrollo y la identidad de las SC neurales (Pevny y cols., 1997, Bylund y cols., 2003, Graham y cols., 2003, Zhao y cols., 2004).

Ratones nulos para *Sox1* (Nishiguchi y cols., 1998) y *Sox3* (Rizzoti y cols., 2004) son viables y sin defectos generales en el SNC, sugiriendo una función redundante de ellos, sin embargo *Sox2* es expresado en SC y NPCs durante el desarrollo, incluyendo NSC (Ferri y cols., 2004) y células gliales que se cree representan SC (Alvarez-Buylla y cols., 2001). Por lo tanto, *Sox2* estaría involucrada en la auto-renovación y proliferación de los precursores (Ferri y cols., 2004).

Los NPCs expresan *Sox2*, a diferencia de lo que ocurre con los neuroblastos ya comprometidos los cuales dejan de expresar *Sox2* una vez que se diferencian a neuronas. La expresión de *Sox2* se mantiene durante la gliogénesis en los NPCs gliales. Es decir, los NPCs gliales mitóticamente activos expresan *Sox2* y dicha expresión sólo se apaga una vez que los mismos se vuelven quiescentes. La ausencia de *Sox2* en neuronas postmitóticas y astrocitos quiescentes establece una relación entre la expresión de *Sox2* astroglial y el ciclo celular (Bani-yaghoub y cols., 2006).

Los resultados mostrados en la **Figura 1 (I,J)** demuestran que *cyc* disminuye la expresión de *Sox2*, lo que demuestra que la vía de señalización de *Shh* modula la proliferación de NPCs.

Por otra parte datos recientes indican que *cyc* afecta la progresión del ciclo celular. Mediante un estudio realizado por citometría de flujo, ha sido demostrado que el tratamiento con *cyc* aumenta significativamente el porcentaje de células en fase G0/G1, concomitantemente con una disminución en el porcentaje de células en fase S y G2/M. Estos datos sugieren que el tratamiento con el inhibidor induce arresto celular en fase G0/G1 (Hu y cols., 2007).

Nuestros resultados son consistentes con lo que ocurre durante el desarrollo debido a que en el estadio del desarrollo embrionario E18.5 ocurre predominantemente la astrogénesis en la corteza. Como se mencionó anteriormente, Shh también modula la proliferación de los NPCs en el tectum. Mediante ensayos de diferenciación celular en NPCs tectales (E18.5), realizados en nuestro laboratorio, ha sido determinado que la vía de señalización de Shh ejerce un efecto específico sobre la diferenciación neuronal sin observarse en este caso cambios significativos en la diferenciación de astrocitos y oligodendrocitos (datos no publicados). Además, existen evidencias que indican que durante el desarrollo postnatal temprano, la sobre-expresión de EGFR en la svz y cuerpo calloso favorece la proliferación de progenitores celulares de oligodendrocitos (OPCs) (Aguirre y cols., 2007) y varios estudios indican que Shh favorece la expansión del linaje oligodendrocítico por lo que parece probable que la interacción entre ambas vías de señalización se mantenga durante diferentes etapas del desarrollo embrionario.

Estos datos indican que durante el desarrollo del SNC, en concordancia con un gradiente de maduración antero-posterior a nivel de las diferentes estructuras cerebrales, Shh estaría presente en los nichos celulares donde residen las NSCs, modulando la proliferación de las mismas y por ende, regulando la aparición de distintos tipos celulares que predominan en un período determinado del desarrollo.

Por otra parte, es posible especular que la vía de señalización de EGFR podría promover el desarrollo de astrocitos por diferentes mecanismos, por ejemplo modulando el destino final de los NPCs, su maduración o proliferación.

Nuestros resultados previos muestran un efecto de la vía de Shh y EGF a nivel de la proliferación de los NPCs en etapas tardías del desarrollo embrionario (E18.5), en conjunto con los hallazgos que revelan que *cyc* induce una disminución en la expresión de GFAP, indicarían que *cyc* podría inducir arresto mitótico en los NPCs que se encuentran proliferando en esa etapa del desarrollo embrionario y en consecuencia también se observa una disminución en la expresión de Sox2 que indica menor proliferación de los NPCs gliales

Finalmente, ha sido reportado que la vía de Shh podría ser activada mediante un aumento en la expresión de reguladores del ciclo celular tales como las ciclinas. Por lo tanto *cyc* podría disminuir la expresión de tales reguladores y como resultado el efecto mitogénico inducido por otros factores de crecimiento, tales como EGF, podría ser afectado.

En conclusión, esta tesis demuestra que existe una interacción entre las vías de señalización de Shh y EGF que se manifiesta en varios niveles de regulación; Shh modula la expresión de EGFR e induce transactivación del EGFR. Los resultados revelan un mecanismo a través de un mecanismo o loop autocrino que no ha sido descrito previamente para Shh (**Figura 15**).

Como se mencionó anteriormente, existen evidencias que indican que cambios en la expresión de EGFR se asocian con cambios en la proliferación de los NPCs. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos plantear que Shh podría regular la expresión de EGFR, lo que se vería reflejado en el número de receptores en la membrana plasmática y en consecuencia, en el número final de células gliales, es decir cambios en la proliferación que se reflejan finalmente en la diferenciación celular.

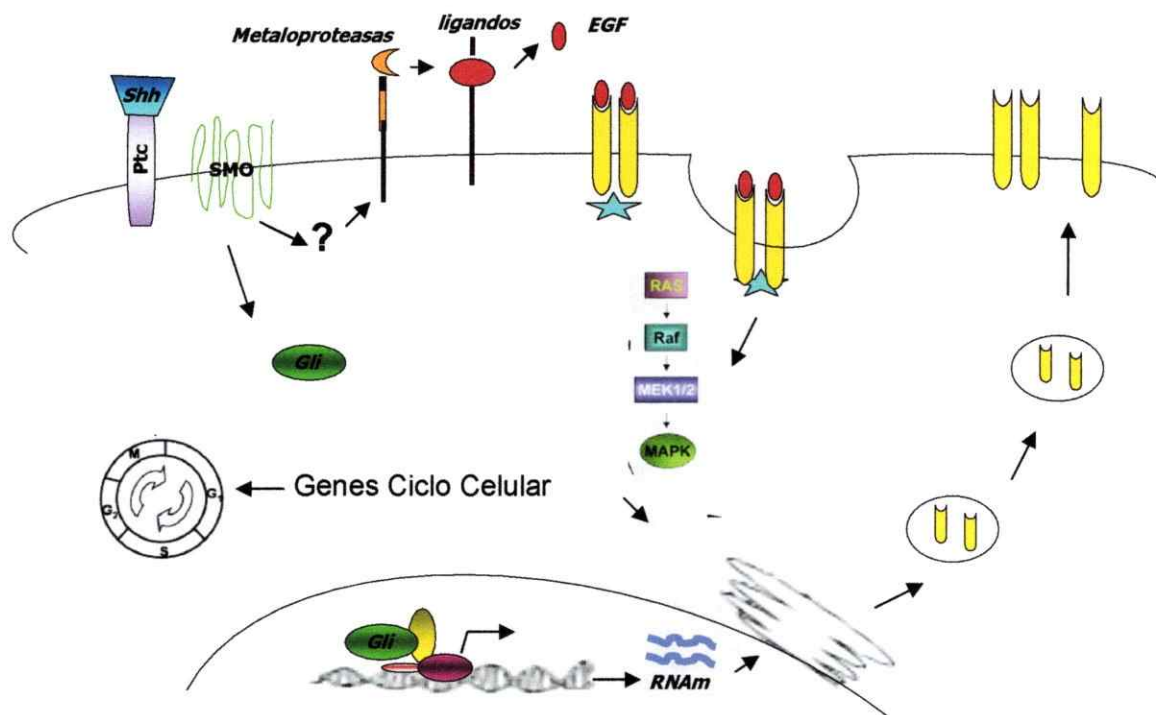


Figura 15. Modelo propuesto. Shh activa a su receptor Smo, luego de unirse a Ptc, activando a las proteínas Gli que regulan la expresión de EGFR, modulando el número de receptores en la membrana plasmática y regulando la proliferación de los NPCS. Por otra parte, Shh activa a EGFR a través de un mecanismo que involucra actividad de MMP.

7. CONCLUSIONES.

- 1)-** Shh modula la expresión de EGFR tanto a nivel de RNAm como de proteína, esta regulación podría ocurrir a través de un mecanismo indirecto.

- 2)-** Ambas vías de señalización (EGF y Shh) modulan la proliferación de los NPCs.

- 3)-** El efecto mitogénico de Shh requiere de la transactivación de EGFR a través de un mecanismo que involucra actividad de MMP que median la liberación de ligandos de la superficie celular.

- 4)-** Existe una interacción entre ambas vías de señalización lo que se traduce finalmente en cambios en la proliferación celular a través de la modulación de la vía de EGF.

- 5)-** En la neocorteza Shh modula la expresión de GFAP y por ende el número de astrocitos durante le embriogénesis tardía en la neocorteza.

- 6)-** En la neocorteza embrionaria tardía Shh no modifica la expresión de otros marcadores de linaje neural (neuronas y oligodendrocitos).

- 7)-** En la neocorteza las vías de señalización de Shh y EGF modulan la proliferación de

una subpoblación de NPCs que son parte de un linaje glial.

7. REFERENCIAS.

Agarwala S., Sanders TA., Ragsdale C W. (2001). Sonic hedgehog control of size and shape in midbrain pattern formation. *Science*. **291**: 2147-2150.

Aguirre A., Dupree JL., Mangin JM., Gallo V. (2007). A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nat Neurosci* **8**: 990-1002.

Aim A., Li Y., Finkelstein R. (1999). Hedgehog activates the EGF receptor pathway during *Drosophila* head development. *Development* **126**: 2623-2630.

Alvarez-Buylla A., García-Verdugo J.M., Tramontin A.D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews Neuroscience* **2**: 287-293.

Aroian R.V., koga M., Mendel J.E., Ohshima Y., Sternberg P.W. (1990). The *let-23* gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosine Kinase of EGF receptor family. *Nature*. **348**: 693-699.

Bani-yaghoub M., Tremblay RG., Lei JK., Zhang D., Zurakowsky B., Sandhu JK., Smith B., Ribocco-Lutkiewicz M., Kennedy J., Walker PR., Sikorska M. (2006). Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev Biol* **295**: 52-66.

Bigelow R., Jen EY., Delehede M., Chari NS., McDonnell TJ. (2005). Sonic hedgehog induces epidermal growth factor dependent matrix infiltration in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol.* **2**: 457-465.

Biscardi J.S., Maa M.C., Tice D.A., Cox M.E., Leu T.H., Parsons S.J. (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem*. **274**: 8335-8343.

Bjorge J.D., Kudlow J.E (1987). Epidermal growth factor receptor synthesis is stimulated by phorbol ester and epidermal growth factor. Evidence for a common mechanism. *J Biol Chem*. **262**: 6615-6622.

Bjorge J.D., Paterson A.J., Kudlow J.E. (1989). Phorbol ester or epidermal growth factor (EGF) stimulates the concurrent accumulation of mRNA for the EGF receptor and its ligand transforming growth factor- α in a breast cancer cell line. *J Biol Chem* **264**: 4021-4027.

Bonni A., Sun Y., Nadal-Vicens M., Bhatt A., Frank DA., Rozovsky I., Stahl N., Yancopoulos GD., Greenberg ME. (1997). Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* **278**: 477-483.

Burgees A.W., Cho H.S., Eigenbrot C., Ferguson K.M., Garret T.P.J., Leahy D.J., Lemmon M.A., Silwkowski M.X., Ward C.W., Yokoyama S. (2003). A open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. **12**: 541.

Buvinic S., Bravo-Zehnder M., Boyer J.L., Huidobro-Toro J.P., González A. (2007). Nucleotide P2Y1 receptor regulates EGF receptor mitogenic signaling and expression in epithelial cells. *J Cell Sci*. **120**: 4289-4301.

Brewster R, Lee J, Ruiz i Altaba A. (1998). Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature*. **393**: 579-583.

Burrows RC., Wancio D., Levitt P., Lillien L. (1997). Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in EGF-R expression cortex. *Neuron*. **19**: 251-267.

Bylund M., Andersson E., Novitsch BG., Muhr J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci*. **6**: 1162-1168.

Cameron HA., Hazel TG., McKay RD. (1998). Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol*. **36**: 287-306.

Carpenter G., Cohen S. (1976). ¹²⁵I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization and degradation in human fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **71**: 159-171.

Carpenter G. (1987). Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 881-914.

Carpenter G (1999). Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol* **146**: 697-702.

Carpenter G (2000). EGF receptor transactivation mediated by the proteolytic production of EGF-like agonists. *Sci STKE* **2000**:PE1.

Casalini P., Iorio M.V., Galmozzi E., Menard S. (2004). Role of HER receptors family in development and differentiation. *J. Cell. Physiol.* **200**: 343-350.

Chang C., Sternberg P.W. (1999). C.elegans vulval development as a model study the cancer biology of EGFR signaling. *Cancer Metastasis Rev* **18**: 203-213.

Cheng J, Dutra A, Takesono A, Garrett-Beal L, Schwartzberg PL.(2005).Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum-free media. *Genesis* **39**: 100-104.

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

Dahmane N., Ruiz i Altaba A. (1999) Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* **126**: 3089-31100.

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

Daub H., Weiss FU., Wallasch C., Ullrich A (1996).Role of transactivation of EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**: 557-560.

Daub H., Wallasch C., Lankenau A., Herrlich A., Ullrich A. (1997). Signal characteristics of G transactivated EGF receptor. *EMBO.J* **16**: 7032-7044.

Doetsch F., García-Verdugo JM., Alvarez-Buylla A.(1997).Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* **17**: 5046-5061.

Doetsch F. (2003). The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* **6**: 1127-1134.

Dong J.,Opresco L.K., Chrisler W., Orr G., Quesenberry R.D., Lauffenburger D.A, Wiley H.S (2005). The membrane-anchoring domain of epidermal growth factor receptor ligands dictates their ability to operate in juxtacrine mode. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2984-2998.

Eagleson, K.L., Ferri R.T., Levitt.P.(1996).Complementary distribution of collagen type IV and the epidermal growth factor receptor in the rat embryonic telencephalon. *Cerebral Cortex* **6**: 540-549.

Earp HS., Austin KS., Blaisdell J., Rubin RA., Nelson KG., Lee LW., Grisham JW. (1986). Epidermal growth factor (EGF) stimulates EGF receptor synthesis. *J Biol Chem* **261**: 4777-4780.

Faúndez V., Krauss R., Holuique L., Garrido J., González A. (1992). Epidermal growth factor receptor in synaptic fractions of the rat central nervous system. *J Biol Chem* **267**: 20363-20370.

Ferri RT., Levitt P. (1995). Regulation of regional differences in the differentiation of cerebral cortical neurons by EGF family-matrix interactions. *Development* **121**: 1151-1160.

Ferri RT., Eagleson KL., Levitt P. (1996). Environmental signals influence expression of a cortical areal phenotype in vitro independent of effects on progenitor cell proliferation. *Dev. Biol.* **175**: 184-190.

Ferri AL., Cavallaro M., Braida D., Di Cristofano A., Canta A., Vezzani A., Ottolenghi S., Pandolfi PP., Sala M., DeBiasi S., Nicolis SK. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* **131**: 3805-3819.

Fuchs E., Tumber T., Guasch G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* **116**: 605-631.

Fischer OM., Hart S., Gschwind A., Ullrich A. (2003). EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans* **31**: 1203-1208.

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

Gage FH., Kempermann G., Palmer T., Peterson D.A., Ray J. (1998). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J. Neuroscience* **36**: 249-266.

Gage FH. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* **287**: 1433-1438.

Garcion E., Halilagic A., Faissner A., French-Constant C. (2004). Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* **131**: 3423-3432.

Goishi K., Higashiyama S., Klagsbrun M., Nakano N., Umata T., Ishikawa M., Mekada E., Taniguchi N. (1995). Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity. *Mol. Biol. Cell* **6**: 967-980.

Graham V., Khudyakkov J., Ellis P., Pevny L.(2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**: 749-765.

Gritti A., Frolichsthal-Schoeller P., Galli R., Parati EA., Cova L.(1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J. Neurosci* **19**: 3287-3297.

Gross RE., Mehler MF., Mabie PC., Zang Z., Santschi L., Kessler JA. (1996) Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* **17**: 595-606.

Gschwind A., Zwick E., Prenzel N., Leserer M., Ullrich A. (2001). Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* **20**: 1594-1600.

Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Munsterberg A., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed gene. *Nature* **346**: 245-250.

Guerrero, J., Santibañez, J.F., González, A., Martínez, J.(2004).EGF receptor transactivation by urokinase receptor stimulus through a mechanism involving Src and matrix metalloproteinases.*Experimental. Cell.Research.* **292**: 201-208.

Guimerá J., Casas C., Pucharcos C., Solans A., Domenech A., Planas AM., Ashley J., Lovett M., Estivill X and Pritchard MA. (1996). A human homologue of Drosophila minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet* **5** : 1305-1310.

Hackel PO., Zwick E., Prenzel N., Ullrich A. (1999). E pidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 184-189.

Haigler H.T., McKanna J.A., Cohen S. (1979). Direct visualization of the binding and internalization of ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431.*J.Cell.Biol.* **81**: 382-395.

Hammerle B., Vera-Samper E., Speicher S., Arencibia R., Martínez S., Tejedor FJ. (2002). *Mnb/Dyrk1A* Is Transiently Expressed and Asymmetrically Segregated in Neural Progenitor Cells at the Transition to Neurogenic Divisions. *Dev Biol* **246**: 259-273.

Hammerschmidt M., Brook, A., McMahon AP. (1997) The world according to hedgehog. *Trends Genet* **13**: 14-21.

Hirata J., Nakagoshi H., Nabeshima Y and Matsuzaki F.(1995).Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* **377**: 627-630.

Hitoshi S., et al. (2002). Neural Stem Cells lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. *Development* **129**: 233-244.

Hu W.G., Liu T., Xiong J.K., Wang C.Y. (2007). Blockade of sonic hedgehog pathway enhances antiproliferative effect of EGFR inhibitor in pancreatic cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* **28**: 1224-1230.

Huang Z., Shilo BZ., Kunes S. (1998). A retinal axon fascicle uses spitz, an EGF receptor ligand, to construct a synaptic cartridge in the brain of *Drosophila*. *Cell* **95** : 693-703.

Hynes M., Stone DM., Dowd M., Pitts-Meek S., Goddard A., Gurney A., Rosenthal A. (1997).Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. *Neuron* **19**, 15-26.

Hynes M., Ye W., Wang K., Stone D., Murone M., Sauvage F., Rosenthal A. (2000) The seven transmembrane receptor smoothed cell-autonomously induces multiple ventral cell types. *Nat Neurosci* **3**: 41-46.

Izumi Y., Hirata M., Hasuwa H., Iwamoto R., Umata T., Miyado K., Tamai Y., Kurisaki T., Sehara-Fujisawa A., Ohna S., et.al. (1998). A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Embo J* **17**: 7260-7272.

Iwamoto R., Mekada E. (2000). Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**: 335-344.

Jessell TM. (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signal and transcriptional codes. *Nat.Rev.Genet* **1**: 20-29.

Johe KK., Hazel TG., Muller T., Dugich-Djordjevic MM., McKay RD. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes. Dev.* **10**: 3129-3140.

Kaplan M and Bell D.(1984).Mitotic neuroblast in the 9 day old and 11 month old rodent hippocampus. *J Neuroscience* 4: 1429-1441.

Kasper M., Schnidar H., Neill GW., Hanneder M., Klingler S., Blaas L., Schmid C., Hauser-Kronberger C., Regl G., Philpott MP., Aberger F. (2006). Selective modulation of Hedgehog/GLI target gene expression by epidermal growth factor signaling in human keratinocytes. *Mol Cell Biol* 26: 6283-6298.

Kentrup H., Becker W., Heukelbach J., Wilmes A., Schurmann A., Huppertz C., Kainulainen H., Joost H.G. (1996). Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* 271: 3488-3495.

Kessarlis N., Jamen F., Rubin LL.,Richardson WD. (2004).Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors.*Development*. 13: 1289-1297.

Khun HG., Winkler j., Kemperman G., Thal LJ., Gage FH. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17: 5820-5829.

Kilpatrick TJ and Bartlett PF.(1993). Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation. *Neuron* 10: 255-265.

Kilpatrick TJ., Bartlett F. (1995). Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF. *J Neurosci* 15: 3653-3661.

Kinzler KW., Ruppert JM., Bigner SH, Vogelstein B. (1989). The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* 332, 371-374.

Knoblich JA.,Jan LY and Jan YN.(1995).Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* 377: 624-627.

Kohtz JD., Baker DP.,Corte G., Fishell G. (1998). Regionalization within the mammalian telencephalon is mediated by changes in responsiveness to Sonic Hedgehog. *Development* 125: 5079-5089.

Koopman P. (1999). Sry and Sox9: mammalian testing-determining genes.*Cell. Mol. Life. Sci* 55: 839-856.

Kornblum HI, Hussain RJ, Bronstein J M., Gall CM., Lee DC., Seroogy KB. (1997). Prenatal ontogeny of the epidermal growth factor receptor and its ligand, transforming growth factor alpha, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **380**: 243-261.

Kornblum HI., Hussain R., Wiesen J., Miettinen P., Zurcher SD., Chow K., Derynck R., Werb Z. (1998). Abnormal astrocyte development and neuronal death in mice lacking the epidermal growth factor receptor. *J. Neurosci. Res.* **53**: 697-717.

Kodama H., Fukuda K., Takahashi T., Sano M., Kato T., Tahara S., Hakuno D., Sato T., Manabe T., Konishi F., Oqawa S. (2002). *J Mol Cell Cardiol* **34**: 139-150.

Kriegstein A., Noctor S., Martínez-Cerdeño V. (2006). Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nature Reviews Neuroscience.* **7**: 883-890.

Lai K., Kaspar BK., Gage FH., Schaffer DV. (2003). Sonic Hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* **6**: 21-27.

Laudet V., Stehelin D., Clevers H. (1993). Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res.* **21**: 2493-2501.

Li L., Xie T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 605-631.

Lillien LE., Sendtner M., Rohrer H., Hughes SM., Raff MC. (1988). Type-2 astrocyte development in rat brain cultures is initiated by a CNTF-like protein produced by type-1 astrocytes. *Neuron.* **1**: 485-494.

Lillien L. (1995). Changes in retinal cell fate induced by overexpression of EGF receptor. *Nature.* **377**: 158-162.

Lillien L and Wancio D. (1998). Changes in epidermal growth factor receptor expression and competence to generate glia regulate timing and choice of differentiation in the retina. *Mol. Cell. Neurosc.* **10**: 296-308.

Lillien L., Raphael H. (2000). BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells. *Development.* **127**: 4993-5005.

Lendahl U., Zimmerman L.B., McKay R.D.G. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**: 585-595.

Marigo V., Johnson RL., Vortkamp A., Tabin CJ. (1996). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol* **180**: 273-283.

Marin YE., Chen S. (2004). Involvement of metabotropic glutamate receptor 1, a Gprotein coupled receptor, in melanoma development. *J Mol Med* **82**: 735-749.

Marinissen MJ., Gutkind JS. (2001). G-protein-coupled receptors and signalling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **58**: 368-376.

Marmor MD., Skaria KB., Yarden Y. (2004). Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int j Radiat Oncol Biol Phys* **58**: 903-913.

Marshall G.P 2 nd., Reynolds B.A., Laywell E.D. (2007). Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo. *Curr Pharm Biotechnol* **8**: 141-145.

Massagué J., Pandiella A. (1993). Membrane-anchored growth factors. *Ann Rev Biochem.* **62**: 515-541.

Mayer-Proschel M., Kalyani A., Mujtaba T., Rao MS.(1997). Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial ítem cells. *Neuron* **19**: 773-785.

McKay R. (1997). Stem Cell in the central nervous system. *Science* **276**: 66-71.

Mehler MF., Mabie PC., Zhu G., Gokhan S., Kessler JA. (2000). Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate. *Dev. Neurosci.* **22**: 74-85.

Molne M., Studer L., Tabar V., Ting YT.,Eiden MV., McKay RD. (2000). Early cortical precursors do not undergo LIF-mediated astrocytic differentiation. *J. Neurosci. Res.* **59**: 301-311.

Morrison SJ., Shah NM., Anderson DJ.(1997).Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* **88**: 287-298.

Nakagawa Y., et.al (1996). Roles of cell-autonomous mechanisms for differential expression of region-specific transcription factors in neuroepithelial cells. *Development* **122**: 2449-2464.

Nishiguchi S, Wood H, Kondoh H, Lovell-Badge R, Episkopou V. (1998). Sox1 directly regulates the gamma-crystallin genes and is essential for lens development in mice. *Genes Dev* **12**: 776-781.

Orentas DM., Miller RH. (1996). The origin of spinal cord oligodendrocytes is dependent on local influences from the notochord. *Dev Biol* **177**: 43-53.

Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**: 335-344.

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

Parnot C., Miserey-Lenkei S., Bardin S., Corvol P., Clauser E. (2002). Lesson from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* **13**: 336-343.

Pevny L., Rao MS. (2003). The stem-cell menagerie. *TRENDS in Neurosciences* **26**: 351-359.

Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**: 884-888.

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

Qian X., Shen Q., Goderie SK., He W., Capela A., Davis AA., Temple S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* **28**: 69-80.

Rajan P, McKay RD. (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* **18**: 3620-3629.

Reynolds B.A., Weiss S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**: 1707-1710.

Reynolds BA., Weiss S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* **175**: 1-13.

Rizzoti K., Brunelli S., Carmignac D., Thomas PQ., Robinson IC., Lovell-Badge R. (2004). SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nat Genet* **36**: 247-255.

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. (1999a). Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. *Trends in Genetics* **15**: 418-425.

Ruiz i Altaba A. (1999c). Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* **126**: 3205-3216.

Ruiz i Altaba A., Palma V and Dahmane N. (2002). Hedgehog-Gli signaling and growth of the brain. *Nature Review Neuroscience* **3**: 24-33.

Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* **19**: 183-232.

Salmon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. (1987). *Science* **235**: 177-182.

Sasai Y. (2001). Roles of Sox factors in neural determination: conserved signaling in evolution?. *Int J Dev Biol.* **45**: 321-326.

Schaudies M.P., Grimes J., Davis D., Rao RK., Koldovský O. (1989). EGF content in the gastrointestinal tract of rats: effect of age and fasting/feeding. *Am J Physiol* **256**: G856-861.

Schlessinger J. (2000). New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell* **100**: 293-296.

Schlessinger J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**: 669-672.

Schmechel D.E., Rakic P.A. (1979). Golgy study of radial glia cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol* **156**: 115-152.

Schnepp, B., Grumblin, G., Donaldson, T., Simcox, A. (1996). Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev.* **10**: 2302-2313.

Schweitzer R., Shilo B.Z., (1997). A thousand and one roles for the *Drosophila* EGF receptor. *Trends Genet* **13**: 191-196.

Sefton B.M., Hunter T. (1984). Tyrosine protein kinases. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **18**: 195-226.

Shindoh N., Kudoh J., Maeda H., Yamaki A., Minoshima S., Shimizu Y and Shimizu N. (1996). Cloning of human homolog of the *Drosophila* minibrain/rat Dyrk gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21. *Biochem Biophys Res* **225**: 92-99.

Soltoff S P., Avraham H., Avraham S., Cantley L.C. (1998). Activation of P2Y2 receptors by UTP by ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* **273**: 2653-2660.

Spana EP and Doe CQ. (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* **121**: 3187-3195.

Spana EP., Kopczynski C., Goodman CS and Doe CQ. (1995). Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in *Drosophila* CNS. *Development* **121**: 3489-3494.

Stepan V., Ramamoorthy S., Nitsche H., Zavros Y., Merchant J.L., Todisco A. (2005). Regulation and function of the sonic hedgehog signal transduction pathway in isolated gastric parietal cells. *J Biol Chem* **280**: 15700-15708.

Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., Greenberg, M.E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell*. **104**: 365-376.

Taipale J., Chen JK., Cooper MK., Wang B., Mann RK., Milenkovic L., Scott MP., Beachy PA. (2000). Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**: 1005-1009.

Tejedor F., Zhu XR., Kaltenbach E., Ackermann A., Baumann A., Canal I., Heisenberg M., Fischbach KF and Pongs O. (1995). Minibrain: A new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* **14**: 287-301.

Thompson D.M., Gill G.N. (1985). The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy. *Cancer Surv* **4**: 767-788.

Traverse S., Seedorf K., Paterson H., Marshall CJ., Cohen P., Ullrich A. (1984). EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol* **4**: 694-701.

Tropepe V., Sibilio M., Ciruna BG., Rossant J., Wagner EF., et al. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol*. **208**: 166-188.

Tsai W., Morielli A D., Peralta EG., (1997). The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *Embo J* **16**: 4597-4605.

Viti J., Feathers A., Phillips J., Lillien L. (2003). Epidermal growth factor receptors control competence to interpret leukemia inhibitory factor as an astrocyte inducer in developing cortex. *J. Neurosci.* **23**: 3385-3393.

Voigt T. (1989). Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol*. **289**: 74-88.

Watanabe Y., Nakamura H. (2000). Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by Sonic hedgehog. *Development*. **127**: 1131-1140.

Watt FM., Hogan BL. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**: 1427-1430.

Wetzker R., Bohmer FD. (2003). Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MARK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 651-657.

Wijgerde M., McMahon J.A., Rule M., McMahon A.P. (2002) A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes Dev* 16: 2849-2864. Yamada M., Ikeuchi T., Hatanaka H. (1997). The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol* 51: 19-37.

Yarden Y., Sliwkowski M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2: 127-137.

Zhao S., Nichols J., Smith AG., Li M. (2004). SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol Cell Neurosci* 27: 332-342.

Zhou JX., Jia LW., Liu WM., Miao CL., Liu S., Cao YJ., Duan EK. (2006). Role of sonic hedgehog in maintaining a pool of proliferating stem cells in the human fetal epidermis. *Hum Reprod* 21: 1698-1704.

Zwick E., Wallasch C., Daub H., Ullrich A. (1999). Distinct calcium dependent pathways of epidermal growth factor receptor transactivation and PYK2 tyrosine phosphorylation in PC12 cells. *J Biol Chem* 274: 20989-20996.