

UCH - FC
Biotecnología
058
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



“Papel de la vía de señalización Sonic hedgehog/Gli en el crecimiento del tectum del embrión de pez cebra (*Danio rerio*)”



Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

MARITZA OÑATE VALENZUELA

Directora de Seminario de Título: Dra. Verónica Palma Alvarado

Diciembre 2010

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.:

MARITZA GABRIELA BEATRIZ OÑATE VALENZUELA

Titulado:

“Papel de la vía de señalización Sonic hedgehog/Gli en el crecimiento del tectum del embrión de pez cebra (*Danio rerio*)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dra. Verónica Palma Alvarado
Directora Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Alejandro Roth Metcalfe
Presidente Comisión

Dr. Miguel Allende Connelly
Evaluador





Nací un 7 de Abril de 1987 en Concepción, lugar que conocí poco ya que un par de meses después partimos con mis padres a Santiago en donde nos instalamos hasta el día de hoy.

Cursé mi enseñanza básica en el Colegio Compañía de María, en donde, a los 13 años supe que existía el área que siempre había querido estudiar, la Biotecnología.

A los 14 años llegué al Colegio Pedro de Valdivia en donde conocí a personas increíbles, incluyendo a mi profesora de Biología quien me incentivó a acercarme aún más al camino de la Ciencia.

Al terminar la etapa escolar y firme con el plan que había decidido 4 años atrás, me matriculé en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en el lugar que sería mi segundo hogar por los siguientes años, la Facultad de Ciencias.

En el transcurso de la carrera conocí a mis estimados compañeros bioteks, con quienes compartí días de estudio, noches de carrete y las mejores excursiones de mi vida.

Así fue como en una clase de Biología Molecular decidí ingresar al Laboratorio de la Dra. Palma en donde me encontraría con el área de la Biología más elemental, apasionante y desconocida por mí; la Biología del Desarrollo.

Finalmente hoy termino una gran etapa de mi vida fundamentada principalmente en la pasión por la ciencia y el trabajo científico, decidida a continuar por este camino.



AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a la Juli, el Julio, la Toto, el Dieguito y el Momin por el amor, apoyo e incentivo incondicional durante todos estos años.

A Jorge, por su compañía, amor, apoyo y paciencia infinita.

A la Profe Vero por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por guiarme durante todo este proceso.

A mis compañeros del VP Lab, especialmente a Polo, Claudio, Pablo y Joao por tener la disposición, paciencia y buena voluntad de enseñarme gran parte de lo que aprendí en el laboratorio.

A todos los compañeros del Laboratorio de Biología del Desarrollo, a los colegas de MA y AG Lab.

A mis amigas de toda la vida, Carmen, Valentina y Andrea, por compartir tantos lindos momentos y mantenernos unidas hasta el día de hoy.

A mis amigos Bioteks, por todos los momentos vividos durante estos 5 años tanto dentro como fuera de la U.



Con cariño
a mi familia

I. ÍNDICE



I.1 Índice de contenidos

PORTADA	i
AUTOBIOGRAFÍA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
I.ÍNDICE	v
I.1 Índice de contenidos	vi
I.2 Índice de figuras	vii
I.3 Lista de abreviaturas	viii
II.RESUMEN	ix
III.ABSTRACT	x
IV.INTRODUCCIÓN	1
Familia de proteínas Hedgehog (Hh)	2
Cascada de transducción de Shh/Gli	3
Recepción y transducción de la señal	3
Control transcripcional: proteínas Gli	6
Shh y proliferación en el cerebro dorsal	7
Tectum óptico como sistema de estudio	8
El pez cebra como modelo de estudio	10
Cepas mutantes de peces para la vía de señalización de Shh/Gli	10
Propuesta	13
Hipótesis	14
Objetivo General	14
Objetivos Específicos	14
V.MATERIALES Y MÉTODOS	15
V.1 Materiales y reactivos	15
V.2 Material Biológico	15
V.3 Tratamientos farmacológicos con ciclopamina y purmorfamina	16



V.4 Síntesis de ribosondas marcadas con digoxigenina	17
V.5 Hibridación in situ (ISH), inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IHQ) en embrión completo	17
V.6 Secciones de embriones incluidos en gelatina	19
V.7 Criosecciones de embriones embebidos en OCT	19
V.8 Conteos celulares y análisis estadístico	20
VI.RESULTADOS	21
Componentes esenciales de la vía de Shh/Gli se expresan en el tectum óptico durante la embriogénesis del pez cebra.	22
El <i>patterning</i> en mutantes <i>smu</i> , <i>dtr</i> y <i>yot</i> no se ve severamente alterado.	24
Ausencia de la vía de Shh/Gli en mutantes disminuye la proliferación en el tectum.	29
Inhibición farmacológica de la vía de Shh/Gli disminuye la proliferación en el tectum óptico.	30
La vía de señalización de Shh/Gli regula la proliferación en el tectum óptico durante la embriogénesis.	23
VII.DISCUSIÓN	38
La vía de señalización de Shh/Gli se expresa en regiones proliferativas del tectum óptico	38
Shh modula la proliferación en el tectum	40
Shh actúa sobre una subpoblación de progenitores <i>sox2</i> (+)	42
La vía de Shh/Gli modula la proliferación tectal durante la embriogénesis del pez cebra	43
Proyecciones e investigación futura	44
VIII.CONCLUSIÓN	45
IX.BIBLIOGRAFÍA	46
X.MATERIAL SUPLEMENTARIO	52



1.2 Índice de figuras

Figura 1. Cascada de señalización de Shh/Gli.	5
Figura 2. Estructura del tectum óptico en el embrión de pez cebra de 48hpf	9
Figura 3. Cepas mutantes <i>smu</i> , <i>dtr</i> y <i>yot</i> presentan defectos en componentes de la vía de señalización de Shh/Gli.	12
Figura 4. Patrón proliferativo en la embriogénesis del tectum óptico del pez cebra.	22
Figura 5. Los componentes de la vía de señalización de Shh/Gli se expresan en regiones proliferativas del tectum óptico durante la embriogénesis del pez cebra.	24
Figura 6. Estructuras dorsales del cerebro medio están presentes en embriones mutantes <i>smu</i> , <i>dtr</i> y <i>yot</i> .	28
Figura 7. La ausencia de componentes de la vía de señalización de Shh/Gli disminuye la proliferación en el tectum.	31
Figura 8. La inhibición farmacológica de la vía de señalización de Shh/Gli disminuye la proliferación.	32
Figura 9. Efecto específico de la vía de señalización de Shh/Gli sobre la proliferación en el tectum óptico.	34
Figura 10. La vía de señalización de Shh/Gli regula la proliferación del tectum durante la embriogénesis tardía.	37
Figura S1. Efectividad de los tratamientos farmacológicos sobre la vía de señalización de Shh/Gli.	52

1.3 Lista de abreviaturas

<i>cyc</i>	Ciclopamina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>dtr</i>	detour
EtOH	Etanol
H3P	Histona 3 fosforilada
hpf	horas post-fertilización
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
MHB	<i>Midbrain-hindbrain boundary</i>
PBS	Solución tampón fosfato
PBST	Solución tampón fosfato con 0,1% de Tween-20
PFA	Paraformaldehído
Ptc	Patched
pur	Purmorfamina
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
<i>smu</i>	slow-muscle ommited
SNC	Sistema Nervioso Central
T.O	Tectum óptico
<i>WT</i>	<i>wild type</i> (silvestre)
<i>yot</i>	<i>you-too</i>

II. RESUMEN

A pesar del progreso considerable que se ha alcanzado en la investigación del desarrollo del sistema nervioso, los mecanismos que controlan la proliferación y diferenciación a partir de progenitores neurales, y la posterior integración funcional de los distintos tipos celulares dentro de los circuitos adultos están lejos de ser comprendidos. Dada la complejidad del cerebro de mamíferos, resulta conveniente utilizar otros modelos vertebrados para el estudio de la neurogénesis, permitiendo estudiar tanto la composición celular del microambiente como los factores involucrados. En particular, nos interesó investigar el posible control de la proliferación celular mediada por Sonic Hedgehog (Shh) utilizando como sistema de estudio el tectum óptico (mesencéfalo dorsal) del pez cebra. Observamos que la proliferación celular en el tectum óptico es dependiente de la señalización de Shh; el aumento de función de la vía de Shh mediante tratamientos farmacológicos con purmorfamina produce un aumento significativo en la proliferación celular. Contrariamente, la inhibición de la vía utilizando mutantes que carecen de elementos clave y por medio de tratamientos farmacológicos utilizando ciclopamina, inducen una reducción en la proliferación celular del tectum. Además, la presencia de elementos esenciales de la vía de Shh revela por primera vez una expresión dorsal tardía en el tectum embrionario. Nuestras observaciones indican que la vía canónica de Shh cumple un papel en el proceso de neurogénesis en el tectum del pez cebra, entregando datos comparativos para comprender el mecanismo de proliferación celular y su relación con Shh.

III. ABSTRACT

Despite considerable progress, the mechanisms that control neural progenitor proliferation and differentiation, as well as their functional integration into adult neural circuitry are far from being understood. Given the complexity of the mammalian brain, non-mammalian models provide an excellent opportunity to study neurogenesis, allowing access to the cellular composition of the neurogenic microenvironment, and the factors required for precursor growth and maintenance. In particular we studied the control of progenitor proliferation by Sonic hedgehog (Shh) in zebrafish optic tectum, OT (dorsal mesencephalon). Here we show that inhibition by cyclopamine or elimination of Shh signaling in mutants lacking essential components of the Shh pathway reduces neural progenitor proliferation in the OT. On the contrary, pharmacological gain-of-function experiments by purmorphamine results in a significant increase in progenitor proliferation. Characterization of the expression of essential Shh pathway components reveals for the first time their late dorsal expression in zebrafish embryonic OT. Our observations strongly suggest a role of Shh in OT neurogenesis and provide comparative data to our current understanding of progenitor cells mechanisms and their relation with Shh signaling.

IV. INTRODUCCIÓN

Los circuitos neurales se ensamblan con una precisión extraordinaria durante el desarrollo embrionario. En el Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados este programa de desarrollo comienza con la proliferación y diferenciación de distintas clases neuronales a partir de células troncales y progenitores ubicados a lo largo del tubo neural. Esta tarea está comandada por moléculas denominadas morfógenos, señales producidas y secretadas por una fuente localizada que forman un gradiente de concentración y determinan el destino celular dependiendo de la señal que percibe la célula que responde. De esta forma, la concentración del morfógeno otorga a las células información posicional que permite la formación de distintos tipos celulares de acuerdo al establecimiento de patrones o *patterning* producto de las diferentes señales secretadas (Gurdon & Bourillot, 2001; Ashe & Briscoe, 2006).

Se han descrito varias familias de moléculas que actúan como morfógenos encargadas de la formación, compartimentalización y crecimiento de las distintas estructuras que conforman el SNC. Entre ellas se encuentran las vías de señalización mediadas por las moléculas secretadas *wingless/int-1* (Wnt), Factor de crecimiento fibroblástico (*Fibroblast growth factor, Fgf*), proteína morfogenética de hueso (*Bone morphogenetic protein, Bmp*) y Hedgehog (Hh), entre otras. Estos mecanismos moleculares se encuentran conservados entre los diferentes organismos permitiendo la formación de estructuras diversas y especializadas para cada grupo de vertebrados (Ulloa & Briscoe, 2007).

Familia de proteínas Hedgehog (Hh)

Como se mencionó anteriormente, la glicoproteína Hedgehog (Hh) es uno de los morfógenos más importantes, encargado de múltiples procesos imprescindibles en el desarrollo a lo largo del reino animal. La señalización por Hh cumple un papel fundamental en el desarrollo de diferentes organismos desde *Drosophila* hasta el ser humano, regulando la diferenciación y el crecimiento celular de distintos tipos celulares en una variedad de tejidos y órganos. Además está involucrada en el control de la proliferación de las células troncales en el adulto y la activación aberrante de esta cascada se ha relacionado con múltiples tipos de cáncer en humanos (Taipale & Beachy, 2001; Varjosalo & Taipale, 2007).

Se han identificado tres genes Hh en mamíferos; Desert hedgehog (Dhh), Indian hedgehog (Ihh) y Sonic hedgehog (Shh), lo cuales se expresan en diferentes tejidos a lo largo del desarrollo, pero actúan a través de la misma vía de señalización, siendo Shh el que actúa a lo largo del SNC.

Durante el desarrollo embrionario Shh es inducido desde la notocorda en la placa del piso del tubo neural de donde es secretado formando un gradiente de concentración sobre la mitad ventral, otorgando distintas identidades a las células y dando origen a los diferentes tipos neuronales que formarán el futuro SNC (Jessell, 2000). Sin embargo, existe evidencia reciente de que Shh además tiene un papel más tardío en el desarrollo promoviendo la proliferación celular.

Cascada de transducción de Shh/Gli

Como mencionamos anteriormente Shh es una proteína secretada, que sufre una serie de modificaciones post-traduccionales que terminan en la liberación de Shh por parte de la célula secretora. Los mecanismos de procesamiento y secreción de las proteínas Hh parecen estar conservados evolutivamente entre diferentes organismos y en todas las isoformas existentes.

Primeramente se producen varias modificaciones en donde el péptido precursor de la proteína sufre autoprosesamiento, una reacción de palmitoilación y la posterior adición de una molécula de colesterol. Finalmente la liberación de Hh desde la célula secretora se realiza mediado por la proteína transmembrana Dispatched (Disp) (Varjosalo & Taipale, 2007).

Recepción y transducción de la señal

En vertebrados, la unión de Shh a la célula receptora está mediada por receptores accesorios como Hhip (*Hedgehog-interacting protein*), que modulan negativamente la disponibilidad del ligando, secuestrándolo, y como CDO (*Cell adhesion molecule-related, down-regulated by oncogenes*) y BOC (*Brother of CDO*), que aumentan la afinidad por su receptor: la proteína de 12-segmentos transmembrana Patched (Ptc) (revisado en Traiffort y col, 2010). En ausencia de Shh, Ptc inhibe la actividad del co-receptor, la proteína con 7-segmentos transmembrana, Smoothened (Smo). La unión de Shh a Ptc libera la inhibición sobre Smo, activándose la cascada de transducción hacia el citoplasma que finalmente regula a los efectores de la vía: la familia de factores de transcripción Gli (Ingham & McMahon, 2001; Lum & Beachy, 2004). En vertebrados se han descrito 3 genes *gli* (*gli1*, *gli2* y *gli3*), que

actúan como factores duales, ejerciendo su acción como activadores o represores de la transcripción (ver más adelante).

Estudios recientes indican la importancia de una estructura basada en microtúbulos denominada cilio primario. Esta estructura es una extensión no-motil de la membrana celular de aproximadamente 5 μm de largo que se encuentra presente en todas las células de un organismo mamífero. Está compuesto por un axonema formado por microtúbulos dispuestos en un arreglo de 9+0 que se ensamblan desde el centrosoma de la célula, de manera que se regula de acuerdo al ciclo celular (Michaud & Yoder, 2006).

El cilio primario es un organelo que actúa como "sensor" en el proceso de transducción de señales, y principalmente de la vía de señalización de Shh/Gli (Simpson y col, 2009). Se ha reportado que gran parte de los componentes de la vía como Ptc, Smo, Gli, entre otros, se localizan en el cilio primario y que la unión de Shh a Ptc provocaría la liberación de la inhibición sobre Smo y la subsecuente localización de Smo en el cilio permitiendo la síntesis de las formas activadoras de Gli y la transducción de la señal (Figura 1) (Simpson y col, 2009; Traiffort y col, 2010).

Debido a la importancia de la vía de señalización de Shh en el desarrollo y principalmente en la formación de múltiples tipos de cáncer varios estudios están centrados en generar drogas específicas que modulen la cascada de transducción inhibiendo o promoviendo su acción. La ciclopamina (cyc) es un compuesto natural que interrumpe la señalización uniéndose directamente a Smo, específicamente a la séptima región transmembrana (Cooper y col, 1998; Incardona y col, 1998; Taipale y col, 2000; Chen y col, 2002). Por otro lado, la purmorfamina (pur) es un compuesto

que también se une directamente a Smo actuando como agonista de la vía (Figura 1, Briscoe, 2006; Aanstad y col, 2009; Mas & Ruiz i Altaba, 2010).

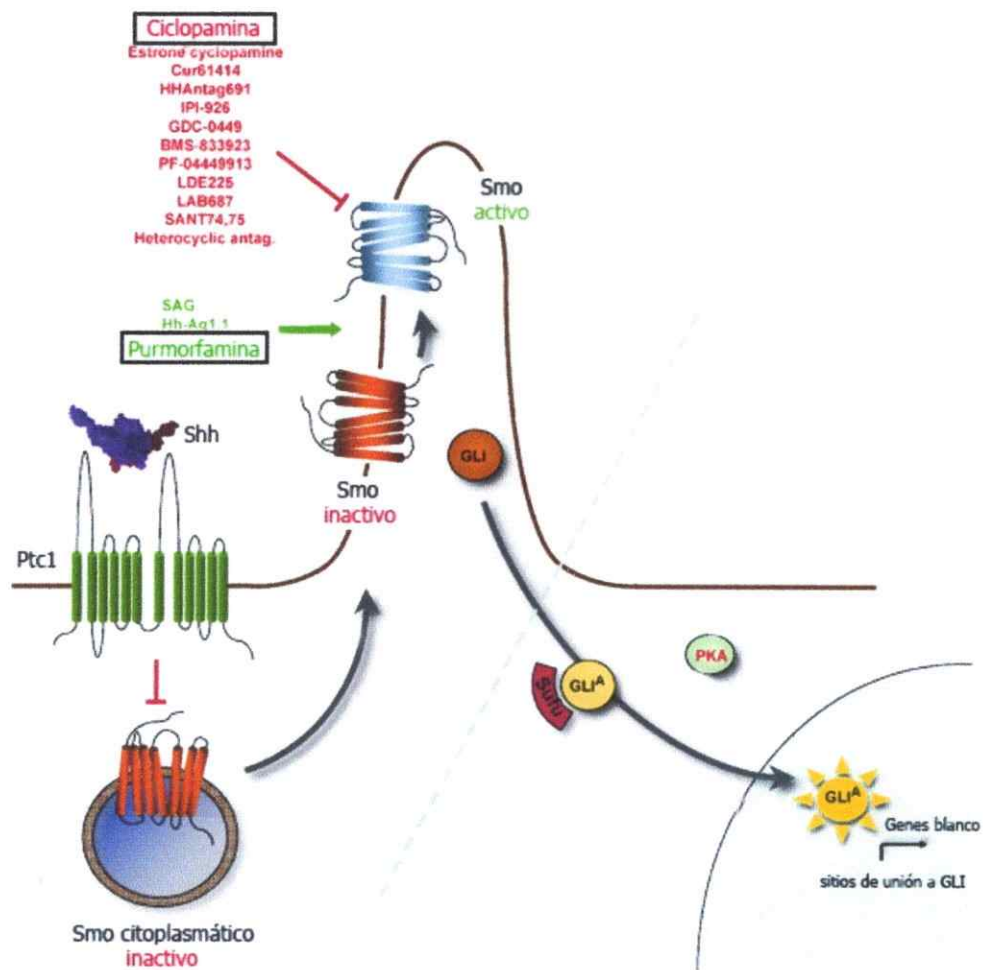


Figura 1. Cascada de señalización de Shh/Gli. Esquema de la recepción de la señal de Shh y transducción en el cilio primario. La unión del ligando Shh al receptor transmembrana Ptc provoca la remoción de este complejo (Shh-Ptc) y la localización de la proteína Smo en el cilio permitiendo la transducción de la señal a través de los factores de transcripción, las proteínas Gli. En rojo se observa una lista de moléculas que actúan como antagonistas de la vía de señalización, inhibiendo la señalización de Shh, entre ellas destaca el alcaloide Ciclopamina (encerrado en negro). En verde se muestran moléculas que actúan como agonistas de la vía en donde destaca el compuesto Purmorphamina (también encerrado en negro). (Modificado de Mas & Ruiz i Altaba, 2010).

Control transcripcional: proteínas Gli

A diferencia de *Drosophila*, en donde la regulación transcripcional dependiente de Hh es efectuada por la forma activadora o represora de la proteína Ci (*Cubitus interruptus*), en vertebrados existen tres genes homólogos a Ci; *gli1*, *gli2* y *gli3*, los cuales codifican para las proteínas Gli (*glioma-associated oncogene*). Estas proteínas poseen 5 motivos denominados "dedos de zinc" (*zinc fingers*), altamente conservados, que se unen al DNA en secuencias específicas. Las proteínas Gli además contienen un dominio N-terminal represor y un dominio C-terminal activador. Dependiendo del clivaje del dominio N-terminal o C-terminal se obtendrán formas activadoras o represoras de estas proteínas. Estudios en roedores, anfibios y peces indican funciones especie-específicas de las distintas formas clivadas de las tres proteínas Gli.

En ratón, las proteínas Gli1 y Gli2 actúan predominantemente como activadores transcripcionales, sin embargo, Gli2 actúa como el activador principal (Park y col, 2000). Además se ha descrito que Gli3 actúa principalmente como represor (Park y col, 2000). Contrariamente en pez cebra Gli1 es esencial para el desarrollo actuando como el principal activador mientras que Gli2 jugaría un papel menor y parcialmente redundante en la activación de genes blanco de la cascada (Karlstrom y col, 2003). Se ha visto que Gli3 posee funciones conservadas entre peces y mamíferos actuando como activador y represor de forma contexto-dependiente (Tyurina y col, 2005).

Shh y proliferación en el cerebro dorsal

Como se describió previamente se ha visto que Shh puede actuar como morfógeno, regulando la especificación de los diferentes tipos neuronales en el SNC. Sin embargo, existe evidencia reciente de que Shh puede actuar como mitógeno, promoviendo la proliferación y la supervivencia de las células troncales y progenitores neurales (Britto y col, 2002; Palma y col, 2005; Cai y col, 2008).

Se ha observado que Shh controla el crecimiento del cerebro dorsal en el cerebelo (Dahmane & Ruiz i Altaba, 1999; Wallace, 1999; Weschler-Reya & Scott, 1999), corteza y tectum (Dahmane y col, 2001).

Shh es producido y secretado por las células de Purkinje en etapas tempranas y es requerido para la proliferación de los precursores granulares en el cerebelo en desarrollo. Tratamientos en que se agrega Shh al tejido en desarrollo aumentan la proliferación de los precursores 2,5 veces mientras que la inhibición de la vía genera el efecto contrario provocando una disminución de 5 veces en el número de células bromodeoxiuridina (BrdU) positivas (Dahmane & Ruiz i Altaba, 1999).

Estudios realizados en corteza y tectum de ratón, tanto *in vivo* como *in vitro* muestran que Shh controla la proliferación en un grupo de células con propiedades de célula troncal (Palma & Ruiz i Altaba, 2004). Tratamientos de sobreactivación de la vía utilizando Shh generan un aumento en la proliferación de precursores corticales y tectales mientras que la inhibición de la vía con ciclopamina resulta en la disminución de la proliferación de estas células (Dahmane y col, 2001).

Tectum óptico como sistema de estudio

El tectum óptico (T.O) es el principal centro de procesamiento sensorial (generalmente de modalidad visual) en aves, reptiles, anfibios y peces. Corresponde al derivado dorsal del mesencéfalo (o cerebro medio), que en mamíferos origina el colículo superior. En peces teleósteos adultos, está formado por varias capas, sin embargo, durante el desarrollo embrionario consiste de una zona interna de materia gris, que limita con el ventrículo (Figura 2E y F, línea negra), equivalente a la zona subventricular (zona periventricular), y una zona externa de materia blanca, que posteriormente dará origen a las zonas intermedia y marginal (Schmatolla, 1972).

En peces teleósteos, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, el tectum adulto conserva el potencial de proliferar y diferenciarse. Esta mantención de la neurogénesis durante estadios adultos resulta interesante puesto que aún se desconocen los mecanismos detrás de este proceso (Zupanc y col, 2005; Zupanc y col, 2006) sin embargo, es posible considerar que al igual de lo que se ha visto en ratón y pollo, (Watanabe & Nakamura, 2000) este proceso podría estar regulado por la vía de señalización de Shh.

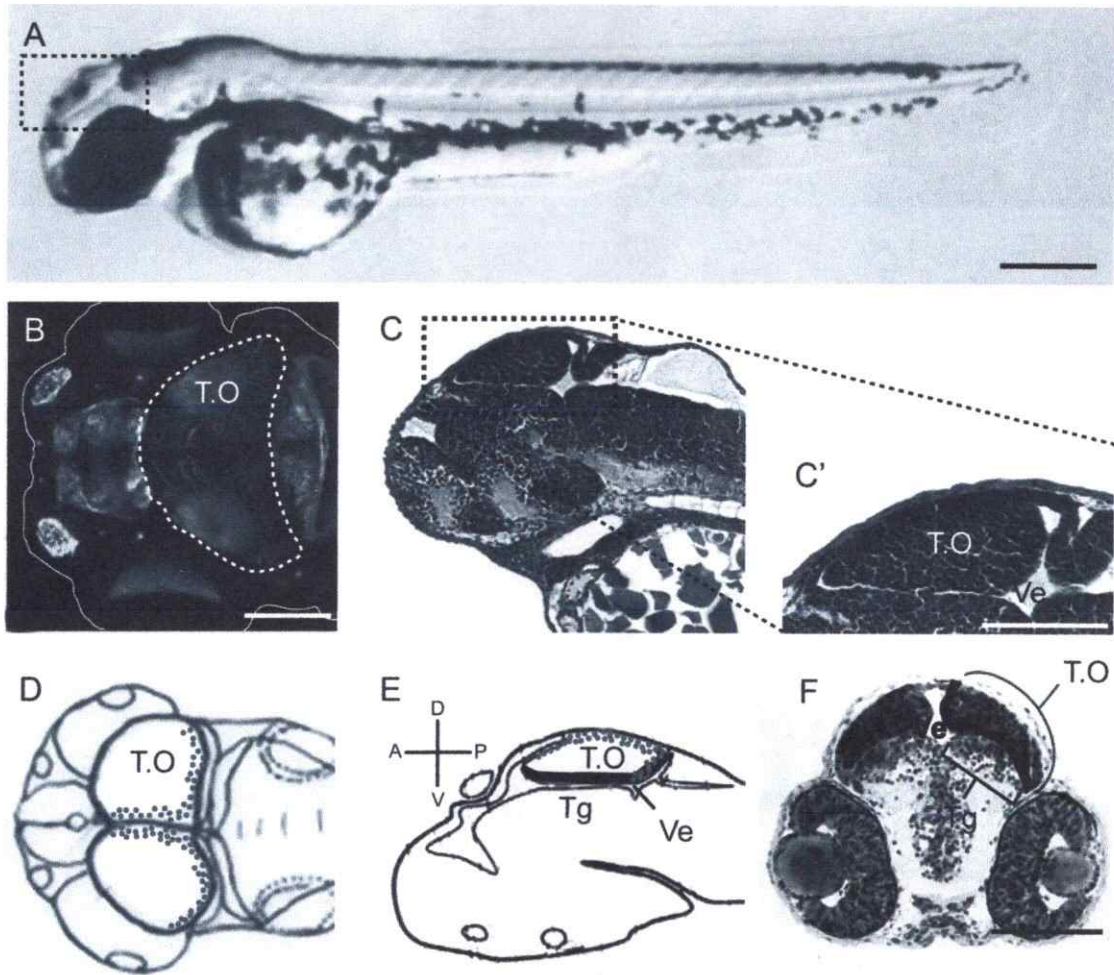


Figura 2. Estructura del tectum óptico en el embrión de pez cebra de 48hpf. (A) Vista lateral completa de un embrión de pez cebra, la región marcada en línea punteada muestra la región del cerebro medio dorsal estudiada. (B) Vista dorsal de la región cefálica, se limita la región del tectum óptico con línea punteada. El límite del embrión se muestra en línea blanca. (C) Sección sagital de vista lateral, se demarca con línea punteada el aumento en C'. (D) Esquema de vista dorsal, los puntos grises muestran las regiones proliferativas. (E) Esquema de sección sagital, los puntos grises muestran las regiones proliferativas y la línea negra la región periventricular. Se muestra el eje de coordenadas. (F) Sección coronal, la línea negra muestra la región periventricular. Anterior se ubica a la izquierda excepto en F, en donde se ubica hacia afuera. Barras de escala, (A) 250µm, (B, C' y F) 100µm. A, Anterior, D, Dorsal, P, Posterior, Tg, Tegmentum, T.O, Tectum óptico, V, Ventral, Ve, Ventrículo. Imágenes modificadas de Kimmel y col, 1995, Nguyen y col, 2005, <http://zfatlas.psu.edu/view.php?s=527&z=2&c=1707,935> y <http://zfin.org/> [Julio, 2010].

El pez cebra como modelo de estudio

Uno de los teleósteos más utilizado como modelo de estudio pez cebra (*Danio rerio*). Este teleósteo posee varias ventajas que lo convierten en un buen candidato para estudiar *in vivo* el desarrollo dentro de los vertebrados: i) tiene un tiempo de generación corto de aproximadamente 3 meses, ii) se obtienen muchos embriones de un solo cruce, iii) los embriones son transparentes permitiendo la visualización de estructuras y órganos internos (Figura 2A); siendo además un buen modelo de estudio genético: i) posee un genoma secuenciado completamente lo que ha permitido la generación de organismos mutantes y transgénicos.

Cepas mutantes de peces para la vía de señalización de Shh/Gli

La pérdida de señalización de Shh en el pez cebra genera defectos a nivel de la médula espinal ventral, deficiencias a nivel del cerebro anterior ventral, ausencia del quiasma óptico debido a problemas en la guía axonal de la retina, ausencia de fibras musculares lentas, malformaciones en la aorta dorsal, defectos en el desarrollo de la aleta pectoral y curvatura ventral del cuerpo.

En el laboratorio disponemos de tres cepas mutantes con pérdida de función en componentes esenciales de la vía de señalización de Shh/Gli; las cepas *slow-muscle ommited*, *you-too* y *detour*. La cepa mutante *slow-muscle ommited* (*smu*), presenta una mutación de falta de función en el co-receptor Smoothened (Barresi y col, 2000; Chen y col, 2001; Varga y col, 2001), el mutante *detour* (*dtr*) genera falta de función de *gli1* producto de una mutación que genera una proteína trunca y el mutante *you-too* (*yot*) produce una forma dominante negativo de la proteína Gli2 (Brand et al.,

1996; Karlstrom et al., 1996; Karlstrom y col, 2003). Estas tres cepas mutantes presentan todos, o gran parte de los defectos descritos anteriormente. Se ha observado que a diferencia de los mutantes para *smo* y *gli2*, el mutante *dtr* no tiene defectos a nivel del *patterning* de los somitos, diferenciación de las fibras musculares lentas o formación de la aorta dorsal (Karlstrom y col, 2003). Además los mutantes *smu* y *yot* poseen somitos abultados con forma de "U" y ciclopía debido a disminución de la distancia intraocular a nivel ventral (Figura 3) (Brand y col, 1996; Karlstrom y col, 1996; Chen y col, 2001).

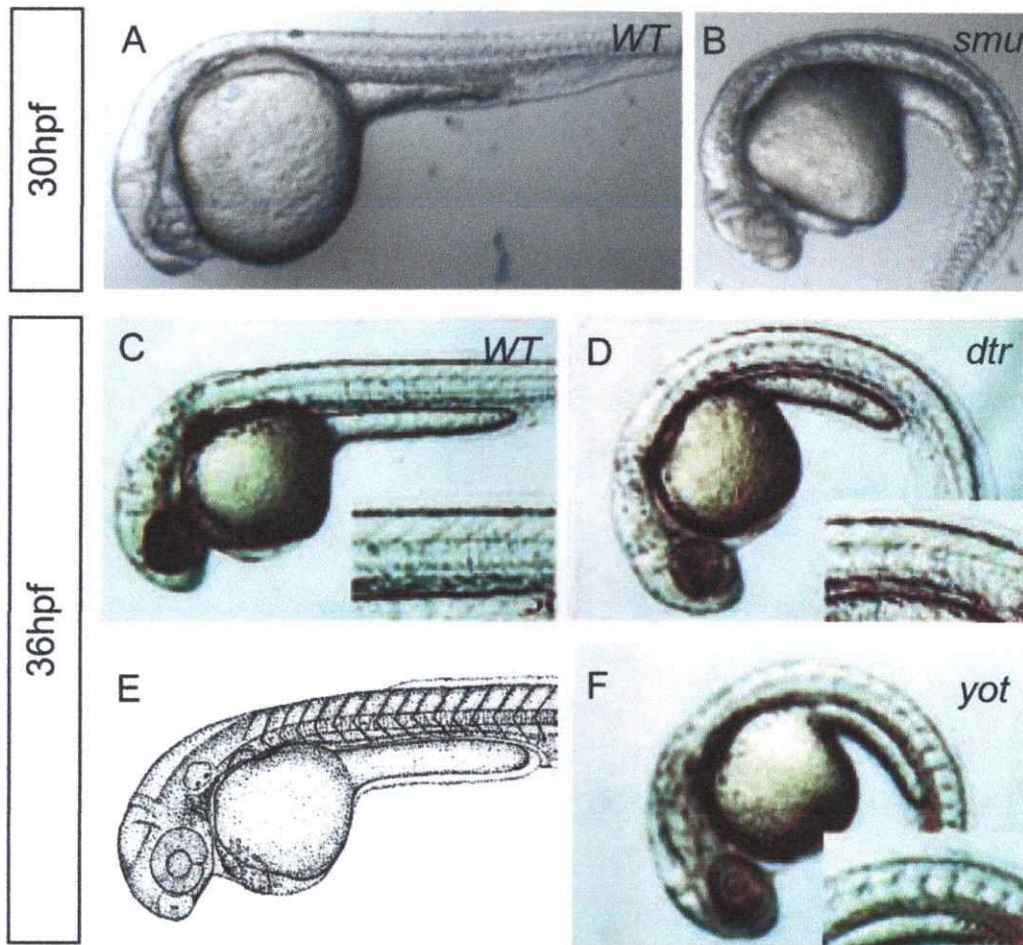


Figura 3. Cepas mutantes *smu*, *dtr* y *yot* presentan defectos en componentes de la vía de señalización de Shh/Gli. Mutantes *smu*, *dtr* y *yot* poseen defectos a nivel del eje ventral del cuerpo generando embriones curvos. Tanto el mutante *smu* como el *yot* presentan errores en la diferenciación de los músculos, desarrollando somitos con forma de "U", fenotipo que no se observa en el *dtr*. (A, B) Embriones de 30hpf. (C-F) Embriones de 36hpf. (E) Esquema lateral de un embrión silvestre (*WT*) de 36hpf. Los insertos en C, D y F muestran los somitos. Anterior a la izquierda. (Adaptado de Kimmel y col, 1995 y Karlstrom y col, 2003).

Propuesta

Considerando los estudios que indican que Shh regula la proliferación de las células progenitoras en el cerebro dorsal de mamíferos y aves quisimos investigar si este mecanismo es conservado en otras especies. Utilizamos como sistema de estudio el tectum óptico del pez cebra debido a la importancia de esta estructura en el SNC de vertebrados no-mamíferos. Tomando ventaja de la disponibilidad de herramientas como cepas mutantes de falta de función de componentes de la vía de Shh en pez cebra y la disponibilidad de fármacos capaces de inhibir o sobreactivar la cascada de señalización, el presente Seminario de Título se centró en determinar el posible papel de la cascada de señalización de Shh/Gli en el control de la proliferación de los progenitores neurales en el tectum óptico del embrión de pez cebra.

Hipótesis

La vía de señalización de Shh/Gli controla la proliferación de precursores neurales en el tectum óptico del embrión de pez cebra.

Objetivo general

Estudiar *in vivo* el papel que cumple la vía de señalización de Shh/Gli en el proceso de proliferación del tectum del embrión de pez cebra.

Objetivos específicos

- Determinar el patrón de expresión de los componentes principales de la vía de Shh/Gli en el tectum óptico durante el desarrollo embrionario del pez cebra.
- Evaluar el efecto de la vía de señalización de Shh/Gli sobre la proliferación en condiciones de pérdida de función genética en el pez cebra.
- Estudiar la regulación efectuada por la vía de señalización de Shh/Gli sobre el proceso de proliferación en el tectum óptico en ventanas temporales acotadas en condiciones de ganancia y pérdida de función farmacológica.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 *Materiales y reactivos*

Plásmidos para ribosondas de *gli1*, *gli2*, *ptc1*, *shh* (donadas por el Dr. Rolf Karlstrom), *pax7* (donada por el Dr. Steve Wilson), *fgf8*, *wnt1*, *otx2* y *sox2* (donadas por el Dr. Miguel Allende). Kit de purificación de DNA Miniprep (Kit QIAprep, QIAGEN). Endonucleasas de restricción (Fermentas). RNA polimerasas T7 y T3 (Fermentas). Ciclopamina stock 10mM en EtOH (Toronto Research Chemicals). Purmorfamina stock 10mM en DMSO (Calbiochem). Boehringer Mannheim Blocking Reagent (BMB, Roche). BM purple AP substrate precipitating (Roche). Kit DAB Reagent (Vector laboratories). Medio de montaje (Aqua Mount, Lerner Laboratories) DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma).

Anticuerpos: Anti digoxigenina-fosfatasa alcalina (1:2000, Roche), policlonal conejo anti fosfo-histona H3 (H3P 1:250, Upstate 07-424), cabra anti conejo peroxidasa (1:300, Jackson ImmunoResearch), alexa fluor 488 cabra anti conejo (1:1000, Molecular probes).

V.2 *Material Biológico*

Los embriones de pez cebra (*Danio rerio*) se mantuvieron a 28,5°C y en medio E3 (5mM NaCl, 0,17mM KCl, 0,33 mM CaCl₂ y 0,3 mM MgSO₄) de acuerdo a protocolos estándar (Westerfield, 2007). El tiempo de desarrollo se expresa en horas post fertilización (hpf). Una vez alcanzado el estadio a estudiar se removió la membrana coriónica utilizando pinzas, se fijaron los embriones con paraformaldehído (PFA) al 4% en solución tampón fosfato (PBS) y se deshidrataron en metanol. Se

utilizaron peces silvestres (*WT*) y las cepas mutantes *slow-muscle ommited (smu)* con falta de función a nivel del receptor Smoothened (Barresi y col, 2000), *detour (dtr)* con pérdida de función de *gli1* y *you-too (yot)* dominante negativo de *gli2* (Karlstrom y col, 1996). Las cepas mutantes se mantuvieron como heterocigotos y al realizar los cruces se identificaron los homocigotos por criterio morfológico (fenotipo).

V.3 *Tratamientos farmacológicos con ciclopamina y pumorfamina*

Se trataron embriones *WT* con ciclopamina 10 μ M disuelta en medio E3 (a partir de un *stock* 10 mM disuelto en etanol) y se utilizó como vehículo etanol (EtOH) al 0,1% en medio E3. Los tratamientos con pumorfamina se realizaron a una concentración de 10 μ M en medio E3 (a partir de un *stock* 10 mM disuelto en dimetilsulfóxido, DMSO) y se utilizó DMSO al 0,1% como vehículo.

Se agregó pumorfamina, ciclopamina y el control respectivo (etanol o DMSO) a una placa de 24 pocillos con 10 embriones en cada uno. Además se utilizó otro control sólo con medio E3. Se establecieron diferentes ventanas temporales fijando los embriones a las 48hpf o 60hpf.

Se iniciaron los tratamientos con pumorfamina (y DMSO) y ciclopamina (y EtOH) a las 10hpf (una vez terminada la gastrulación) o a las 24hpf (una vez terminado el *patterning*) y se dejaron crecer a 28,5°C hasta las 48hpf donde se fijaron los embriones con PFA al 4%. También se realizaron tratamientos con pumorfamina desde las 30hpf y se fijaron los embriones a las 60hpf (estadio embrionario tardío). Para todos los tratamientos se cambió el medio cada aproximadamente 12 horas para evitar la formación de cristales en el caso de la ciclopamina.

V.4 Síntesis de ribosondas marcadas con digoxigenina

Se sintetizaron las ribosondas antisentido de *gli1*, *gli2* (Karlstrom y col, 2003), *ptc1* (Concordet y col, 1996) y *shh* (Krauss y col, 1993). Para esto se transformaron bacterias *Escherichia coli* competentes con los vectores respectivos para cada sonda, posteriormente se realizó la extracción del DNA utilizando el protocolo kit Miniprep y luego se linealizaron los plásmidos utilizando las enzimas de restricción correspondientes: BamHI para *gli1*, *gli2* y *ptc1* y EcoRI para *shh*. Para la transcripción *in vitro* de las ribosondas se utilizó la RNA polimerasa T7 (para *gli1*, *gli2* y *shh*) y la RNA polimerasa T3 (para *ptc1*) y se agregaron los nucleótidos correspondientes además del nucleótido UTP marcado con digoxigenina. Finalmente se precipitaron las ribosondas y se cuantificó la cantidad de RNA obtenido.

V.5 Hibridación *in situ* (ISH), inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IHQ) en embrión completo

Las hibridaciones *in situ* se realizaron utilizando el protocolo de Thisse & Thisse, (2008). Se utilizaron las ribosondas sintetizadas para *gli1*, *gli2* y *ptc1* y las sondas previamente sintetizadas para *shh* (Krauss y col, 1993), *fgf8* (Reifers y col, 1998), *wnt1* (Molven y col, 1991; Lun & Brand, 1998), *pax7* (Hammond y col, 2007), *otx2* (van the Water y col, 2001), *sox2* (Hernandez y col, 2007) y *pax2.1-krox20* (Crump y col, 2004) marcadas con digoxigenina. Luego de la hibridación se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina y finalmente se detectó la ribosonda utilizando el revelador BM purple substrate precipitating, esto mediante la reacción catalizada por la fosfatasa alcalina que forma un precipitado color púrpura.

Los inmunoensayos se realizaron utilizando el protocolo de Sarrazin y col (2006). Los embriones se incubaron en solución de bloqueo (BMB 2%, suero fetal de ternero (FCS) 20% en solución tampón de ácido maleico (MAB)) para evitar marcaje inespecífico durante una hora y posteriormente con el anticuerpo primario específico durante la noche a 4°C. Se recuperó el anticuerpo primario y se lavaron los embriones varias veces con PBS con tween-20 al 1% (PBST) para posterior incubación con el anticuerpo secundario durante la noche a 4°C. Se recuperó el anticuerpo secundario y se lavaron los embriones varias veces con PBST. Para la inmunohistoquímica se reveló utilizando kit DAB Reagent, que contiene los reactivos necesarios para preparar 3,3'-diaminobenzidina (DAB), sustrato de la peroxidasa, que forma un precipitado color pardo. En el caso de doble tinción de ISH/IHQ para *otx2*/H3P se utilizó un protocolo combinado de ambos descritos anteriormente.

Tanto para la ISH como para la IHQ se detuvo la reacción lavando los embriones con PBS, posteriormente se fijaron con PFA al 4% y se dejaron en glicerol al 100%. En el caso de la IF se lavaron los embriones con PBS y posteriormente se dejaron en metilcelulosa. Finalmente los embriones se montaron en cámaras y se visualizaron en la lupa de fluorescencia (Olympus MVX10). Las IF se visualizaron en un microscopio confocal (Zeiss Laser Meta). Las imágenes obtenidas fueron procesadas con Adobe Photoshop CS3 y Adobe Illustrator CS3.

V.6 *Secciones de embriones incluidos en gelatina*

Se deshidrataron los embriones en sacarosa al 30% durante toda la noche a 4°C. Luego se colocaron, el embrión en sacarosa y la solución de gelatina (0,5 g sacarosa y 0,6 g de gelatina tipo A en 10 ml de agua) a 37°C por una hora. Se trasladó el embrión al molde con gelatina evitando la formación de burbujas y se dejó un par de minutos a -20°C. Posteriormente se fijó en PFA al 4% durante la noche a 4 °C y se colocó en sacarosa al 30% para deshidratar el bloque.

Se obtuvieron secciones de ~40 µm utilizando un micrótomo (Leica SM2010R) y se montaron los cortes utilizando medio de montaje para posteriormente ser fotografiados en la lupa.

V.7 *Criosecciones de embriones embebidos en OCT*

Se deshidrataron los embriones en sacarosa al 30% durante toda la noche a 4°C. Luego se incluyeron en un molde plástico con OCT (*optimal cutting temperature*) evitando la formación de burbujas, se ubicaron en la posición para cortar y se dejaron a -20°C por una hora. Posteriormente se dejaron durante la noche a -80°C.

Se obtuvieron criosecciones sagitales de 10 µm utilizando un criostato (Microm HM 525), se tiñeron con DAPI durante 5 minutos y se montaron los cortes utilizando medio de montaje para posteriormente ser fotografiados en la lupa.

V.8 *Conteos celulares y análisis estadístico*

Se realizaron conteos celulares para fosfo-histona H3 (H3P) en embriones silvestres (*WT*), mutantes (*smo*, *dtr* y *yot*) y con tratamiento farmacológico (ciclopamina y EtOH o purmorfamina y DMSO). Para esto se fotografiaron embriones desde vistas dorsales y laterales luego de realizar los inmunomarcajes y posteriormente se cuantificaron las células H3P positivas. Se utilizó una foto representativa de cada ensayo y se estableció un área arbitraria correspondiente al tectum óptico determinado por criterio morfológico, que se utilizó para realizar todos los conteos del experimento. Para la cuantificación realizada en cortes de criostato de embriones tratados farmacológicamente y con doble marcaje de ISH/IHQ para *otx2*/H3P se contó el número de células H3P positivas en la región tectal (delimitada por la expresión de *otx2*) y el número total de células DAPI positivas. De esta forma se calculó el *índice mitótico* como el porcentaje de células en mitosis de la región tectal (número de células H3P positivas en la región *otx2* positiva/ número total de células DAPI positivas en la región *otx2* positiva*100). Los conteos se realizaron utilizando el programa Image J (NIH).

Se contaron al menos 4 embriones y se obtuvo un promedio de los datos obtenidos por cada condición. Se calculó la desviación estándar (s.d) y los datos fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba t de Student de una cola utilizando el programa GraphPad Prism 5 con un nivel de significancia mínimo $p < 0,05$.

VI. RESULTADOS

Primero caracterizamos el patrón proliferativo en el cerebro medio dorsal durante la embriogénesis utilizando el marcador de mitosis histona 3 fosforilada (H3P) entre las 30hpf (período en que ya ha terminado el *patterning*) y 60hpf (período embrionario tardío) para estudiar el papel de Shh como mitógeno. La Figura 4 muestra vistas dorsales y laterales como indican los esquemas de la Figura 1D y E, respectivamente. Al inicio de la ventana temporal estudiada (30hpf) observamos proliferación a lo largo de todo el tectum, pero preferentemente en la región más ventral cercana a la zona ventricular limitante con el tegmentum denominada zona periventricular (Figura 4B, flecha blanca, Figura 1E, línea negra). A medida que se desarrolla el embrión (48hpf) la proliferación se restringe a la zona dorsomedial (Figura 4C, elipse punteada) y más posterior del tectum (membrana posterior tectal; Figura 4D, flecha blanca). Esta última forma parte de la zona límite entre el cerebro medio y posterior (*midbrain-hindbrain boundary*, MHB). La vista dorsal muestra un patrón proliferativo característico en forma de "T" observado en los estadios estudiados (Figura 1D, línea punteada). A las 60hpf notamos mayor proliferación que a las 48hpf, sin embargo, las células H3P positivas continúan restringiéndose hacia los dominios más dorsales del tectum. También observamos proliferación en la membrana posterior tectal (Figura 4F, flecha blanca) y a lo largo del eje dorsomedial limitando ambos hemisferios al igual que a las 48hpf (Figura 4E, línea punteada en forma de "T").

Estos resultados sugieren que en el tectum óptico del pez cebra existe un curso temporal proliferativo a lo largo de la embriogénesis que comienza en ventral y posteriormente se concentra en la región dorsal entre las 30 y 60hpf. De esta forma,

en etapas más tempranas del desarrollo se establece un patrón proliferativo ubicuo que se concentra en la región ventral del tectum para luego restringirse a regiones dorsales, principalmente en la zona dorsomedial y en el límite posterior del tectum.

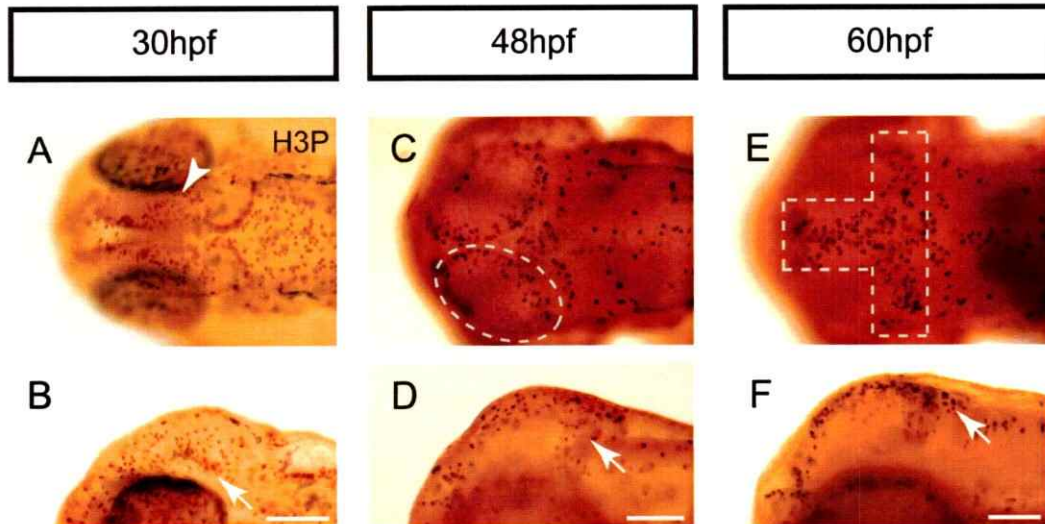


Figura 4. Patrón proliferativo en la embriogénesis del tectum óptico del pez cebra. IHQ para H3P en embriones *WT* de 30, 48 y 60hpf que muestra el curso temporal de la proliferación en el tectum del pez cebra. (A, B) A las 30hpf el tectum óptico presenta un patrón proliferativo amplio (A, cabeza de flecha blanca) que se concentra a nivel del tectum ventral (B, flecha blanca). (C, D) A las 48hpf la proliferación se restringe hacia la periferia del tectum (C, elipse punteada) y a las regiones dorsal y posterior (D, flecha blanca). (E, F) A las 60hpf la proliferación se circunscribe a la región dorso-medial que delimita ambos hemisferios del tectum a nivel antero-posterior y al límite con el cerebro posterior (E, línea punteada con forma de "T") y concentrándose en las zonas más dorsales del tectum (F, flecha blanca). (A, C, E) Vistas dorsales, (B, D, F) vistas laterales, anterior se ubica a la izquierda. Barras de escala, 100 μ m.

Componentes esenciales de la vía de Shh/Gli se expresan en el tectum óptico durante la embriogénesis del pez cebra.

Una vez caracterizado el patrón de proliferación del tectum óptico, el segundo paso fue determinar si los diferentes componentes efectores de la vía de señalización de Shh/Gli estaban presentes en el tectum del pez cebra. Para esto realizamos

hibridaciones *in situ* (ISH) con ribosondas específicas para los principales componentes de esta cascada (*shh*, *ptc1*, *gli1*, y *gli2*) en distintos estadios del desarrollo embrionario del pez cebra. La Figura 5 muestra vistas laterales de los resultados obtenidos para las ISH de *ptc1*, *gli1*, *gli2* y *shh* en embriones de 30, 48 y 60hpf.

A las 30hpf podemos observar una distribución amplia de los componentes a lo largo del tectum. La expresión del RNA mensajero de *ptc1*, *gli1* y *gli2* abarca gran parte de la estructura (Figura 5A, asterisco, D y G). Sin embargo la región de mayor expresión se concentra en el MHB. Por el contrario, la expresión de *shh* se restringe específicamente al tubo neural ventral, a nivel de la placa precordial (Figura 5J, flecha vacía). Conforme avanza el desarrollo, la expresión de los componentes se restringe a la zona periventricular (cabeza de flecha negra) y a la membrana posterior tectal en el MHB (flecha negra). A las 48hpf observamos una expresión débil que tiende a aumentar y concentrarse en estas regiones a las 60hpf. Además podemos notar que la expresión de *gli2* se extiende fuertemente hacia la región dorsal del tectum a partir de las 48hpf. En esta etapa podemos notar también que la expresión de *shh* se dorsaliza, observándose a nivel de la zona periventricular y en el límite mesencefálico del MHB y que a las 60hpf tiende a disminuir manteniéndose principalmente en la zona más ventral de la membrana posterior tectal (Figura 5L, flecha vacía). De esto podemos concluir que los componentes principales de la cascada de señalización de Shh/Gli se expresan a lo largo de la embriogénesis en el tectum del pez cebra, específicamente cercanos a las regiones ventriculares, limitando con el tegmentum en la zona periventricular y en el componente mesencefálico del MHB, ambos territorios en donde previamente encontramos que ocurre proliferación celular.

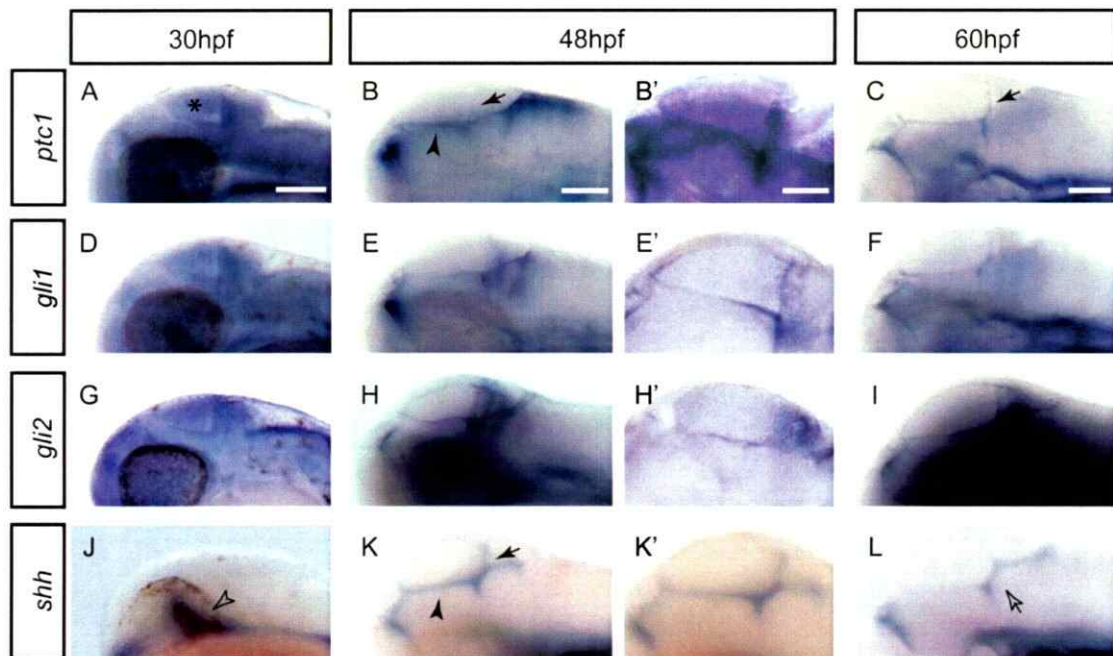


Figura 5. Los componentes de la vía de señalización de Shh/Gli se expresan en regiones proliferativas del tectum óptico durante la embriogénesis del pez cebra. Expresión de *ptc1* (A-C), *gli1* (D-F), *gli2* (G-I) y *shh* (J-L) mediante ISH en el cerebro dorsal. (A, D, G) A las 30hpf *ptc1*, *gli1* y *gli2* se expresan ampliamente en la región del tectum (asterisco). (J) Por otro lado, *shh* se expresa a nivel del tubo neural ventral (cabeza de flecha vacía). (B, E, H) A las 48hpf la expresión de estos componentes se restringe a la zona periventricular (cabeza de flecha negra) y a la región posterior que limita con el cerebro posterior (flecha negra). (B', E', H') Secciones sagitales de las ISH correspondientes. (K) Igualmente la expresión de *shh* se extiende a estas zonas más dorsales. (K') Aumento de K. (C, F, I) A las 60hpf la expresión de *ptc1*, *gli1* y *gli2* es más evidente en la zona periventricular y en el límite posterior (flecha negra), (L) mientras que la expresión de *shh* se restringe a la zona más posterior y ventral del tectum (flecha vacía). Vistas laterales, anterior se ubica hacia la izquierda. Barras de escala, 100 μm , excepto en B', E', H', K', barras de escala, 75 μm .

El patterning en mutantes smu, dtr y yot no se ve severamente alterado.

Posteriormente utilizamos las cepas mutantes *smu*, *dtr* y *yot* para investigar si la cascada de señalización de Shh/Gli modula la proliferación en el tectum óptico del pez cebra. Estas cepas presentan ausencia de componentes clave de la cascada de

transducción permitiendo estudiar el efecto del bloqueo de la señalización de Hh en diferentes niveles de la vía y en distinto grado. El mutante *smu* presenta prácticamente ausencia completa de la señalización de la vía, río abajo del co-receptor Smo, mientras que los mutantes *dtr* y *yot* tienen ausencia de los efectores de la vía, las proteínas Gli (*gli1* y *gli2* respectivamente).

Debido a la importancia de esta cascada de señalización en el *patterning* ventral durante el desarrollo temprano, estudiamos si la falta de función de estos componentes esenciales trae como consecuencia defectos severos o ausencia de la estructura del tectum óptico en el pez cebra en las cepas mutantes utilizadas. Realizamos ISH para diferentes marcadores de territorios dorsales y/o específicos del cerebro medio como *pax2.1-krox20*, *fgf8*, *wnt1*, *pax7* y *otx2* en diferentes etapas del desarrollo embrionario.

Tanto *fgf8*, como *wnt1* y *otx2*, corresponden a genes clave involucrados en el establecimiento de un centro organizador en el MHB, que permitirá la regionalización y estructuración del tectum óptico y diferenciación con el componente posterior, que finalmente dará origen al cerebelo. La expresión de *fgf8* se restringe exclusivamente al MHB mientras que *wnt1* se expresa además en el límite dorsal del tectum. Por otro lado, la expresión de *otx2* se extiende a lo largo de toda la estructura tectal (Reifers y col, 1998; Molven y col, 1991; Lun & Brand, 1998; van the Water y col, 2001).

pax2.1 y *pax7* también forman parte de este proceso de regionalización; *pax2.1* se expresa exclusivamente en el MHB mientras que *pax7*, que además se ha relacionado en procesos de polaridad en la región del tectum se expresa a lo largo de toda la estructura en forma de gradiente (Hammond y col, 2007; Crump y col, 2004).

Como se muestra la Figura 6 a las 36hpf la expresión de *fgf8* en la región del MHB no se ve alterada en los mutantes *dtr* y *yot* (A, flecha negra, E, I). Igualmente para *wnt1* observamos expresión a lo largo del límite anterior y posterior dorsal en los mutantes *dtr* y *yot* como en el *WT* (Figura 6B, F y J). A las 48hpf estudiamos el patrón de expresión del gen *otx2* que se expresa a lo largo de toda la región tectal (Figura 6C, línea punteada). La expresión de este marcador en el mutante *yot* es similar al embrión *WT* mientras que en el *dtr* observamos menor expresión en la zona dorsal (Figura 6G y K, cabeza de flecha negra).

Además quisimos observar que ocurre en etapas más avanzadas del desarrollo y fuera de la ventana temporal estudiada, por lo que estudiamos la expresión del marcador dorsal *pax7* a las 72hpf (una vez que ha terminado el período embrionario y ha comenzado el período larval). El mutante *yot* presentan un patrón de expresión similar al *WT* mientras que en el *dtr* hay disminución de la expresión de *pax7* en la región más dorsal (Figura 6D, H y L, cabeza de flecha negra).

En el caso del mutante *smu* realizamos ISH para los mismos marcadores y además estudiamos la expresión de los marcadores *pax2.1-krox20* una vez terminado el *patterning*, a las 24hpf. Estos genes se expresan en el MHB (*pax2.1*, Figura 6M, flecha negra) y en los rombómeros (*krox-20*) respectivamente. Como indica la Figura 6, no observamos cambios en la expresión de los marcadores en los estadios estudiados en comparación al *WT* a nivel del tectum (Figura 6Q, R, S y T).

Como muestra la Figura 6, la ausencia de *gli2* genera un embrión similar al *WT*. El mutante *yot* posee un cerebro y específicamente un tectum comparable al embrión silvestre tanto en tamaño como en la presencia de marcadores de territorio. Al

observar el mutante *dtr* notamos que posee un cerebro de menor tamaño, pero que sin embargo se ha formado una estructura mesencefálica determinada por los marcadores utilizados. La expresión de *otx2* y *pax7* demuestran la ausencia de una parte de la región dorsal del tectum que podría estar dado por ausencia de aferencias desde la retina (Karlstrom y col, 1996; Karlstrom y col, 2003). Finalmente, al analizar el mutante *smu* observamos que a pesar de poseer un cerebro de menor tamaño, se forma una estructura tectal, delimitada por los diferentes marcadores utilizados.

Los resultados obtenidos indican que la ausencia de la señalización de Shh no genera defectos graves en el *patterning* del tectum óptico. Las cepas mutantes estudiadas presentan una estructura tectal que posee marcadores del cerebro medio dorsal a lo largo del desarrollo embrionario.

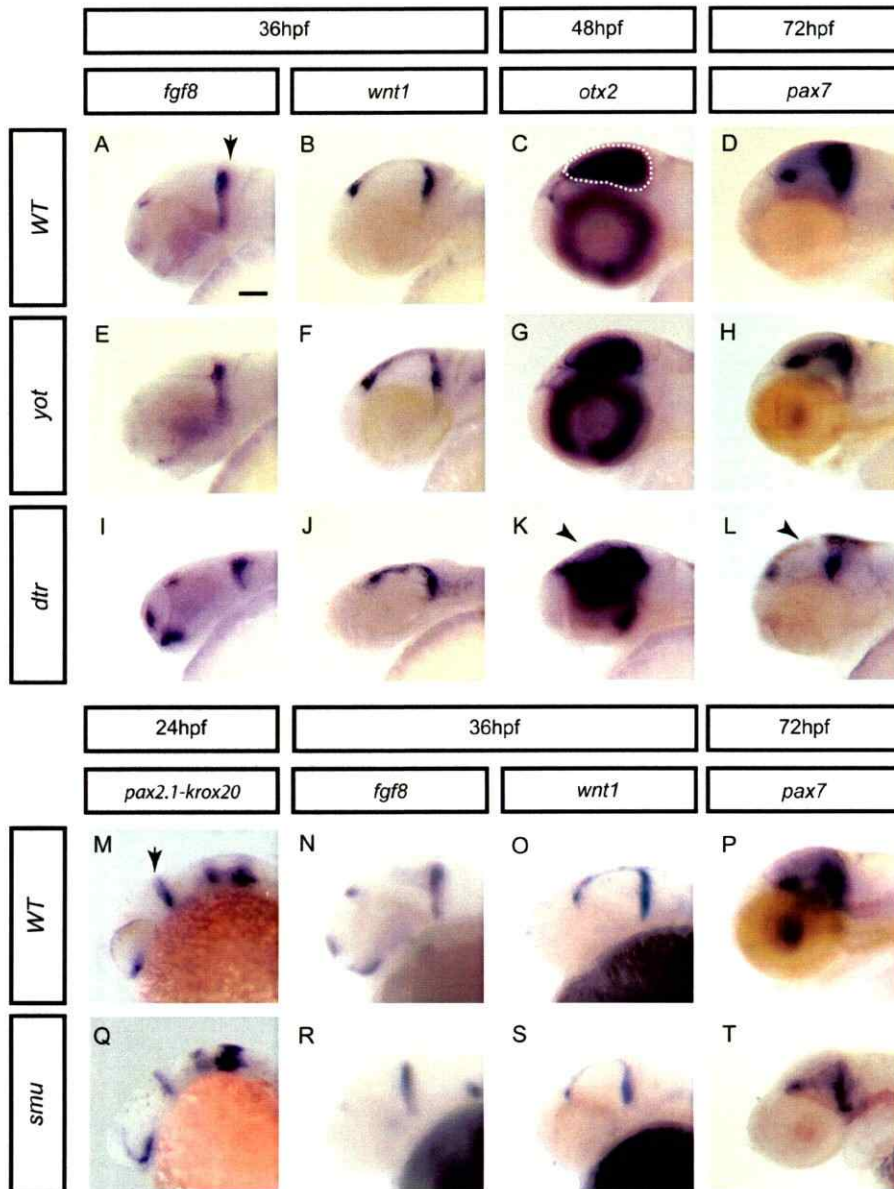


Figura 6. Estructuras dorsales del cerebro medio están presentes en embriones mutantes *smu*, *dtr* y *yot*. ISH para los marcadores de cerebro medio dorsal *fgf8*, *wnt1*, *otx2*, *pax7* y *pax2.1-krox20* en embriones de 24, 36, 48 y 72hpf. Tanto *fgf8* (A, E, I) como *wnt1* (B, F, J) presentan expresión similar en el WT y en los mutantes *yot* y *dtr* delimitando la región posterior (A, flecha negra) y dorsal respectivamente. La expresión de *otx2* (marcada en C con línea punteada) y *pax7* disminuyen en la región dorsal del tectum del mutante *dtr* (K y L, cabeza de flecha negra) mientras que para el mutante *yot* se mantienen los dominios de expresión de estos marcadores (G, H). En el mutante *smu* se mantienen los territorios de los marcadores utilizados al igual que en el embrión silvestre (Q, R, S, T). Vistas laterales, anterior se ubica hacia la izquierda. Barras de escala, 100µm.

Ausencia de la vía de Shh/Gli en mutantes disminuye la proliferación en el tectum.

Una vez corroborada la presencia de la estructura tectal sin defectos severos de *patterning* en las cepas mutantes estudiamos la proliferación en el tectum del pez cebra en ausencia de la vía de señalización de Shh/Gli. Para esto realizamos ensayos de inmunohistoquímica con el anticuerpo H3P para determinar el nivel de proliferación en embriones mutantes de 48hpf y luego se cuantificaron los datos obtenidos.

La Figura 7 muestra vistas dorsales y laterales para las cepas mutantes *dtr*, *yot* y *smu* demostrando la disminución en la proliferación tectal en ausencia de Shh al comparar con el embrión *WT*. Los mutantes *dtr* y *yot* presentan una tendencia significativa en la disminución de la proliferación mientras que en el caso del *smu* la diferencia es drástica. Si bien las vistas laterales muestran una reducción en la proliferación a nivel de todo el tectum en los mutantes, la diferencia más significativa ocurre a nivel de la región tectal posterior del MHB.

La cuantificación de células H3P positivas muestra que las cepas mutantes presentan una disminución significativa respecto a la condición control (*WT* $69,2 \pm 4,5$; *dtr* $43,5 \pm 3,9$; *yot* $37,0 \pm 2,273$; *smu* $22,50 \pm 1,443$; células H3P positivas por área de tectum, para más detalles ver Materiales y Métodos). De acuerdo a los datos obtenidos calculamos una disminución en la proliferación de un 37,2% en el *dtr*, de un 46,6% para el *yot* y de un 67,5% en el mutante *smu*.

Además quisimos estudiar qué población de progenitores se ve afectada por la ausencia de la vía de Shh/Gli. A la fecha el marcador más temprano de especificación

neural utilizado para identificar células troncales y progenitores neurales es Sox2 (Pevny & Lovell-Badge, 1997; Graham y col, 2003; Zhao y col, 2004).

Realizamos ISH para *sox2* en embriones *WT* y *smu* de 48hpf observando una disminución de la expresión en la región de la zona periventricular anterior y a nivel del límite dorsal del tectum (Figura 7I, J).

Estos resultados sugieren fuertemente que la vía de señalización de Shh/Gli es necesaria para la proliferación tectal y que la ausencia de esta cascada genera disminución en la expresión del marcador de progenitores neurales *sox2* en las regiones proliferativas del tectum.

Inhibición farmacológica de la vía de Shh/Gli disminuye la proliferación en el tectum óptico.

Posteriormente realizamos tratamientos farmacológicos específicos en ventanas temporales acotadas para complementar y corroborar los datos obtenidos con los mutantes con el fin de determinar el papel de Shh en la proliferación celular en un lapso determinado del desarrollo.

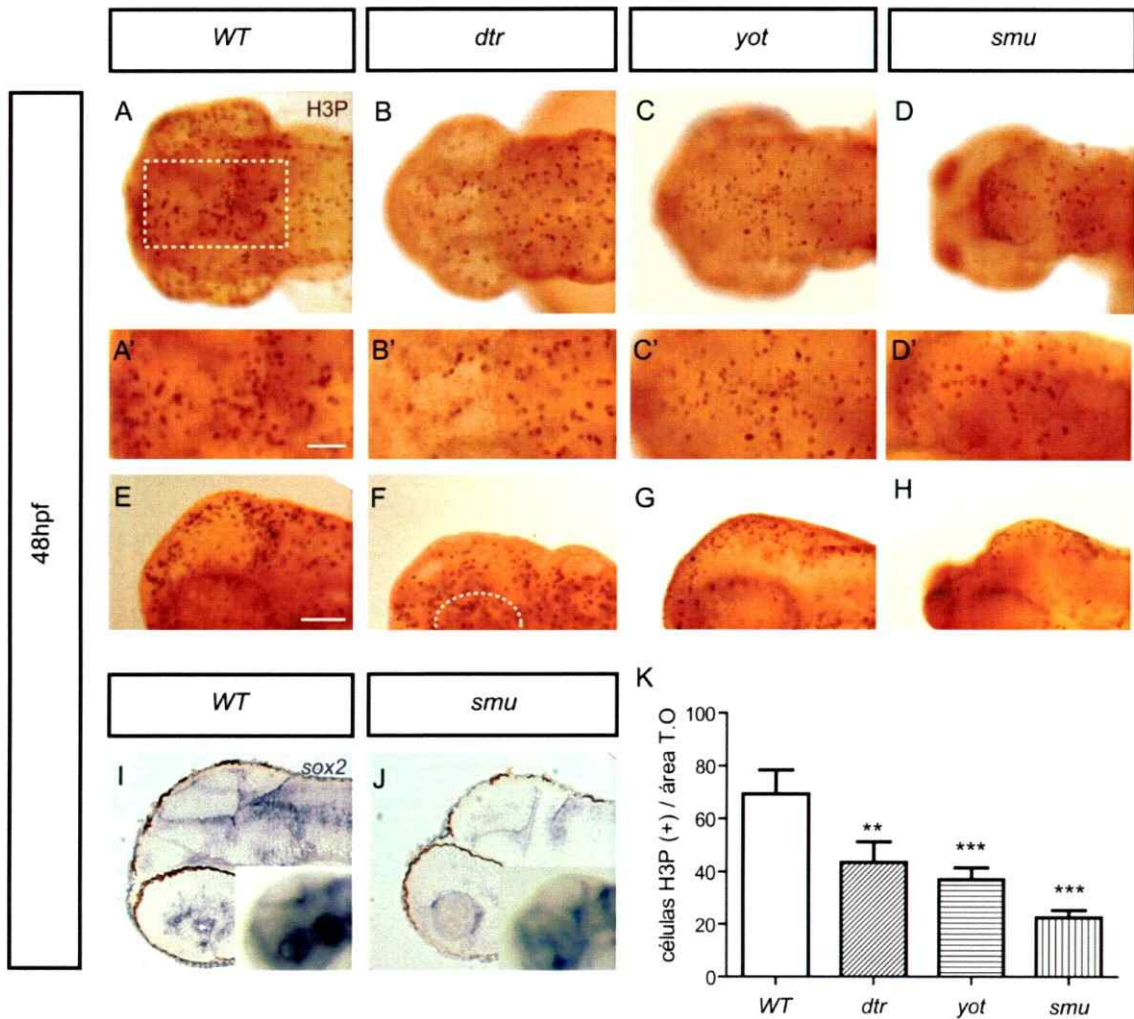


Figura 7. La ausencia de componentes de la vía de señalización de Shh/Gli disminuye la proliferación en el tectum. IHQ para H3P en embriones de 48hpf silvestres (*WT*; A, A', E) y mutantes (*dtr*; B, B', F, *yot*; C, C', G y *smu*; D, D', H). El área a analizar se demarca en A con línea punteada y corresponde al aumento en A'. Al analizar la proliferación del tectum en ausencia de *gli1* (*dtr*) se observa disminución en el número de células H3P positivas con respecto al *WT* (comparar A' con B'). Esta diferencia se evidencia más en el mutante *yot* (*gli2*; C') mientras que en el mutante *smu* (*Smo*) la disminución en la proliferación es aún más drástica (D'). (E-H) Al comparar las vistas laterales también se observa una disminución en la proliferación que se corresponde con lo observado en las vistas dorsales. Cortes sagitales de la ISH para el marcador de progenitores neurales *sox2* muestran diferencias entre el *WT* (I) y el mutante *smu* (J). Se muestran las ISH en embrión completo como inserto en cada caso. (K) Cuantificación del número de células H3P positivas por demuestra una disminución significativa en las tres cepas mutantes (** $p < 0.01$). (A-D') Vistas dorsales, (E-J) vistas laterales. En F la línea punteada delimita el ojo. Anterior se ubica hacia la izquierda. T.O, tectum óptico. Barras de escala, (A-D, E-J) 100 μ m, (A'-D') 50 μ m. Las figuras de la ISH de *sox2* se extrajeron de Oñate y col, (2010).

Primero realizamos tratamientos utilizando el alcaloide ciclopamina (*cyc*) para bloquear específicamente la señalización de Hh. Para simular el fenotipo obtenido en el mutante *smu* iniciamos los tratamientos a las 10hpf, momento donde termina la gastrulación, evitando así agregar la droga en un periodo crítico en donde se establecen las tres capas embrionarias. Fijamos los embriones a las 48hpf y realizamos la IHQ para H3P (Figura 8). Para verificar la efectividad del fármaco evaluamos la expresión de *ptc1* mediante ISH, puesto que este gen es un blanco directo de la vía (Concordet y col, 1996), en los embriones tratados resultando en la disminución de la expresión de este gen en comparación al control (Figura suplementaria 1A y B).

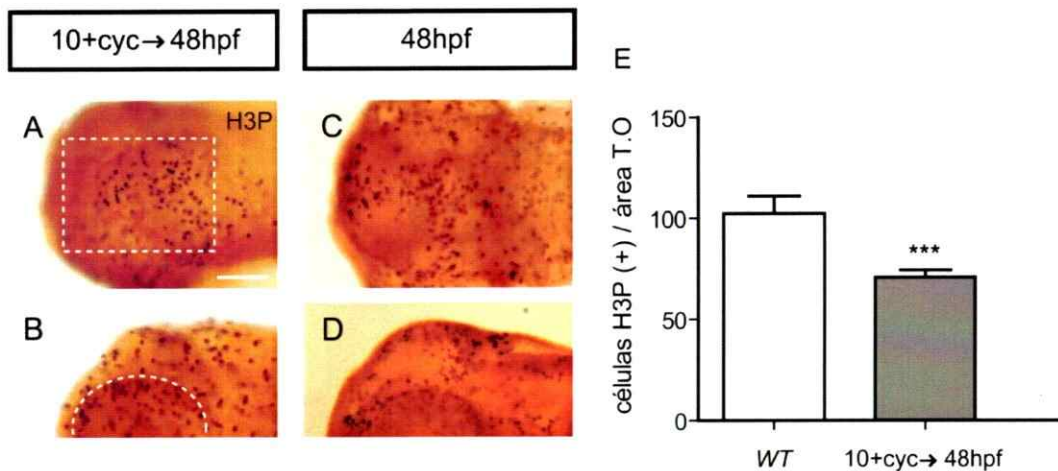


Figura 8. La inhibición farmacológica de la vía de señalización de Shh/Gli disminuye la proliferación. Inmunomarcaje con H3P en embriones tratados con el inhibidor farmacológico específico ciclopamina desde las 10hpf hasta a las 48hpf. La región analizada se demarca en A con línea punteada. (A, B) El tratamiento con ciclopamina disminuye la proliferación a lo largo de toda la región tectal en comparación al embrión *WT* (C, D). (E) Cuantificación del número de células marcadas positivamente para H3P en la región delimitada en A en ambas condiciones demuestra diferencias significativas. *** $p < 0.001$. (A, C) Vistas dorsales, (B, D) vistas laterales. La línea punteada en B delimita la zona del ojo. Anterior se ubica a la izquierda. Barras de escala, 100 μ m.

Como muestra la Figura 8, la inhibición con ciclopamina genera una disminución significativa en la proliferación en relación al *WT*, que podemos observar tanto en las vistas laterales y dorsales (comparar Figura 8A y B con C y D, respectivamente) como en la gráfica (Figura 8E) en donde calculamos una baja de un 30,8% (*cyc* $70,75 \pm 1,797$; *WT* $102,3 \pm 4,910$).

La vía de señalización de Shh/Gli regula la proliferación en el tectum óptico durante la embriogénesis.

Para descartar el efecto que tendría la alteración de esta cascada de transducción de señales durante el *patterning* estudiamos el papel de Shh una vez que ha terminado este proceso, es decir a las 24hpf, de forma de obtener un efecto producto de la ausencia de Shh cuando este actúa como mitógeno y no como morfógeno. Realizamos experimentos de ganancia y pérdida de función de la vía de Shh desde las 24hpf hasta las 48hpf utilizando el agonista purmorfamina (*pur*) y el inhibidor ciclopamina, respectivamente y posteriormente evaluamos la proliferación mediante inmunomarcaje con H3P.

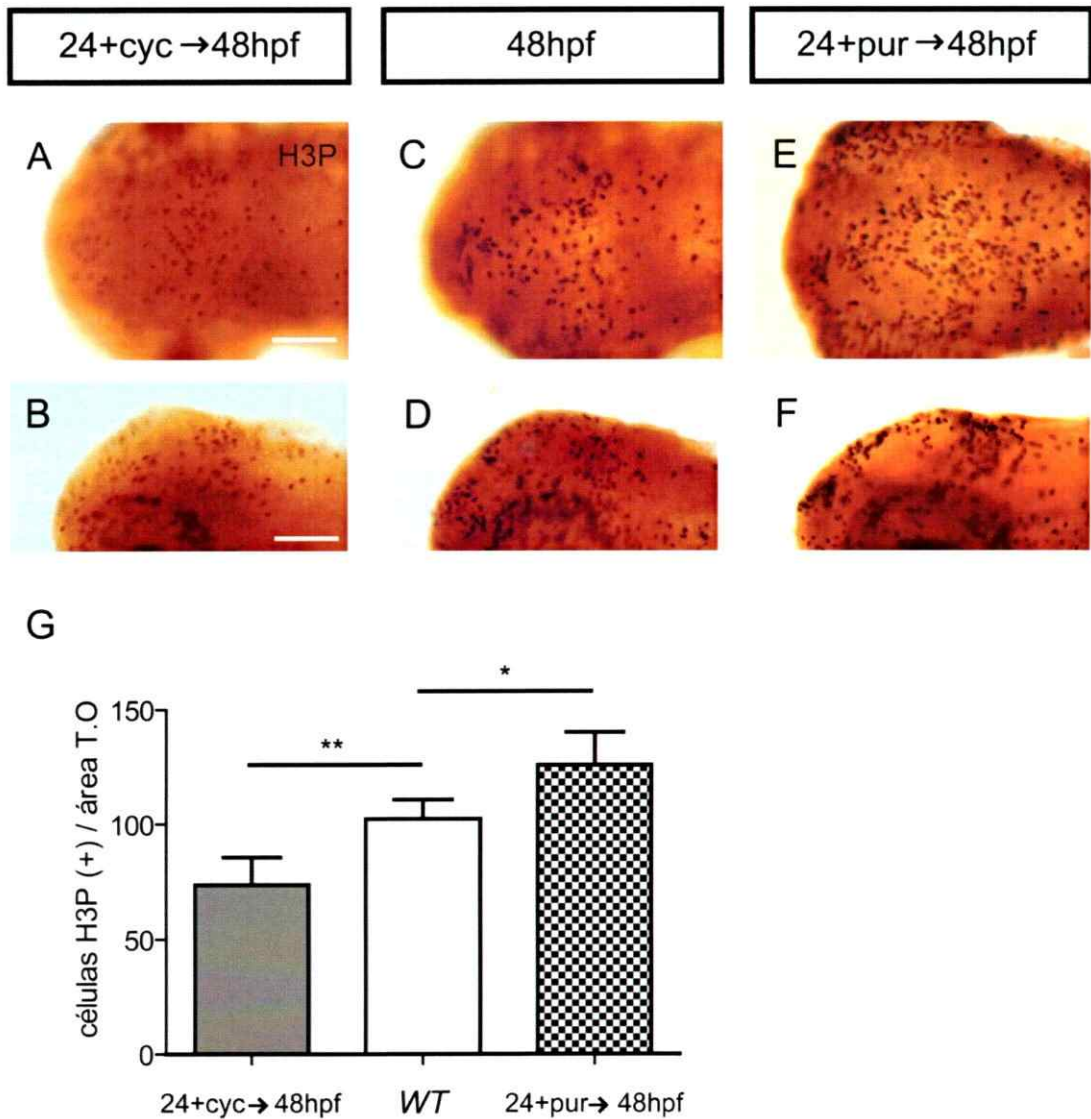


Figura 9. Efecto específico de la vía de señalización de Shh/Gli sobre la proliferación en el tectum óptico. IHQ para H3P en embriones tratados con ciclopamina (A, B) y purmorphamina (E, F) desde las 24hpf hasta las 48hpf. El control corresponde a embriones *WT* de 48hpf (C, D). Tanto en las vistas dorsales como laterales se observa disminución en la proliferación de embriones tratados con el inhibidor ciclopamina mientras que al ser tratados con el agonista purmorphamina se observa el efecto contrario. (G) Como se observa en la cuantificación tanto la disminución con ciclopamina como el aumento con purmorphamina son significativos estadísticamente (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). (A, C, D) Vistas dorsales, (B, D, F) vistas laterales. Anterior se ubica a la izquierda. Barras de escala, 100 μm .

Como observamos en la Figura 9 la ausencia de la vía de señalización genera una disminución en la proliferación (Figura 9A, B) mientras que la sobreactivación de esta cascada tiene un efecto contrario aumentando la proliferación en la región del tectum (Figura 9E, F) en relación al *WT* (Figura 9C, D). La cuantificación en el número de células marcadas positivamente para H3P muestra diferencias significativas entre los tratamientos y los embriones *WT* (*cyc* $73,75 \pm 5,907$; *pur* $125,7 \pm 8,293$; *WT* $102,3 \pm 4,910$, Figura 9G). Observamos una disminución del 41,3% en los tratamientos con ciclopamina y un aumento del 22,9% al tratar los embriones con purmorfamina y compararlos con el *WT*. Para verificar la efectividad de los tratamientos realizamos ISH para *ptc1* en los embriones tratados. Como muestra la Figura suplementaria 1 el tratamiento con ciclopamina genera disminución en la expresión de *ptc1* mientras que el tratamiento con purmorfamina aumenta la expresión de este gen (Figura suplementaria 1E, F, G y H).

Finalmente estudiamos qué ocurre en etapas embrionarias tardías analizando el papel de Shh en una ventana temporal posterior. Para esto iniciamos tratamientos con ciclopamina y purmorfamina a las 30hpf, fijamos los embriones a las 60hpf y luego realizamos doble marcaje para *otx2* y H3P mediante ISH/IHQ (ver Materiales y Métodos) de manera de cuantificar la proliferación específicamente en la región tectal. Posteriormente obtuvimos secciones sagitales de 10 μm en el criostato, realizamos tinción DAPI y cuantificamos el número de células H3P positivas y el de células totales. Al igual que para los tratamientos anteriores verificamos la efectividad de los tratamientos mediante ISH para *ptc1* (Figura suplementaria 1I, J, K y L). Como muestra la Figura 10 la inhibición de la vía de señalización de Shh disminuye la proliferación en el tectum óptico mientras que el tratamiento con el agonista de la vía

genera un aumento en las células H3P positivas en relación al *WT*. El gráfico de la Figura 10J muestra la cuantificación de los datos representados como índice mitótico (cyc $3,351 \pm 0,2106$, pur $5,896 \pm 0,1384$, *WT* $4,951 \pm 3,307$) corroborando la disminución en el tratamiento con ciclopamina (baja en la proliferación del 32,3%) y un aumento en el tratamiento con purmorfamina (aumento del 19,1%).

A partir de los datos obtenidos de los tratamientos farmacológicos podemos establecer una regulación específica de la vía de señalización de Shh/Gli sobre la proliferación de precursores del tectum óptico durante ventanas temporales acotadas en la embriogénesis tardía.

Los resultados obtenidos permiten demostrar que la vía de señalización de Shh/Gli posee un papel fundamental en la proliferación del tectum durante la embriogénesis del pez cebra. Mediante la utilización de cepas mutantes y tratamientos farmacológicos realizamos ganancia y pérdida de función de la vía de Shh mostrando la regulación positiva y directa de la cascada de transducción en este proceso.

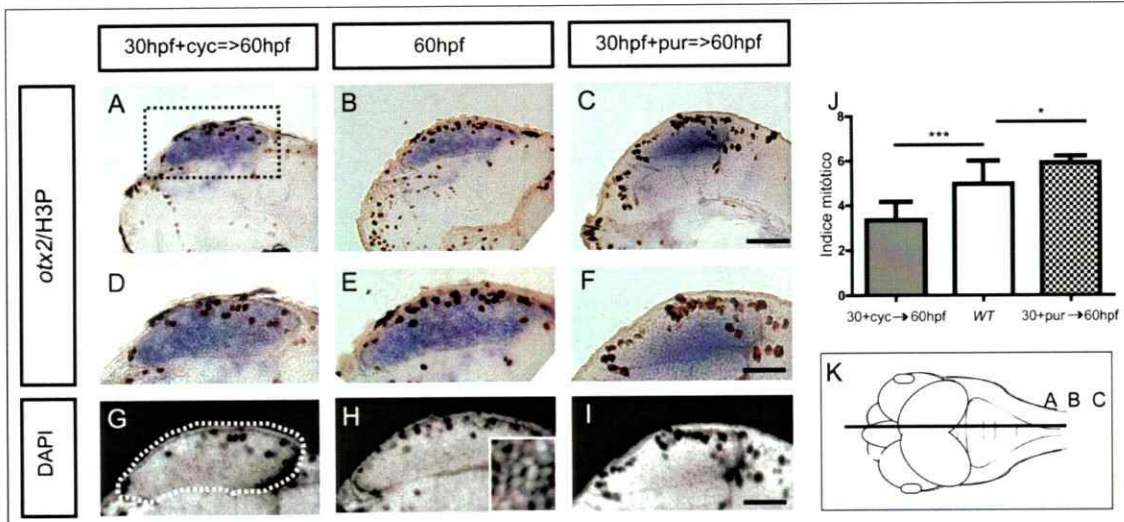


Figura 10. La vía de señalización de Shh/Gli regula la proliferación del tectum durante la embriogénesis tardía. Doble marcaje de ISH/IHQ para *otx2*/H3P (A-F) y tinción para DAPI (G-I) en secciones sagitales de 10µm de embriones tratados con ciclopamina (A, D) y purmorfamina (C, F) desde las 30hpf hasta las 60hpf. (B, E) El control corresponde a embriones *WT* de 60hpf. Se observa menor número de células H3P positivas en la región del tectum (expresión de *otx2*) en los embriones tratados con ciclopamina con respecto al *WT* (comparar D con E). El tratamiento con purmorfamina genera un efecto opuesto aumentando el número de células marcadas para H3P (comparar E con F). (G-I) Tinción DAPI en las diferentes condiciones. La línea punteada en G representa el área delimitada para la cuantificación correspondiente a la región *otx2* positiva. El inserto en H muestra la resolución celular de la tinción DAPI. (J) Cuantificación del número de células H3P positivas por área de tectum representado como índice mitótico (número de células proliferativas/ número total de células) en cada condición muestra diferencias significativas. *** cyc versus *WT* $p < 0.001$, * pur versus *WT* $p < 0.05$. (K) Esquema dorsal de un embrión de 60hpf. La línea negra corresponde a las criosecciones en A, B y C. La línea punteada en A corresponde al aumento en D. (A-I) Vistas laterales. (K) Vista dorsal. Anterior se ubica a la izquierda. Barras de escala, 50 µm.

VII. DISCUSIÓN

La vía de señalización de Shh/Gli cumple un importante papel en el *patterning* ventral durante el desarrollo temprano del SNC, sin embargo, estudios recientes involucran a esta cascada de transducción en procesos más tardíos de proliferación celular y crecimiento tisular en regiones del cerebro dorsal de vertebrados. En este seminario de título demostramos, por primera vez, que Shh promueve la proliferación de progenitores en el tectum óptico durante la embriogénesis del pez cebra.

La vía de señalización de Shh/Gli se expresa en regiones proliferativas del tectum óptico

Mediante inmunoensayos con el marcador de proliferación H3P estudiamos el proceso de proliferación celular en el tectum óptico durante el período embrionario del pez cebra. Identificamos regiones proliferativas en zonas limitantes al ventrículo, principalmente en la zona dorsomedial, hacia los límites laterales y esencialmente en el límite posterior del tectum (Figura 4).

Estudios realizados por Wullimann y Knipp, (2000) utilizando el anticuerpo monoclonal contra el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, por sus siglas en inglés) corroboran y complementan los datos obtenidos en la Figura 4. En dicho trabajo es posible observar fuerte marcaje de PCNA en la mayoría de las células presentes en el mesencéfalo a las 24hpf. Al igual que nuestros datos obtenidos a las 48hpf la proliferación se restringe a las regiones cercanas al ventrículo, particularmente a la región dorsomedial y a la membrana posterior tectal. Finalmente a

las 72hpf la proliferación disminuye fuertemente y se restringe aún más a los límites mediales y laterales. Sin embargo todas las células de la membrana tectal posterior siguen proliferando.

De esta manera, nuestros resultados corroboran y complementan la existencia de una onda proliferativa en el tectum óptico embrionario que ocurre inicialmente en la zona ventral y posteriormente se concentra en la región dorsal del tectum. Durante este proceso observamos un aumento en la proliferación de las células tectales conforme se desarrolla el embrión, alcanzando el máximo número de células proliferativas cercano a las 60hpf, y que posteriormente decaen en el desarrollo hacia las 72hpf.

Posteriormente estudiamos el patrón de expresión de los componentes principales de la vía de señalización de Shh durante la embriogénesis. La Figura 5 muestra que la expresión de *ptc1*, *gli1* y *gli2* se restringe a la región periventricular y a la membrana posterior tectal en el MHB. Existe evidencia que demuestra la presencia de componentes de la cascada de señalización (específicamente, las proteínas Gli) en regiones proliferativas en el límite del ventrículo con el tectum y la corteza de ratón (Dahmane y col, 2001) que corroboraría nuestros resultados. Este patrón de expresión coincide además con los dominios de proliferación evaluados con H3P. Nuevos experimentos realizados en el laboratorio usando doble marcaje ISH/IHQ muestran que existe co-localización en las regiones proliferativas de la membrana posterior tectal (marcadas con H3P) y la expresión de *ptc1* y *gli2* (datos no mostrados).

Cabe destacar que la expresión de *shh* no co-localiza exactamente con el resto de los componentes de la cascada. Esto se debe a que la expresión de *shh* se concentra en regiones ventrales donde se localizan las células secretoras del morfógeno, mientras que el resto de los componentes se encuentran presentes en aquellas células que responden a la vía de señalización y que necesariamente no son las mismas. También es necesario considerar que el ensayo de ISH da cuenta de la expresión del RNA mensajero y no de la proteína, por lo que el patrón de expresión de Shh no es necesariamente igual a su mensajero teniendo en cuenta que este morfógeno es una proteína secretada. Esto indica que a las 30hpf, las células ventrales del tubo neural se encuentran sintetizando Shh, sin embargo el morfógeno difunde hacia las regiones dorsales donde observamos las células que responden (que son las que expresan *gli1*, *gli2* y *ptc1*). Estudios en el tubo neural de pollo indican que el gradiente de Shh no se extiende hacia las regiones más dorsales, siendo un gradiente de las proteínas Gli el responsable del efecto de la cascada a lo largo de todo el tubo neural, (Ingham & McMahon, 2001) lo que estaría explicando en parte los resultados obtenidos en este estudio.

Shh modula la proliferación en el tectum

Realizamos ensayos de proliferación en las cepas mutantes *smu*, *yot* y *dtr*, descritas previamente (Figura 7) para estudiar el papel de la vía de señalización de Shh/Gli en la proliferación del tectum. La cuantificación realizada muestra un efecto significativo y directo de la cascada de señalización sobre el número de células H3P positivas, es decir, mientras menor es la señalización de Shh, menor es la proliferación

en el tectum. El efecto mayor se observa en el mutante *smu* (disminución del 68%), esto debido a que no presenta señalización de Shh, por lo tanto no posee las formas represoras y activadoras de las proteínas Gli.

Por otro lado, dada la disminución significativa en la proliferación tectal del mutante *yot*, en comparación al mutante *dtr*, se sugiere un papel más importante para el efector Gli2 como modulador de la proliferación en el tectum. Sin embargo, este efecto también podría deberse al balance entre las formas activadoras y represoras de las proteínas Gli, debido a que el mutante *yot* corresponde a un dominante negativo de *gli2* mientras que el mutante *dtr* es una forma trunca de la proteína Gli1, y por tanto, no funcional.

Posteriormente evaluamos defectos en la formación y estructuración del tectum óptico en las cepas mutantes. Como muestra la Figura 6 el *patterning* no se ve severamente afectado indicando que se ha formado una estructura tectal determinada por diferentes marcadores, a pesar de que los cerebros mutantes poseen un menor tamaño. Es necesario hacer notar además que esta disminución en el tamaño del cerebro no se debe a un aumento en la muerte celular. Experimentos realizados en nuestro laboratorio con naranjo de Acridina no muestran diferencias en el número de células muertas entre el *WT* y el mutante *smu* a nivel del tectum (Oñate y col, 2010).

Cabe destacar que la ausencia completa de la vía de señalización de Shh presenta un nivel de proliferación basal (Figura 7D, H). Esto indica que en el tectum, la proliferación no está regulada solamente por la vía de Shh. Como muestra la Figura 6 existe expresión en el tectum de otros morfógenos como *wnt* y *fgf8*, que podrían dar cuenta de la proliferación independiente de la señalización de Shh. Se ha visto que

Wnt cumple un papel en este proceso en estadios más tempranos del desarrollo (Nyholm y col, 2007) lo que concuerda con los resultados obtenidos.

Shh actúa sobre una subpoblación de progenitores sox2 (+)

Como muestra la figura 7, la ausencia de la vía de señalización de Shh produce disminución en la expresión del marcador de progenitores sox2, lo que sugiere que la regulación de la vía ocurre en los progenitores neurales. Además se observa que el patrón de expresión de este marcador se corresponde con las zonas proliferativas en el tectum. Resultados que corroboran la relación entre Shh y la regulación de los progenitores neurales sox2 positivos muestran que al realizar doble marcaje ISH/IHQ para sox2/H3P existe co-localización a nivel de la membrana posterior tectal en el MHB. Tratamientos farmacológicos con ciclopamina en diferentes ventanas temporales (desde las 30, 36, 48 y 53hpf hasta las 60hpf) corroboran los resultados obtenidos, observando disminución de la expresión de este marcador conforme mayor es la ventana de inhibición de la cascada de transducción (Oñate y col, 2010). Una forma de demostrar que la vía de señalización de Shh/Gli estaría regulando la proliferación a través de progenitores neurales Sox2 (+) sería necesario realizar experimentos de inmunomarcajes dobles para Sox2 y H3P en condiciones WT, de ganancia y pérdida de función de la vía. Sin embargo, en el laboratorio no ha sido posible realizar este ensayo debido a la ausencia de anticuerpos compatibles que funcionen en este sistema de estudio.

La vía de Shh/Gli modula la proliferación tectal durante la embriogénesis del pez cebra.

Finalmente, con el fin de corroborar y complementar los resultados obtenidos con los mutantes se realizaron tratamientos farmacológicos inhibitorios una vez terminada la gastrulación para evitar defectos severos en el desarrollo obteniéndose el mismo efecto en la disminución de la proliferación. Además realizamos experimentos de ganancia y pérdida de función farmacológica en diferentes ventanas temporales empezando el tratamiento una vez terminado el *patterning* para evaluar el papel de mitógeno de Shh en la proliferación determinando el efecto directo que tendría esta proteína en el proceso de proliferación de proliferación celular.

Estudios realizados en el laboratorio (Oñate y col, 2010) mediante tratamientos farmacológicos inhibitorios con ciclopamina indican que Shh modula la proliferación celular del tectum en un periodo de tiempo determinado una vez que ha terminado el *patterning* del embrión. Tratamientos previos a las 30hpf no presentan disminución significativa de la proliferación tectal indicando que Sonic Hedgehog actúa primeramente en la diferenciación de los distintos tipos celulares ventrales en el tubo neural y posteriormente en la mantención de la proliferación de células troncales y precursores neurales de la región dorsal del tubo neural en una etapa más tardía en el desarrollo.

Proyecciones e investigación futura

Existe evidencia que demuestra el papel de Shh en la mantención de células troncales y progenitores neurales en estadios postnatales y adultos del ratón (Machold y col, 2003; Palma y col, 2005). Dado que el tectum óptico de los teleósteos se mantiene constantemente proliferando y que existe neurogénesis en el adulto (Zupanc y col, 2005; Zupanc y col, 2006) es de esperar que Shh también esté encargado de modular este proceso en el pez cebra en estadios adultos.

Las cepas mutantes utilizadas en este trabajo generan fenotipos letales en estadios larvales por lo que se hace necesario utilizar otra herramienta como son las cepas transgénicas, permitiendo realizar un estudio completamente *in vivo*, y el tratamiento con fármacos específicos para realizar un análisis en el adulto. En el laboratorio disponemos de la cepa transgénica *shh::eGFP*, que nos permitiría estudiar el comportamiento del ligando de la vía en distintas condiciones y complementar el estudio con otras técnicas. Por otro lado, los tratamientos farmacológicos y la utilización del análogo de la timidina, Bromodeoxiuridina (BrdU), permitirían generar ventanas temporales para estudiar en un período específico la acción de la cascada de señalización. De esta forma sería posible evaluar un posible papel de Shh en el proceso de mantención de la proliferación y el crecimiento en el tectum óptico adulto de manera *in vivo* y en ventanas temporales acotadas del desarrollo.

VIII. CONCLUSIÓN

En este trabajo observamos que los componentes esenciales de la cascada de transducción de Shh/Gli se expresan a lo largo de la neurogénesis tectal del pez cebra y controlan la expresión del marcador de progenitores neurales, *sox2* en las regiones proliferativas del tectum óptico, lo que sugiere fuertemente un papel de Shh en la regulación de la proliferación de los progenitores neurales.

Además, el bloqueo de la vía utilizando el inhibidor farmacológico específico ciclopamina y cepas mutantes para componentes clave de esta cascada producen disminución en la proliferación celular. Contrariamente, condiciones de ganancia de función mediante tratamientos farmacológicos con el agonista específico purmorfamina generan aumento en la proliferación tectal demostrando que la vía de señalización de Shh/Gli modula positivamente la proliferación en el tectum óptico durante la embriogénesis del pez cebra.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aanstad, P., Santos, N., Corbit, K. C., Scherz, P. J., Trinh, le A., Salvenmoser, W., Huisken, J., Reiter, J. F. & Stainier, D.Y. (2009) The extracellular domain of Smoothened regulates ciliary localization and is required for high-level Hh signaling. *Curr Biol.* **19**:1034-1039.

Ashe, H.L. & Briscoe, J. (2006) The interpretation of morphogen gradients. *Development*, **133**, 385-394.

Barresi, M.J., Stickney, H.L. & Devoto, S.H. (2000) The zebrafish slow-muscle-omitted gene product is required for Hedgehog signal transduction and the development of slow muscle identity. *Development.* **127**: 2189-2199.

Brand, M., Heisenberg, C.P., Warga, R.M., Pelegri, F., Karlstrom, R.O., Beuchle, D., Picker, A., Jiang, Y.J., Furutani-Seiki, M., van Eeden, F.J., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J. & Nusslein-Volhard, C. (1996) Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Development.* **123**: 129-142.

Briscoe, J. (2006) Agonizing Hedgehog. *Nat Chem Biol.* **2**: 10-11.

Britto, J., Tannahill, D. & Keynes, R. (2002) A critical role for sonic hedgehog signaling in the early expansion of the developing brain. *Nat Neurosci*, **5**: 103-110.

Cai, C., Thome, J. & Gabel, L. (2008) Hedgehog serves as a mitogen and survival factor during embryonic stem cell neurogenesis. *Stem Cells*, **26**, 1097-1108.

Chen, W., Burgess, S. & Hopkins, N. (2001) Analysis of the zebrafish smoothened mutant reveals conserved and divergent functions of hedgehog activity. *Development.* **128**: 2385-2396.

Chen, J. K., Taipale, J., Young, K. E., Maiti, T., Beachy, P. A. (2002) Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:14071-14076.

Concordet, J.P., Lewis, K.E., Moore, J.W., Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Scott, M.P. & Ingham, P.W. (1996) Spatial regulation of a zebrafish patched homologue reflects the roles of sonic hedgehog and protein kinase A in neural tube and somite patterning. *Development.* **122**: 2835-2846.

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

Crump, J.G., Maves, L., Lawson, N.D., Weinstein, B.M. & Kimmel, C.B. (2004) An essential role for Fgfs in endodermal pouch formation influences later craniofacial skeletal patterning. *Development*. **131**:5703-16.

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

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

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

Gurdon, J.B. & Bourillot, P.Y. (2001) Morphogen gradient interpretation. *Nature*. **413**: 797-803.

Hammond, C.L., Hinitz, Y., Osborn, D.P., Minchin, J.E., Tettamanti, G. & Hughes, S.M. (2007) Signals and myogenic regulatory factors restrict pax3 and pax7 expression to dermomyotome-like tissue in zebrafish. *Dev Biol*. **302**: 504-521.

Hernandez, P.P., Olivari, F.A., Sarrazin, A.F., Sandoval, P.C. & Allende, M.L. (2007) Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker *sox2* and proliferation-dependent and-independent mechanisms of hair cell renewal. *Dev Neurobiol*. **67**. 637-654.

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

Ingham, P.W. & McMahon, A.P. (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. **15**: 3059-3087.

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

Karlstrom, R.O., Trowe, T., Klostermann, S., Baier, H., Brand, M., Crawford, A.D., Grunewald, B., Haffter, P., Hoffmann, H., Meyer, S.U., Muller, B.K., Richter, S., van Eeden, F.J., Nusslein-Volhard, C. & Bonhoeffer, F. (1996) Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Development*. **123**: 427-438.

Karlstrom, R.O., Tyurina, O.V., Kawakami, A., Nishioka, N., Talbot, W.S., Sasaki, H. & Schier, A.F. (2003) Genetic analysis of zebrafish *gli1* and *gli2* reveals divergent requirements for gli genes in vertebrate development. *Development*. **130**: 1549-1564.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. **203**: 253-310.

Krauss, S., Concordet, J.P. & Ingham, P.W. (1993) A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*. **75**: 1431-1444.

Lum, L. & Beachy, P.A. (2004) The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*. **304**: 1755-1759.

Lun, K. & Brand, M. (1998) A series of no isthmus (*noi*) alleles of the zebrafish *pax2.1* gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary. *Development*. **125**: 3049-3062.

Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M.D., Nery, S., Corbin, J.G., Gritti-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J.A., Rubin, L.L., Dudek, H., McMahon, A.P. & Fishell, G. (2003) Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron*. **39**: 937-950.

Mas, C. & Ruiz i Altaba, A. (2010) Small molecule modulation of HH-GLI signaling: current leads, trials and tribulations. *Biochem Pharmacol*. **80**: 712-723.

Michaud, E. J & Yoder, B. K. (2006) The Primary Cilium in Cell Signaling and Cancer. *Cancer Res*. **66**: 6463-6467.

Molven, A., Njolstad, P. R. & Fjose, A. (1991) Genomic structure and restricted neural expression of the zebrafish *wnt-1* (*int-1*) gene. *EMBO J.* **10**:799-807.

Nguyen, V., Chokas, A.L., Stecca, B. & Ruiz i Altaba, A. (2005) Cooperative requirement of the Gli proteins in neurogenesis. *Development.* **132**: 3267-3279.

Nyholm, M.K., Wu, S.F., Dorsky, R.I. & Grinblat, Y. (2007) The zebrafish *zic2a-zic5* gene pair acts downstream of canonical Wnt signaling to control cell proliferation in the developing tectum. *Development.* **134**: 735-746.

Oñate, M. G., Feijoo, C. G., Milla, L. A. & Palma, V. (2010) Sonic Hedgehog (Shh)-Gli signaling controls neural progenitor cell division in the developing tectum in zebrafish. *Accepted en Europ J Neurosc.*

Palma, V., Lim, D.A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T.C., Herzberg, C.D., 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.

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

Pevny, L.H. & Lovell-Badge, R. (1997) Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev.* **7**: 338-344.

Reifers, F., Bohli, H., Walsh, E.C., Crossley, P.H., Stainier, D.Y. & Brand, M. (1998) *Fgf8* is mutated in zebrafish acerebellar (*ace*) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development.* **125**: 2381-2395.

Sarrazin, A.F., Villablanca, E.J., Nunez, V.A., Sandoval, P.C., Ghysen, A. & Allende, M.L. (2006) Proneural gene requirement for hair cell differentiation in the zebrafish lateral line. *Dev Biol.* **295**: 534-545.

Schmatolla, E. (1972) Dependence of tectal neuron differentiation on optic innervation in teleost fish. *J Embryol Exp Morphol.* **27**: 555-576.

Simpson, F., Kerr, M.C. & Wicking, C. (2009) Trafficking, development and hedgehog. *Mech Dev.* **126**: 279-288.

Taipale, J., Chen, J. K., Cooper, M. K., Wang, B., Mann, R. K., Milenkovic, L., Scott, M. P. & Beachy, P. A. (2000) Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature.* **406**:1005-1009.

Taipale, J. & Beachy, P.A. (2001) The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature.* **411**: 349-354.

Thisse, C. & Thisse, B. (2008) High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc.* **3**: 59-69.

Traiffort, E., Angot, E. & Ruat, M. (2010) Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J Neurochem.* **113**: 576-590.

Tyurina, O.V., Guner, B., Popova, E., Feng, J., Schier, A.F., Kohtz, J.D. & Karlstrom, R.O. (2005) Zebrafish Gli3 functions as both an activator and a repressor in Hedgehog signaling. *Dev Biol.* **277**: 537-556.

Ulloa, F. & Briscoe, J. (2007) Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord. *Cell Cycle.* **6**: 2640-2649.

van de Water, S., van de Wetering, M., Joore, J., Esseling, J., Bink, R., Clevers, H. & Zivkovic, D. (2001) Ectopic Wnt signal determines the eyeless phenotype of zebrafish masterblind mutant. *Development.* **128**: 3877-3888.

Varga, Z.M., Amores, A., Lewis, K.E., Yan, Y.L., Postlethwait, J.H., Eisen, J.S. & Westerfield, M. (2001) Zebrafish smoothed functions in ventral neural tube specification and axon tract formation. *Development.* **128**: 3497-3509.

Varjosalo, M. & Taipale, J. (2007) Hedgehog signaling. *J Cell Sci.* **120**: 3-6.

Wallace, V.A. (1999) Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol.* **9**: 445-448.

Wechsler-Reya, R.J. & Scott, M.P. (1999) Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron.* **22**: 103-114.

Westerfield, M. (2007) *The Zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio)*. University of Oregon Press, Eugene, Or.

Wullmann, M.F. & Knipp, S. (2000) Proliferation pattern changes in the zebrafish brain from embryonic through early postembryonic stages. *Anat Embryol (Berl).* **202**: 385-400.

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

Zupanc, G.K. (2006) Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* **192**: 649-670.

Zupanc, G.K., Hinsch, K. & Gage, F.H. (2005) Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *J Comp Neurol.* **488**: 290-319.

X. MATERIAL SUPLEMENTARIO

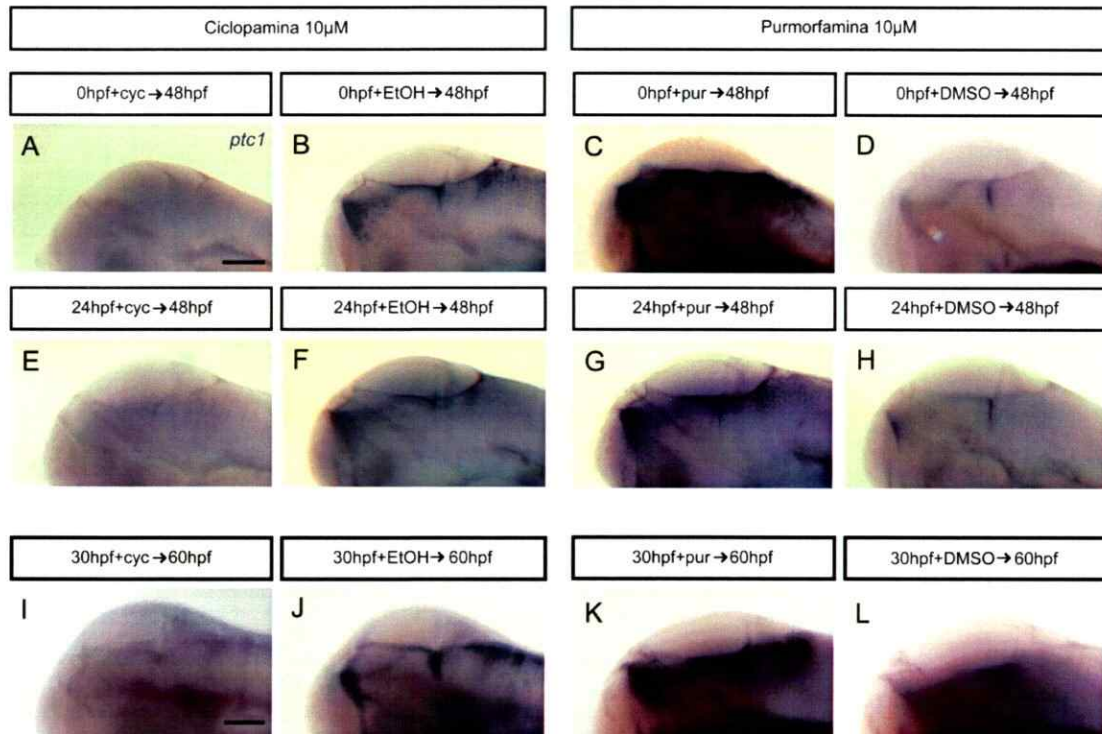


Figura suplementaria 1. Efectividad de los tratamientos farmacológicos sobre la vía de señalización de Shh/Gli. ISH de *ptc1* en embriones tratados farmacológicamente con ciclopamina y purmorfamina durante diferentes ventanas temporales. Los tratamientos se realizaron desde las 0 y 24hpf y se fijaron los embriones a las 48hpf (A, C, E, G) y desde las 30hpf hasta las 60hpf (I, K). Como control se utilizaron tratamientos con EtOH para ciclopamina y DMSO para purmorfamina durante las mismas ventanas temporales. En los tratamientos con ciclopamina se observa disminución en la expresión de *ptc1* con respecto al control con EtOH (A, E, I) mientras que en los tratamientos con purmorfamina se observa aumento en la expresión de *ptc1* con respecto al control con DMSO (C, G, K). Vistas laterales con anterior ubicado hacia la izquierda. Barras de escala, 50 μ m.