

UCH-FC  
Biotecnología  
A 658  
C. 1

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
Facultad de Ciencias



**Papel de Shh en la proliferación y diferenciación  
del mesencéfalo dorsal (tectum) de ratón.**

Memoria de Título  
Entregada a la  
Universidad de Chile  
Para optar al Título de  
Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Francisco Araya Bonilla**

Enero 2008  
Santiago – Chile

Director de Tesis: Dra. Verónica Palma Alvarado



**“Papel de Shh en la proliferación y diferenciación del mesencéfalo dorsal (tectum) de ratón.”**

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

**FRANCISCO JAVIER ARAYA BONILLA**

Dra. Verónica Palma Alvarado  
**Director Seminario de Título**

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

Dr. Christian González-Billault  
**Presidente Comisión**

Firma manuscrita en tinta azul de Christian González-Billault, sobre una línea horizontal.

Dra. Magdalena Sanhueza  
**Correctora**

Firma manuscrita en tinta azul de Magdalena Sanhueza, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, 30 de Enero de 2008

*Con cariño.  
A mi Familia*

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que gracias a su confianza constante y apoyo incondicional, me permitieron concluir esta memoria.

A mi familia. A Daniela por su compañía, amor, apoyo en todo momento y a Florencia por hacer de mi vida una aventura que día a día me hace más feliz.

A mi tutor Verónica, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo en su laboratorio, siendo una excelente guía durante y después del periodo que llevó realizarlo.

A todos los compañeros y amigos del VP lab, en especial a Pablo, Polo, Gisella, Gustavo y Carmen. No olvidaré su buena acogida cuando llegué, los almuerzos, los momentos en el mesón y las discusiones sobre ciencia, que hicieron más llevadero el trabajo de laboratorio.

A mis amigos de la U, a P.A.T.H. y a O.P.A, por el tiempo compartido tanto dentro como fuera del Campus.





“Hola mi nombre es Francisco Araya. Nacido en la ciudad de La Serena en la cuarta región, crecí junto al mar y en la tranquilidad de esta ciudad. Allí curse toda mi educación escolar en el Colegio Ingles Católico de La Serena, siempre involucrado en diversas actividades. Durante aquel periodo se formaron grandes lazos de amistad que aun perduran, además, se fueron definiendo mis intereses ligados a las ciencias. Ya finalizado el colegio decido continuar con estudios universitarios, tomo mis maletas rumbo a Santiago y me incorporo a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile llegando a la Facultad de Ciencias. En esta etapa ocurren los eventos más relevantes de mi vida, el más importante, nos enamoramos con Daniela quien me regalo a Florencia. Conocí también a otras personas que me ayudaron a crecer en el camino académico como en lo cotidiano, haciendo la vida universitaria más llevadera y placentera. Así, no puedo dejar de mencionar a los “Clubes Sociales y Deportivos” P.A.T.H. y O.P.A. compañeros de muchos partidos en Calama y de tardes en las graderías. Ya hacia el final de mi etapa universitaria realizo mi tesis en el Laboratorio de la Dra. Verónica Palma, donde definitivamente me involucro con el trabajo científico y decido continuar por este camino hasta el día de hoy.”

## INDICE DE CONTENIDO

	Pag.
i. Resumen .....	vi
ii. Abstract .....	viii
<b>1. Introducción.</b> .....	<b>1</b>
1.1. Desarrollo del cerebro medio o mesencéfalo en mamíferos. ....	1
1.2. La vía Shh y su contribución al establecimiento del eje ventral del Sistema Nervioso. ....	2
1.3. Papel de Shh en el desarrollo de derivados dorsales del Sistema nervioso Central. ....	4
1.4. La cascada de señalización de Shh/Gli. ....	5
1.5. Implicancia de Shh en el establecimiento de tamaño y forma del cerebro medio .....	10
1.6. Estudios <i>in vitro</i> de la función de Shh en el desarrollo del cerebro anterior....	11
<b>2. Hipótesis</b> .....	<b>13</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>13</b>
3.1. Objetivo general.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
<b>4. Materiales y Métodos</b> .....	<b>14</b>
4.1. Material Biológico.....	14
4.2. Material de Biología celular y Reactivos.....	14
4.3. Cultivo celular.....	16
4.3.1. Medio de disociación de tejido.....	16
4.3.2. Medios de cultivo.....	17

4.4. Procedimientos.....	18
4.4.1.    Obtención de secciones de tectum.....	18
4.4.2.    Generación de Neuroesferas de tectum.....	18
4.4.3.    Experimentos con Neuroesferas de tectum.....	19
4.4.4.    Criopreservación de Neuroesferas:.....	20
4.4.5.    Experimentos con Explantes tectales.....	21
4.4.6.    Inmunofluorescencias:.....	22
4.4.7.    RT-PCR.....	22
4.4.8.    Westernblotting.....	22
4.4.9.    Análisis Estadístico.....	24
<b>5.    Resultados.....</b>	<b>24</b>
5.1.    Generación de un cultivo de células troncales de tectum.....	24
5.2.    Ciclopamina disminuye la generación de neuroesferas tectales en Ensayos Clonales.....	27
5.3.    Shh afecta la proliferación en cultivos de células troncales y de explantes tectales de embriones.....	29
5.4.    El receptor de EGF (EGFR) se expresa en células troncales y explantes tectales y es modulado por la vía de Shh.....	34
5.5.    Diferenciación en cultivo de células troncales y explantes tectales de embriones en respuesta Shh.....	36

<b>6.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>41</b>
6.1.	Generación de un cultivo de células troncales de tectum.....	43
6.2.	Ensayos Clónales de neuroesferas tectales.....	45
6.3.	Proliferación evaluada en cultivos de células troncales y en explantes tectales.....	46
6.4.	Expresión del receptor de EGF (EGFR) en células troncales y explantes tectales. ....	48
6.5.	Diferenciación en cultivo de células troncales y explantes tectales de embriones en respuesta a Shh.....	50
6.6.	Discusión general. ....	53
<b>7.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>55</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLA.

Figura 1	Diagrama del desarrollo del colículo superior de ratón.....	1
Figura 2	Diagrama de la vía de señalización de Shh.....	6
Figura 3	Esquema del código de acción propuesto para los Factores de transcripción Gli. ....	9
Figura 4	Diseño experimental seguido en el estudio del crecimiento del tectum de ratón.....	24
Figura 5	Cultivos de células troncales tectales (neuroesferas tectales) embrionarias de ratón.....	25
Figura 6	Establecimiento de un cultivo de neuroesferas de tectum murino.....	26
Figura 7	Generación de neuroesferas tectales en presencia de ciclopamina.....	28
Figura 8	Efecto de la Ciclopamina sobre la proliferación de células troncales tectales en la embriogénesis tardía. ....	30
Figura 9	Proliferación en explantes tratados con ganancia o pérdida de función de Shh. ....	31
Figura 10	Muerte celular en explantes tectales tratados con ciclopamina.....	32
Figura 11	Expresión de <i>Gli1</i> en explantes tectales tratados con ciclopamina. ....	33
Figura 12	Expresión del receptor de EGF ( <i>EGFR</i> ) en el tectum. ....	35
Figura 13	Efecto de la Ciclopamina en la diferenciación de astrocitos a partir de células troncales tectales. ....	37
Figura 14	Efecto de la Ciclopamina en la generación de neuronas a partir de células troncales tectales. ....	38
Figura 15	Generación de neuronas en explantes tectales de embriones tratados.	39
Figura 16	Generación de astrocitos en explantes tectales de embriones tratados.	40
Figura 17	Diagrama de la localización y respuesta a Shh.....	42
Tabla 1	Listado de anticuerpos utilizados en Inmunofluorescencia y Westernblotting.....	15

## Lista de abreviaturas

aa	: Aminoácidos
Kb	: Kilo Bases
DMSO	: Dimetil Sulfóxido
dNTPs	: Desoxinucleótidos Trifosfato
DTT	: Ditioneitol
EDTA	: Ácido Etileno Di-amino Tetracético
kDa	: Kilo Dalton
NSC's	: neural stem cells; células troncales embrionarias de ratón
PBS	: Tampón Fosfato
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa.
PM	: Peso Molecular
PMSF	: Fenil Metil Sulfonil Fluoruro
RT-PCR	: PCR en transcripción reversa
SDS	: Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS
TAE	: Tampón Tris Acetato EDTA
TBS	: Tampón Tris
TX-100	: Tritón X-100
Shh	: Sonic Hedgehog
EGF	: Epidermal growth factor
FGF	: Fibroblastic growth factor
LIF	: Leukimia Inhibitor Factor
EGFR	: Epidermal growth factor receptor
NSP	: Neuroesfera
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol

## I.RESUMEN

En etapas tempranas del desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) en vertebrados, existen numerosas vías de señalización que actúan juntas para dar origen al establecimiento correcto de patrones necesarios para la formación y subdivisión del cerebro en los ejes dorso-ventral y antero-posterior (patterning). Una componente de estas vías es una molécula clave en la especificación del tubo neural, Sonic hedgehog (Shh). Shh es una proteína secretada con características de morfógeno que controla diversos aspectos del desarrollo embrionario tales como proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Además de ser un factor de especificación celular ventral, durante la embriogénesis temprana, existe el antecedente que Shh actuaría como mitógeno para precursores neuronales en la neocorteza, en el hipocampo y también en el cerebelo, tres estructuras dorsales y de desarrollo embrionario tardío en ratón. Sin embargo, existen aun incógnitas en cuanto a la acción, efecto y regulación de Shh y sus proteínas efectoras que participan en esta cascada de señales, las proteínas Gli, en el crecimiento del mesencéfalo dorsal. A lo menos tres proteínas Gli han sido identificadas en vertebrados (Gli1, Gli2 y Gli3), factores de transcripción modulados por la señal Hedgehog. Dependiendo de la señalización de Shh, se han descrito tanto funciones específicas como redundantes para estas proteínas; si bien Gli1 es sólo un activador fuerte, Gli2 y Gli3 actuarían como factores de transcripción duales ya que ambos poseen dominios de activación y represión.

Durante este trabajo se caracterizó el efecto de Shh/Gli en etapas tardías del desarrollo embrionario del mesencéfalo de ratón, específicamente en la formación del componente dorsal (tectum) que dará origen a los colículos superior e inferior. Además se estudió la posible relación entre la vía de Shh con la señalización mediada por otros factores de crecimiento implicados en el desarrollo del cerebro tales como el Factor de

crecimiento epidérmico (EGF) y el Factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb). Ensayos de proliferación y diferenciación fueron llevados a cabo en cultivos de células troncales y explantes obtenidos del tectum del cerebro embrionario.

## **ii.ABSTRACT**

In early stages of development of the Central Nervous System (CNS) in vertebrates, numerous signalling pathways act together to give origin to the correct pattern of formation and subdivision of the brain to pattern both the dorso-ventral and antero-posterior axes. One part of these signalling pathways is a key molecule involved in the ventral specification of the neural tube, Sonic hedgehog (Shh).. Shh is a secreted protein with morphogenic functions controlling diverse aspects of embryonic development such as proliferation, differentiation and survival of cells. In addition to being a ventral cellular specification factor during the early development of the nervous system, several studies have shown that Shh can act like a mitogen for neuronal precursors in neocortex, hippocampus and also in the cerebellum, three dorsal structures of late stage embryonic development in mouse. Nevertheless, little is known about the action, effect and regulation of the proteins that participate in the Shh cascade, including the Gli proteins. At least three Gli proteins have been identified in vertebrates (Gli1, Gli2 and Gli3), and they are transcription factors modulated by the Shh signal. Depending on the signaling status of Shh, specific as well as redundant functions for these proteins have been described; although Gli1 is only a strong activator, Gli2 and Gli3 could act like dual transcription factors, since both have activation and repressor domains.

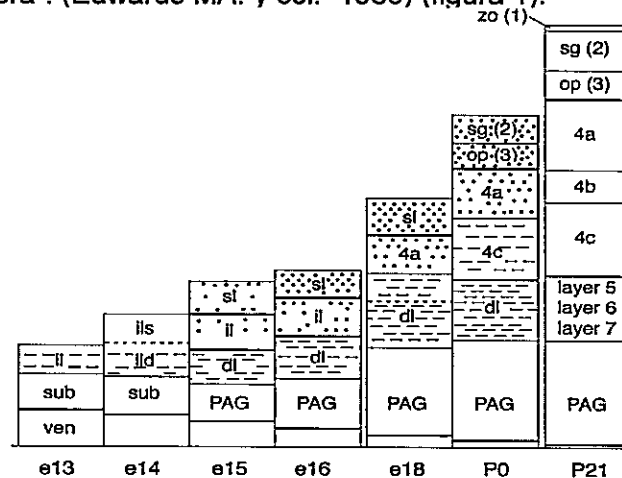
Here we have characterized the effect of Shh/Gli on mouse mesenphalon development at late stages of embryonic development, specifically in the formation of

the dorsal component (tectum) that will give origin to the superior and inferior colliculus. In addition to the interactions between Shh and Gli proteins we have also investigated interactions between the Shh signaling pathway and other growth factors important in the development of the brain, such as Epidermal Growth factor (EGF) and basic Fibroblastic Growth factor (FGFb). Studies of proliferation and differentiation were carried out in neural stem cells and explants obtained from the tectum of the embryonic brain.

# 1. INTRODUCCION

## 1.1. Desarrollo del cerebro medio o mesencéfalo en mamíferos.

El desarrollo del cerebro medio o mesencéfalo, puede dividirse tempranamente en el plano dorso ventral. El derivado ventral forma el tegmentum, que a su vez origina una serie de núcleos neuronales relacionados con el control motor y equilibrio, y el componente dorsal da origen al tectum óptico. Esta última es una estructura laminada y el mayor centro de integración visual en vertebrados inferiores, que en mamíferos formará los colículos inferior y superior. Rápidamente durante la última semana de gestación embrionaria, el colículo superior se genera a partir de un simple neuroepitelio transformándose en una estructura compuesta por múltiples capas, para alcanzar definitivamente el patrón de laminación característico en el adulto hacia el final de la primera semana postnatal. El tectum presenta un patrón de crecimiento llamado de "adentro-hacia afuera". (Edwards MA. y col. 1986) (figura 1).



**Figura 1.** Diagrama del desarrollo del colículo superior de ratón. En el colículo superior se aprecia en general un patrón de neurogénesis de "adentro-hacia afuera", a excepción de la capa óptica (3), que se genera más temprano que la capa 2 (afuera-hacia adentro). Las capas 4a y 4c se desarrollan en su mayoría durante el mismo día, al igual que algunas neuronas destinadas a otras capas. La aparición de forma transversal de fibras fasciculadas en las capas (il) temprana y emergente (dl) se muestra esquemáticamente por líneas horizontales; los paquetes longitudinales formados en las capas (sl) y (il) desde e15 en adelante son indicados por puntos. dl, capa profunda; il, capa intermedia; ild, capa intermedia profunda; ils, capa intermedia superficial; op, capa óptica; PAG, periaqueductal gris; sg, capa gris superficial; sub, capa subventricular; ven, capa ventricular; zo, capa zonal. (Basado en Edwards MA. y col. 1986 y Alvarez-Bolado G. 1999). e, días de gestación embrionaria; P días de gestación postnatal.

La regionalización del mesencéfalo esta determinada por diferentes señales inductivas secretadas, como son miembros de la familia de los factores de crecimiento FGF, EGF y Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Shh y Wnt. Estas señales se expresan en el cerebro en desarrollo de manera regionalmente restringida (Liu A., Joyner AL. 2001), lo que trae consigo la generación de diferentes tejidos delimitados por gradientes en las concentraciones de estos factores de crecimiento. Así distintas células con propiedades específicas, que a su vez definen un fenotipo particular, se ubican en torno al centro inductor. La acción de los factores de crecimiento se traduce en la activación de factores de transcripción específicos. Por otro lado la regulación de la actividad biológica diferencial de cierto ligando es llevada a cabo por antagonistas, activadores o modificadores postraduccionales, que por ejemplo, controlan el rango funcional de la proteína o su vida media (Ruiz i Altaba y col., 2002). En ratón se ha descrito una serie de genes involucrados en la determinación de la región mesencefálica, y se postula que la región del tubo neural que expresa *En*, *Pax2*, *Pax5*, *Pax7* y *Otx*, dará origen al tectum, siendo la inducción de FGF8 y Wnt1 clave para el desarrollo normal del mesencéfalo (Liu A., Joyner AL. 2001).

## **1.2. La vía Shh y su contribución al establecimiento del eje ventral del Sistema Nervioso.**

El gen *Hedgehog* (*Hh*) fue originalmente descrito en una búsqueda de mutantes en los que se viera afectado el plan corporal y la polaridad larval en *Drosophila* (Nusslein-Volhard y Wiechaus, 1980). El fenotipo del mutante *Hh*, mostró la duplicación de estructuras externas llamadas cerdas, que al proyectarse, se asemejan a las espinas de un erizo. En vertebrados, posteriormente se determinó que existen tres

proteínas homólogas: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) y Desert Hedgehog (Dhh). Shh es una glicoproteína con comportamiento de morfógeno; previamente a ser secretada sufre modificaciones postraduccionales, como la adición de compuestos lipídicos y procesamiento proteolítico esenciales para su difusión (Lewis P.M. y cols., 2001).

Al secretarse, Shh es transportado a células vecinas por mecanismos que aún se investigan, sin embargo, se sabe que elementos de la matriz extracelular pueden estar involucrados en su difusión (Bornemann y cols., 2004, Rubin y cols., 2002, Larraín y Palma, 2006, manuscrito en preparación). En el sistema nervioso a nivel del tubo neural, Shh es requerido tempranamente y de una forma dosis dependiente, siendo éste secretado por células de la notocorda y la placa del piso. Actuando como morfógeno, Shh inicia una cascada de señales que lleva a la especificación de diferentes tejidos durante el desarrollo embrionario en el eje neural ventral, en particular en la formación de la médula espinal (Jessell, 2002; Fuccillo y col. 2006). La mayor concentración ventral de Shh en la médula espinal, resulta en el aumento de la expresión de algunos genes (genes clase II), y la represión de la expresión de otros (genes clase I), lo que finalmente se traduce en la especificación de distintos tipos celulares, tales como oligodendrocitos y motoneuronas en el tubo neural. En el cerebro medio y posterior ventral Shh especifica neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas (Ye y cols., 1998, Soula y cols., 2001).

A través de la regulación de la proliferación y la especificación de distintos territorios, Shh también se encuentra relacionado con el desarrollo del cerebro anterior, medio y posterior. Específicamente en el cerebro anterior Shh se requiere tempranamente para formar las estructuras ventrales del telencéfalo (Chiang C. y col. 1996). Existen varios antecedentes que indican que Shh tendría una acción ventralizante sobre el



mesencéfalo generando el tegmentum. En embriones de pollo, el transplante de la placa del piso mesencefálica hacia la parte dorsal del mesencéfalo cambia el destino de tectum a tegmentum, esto en las zonas adyacentes a los transplantes. Similares resultados fueron obtenidos mediante el transplante de fibroblastos secretores de Shh (Nomura T. y Fujisawa H., 2000). Mediante la temprana acción ectópica de Shh, a través de electroporación *in ovo*, es posible ventralizar y reordenar la zona dorsal del cerebro medio (Agarwala y col. 2001). A su vez Shh reprime la expresión de genes tectales como *En1*, *En2*, *Pax2*, *Pax7* y *Fgf8* (Watanabe y Nakamura, 2000; Thompson y col, 2004), además de inducir marcadores ventrales como *HNF-3 $\beta$* .

### **1.3. Papel de Shh en el desarrollo de derivados dorsales del Sistema nervioso Central.**

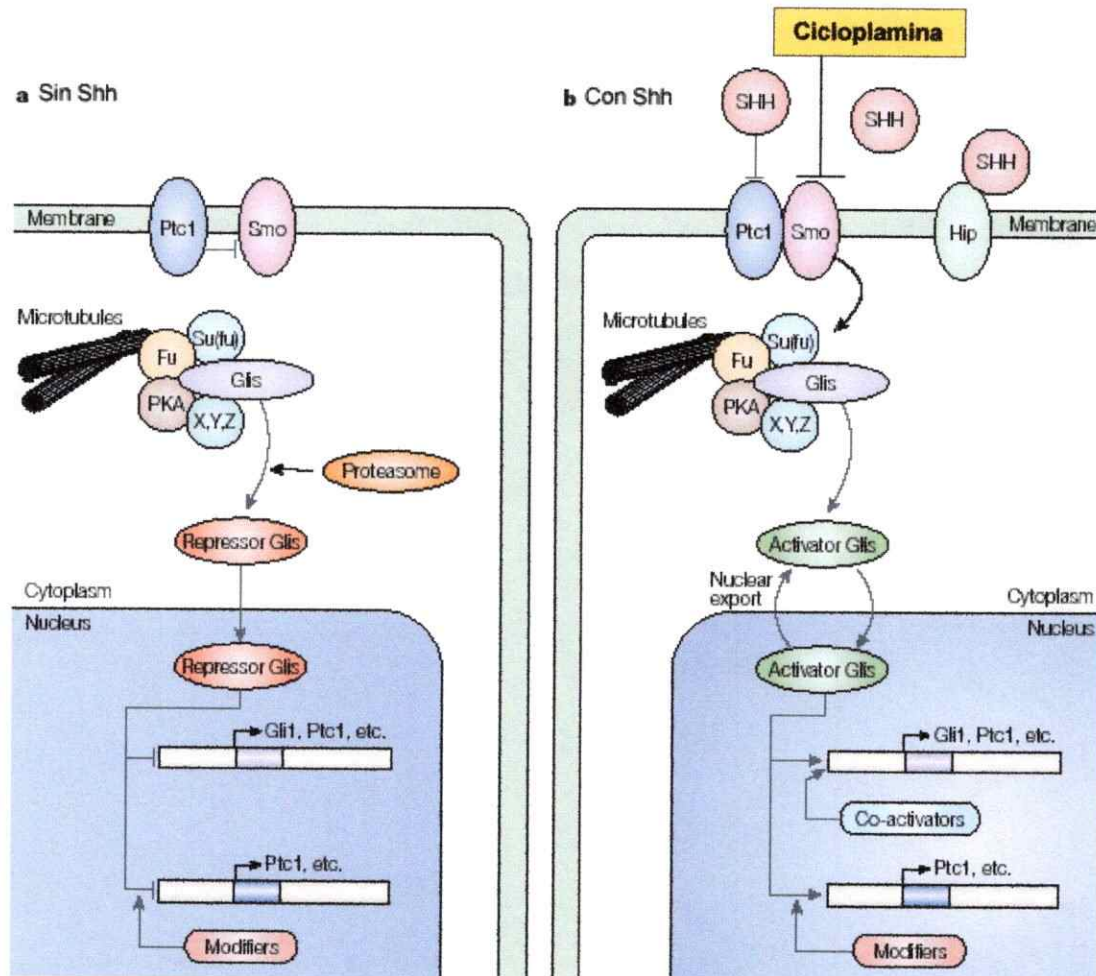
Luego de la función ventralizante sobre el tubo neural, Shh promueve el crecimiento y la proliferación en el eje dorsal del SNC durante la embriogénesis tardía. En ciertas células precursoras, Shh funciona estrictamente como mitógeno modulando la proliferación celular en zonas delimitadas del cerebro. Shh induce proliferación tanto de los precursores de las neuronas en la retina, como de los precursores de oligodendrocitos en el tubo neural (Oh y cols. 2005; Wang y cols. 2005). En el cerebelo, Shh se produce en las células de Purkinje y actúa como mitógeno para los precursores de las neuronas granulares (Dahmane N y Ruiz i Altaba, 1999), siendo responsable de su tamaño global, de su foliación, del desarrollo de las células de Purkinje y de la proliferación de células precursoras granulares (Lewis P.M. y cols. 2004). En tanto, en la corteza cerebral embrionaria de ratón Shh promueve la proliferación de las células precursoras (Ruiz i Altaba y col. 2002; Palma y Ruiz i Altaba, 2004). En etapas tardías de desarrollo del sistema nervioso, la expresión de

Shh se dorsaliza, incluyendo estructuras como el cerebelo, tectum, neocorteza e hipocampo. Shh también, induce proliferación en precursores celulares del oído interno y contribuye a la generación de células ciliadas o "hair cells" *in vitro* (Zhao Y. y cols. 2006).

En el cerebro anterior dorsal, Shh a su vez es requerido para la proliferación de las células troncales neuronales (neural stem cells) ubicadas tanto en la zona subventricular (SVZ) como en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo; dicha función se mantiene en el adulto. Shh mantiene la neurogénesis al ser directamente responsable de la producción de nuevas interneuronas olfatorias derivadas de la SVZ y de células granulares hipocámpales (Machold R y col. 2003; Palma y cols. 2005; Lai K y col. 2003).

#### **1.4. La cascada de señalización de Shh/Gli.**

La señalización mediada por Shh se transmite desde la membrana hasta el núcleo a través de un complejo de receptores conformado por Ptc1 (patched 1) y Smo (smoothened), éste último se libera de la represión ejercida por el primero luego de la unión de Shh, transduciendo la señal y activando últimamente a los factores de transcripción Gli. Un aumento en la presencia del receptor *Ptc1* es evidencia de una vía activa y refleja la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativo, en tanto un aumento de Gli1 refleja la existencia de un mecanismo de retroalimentación positivo. El alcaloide esteroide de origen vegetal ciclopamina (11-Deoxyjervina), mediante su unión directa a Smo, es capaz de bloquear específicamente la respuesta celular a la señal de Hh (Ihh, Dhh, Shh) en vertebrados (Chen JK y col, 2002) (Figura 2).

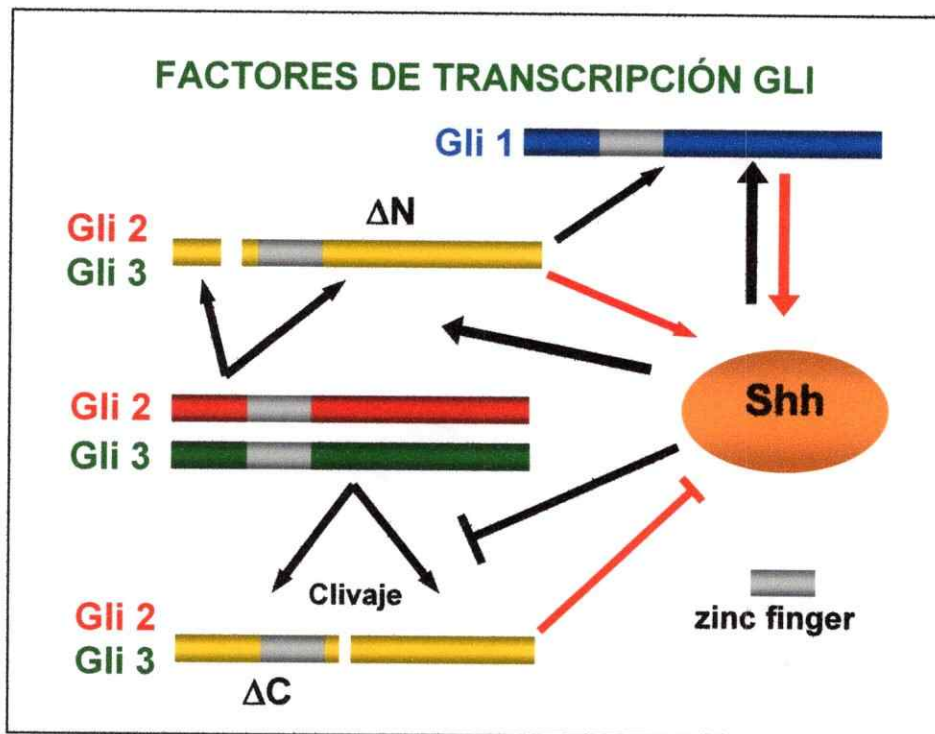


**Figura 2.** Diagrama de la vía de señalización de Shh. (a) En ausencia de Shh, las proteínas Gli se procesan proteolíticamente desde el proteosoma, generándose una forma represora que se traslada al núcleo. (b) En presencia de Shh, se mantiene la presencia de las formas activadoras de Gli, permitiendo la transcripción de genes blanco. Para experimentos en que se requiere una inhibición general de la vía, se utiliza ciclopamina (Keeler, 1978), un alcaloide de pequeño tamaño, que antagoniza la función de Smo. (Extraído de Ruiz i Altaba y cols., 2002)

En *Drosophila* un factor de transcripción que responde a la señal de Hh es Cubitus interruptus (Ci), siendo éste necesario y suficiente para mediar la acción de la señal (Alexandre y col. 1996). Ci es un factor de transcripción de 155 kDa que contiene 5 dominios de unión a DNA del tipo "dedos de zinc". Ci sufre un procesamiento proteolítico generando una forma represora de la transcripción de 75 kDa que contiene la región de unión al DNA y el extremo amino-terminal. En presencia de Hh, se mantiene la forma completa, y se produce una maduración de Ci en un activador transcripcional permitiéndose la activación de la transcripción de genes blanco. Se puede encontrar a Ci formando parte de complejos multiproteicos. Proteínas citoplasmáticas tales como Costal2, Fused y Sufu forman parte de estos complejos y están relacionadas con procesos de modulación de la expresión génica a través del transporte de Ci. La entrada de Ci al núcleo es otro nivel de regulación para la activación génica.

El homólogo en vertebrados de Ci esta conformado por tres proteínas Gli (Gli1, Gli2, Gli3) que participan en la mediación, interpretación y respuesta a la señal Shh. Estas proteínas actuarían de forma combinada siendo el resultado de dichas interacciones el efecto final de Shh en la célula. Gli1 y Gli2 tendrían funciones activadoras. En ratón, Gli1 actúa como un activador de la expresión génica y a su vez es transcrito en células que responden a Shh. Se ha demostrado recientemente que la fosforilación por parte de la proteína quinasa A (PKA), mantiene a Gli en el citoplasma, al producir una alteración en el dominio de señalización al núcleo -NLS (Sheng y cols., 2006). Así mismo, se ha demostrado que en ratón Gli2 tiene una función principalmente activadora, mostrando una superposición casi total con la función de Gli1 (Park y cols., 2000). Por el contrario Gli3 (y en ocasiones Gli2) antagoniza la función de Shh-Gli1 (Ruiz i Altaba y col. 2002), lo que da evidencia de la acción combinada y contexto-

dependiente de las proteínas Gli (Ruiz i Altaba, 1998). En diferentes modelos, experimentos de sobreexpresión de Gli2, han permitido observar una forma represora truncada de esta proteína. En ausencia de sobreexpresión, no es clara la presencia de dicha forma represora (Wang y cols, 2000). Para el caso de Gli3, ha sido muy estudiada la actividad represora de una forma truncada en el extremo C-terminal *in vitro* e *in vivo* que parece ser la preponderante (Wang y cols., 2000, Litingtung y Chiang, 2000, Persson M. y cols. 2002). Sin embargo existe evidencia reciente que demuestra que Gli3 actuaría también como activador débil, mas aún, una combinación de Gli2 y Gli3 es requerida para la especificación de los dominios de los progenitores ventrales de la médula espinal (Bai y Joyner, 2004). Así al igual que su homólogo Ci en *Drosophila*, las proteínas Gli entonces poseen funciones activadoras y represoras (Aza-Blanc y col. 2000). Dicha dualidad funcional estaría dada, al igual que para Ci, por el clivaje proteolítico de sus dominios de activación (carboxilo terminal,  $\Delta C$ ) y represión (amino terminal,  $\Delta N$ ) (Sasaki y col. 1999) (Figura 3). Por último, la función de Shh, ejecutada por la acción de las proteínas Gli puede variar dependiendo del contexto y de la especie. A diferencia de lo descrito en ratón, en el pez cebra, Gli1 es el principal activador de la vía, y Gli2 tiene solamente un rol menor en este proceso, además de una función represora de la transcripción (Karlstrom y cols.,2003, Tyurina y cols., 2005). Gli3 puede actuar tanto como activador o represor (Tyurina y cols., 2005).



**Figura 3.** Esquema del código de acción propuesto para los Factores de transcripción Gli. Las tres proteínas Gli poseen el dominio de zinc finger conservado (cuadro gris). Gli1 funciona como activador fuerte de la vía de Shh (flecha roja), esta última a su vez favorece la transcripción de *gli1* (flecha negra). Gli2 y Gli3 poseen funciones represoras (T roja) y activadoras (flecha roja) de la vía de Shh. Mediante el clivaje proteolítico de la zona carboxilo terminal se genera la forma represora ( $\Delta C$ ) (flecha negra). La presencia de Shh bloquea (T negra) el clivaje proteolítico que se produce junto a la zona zinc finger, favoreciendo la pérdida de la zona amino terminal que genera un activador ( $\Delta N$ ).  $\Delta C$ , proteína Gli sin su zona carboxilo terminal;  $\Delta N$ , proteína Gli sin su zona amino terminal.

Las proteínas Gli entonces serían los mediadores finales de la señal Shh, sin embargo estas proteínas podrían ver afectada su acción por otras vías. Por ejemplo, Gli2 y Gli3 pero no Gli1, están involucrados en la señalización de FGF en el desarrollo del mesodermo del embrión de rana (Brewster y col, 2000). Por otro lado, Gli's pueden activar otras vías de señalización, como componentes de la vía IGF y Wnt, además de regular genes como *Cyclina D* y *N-Myc*, efectores compartidos por otras vías de señalización (Ruiz i Altaba y col. 2002).

### 1.5. Implicancia de Shh en el establecimiento de tamaño y forma del cerebro medio.

La expresión ectópica, temprana y localizada de Shh conlleva a un cese en la proliferación de precursores de la región tectal generándose un desarrollo ategmentum, reflejando así el papel ventralizante de este morfógeno (Watanabe y Nakamura 2000). La expresión puntual dorsolateral de Shh induce la expresión de *gli1* y *ptc1* ectópica y altera el patrón dorso ventral del mesencéfalo. Sin embargo, a la fecha no existen estudios que indiquen si estos resultados se reproducen en etapas posteriores del desarrollo. Mencionábamos anteriormente la función mitogénica tardía propuesta para Shh. Evidencias experimentales demuestran que los genes *gli* no sólo se expresan en la zona ventricular/subventricular de corteza y tectum durante la embriogénesis tardía, sino que tienen un papel mediador de la señal Shh en las células precursoras neuronales (Dahmane N. y col. 2001). Ratones mutantes para *gli1* presentan un fenotipo normal, en cambio ratones nulos para *gli2* tienen un tectum y cerebelo reducido; por el contrario, mutantes para *gli3* generan un tectum más grande (Palma y Ruiz i Altaba, 2004, Blaess y col. 2006). En ratón, Gli1 parece tener una función redundante con respecto a Gli2 (Park y cols., 2000), sin embargo el doble mutante *Gli1/Gli2* tiene un fenotipo más pronunciado que el mutante *Gli2*. Además, Gli1 puede rescatar la función de Gli2 *in vivo* (Bai y Joyner, 2001). Las funciones de Gli2 y Gli3 son más específicas, no pudiendo rescatarse uno a otro. Mediante experimentos de mutagénesis condicional es posible observar como Shh, secretado desde la zona ventral, dirige el correcto desarrollo de la región correspondiente a la unión del cerebro medio con el posterior (mesencéfalo / rombómero 1). Se postula que esto último sería a través de una regulación temporal y espacial, positiva de Gli2 como

activador y negativa de Gli3 como represor. El primero involucrado en la inducción temprana de neuronas en la zona ventral y el segundo regulando el crecimiento general de la región del cerebro medio/posterior, a través de la supresión de la muerte celular (Blaess y cols. 2006).

De esta manera Shh modula su acción de forma contexto dependiente, posee una acción ventralizante claramente descrita en etapas tempranas del desarrollo embrionario y en etapas tardías esta relacionado con proliferación de la zona dorsal del cerebro de ratón. A su vez es posible vincular a los genes *gli* con proliferación, diferenciación, especificación posicional, sobrevivencia y multipotencialidad en el cerebro medio dorsal.

Shh entonces cumple un papel dual: no sólo especifica identidad celular, sino también es capaz de regular la expansión de poblaciones de progenitores. Exactamente cómo estas actividades se coordinan durante la morfogénesis, sin embargo, aún se desconoce.

#### **1.6. Estudios *in vitro* de la función de Shh en el desarrollo del cerebro anterior.**

Cultivos de explantes extraídos de diferentes zonas del cerebro en desarrollo permiten identificar el efecto de Shh sobre la proliferación y/o diferenciación celular. Ensayos de RT-PCR de explantes neocorticales de ratón determinaron que Shh regula positivamente la transcripción de *Gli1*, un gen diana de la vía de Shh, y que dicho aumento se correlaciona con un aumento en el índice proliferativo de los precursores neuronales (Dahmane y col, 2001).

Por otro lado, es posible aislar células madres o troncales (neural stem cells; NSC's) de diversas regiones del SNC en desarrollo. Se define como NSC's a células no



diferenciadas que poseen un potencial proliferativo (auto-replicativas), capaces de generar una variedad de progenie diferenciada (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos), y de mantener la capacidad de formar múltiples linajes en el tiempo (Anderson, 2001; Pachision y McKay, 2001). Las NSC's al contar con factores de crecimiento adecuados tales como FGF2 y EGF son capaces de generar agregados en forma de esfera en suspensión llamadas *neuroesferas*. Las NSC's, entonces, se presentan como un excelente modelo para estudiar la modulación de la diferenciación y proliferación frente a la acción de diferentes factores de crecimiento. Recientemente se ha descrito al nivel de la corteza murina, la posibilidad de que la vía de Shh-Gli regule las propiedades proliferativas de las células progenitoras y NSC's (Palma y Ruiz i Altaba, 2004; Dahmane N. y col, 1999).

Dado que tanto EGF como FGF inducen la proliferación de precursores neuronales de varias regiones del SNC, es probable que exista regulación de la vía de Shh al interactuar cruzadamente con estas vías de señalización, como por ejemplo FGF (Wechsler-Reya y Scott, 1999), EGF (Palma y Ruiz i Altaba, 2004), u otras como Wnt (Meng y cols., 2001). Surge entonces la idea de estudiar el efecto de Shh en etapas medias a tardías del desarrollo cerebral embrionario (E13,5 hasta E18,5), además de su posible relación con la señalización mediada por otros factores de crecimiento implicados en el desarrollo del cerebro tales como EGF y FGF, centrándose en la formación del tectum. Para ello durante el presente trabajo se llevaron a cabo ensayos de proliferación y diferenciación tanto en explantes como en cultivos de células troncales generados a partir del mesencéfalo dorsal de ratón, específicamente del colículo superior. Por otro lado se diseñó una estrategia para estudiar los factores transcripción Gli de forma modulada.



## 2. HIPÓTESIS

Shh, en coordinación con EGF y bFGF, está involucrado en el aumento de la proliferación de células precursoras y troncales (NSCs) del tectum de ratón.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

Determinar si la actividad de Shh está involucrada en el crecimiento del tectum de ratón y si dicha acción se establece en interacción con otras vías de señalización.

### 3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Generación de cultivos de neuroesferas de tectum a partir de embriones de ratón en diferentes etapas del desarrollo (E11,5 - E18,5) estableciendo un modelo de estudio adecuado para evaluar el papel de Shh sobre parámetros de proliferación y diferenciación.
- 3.2.2. Obtención de explantes tectales a partir de embriones de ratón en etapa medianas y tardía de desarrollo (E11,5-E18,5) y ensayar el potencial rol de Shh en el control de la proliferación y diferenciación celular.
- 3.2.3. Observar frente a la acción de distintos estímulos (ciclopamina, Shh, EGF, bFGF) en cultivo de neuroesferas y explantes tectales cambios en la proliferación y diferenciación mediante inmunofluorescencia para marcadores establecidos. Además, observar cambios de expresión mediante RT-PCR y Westernblotting.
- 3.2.4. Generar constructos, inducibles por dexametasona, de las formas activadoras y represoras de *Gli2*.

## 4. MATERIALES y MÉTODOS

### 4.1. Material Biológico:

- Ratones (*Mus musculus*) de cepas C57 BL/6 y BalbC mantenidas en condiciones controladas de luz y temperatura; alimentado con "pelet" y agua *ad libitum*. Hembras en edad fértil se ponen a cruzar con machos de fertilidad comprobada. A la mañana siguiente, se verifica la cópula mediante la presencia del tapón vaginal, definiéndolo como el día de desarrollo embrionario E0,5 .

### 4.2. Material de Biología celular y Reactivos:

- Placas Petri de 60 y 90 mm (Corning; Nunc)
- Frascos de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup> (Corning; Nunc)
- Placa de 6 y 24 pocillos (Orange; Nunc)
- Placa de 6 pocillos con insertos de membranas de policarbonato. (Millipore).
- Porta objetos
- Cubre objetos de vidrio de 13mm<sup>2</sup>
- Ciclopamina 5 y 10 μM (Toronto Research Chemicals).
- Sonic Hedgehog 10 nM (R&D Systems).
- Microesferas de agarosa embebidas en BSA (Donado por el Dr. Rolf Karlstrom. University of Massachussets)
- o Shh 1μg/μl. (Affigel-Blue, Bio-Rad)
- Solución de lisis celular "Trizol Reagent" (Invitrogen).
- Kit de muerte celular "*In situ* cell death Detection Kit, POD" (Donado por el Laboratorio del Dr. Christian González) (Roche Applied Science)
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Sigma)
- Solución de montaje para fluorescencia (gel/mount) (Biomeda)
- Anticuerpos: Se indica el tipo de anticuerpo y la dilución usada en la tabla 1.

<b>Primarios</b>			
anti Marcador Oligodendrocítico O4 monoclonal IgM	O4	1:100	Chemicon
anti Proteína Ácida Fibrilar Glial policlonal IgG conejo	GFAP	1:100 0	Sigma
anti $\beta$ Tubulina III monoclonal IgG2b ratón	Tuj1	1:300	Sigma
anti BrdU monoclonal IgG1 ratón	BrdU	1:200	Dako
anti "paired box gene 2" Pax2 policlonal IgG cabra	Pax2	1:100	SantaCruz
anti Proteína asociada a microtúbulo 1B policlonal cabra	MAP1B	1:250	Santacruz
anti Receptor de EGF para Inmunofluorescencia policlonal IgG cabra	EGFR	1:50	Upstate
anti Receptor de EGF para Western Blott	EGFR*	1:300	(Donado por Dr. Alfonso González, PUC)
<b>Secundarios</b>			
Cy <sup>TM</sup> 2 burro anti cabra		1:200	Upstate
Fluoresceína (FITC) cabra anti conejo o ratón IgG		1:200	Jackson Immuno Research
Rodamina (TRITC) cabra anti conejo o ratón IgG		1:200	
Peroxidasa cabra anti conejo o ratón IgG		1:200	
Rodamina (TRITC) anti cabra IgG		1:400	Molecular Probe
Alexa fluor 488 cabra anti ratón IgM		1:200	

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en experimentos de Inmunofluorescencia y Westernblotting (\*). Se indica el tipo de anticuerpo y la dilución usada, así como la procedencia.

- Inhibidor de proteasas PMSF
- Membrana de transferencia para Westernblott "Immobilon" (Millipore)
- Kit de revelado quimiluminiscente "SuperSignal West Pico Chemilumin" (Pierce)
- Placas radiográficas. "Super HR-U30 (Fuji)
- *Taq* Dna Polimerasa (Invitrogen).
- Partidores: F= Forward, R=Reverse

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

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

Gli3: F-5'-GAGTTAGCTGGCAACACAGT-3'  
R-5'- CTCAAAGCTGTCAACTGTGC-3'

#### 4.3. Cultivo celular:

##### 4.3.1. Medio de disociación de tejido:

Solución activadora de papaína:

- EDTA (Sigma) 1,1 mM
- L-cisteina/HCl (Sigma) 5,5 mM

Solución de papaína:

- Papaína (Worthington) 0,3% p/v en solución activadora de papaína.

Buffer fosfato salino (PBS) con antibióticos:

- Penicilina / estreptomina 10000 U/mL (100X) (Invitrogen) en PBS

Se prepara el medio de disociación media hora antes de su uso diluyendo cuatro veces la solución de papaína en PBS con antibióticos. Luego es filtrada y debe ser usada de inmediato. La reacción enzimática se prepara utilizando la siguiente solución:

- Medio L:15 (Invitrogen)
- Dnasa 0,1 % p/v (Worthington)
- Inhibidor de Papaína, ácido ovomucoide 0,007 % p/v (Worthington)

#### 4.3.2. Medios de cultivo:

Medio de crecimiento de neuroesferas corticales de acuerdo al protocolo señalado en Palma y cols. 2004.

##### Medio de crecimiento de neuroesferas tectales:

- DMEM/F-12 (Invitrogen)
- L- glutamina 200mM (100X) (Invitrogen)
- B27 (50X) (Invitrogen)
- Penicilina / estreptomicina (100X) (Invitrogen)
- Heparina (1000X) (Calbiochem)
- EGF 10 ng/mL (Invitrogen)
- FGF2 10 ng/mL (Invitrogen)

Una vez mezclado el medio debe ser filtrado. El EGF y FGF2 son agregados al momento de cultivar las células, el resto puede ser preparado y guardado por no más de 10 días.

##### Medio de cultivo de Explantes:

- DMEM/F-12 (Invitrogen)
- L- glutamina 200mM (100X) (Invitrogen)
- B27 (50X) (Invitrogen)
- Penicilina / estreptomicina (100X) (Invitrogen)
- Mito C (1000X) (BD)
- N2 (100X) (Invitrogen)

#### **4.4. Procedimientos:**

4.4.1. Obtención de secciones de tectum: Hembras preñadas de cepas de ratón C57 o BalbC son sacrificadas mediante dislocación cervical para la extracción de sus embriones. Se baña el abdomen de la ratona con etanol al 70% y se le extraen los cuernos uterinos, éstos se lavan con PBS varias veces dentro de placas de 100 mm. Se rompen las bolsas uterinas y se transfieren los fetos a una nueva placa con PBS. Son eliminados los embriones malformados o pequeños. A aquellos seleccionados se les corta la cabeza a la altura de la espina dorsal (el corte debe ser lo mas recto posible), estas son transferidas a otra placa con L:15 frío. Bajo lupa y utilizando herramientas estériles, se corta a través de la línea media dorsal exponiendo ambos hemisferios, se sacan las meninges mecánicamente para luego extraer el cerebro y transferirlo a una nueva placa con L:15, de éste se disectan explantes de tectum. El número de explantes que se obtienen depende del tamaño del tectum (y por ende de la edad del embrión, ver Figura 4.).

4.4.2. Generación de Neuroesferas de tectum: Secciones de tectum de embrión de ratón C57 (E11,5 hasta E18,5), cortados en fragmentos, son transferidos a un tubo de centrifuga de 15 mL con medio de disociación e incubados a 37 °C por 20 minutos en agitación suave. Luego son centrifugados a 800 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. El sobrenadante es removido. El pelet es resuspendido en 1 mL de medio de neuroesferas tectales con Dnasa y ovomucoide (ver en Materiales) usando una pipeta Pasteur flameada con la punta disminuida en su diámetro, esto hasta ver una solución homogénea. Se centrifuga nuevamente por 5 minutos a 800 rpm, se retira el sobrenadante y se resuspende en 1 mL de medio nuevamente. Se toma una alícuota de 10 µL y se calcula el número total de células usando una cámara de conteo de

Neubauer. Se comienza con cultivo primario de células, el cual es crecido en medio de neuroesferas tectales (medios de cultivo) en presencia de uno o ambos factores de crecimiento, EGF 10 ng/mL y FGF2 10 ng/mL en una botella de 75 cm<sup>2</sup>. Pasado 5 a 7 días, cuando las neuroesferas poseen el tamaño adecuado (Figura 6A), se lleva a cabo el denominado "Pasaje" de neuroesferas, con el fin de evitar muerte celular. Para llevar a cabo el Pasaje se colectan las neuroesferas recuperando el medio y lavando la botella con el mismo, luego se centrifugan a 800 rpm por 5 minutos y se remueve el medio. El pelet es resuspendido en PBS tibio y las células se centrifugan nuevamente, este proceso elimina las células muertas. Finalmente se resuspende el pelet en 1 mL de medio de neuroesferas tectales y se calcula el número total de células. Se siembran alrededor de 4000 células por cm<sup>2</sup>.

4.4.3.Experimentos con Neuroesferas de tectum: Luego de realizado el Pasaje de las neuroesferas, las células son sembradas para experimentos de diferenciación o proliferación. Para los experimentos de diferenciación se siembran 600.000 células y se incuban en presencia de diferentes estímulos (por ej. Shh 10 nM, Ciclopamina 10 μM ) deprivadas de factores de crecimiento en una placa de 60mm de diámetro con 11 cubre objetos de vidrio de 13mm<sup>2</sup> tratados previamente con poliornitina/laminina para permitir adhesión de las células. Se cultivan durante 5 a 7 días y luego son fijados en frío con PFA al 4%. Para experimentos de proliferación se siembran 80000 células frente a diferentes estímulos (Shh 10 nM, Ciclopamina 10 μM ) que crecen en monocapas adheridas a sustrato en presencia de factores de crecimiento (EGF y FGF2) durante 7 días para luego, previo pulso de BrdU 2 horas antes, ser fijadas. Para los ensayos clonales se siembra en cultivo de suspensión a razón de 1 a 2 células/μL en presencia o ausencia de ciclopamina (5 y 10 μM), en una placa de 24 pocillos con



500  $\mu$ L totales en cuadruplicado (ensayo realizado en presencia de factores de crecimiento EGF y/o FGF2). Al séptimo día de cultivo, se cuenta el número de neuroesferas individuales generadas bajo lupa en las distintas condiciones experimentales.

4.4.4.Criopreservación de neuroesferas:: Parte de las Nsp cultivadas fueron criopreservadas luego del segundo subcultivo, es decir luego de un "pasaje". De esta forma se utilizó posteriormente en la repetición de experimentos. Las Nsp se colectan como se describió anteriormente y se resuspenden en una mezcla de criopreservación fría, compuesta por medio de cultivo (80%), albúmina al 2% (10%) y DMSO (10%). Luego se traspasan a criotubos a una densidad superior a  $1 \times 10^6$  células/ml, y son sometidas a un descenso gradual de la temperatura hasta alcanzar  $-80^{\circ}\text{C}$  para ser almacenadas en nitrógeno líquido. En esta tesis no se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos con Nsp criopreservadas sometidas a experimentación.

4.4.5.Experimentos con Explantes tectales: A partir de embriones obtenidos de ratonas C57 en diferentes días de gestación (E11,5 hasta E18,5), se obtienen secciones del cerebro medio, específicamente de la zona correspondiente al tectum. Las secciones de tectum, llamadas "explantes tectales", se siembran en medio de cultivo de explantes (ver medios de cultivo) sobre una membrana porosa de  $0,2 \mu\text{m}$  con la zona ventricular hacia abajo y dorsal hacia arriba. Los diferentes tratamientos (Shh 10 nM, FGF2 y Ciclopamina  $10 \mu\text{M}$ ) fueron aplicados directamente en el medio de cultivo o a través de microesferas previamente sumergidas en una solución de BSA (control) o en una

solución de Shh 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  , colocadas estas últimas entre la membrana y el explante. Los explantes fueron tratados por 48 horas. Luego del tratamiento fueron fijados enteros o disociados y plaqueados, para ser fijados en frío con PFA al 4% a las 24 horas. Se utilizan luego para diferentes Inmunofluorescencias. Para ensayos de proliferación se aplica un pulso de BrdU 3 horas previas a la fijación. También se lisan explantes en Trizol para extracción de mRNA y para ser utilizados en westernblotting.

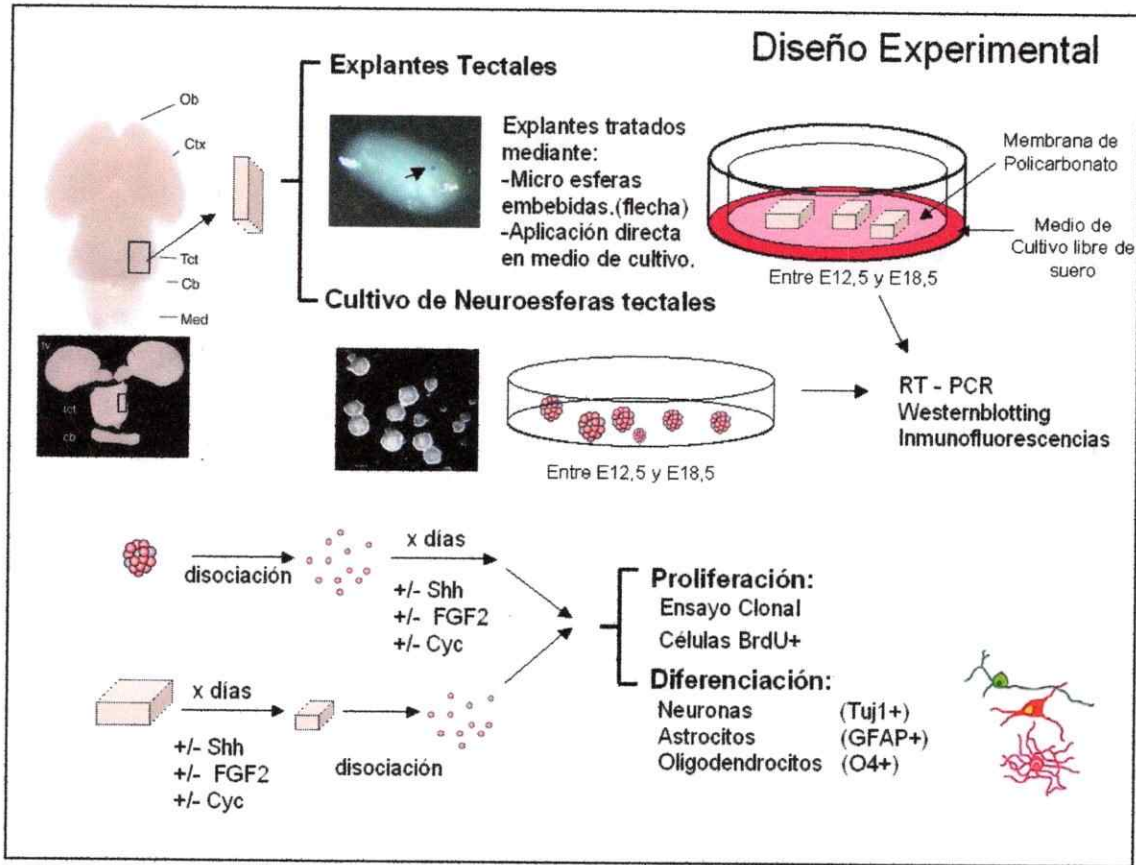
4.4.6. Inmunofluorescencias: Se llevan a cabo inmunofluorescencias anti Marcador tardío de Oligodendrocítico O4 (O4), anti Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), anti  $\beta$  Tubulina III neuronal (Tuj1); anti "paired box gene 2" Pax2 (Pax2); anti BrdU; anti Proteína asociada a microtúbulo 1B (MAP1B) y anti Receptor de EGF (EGFR). Las muestras fijadas se lavan con Triton X-100 al 0,1% en PBS (PBT), excepto para O4 (solo PBS). Luego, solamente para anti BrdU, las muestras son tratadas para denaturación del DNA con HCl 2N por 30 minutos para secciones de cerebro o explantes y 15 minutos en el caso de células, seguido de un lavado con Borato de Sodio. Se lava tres veces con PBT por 5 minutos y luego se bloquea a temperatura ambiente en cámara húmeda por una hora con suero fetal inactivado de: Cabra al 10% (BrdU, GFAP, Tuj1, Pax2), Caballo al 10% (EGFR), Bovino al 5% (O4), en PBT o PBS. Se incuba con el anticuerpo primario durante una noche a 4°C (BrdU, GFAP, Tuj1, Pax2, excepto para EGFR que se debe incubar por 3 noches) o por una hora a 37°C (O4) en cámara húmeda. Se recupera el anticuerpo y se lava. Se incuba con el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente (2 horas para EGFR y a 37°C para O4). Se recupera el anticuerpo secundario. Se tiñe con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 1:10000 en PBT o PBS según corresponda, para visualización

de núcleos, se lava varias veces y se monta con solución de montaje para fluorescencia (gel/mount).

4.4.7. RT-PCR: La extracción de mRNA se realiza usando "Trizol reagent" según instrucciones del fabricante. Luego se sintetiza el cDNA y se lleva a cabo la reacción de PCR para *Gli1*, *Gli3* y el control de carga *Hprt*. Condiciones de PCR 94°C 2 min ; 32 ciclos de: 94°C 45 seg; 57°C 45 seg; 75°C 45 seg y 72°C 10 min.

4.4.8. Westernblotting: Se lleva a cabo la extracción de proteínas a partir de explantes de tectum, tegmentum y corteza de ratón E18,5. Se determina la cantidad de proteína según método de Bradford. Se cargan entre 38 y 45 µg de proteína por carril en un gel SDS al 10%. Se lleva a cabo la detección del receptor de EGFR y de Actina como control de carga.

4.4.9. 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). La probabilidad de la hipótesis nula se indica en cada caso. Se considera como no significativos aquellos resultados con una probabilidad  $p \geq 0,05$ .



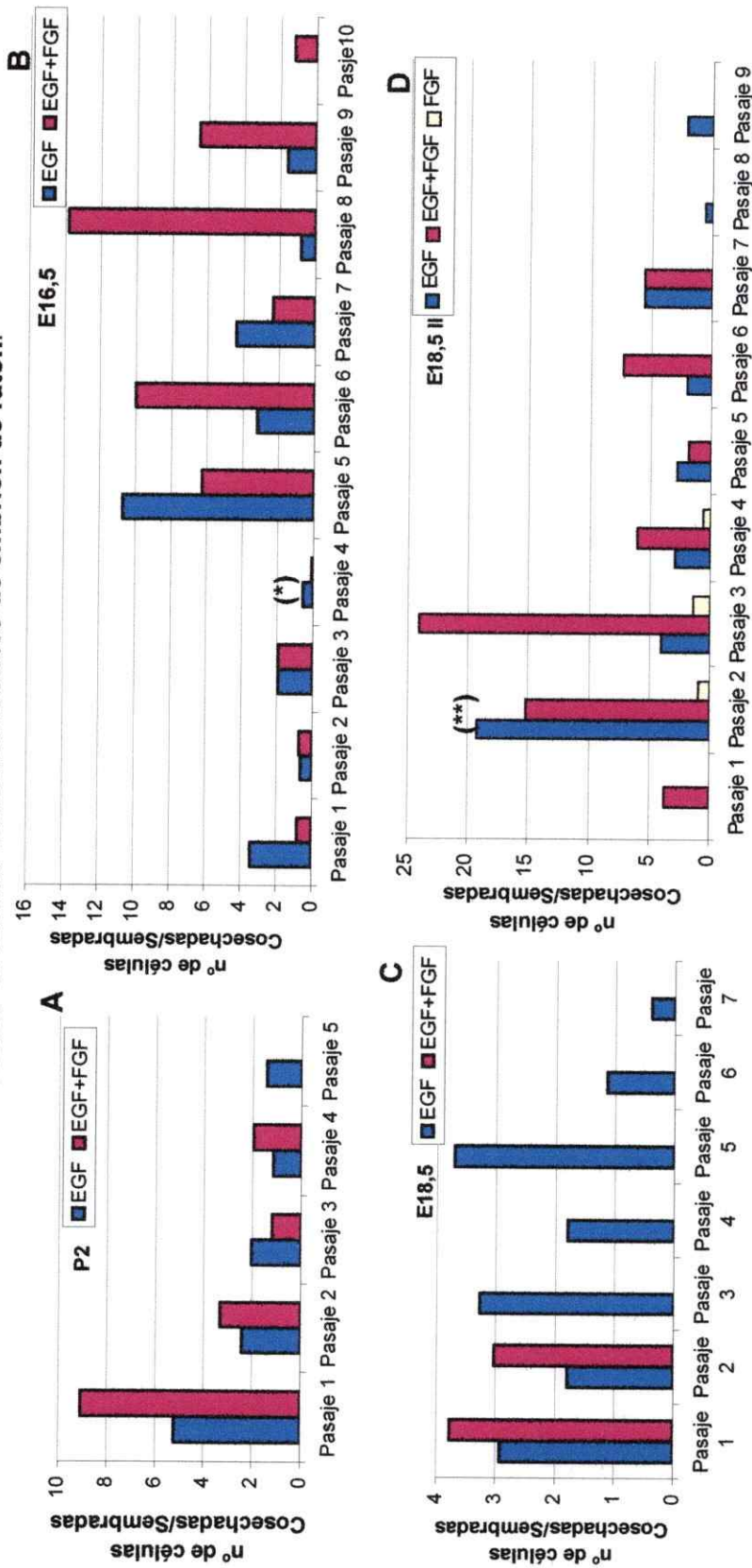
**Figura 4.** Diseño experimental seguido en el estudio del crecimiento del tectum de ratón. En el extremo superior izquierdo se muestra un cerebro embrionario de ratón en vista dorsal, anterior esta hacia arriba. Además se muestra los diferentes componentes dorsales disectados. Para el estudio del tectum entre los estadios E12,5 y E18,5 se utilizan dos aproximaciones experimentales, mediante explantes y neuroesferas generadas a partir de secciones de tectum. Estos últimos fueron tratados en presencia Sonic Hedgehog 10 nM, factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) 10 ng/mL y Ciclopamina 5 y 10  $\mu$ M (Cyc) (ver materiales y métodos). Ob (Bulbos olfatorios), Ctx (corteza), Tct (tectum), Cb (cerebelo), Med (Medula espinal).

## 5. RESULTADOS

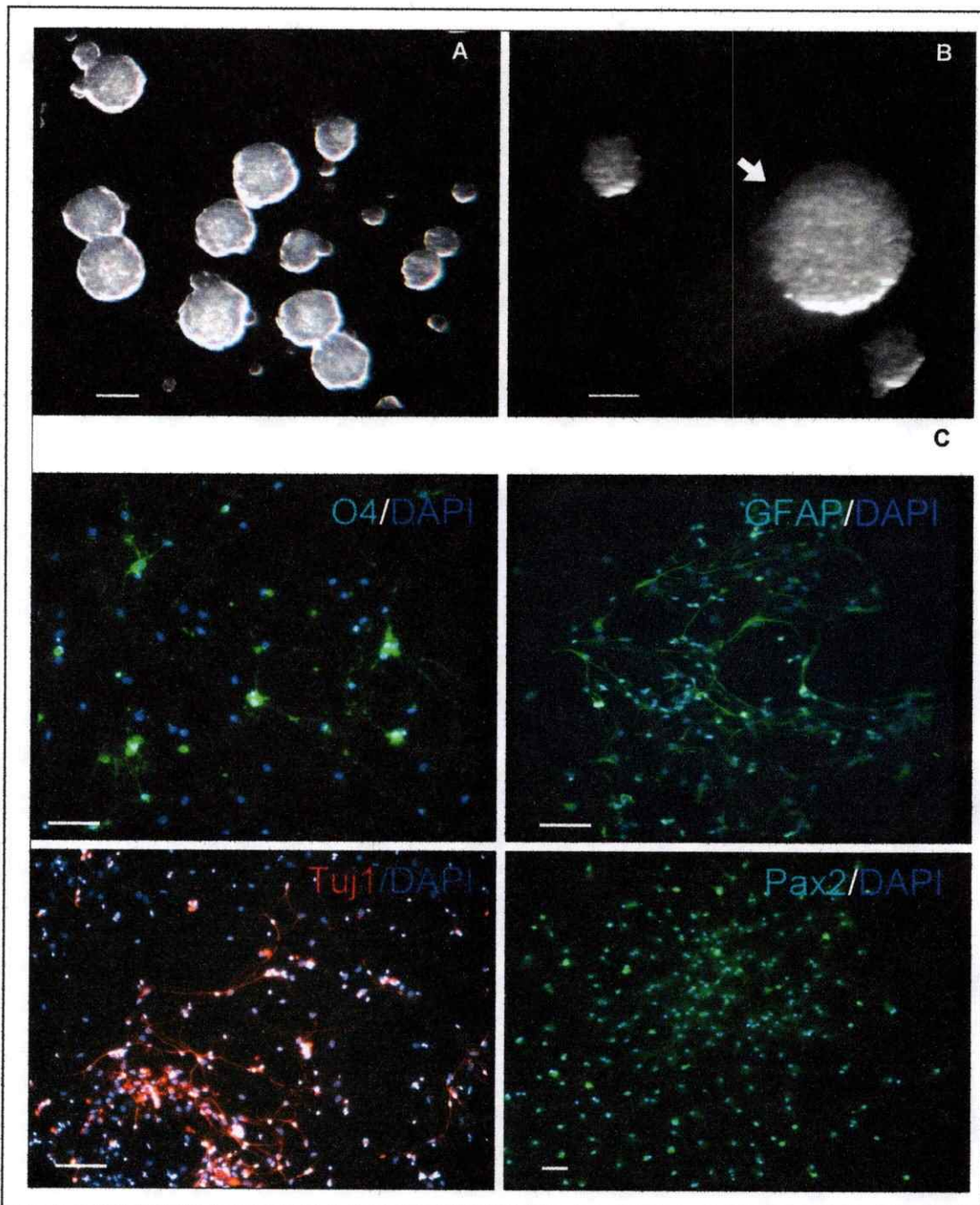
### 5.1. Generación de un cultivo de células troncales de tectum.

Para el estudio de la implicancia de la vía de Shh en el crecimiento del tectum de ratón se decide generar neuroesferas de esta zona a partir de embriones en estado medial y tardío de desarrollo, específicamente de unos de sus derivados, el colículo superior. Dicho procedimiento sólo ha sido descrito recientemente por parte de un grupo de investigadores (Moses D. y cols. 2006). El objetivo es obtener un modelo "in vitro" de las células troncales presentes en el tectum. Fue posible entonces, generar cultivos de neuroesferas tectales a partir de embriones entre los estados de gestación E12,5 (no se muestran datos) y E18,5, además de post natal P2 (Figura 5). Cabe hacer notar que la sobrevivencia y rendimiento general de los cultivos mejoró notablemente al preparar un medio de cultivo específico para estas células (Figura 5C). Por otro lado, a partir de células troncales de tectum como de explantes tectales disociados y sembrados fue posible obtener los tres tipos celulares del sistema nervioso central (oligodendrocitos, astrocitos y neuronas), requisito indispensable para probar la multipotencialidad de las NSCs (Figura 6).

### Cultivo de células troncales tectales de embrión de ratón.



**Figura 5.** Cultivos de células troncales tectales (neuroesferas tectales) embrionarias de ratón. Se muestra algunos de los cultivos de Neuroesferas tectales generados. Los gráficos equivalen al número de células obtenidas al finalizar un "pasaje" sobre el número de células sembradas al iniciar este. Los gráficos corresponden a los diferentes estadios seleccionados **A.** Cultivados en medio de crecimiento de neuroesferas corticales en presencia de EGF o EGF + FGF (EGF+FGF). **B.** E16,5 cultivado en presencia de EGF o EGF+FGF en medio de crecimiento de neuroesferas corticales hasta el "pasaje 4" (\*) y luego en medio de crecimiento de neuroesferas tectales. **C.** E18,5 cultivado en presencia de EGF o EGF+FGF en medio de crecimiento de neuroesferas tectales. **D.** E18,5 (18,5II) cultivado en presencia de EGF desde el pasaje 1 y después con EGF; FGF; o EGF+FGF desde el pasaje 2 (\*\*\*) en medio de crecimiento de neuroesferas tectales (para medios y condiciones ver materiales y métodos).

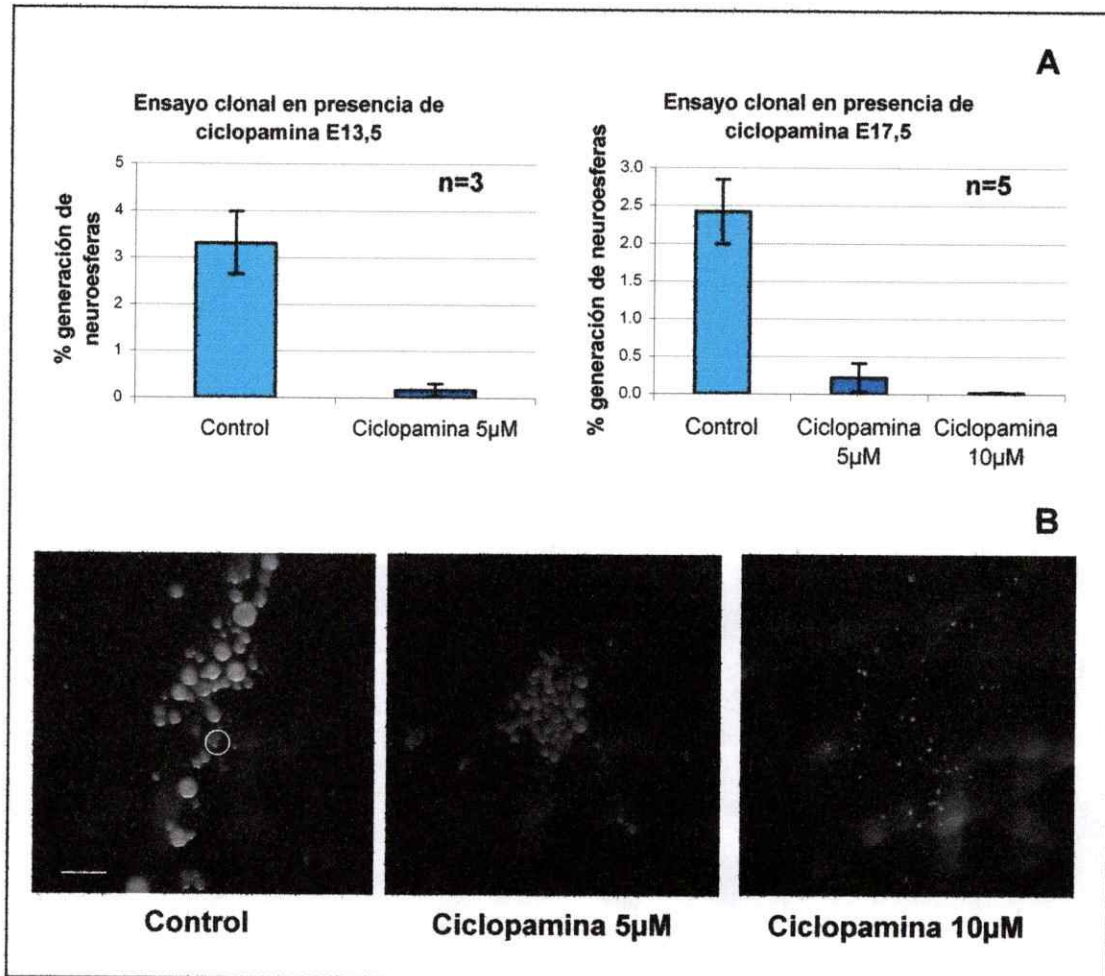


**Figura 6.** Establecimiento de un cultivo de neuroesferas de tectum murino. **A.** Cultivo de Neuroesferas tectales de embrión E18,5 crecido en suspensión en modo proliferativo **B.** Detalle de una Neuroesfera tectal proveniente de un embrión E13,5. La flecha indica una neuroesfera considerada durante el conteo en el ensayo clonal. **C.** Inmunofluorescencia sobre células diferenciadas por 5 días según se indica: anti Marcador Oligodendrocítico O4 (O4; Oligodendrocitos), anti Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP; Astrositos), anti  $\beta$  Tubulina III (Tuj1; Neuronas) y anti Pax2 (Pax2; marcador de cerebro medio), a su vez las células fueron teñidas con DAPI para visualización de los núcleos. GFAP, O4 y Pax2 en verde, Tuj1 en rojo. La barra representa 250  $\mu$ m en A; 50  $\mu$ m en B y C.

## **5.2. Ciclopamina disminuye la generación de neuroesferas tectales en Ensayos Clonales.**

Luego de obtener el cultivo de neuroesferas tectales es que se decide investigar la posible función de la vía Shh en la conducta de las NSC's. Para ello se llevaron a cabo ensayos de dilución clonal en cultivos de neuroesferas tectales de dos estadios embrionarios distintos (E13,5 y E17,5), en presencia o no de ciclopamina, un potente inhibidor de la vía de Shh (5 y 10  $\mu$ M). Se utiliza como control EtOH absoluto, el vehículo para disolver la ciclopamina. De esta forma se pretende determinar el efecto directo de la ciclopamina en la generación de neuroesferas y, de manera indirecta, en la sobrevivencia de las células troncales tectales. Esto último, considerando que cada neuroesfera en este ensayo necesariamente es generada a partir de una célula troncal única que fue capaz de seguir dividiéndose. Los resultados permiten afirmar que la ciclopamina es capaz de afectar negativamente la generación de neuroesferas de forma dependiente de su concentración y por ende la división de la célula troncal. Cabe mencionar la existencia de neuroesferas cuyo crecimiento se observa detenido en presencia de ciclopamina, no alcanzando así el tamaño necesario para llevar a cabo un pasaje, incluso prolongando el tiempo de incubación. Estas neuroesferas no fueron consideradas al momento del conteo del ensayo clonal. (Figura 7).



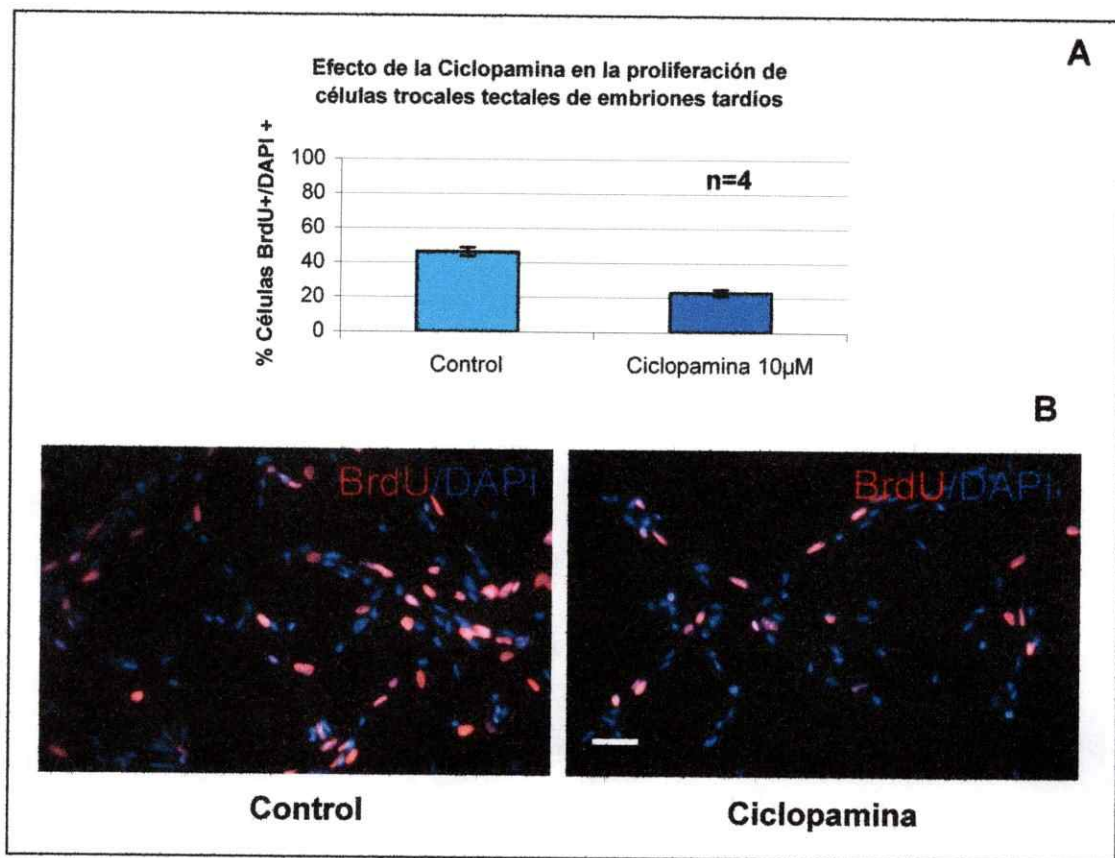


**Figura 7.** Generación de neuroesferas tectales en presencia de ciclopamina. Para determinar la generación de neuroesferas se sembraron de 1 a 2 células por  $\mu$ l en presencia de ciclopamina (5 y 10  $\mu$ M) versus control en que se usó EtOH, en una placa de 24 pocillos con 500  $\mu$ l totales (ver materiales y métodos). Al séptimo día de cultivo, se cuenta el número de neuroesferas individuales generadas bajo lupa (2 contadores independientes). Se considera sólo a aquellas neuroesferas con el tamaño suficiente para un pasaje, descartándose aquellas en que su crecimiento se observa detenido (circulo Figura 7B). **A.** Gráficos del número de neuroesferas generadas en presencia o no de ciclopamina. **B.** Foto bajo lupa de neuroesferas en placa control versus presencia de ciclopamina (aumento20X). Para cultivo E13,5 (n=3) y E17,5 (n=5) (replicas en cada experimento: controles 6, ciclopamina 4). Dos contadores independientes *t-student*  $p < 0,01$ . La barra representa 500  $\mu$ m.

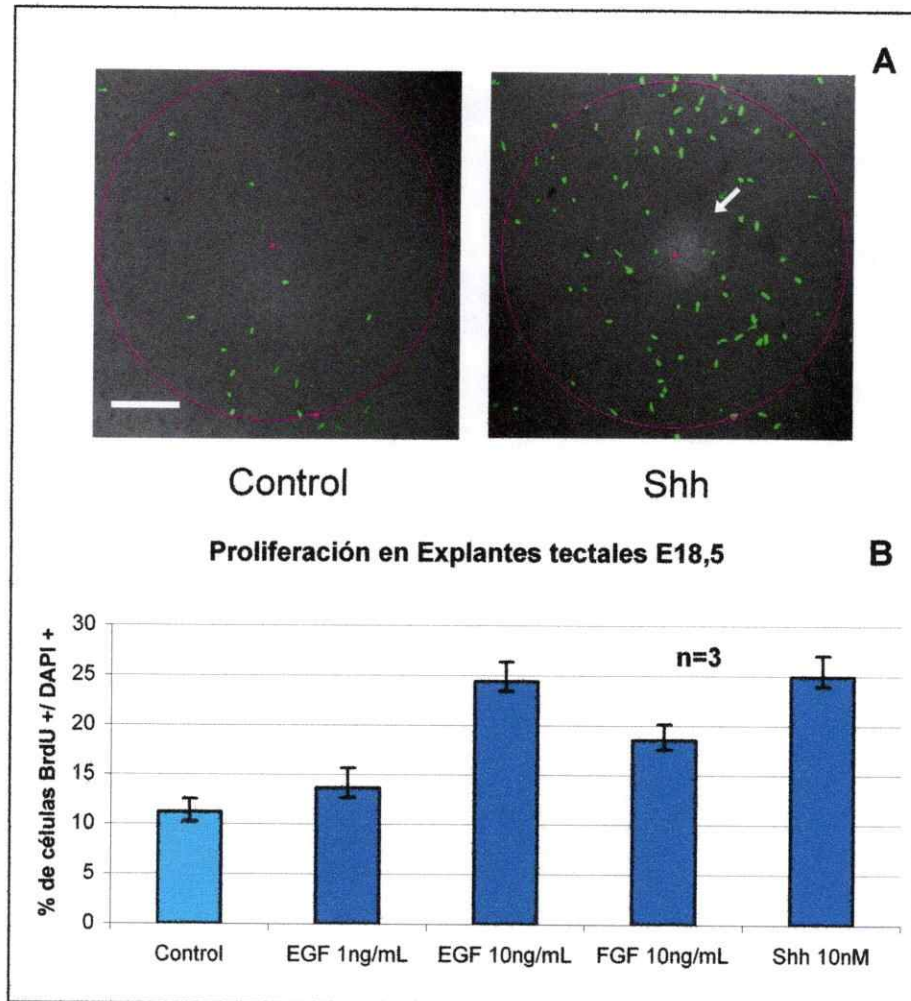
### **5.3. Shh afecta la proliferación de NSP's en cultivos de células troncales y de explantes tectales de embriones.**

Se llevaron a cabo ensayos de proliferación frente a diferentes estímulos tanto en NSP's como en explantes tectales. NSP's tardías (E17,5 y E18,5) crecidas en presencia de EGF junto con FGF2, fueron tratadas con o sin ciclopamina 10  $\mu$ M. La cuantificación de la incorporación de BrdU de las NSP's arroja una disminución en el número de células troncales durante la embriogénesis tardía (Figura 8). Se observa lo mismo para un cultivo E13,5 (no se muestran datos).

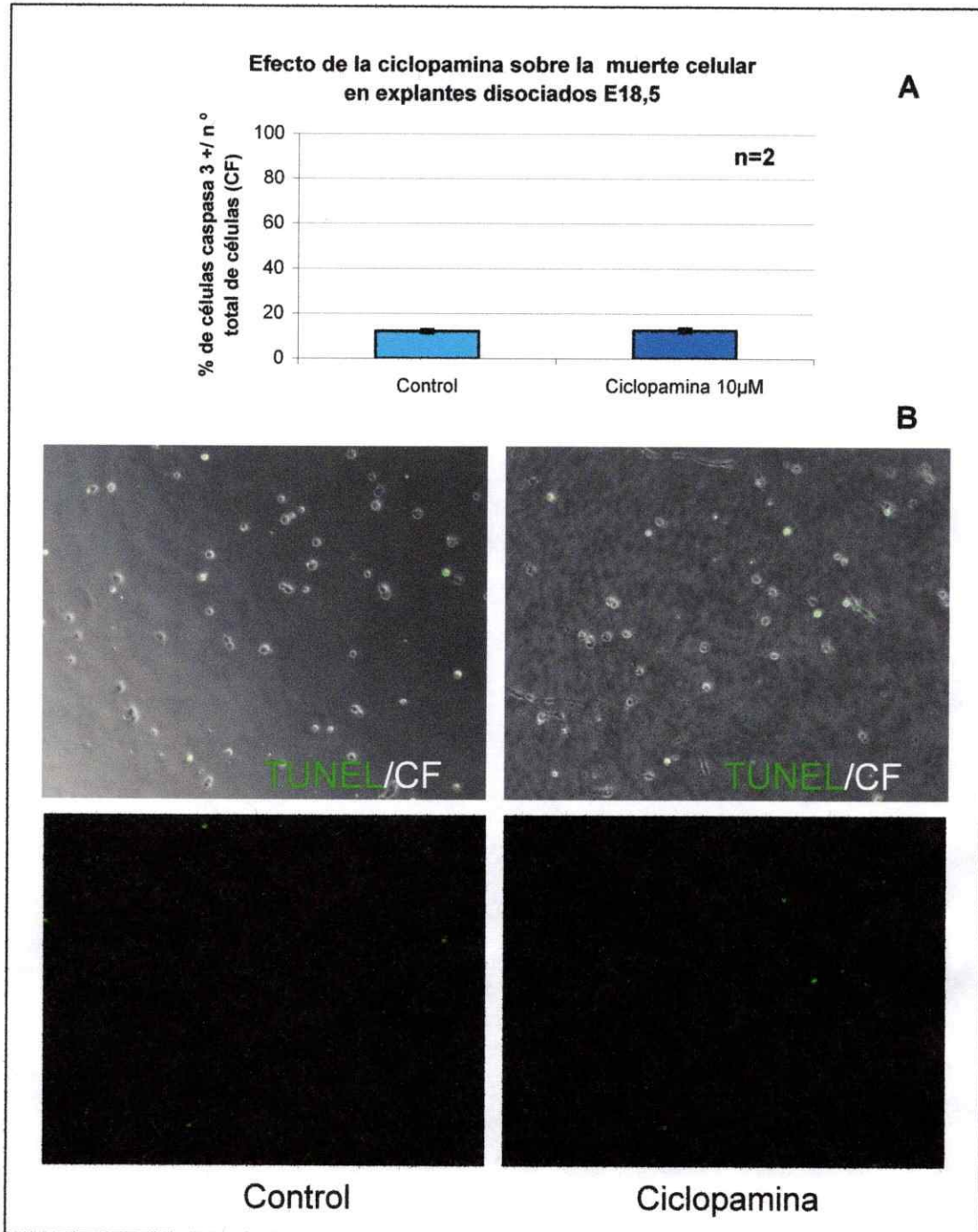
Por el contrario en explantes tectales tratados con microesferas embebidas en Shh o con el factor de crecimiento aplicado directamente al medio de cultivo (Figura 9), se observa un aumento en la incorporación de BrdU para explantes tardíos (E18,5). Se obtiene la misma tendencia en explantes de estadíos más tempranos (E11,5 y E12,5). Para evaluar si el papel de Shh es a nivel de la sobrevivencia de las NSP's, se realizó un análisis de los niveles de muerte celular en los cultivos. No se observan diferencias significativas en el número de células muertas entre los explantes tratados versus no tratados con ciclopamina, esto se determinó mediante un ensayo de TUNEL (Figura 10). En explantes tratados con ciclopamina se observa una disminución en la transcripción de *gli1*, gen diana de la vía de Shh, lo que confirma que la droga está efectivamente actuando en la inhibición de la vía. Por el contrario Shh en tanto promueve un aumento de la transcripción de *gli1* (Figura 11).



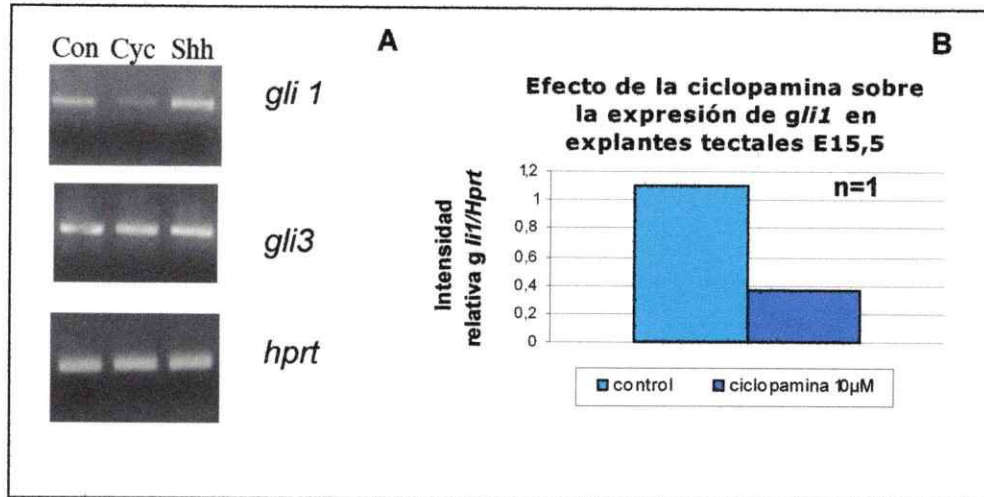
**Figura 8. A.** Efecto de la Ciclopamina sobre la proliferación de células troncales tectales en la embriogénesis tardía (E17,5 y E18,5). **B.** Inmunofluorescencia anti BrdU (rojo) sobre células troncales tectales adheridas tratadas y teñidas con DAPI (azul) para visualización de los núcleos. Neuroesferas de tectum fueron disociadas y sembradas en presencia de factores de crecimiento (FGF2 y EGF) para al día siguiente ser tratadas con y sin (control) ciclopamina 10 µM durante 8 horas, 2 horas previas al fin del tratamiento se aplicó un pulso BrdU para luego llevar a cabo la inmunofluorescencia anti BrdU y contra-teñidas con DAPI. (n=4 por triplicado, 2 contadores independientes) *t-student*  $p < 0,001$ . La barra representa 20 µm.



**Figura 9.** Proliferación en explantes tectales tratados con ganancia o pérdida de función de Shh. **A.** Inmunofluorescencia anti BrdU en explantes tectales tratados. Explantes tectales de embriones E18,5 fueron tratados con micro esferas embebidas (flecha) en solución con BSA (control) y solución de Sonic Hedgehog  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Shh). Se aplica un pulso de BrdU durante 3 horas y se cultiva durante 48 horas, para luego llevar a cabo una Inmunofluorescencia anti BrdU. Mediante microscopía confocal se determina la intensidad de las células BrdU positivas en un área de  $0,3\text{ cm}^2$  mostrando un aumento en presencia de Shh. Similares resultados se obtuvieron en E11,5 (no se muestran resultados). Número de explantes evaluados  $n=5$  por condición. La barra representa  $165\ \mu\text{m}$ . **B.** Proliferación de explantes tectales de embriones E18,5. Explantes de tectum fueron crecidos en medio de explantes en presencia de FGF2, EGF y Shh  $10\text{nM}$  respectivamente y se cultivan durante 48 horas. Posteriormente son disociados mecánicamente y plaqueados por 24 horas. Previa fijación se aplica un pulso de BrdU para luego llevar a cabo una Inmunofluorescencia anti BrdU, a su vez las células son teñidas con DAPI para visualizar los núcleos. El gráfico se construye a partir del número de células BrdU positivas por sobre el total de células (DAPI positivas) ( $n=3$ , 2 contadores independientes). El cultivo crecido en EGF  $1\text{ng}/\text{mL}$  no muestra diferencias significativas respecto al control. *t-student* para EGF  $10\text{ng}/\text{mL}$ , FGF  $10\text{ng}/\text{mL}$ , Shh  $10\text{nM}$  + EGF  $1\text{ng}/\text{mL}$  y Shh  $10\text{nM}$   $p<0,01$ .



**Figura 10. A.** Muerte celular en explantes tectales de embriones E18,5 tratados con ciclopamina. **B.** Ensayo de TUNEL en explantes tectales disociados. Explantes de tectum fueron crecidos en medio de explantes en presencia de ciclopamina 10 µM versus control sin ciclopamina y se cultivaron durante 48 horas. Posteriormente fueron disociados mecánicamente y plaqueados por 24 horas. Luego se llevó a cabo un ensayo de TUNEL mediante el Kit "In situ cell death, Detection Kit, POD". El gráfico se construye a partir del número de células fluorescentes por sobre el total de células (contadas en contraste de fase; CF) (n=2 por condición). No existen diferencias significativas. La barra representa 50µm.

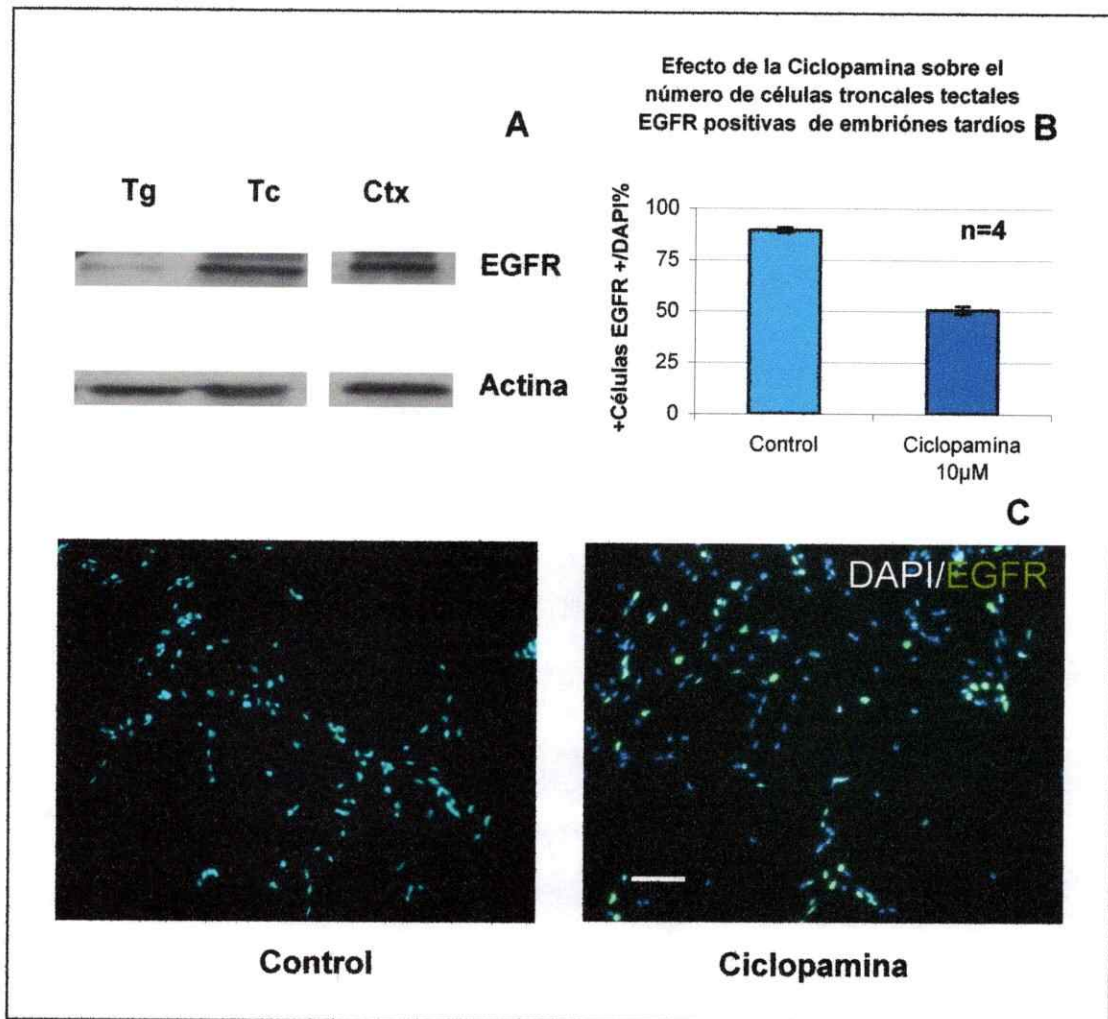


**Figura 11.** Expresión de *gli1* en explantes tectales tratados con ciclopamina. **A.** RT-PCR de explantes tectales de embrión E17,5. **B.** Efecto de la ciclopamina sobre la expresión de *gli1* en explantes tectales de embrión E15,5. Utilizando el programa "Image J" se mide la intensidad de *gli1* y *hprt* como control de carga en el gel. Luego se grafica la intensidad relativa de *gli1* por sobre *hprt* en la situación control versus presencia de ciclopamina (se muestra como ejemplo uno de 2 experimentos). Ciclopamina (Cyc); Control (Con).

#### **5.4. El receptor de EGF (EGFR) se expresa en células troncales y explantes tectales y es modulado por la vía de Shh.**

Los experimentos anteriores dan cuenta de una regulación por parte de la vía de Shh en la proliferación. Frente a la pregunta de sobre qué mecanismos dicha regulación es llevada a cabo, es que se considera la interacción con otras vía encargadas de la proliferación. Existen antecedentes de explantes corticales tratados con EGF y Shh (Palma 2004) donde se muestra un aumento en la proliferación. Sin embargo, en aquellos crecidos en presencia de EGF y Shh juntos, el incremento en la proliferación está por sobre los tratados independientemente. Es posible entonces relacionar a la vía de EGF con la regulación de la proliferación por parte de la vía de Shh. Datos del laboratorio muestran que cambios en la vía de EGF trae como consecuencia modificaciones en la expresión del receptor de EGF (EGFR) en corteza. Primero, mediante westernblotting se confirmó la expresión de EGFR en los explantes tectales (E18,5) igual que en corteza y a diferencia que en tegmentum. Además, se llevaron a cabo experimentos de pérdida de función de la vía de Shh, estos en NSC's generadas a partir de embriones en etapas tardías de desarrollo (E17,5 y E18,5) crecidos en presencia de ciclopamina 10  $\mu$ M. Mediante inmunofluorescencia anti EGFR se observó como éste receptor se encuentra expresado en un alto porcentaje y cómo la ciclopamina genera una disminución en la expresión EGFR (figura 12). Coincide esto último con la baja en la proliferación en NSC's crecidas en ciclopamina.





**Figura 12.** Expresión del receptor de EGF (EGFR) en el tectum. **A.** Efecto de la Ciclopamina sobre la expresión de EGFR en células troncales de tectum tardío. **B.** Expresión de la proteína EGFR en explantes de tectum de embrión E18.5. Se preparó un extracto proteico total a partir de explantes tectales de embriones crecidos en medio de explantes. Las proteínas fueron resueltas en un gel de SDS - Polyacrilamida al 10%. Mediante el uso de un anticuerpo policlonal que reconoce un dominio extracelular de la proteína EGFR, el cual fue donado por el Dr. Alfonso González, ésta fue visualizada. **C.** Inmunofluorescencia anti el receptor de EGF (EGFR, verde). Neuroesferas de tectum E18.5 fueron disociadas y sembradas en presencia de EGF para al día siguiente ser tratadas con ciclopamina 10 µM y EtOH (control) durante 8 horas, luego se llevó a cabo la inmunofluorescencia anti EGFR, a su vez las células fueron teñidas con DAPI. (n=4, 2 contadores independientes) *t-student*  $p < 0,001$ . La barra representa 50 µm. Tg (tegmentum); Tc (tectum) y Ctx (corteza).

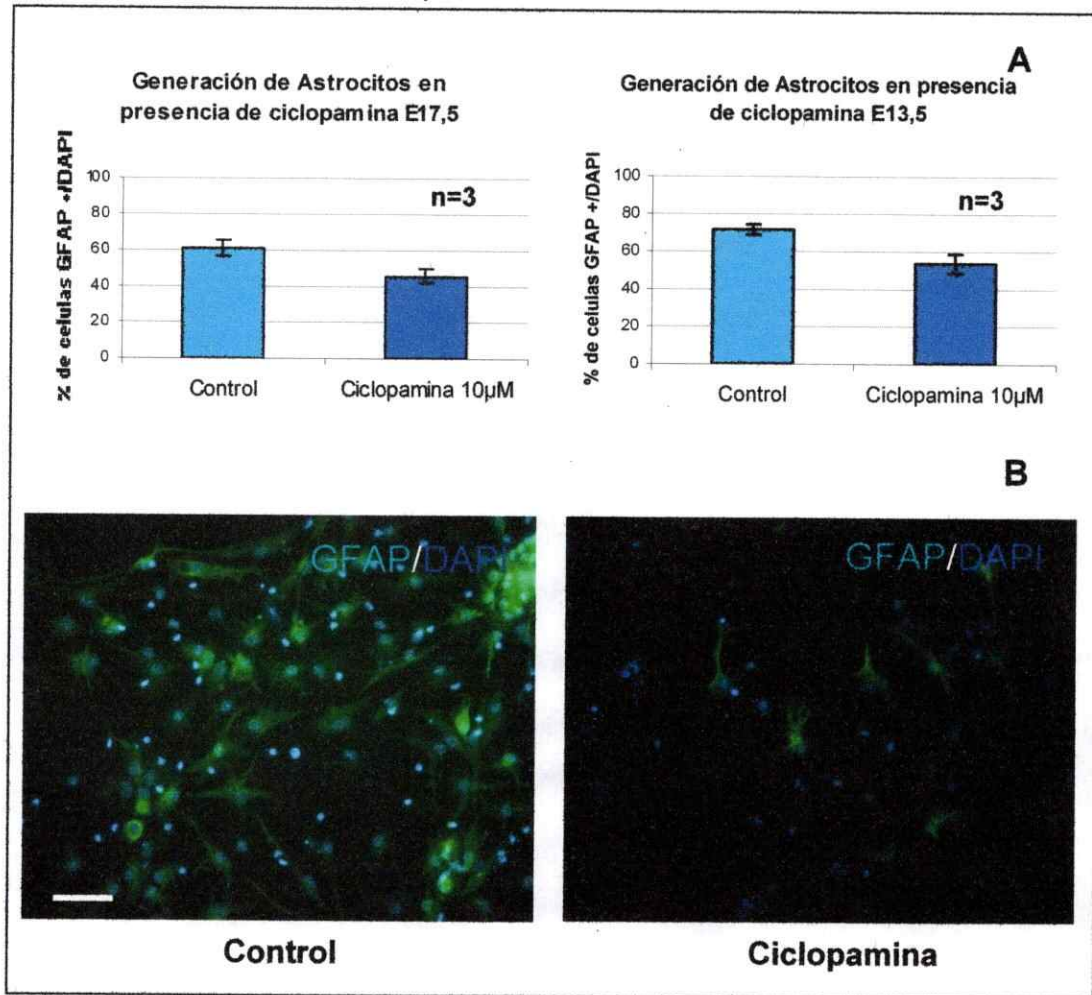


### **5.5. Diferenciación en cultivo de células troncales y explantes tectales de embriones en respuesta a Shh.**

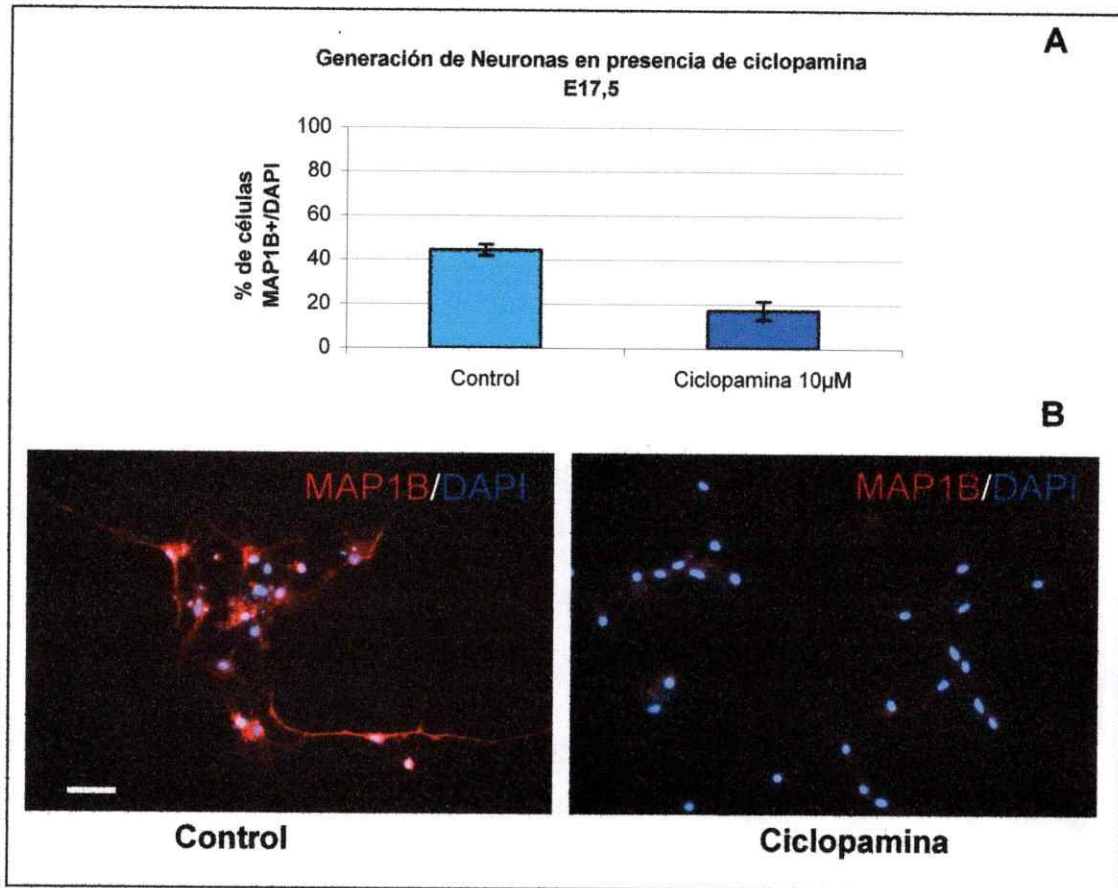
Los resultados obtenidos indican que la inhibición de la vía de Shh trae alteraciones en la proliferación de las células tectales. Para determinar si cambios en la vía de Shh también traen consecuencias en el fenómeno de diferenciación, se llevaron a cabo varios ensayos de ganancia y pérdida de la vía, tanto en NSC's como explantes tectales,

En NSC's E17,5 y E13,5; cultivadas en presencia de ciclopamina se observó una disminución en el número de astrositos (identificados mediante inmunofluorescencia anti GFAP), prevaleciendo un tipo de morfología particular con fenotipo lineal (ésta última observación no publicada) (Figura 13). También se nota una disminución en el número de neuronas generadas, esto visualizado mediante inmunofluorescencia anti MAB1B (Figura 14).

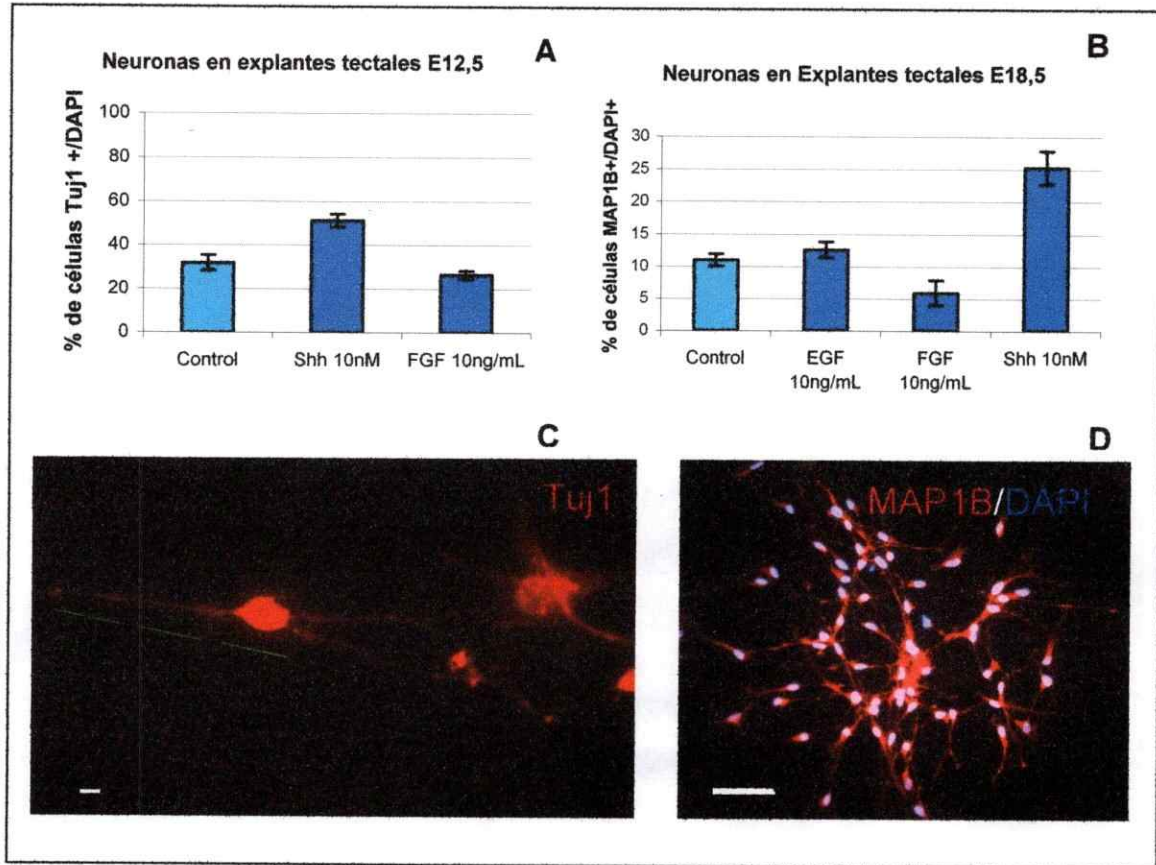
En explantes tectales en presencia de Shh se observó un aumento en el número de neuronas. Esto se advierte tanto en explantes tectales tempranos mediante Inmunofluorescencias anti Tuj1 E12,5 (misma tendencia en explante E11,5, no se muestran datos) como en explantes tardíos E18,5 mediante Inmunofluorescencias anti MAP1B (Figura 15). A su vez, en experimentos de pérdida de función utilizando ciclopamina 10  $\mu$ M, el número de astrocitos también disminuyó. (Figura 16)



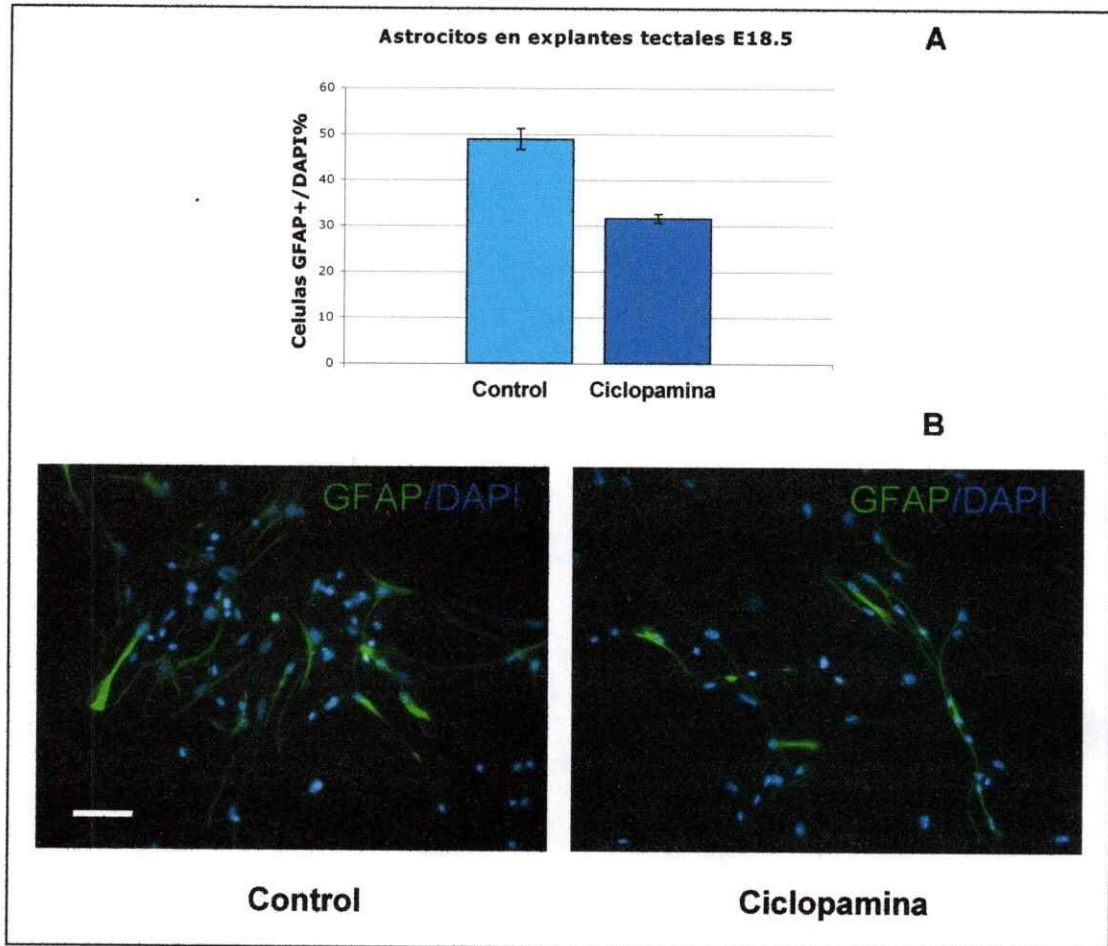
**Figura 13.** Efecto de la Ciclopamina en la diferenciación de astrocitos a partir de células troncales tectales. **A.** Generación de Astrocitos a partir de células troncales tectales E13,5 y E17,5 crecidas en presencia de ciclopamina. **B.** Inmunofluorescencia anti Proteína Ácida Fibrilar Glial sobre células troncales diferenciadas E13.5. Neuroesferas de tectum E13.5 y E17,5 fueron disociadas y sembradas deprivadas de factores de crecimiento (FGF2, EGF) en presencia o ausencia de ciclopamina 10µM, permitiendo la diferenciación celular. Luego de 5 días de cultivo se lleva a cabo la inmunofluorescencia anti Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP; Astrocitos), a su vez las células fueron teñidas con DAPI. Se grafica el porcentaje de células GFAP positivas por sobre el total de células DAPI positivas. (n=3, 2 contadores independientes) En el caso E13,5 *t-student*  $p < 0,01$ ; para E17,5  $p < 0,02$ . La Barra representa 50 µm.



**Figura 14.** Efecto de la Ciclopamina en la generación de neuronas a partir de células troncales tectales. **A.** Generación de Neuronas a partir de células troncales tectales E17,5 crecidas en presencia de ciclopamina. **B.** Inmunofluorescencia anti Map1B, sobre células troncales diferenciadas E17,5. Neuroesferas de tectum E17,5 fueron disociadas y sembradas deprivadas de factores de crecimiento (FGF2, EGF) en presencia o ausencia de ciclopamina 10µM permitiéndose la diferenciación celular. Luego de 5 días de cultivo se lleva a cabo la Inmunofluorescencia anti Proteína asociada a microtúbulo 1B (MAP1B; Neuronas en rojo). A su vez las células fueron teñidas con DAPI (azul). Se grafica el porcentaje de células MAB1B; células DAPI positivas. (n=3, 2 contadores independientes). *t-student*  $p < 0,01$ ; La barra representa 20µm.



**Figura 15.** Generación de neuronas en explantes tectales de embriones tratados. **A.** Generación de neuronas en presencia de Shh y FGF en explante tectal de embrión E12,5. **B.** Generación de neuronas en presencia de EGF, FGF o Shh respectivamente, en explante tectal de embrión E18,5. **C.** Inmunofluorescencia anti Tuj-1 en explantes tectal E11,5, microscopía confocal. Se determina como neurona claramente diferenciada aquella cuyas prolongaciones son a lo menos dos veces su soma (ver barras verdes). **D.** Inmunofluorescencia anti Map1B en explante tectal. Explantes tectales de embriones E12,5 y E18,5 fueron cultivados sin tratamiento (control); Sonic Hedgehog 10 nM, FGF2 10 ng/mL o EGF 10 ng/mL por 48 horas. Fueron disociados, plaqueados y fijados a las 24 horas para llevar a cabo una inmunofluorescencia anti Tubulina (Tuj1) y Inmunofluorescencia anti Proteína asociada a microtúbulo 1B (MAP1B) respectivamente. A su vez las células son teñidas con DAPI. El gráfico se construye a partir del número de células MAP1B o Tuj1 positivas por sobre el total de células DAPI positivas. *t-student*  $p < 0,001$  para Shh 10nM; FGF no muestra diferencias significativas (A). En (B) ( $n=2$ , 2 contadores independientes). *t-student*  $p < 0,05$  para FGF 10ng/mL;  $p < 0,001$  para Shh 10nM. La barra representa 20  $\mu$ m.

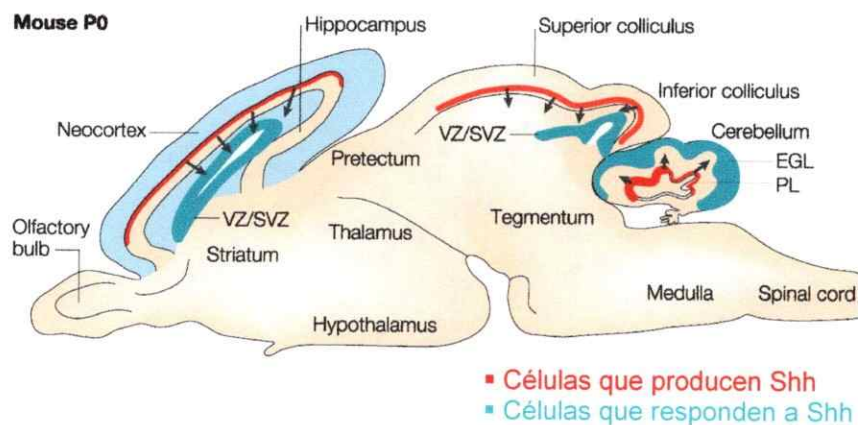


**Figura 16.** Generación de Astrocitos en explantes tectales de embriones tratados. **A.** Generación de Astrocitos en explantes tectales E18,5 crecidos en presencia de ciclopamina. **B.** Inmunofluorescencia anti Proteína Ácida Fibrilar Glial sobre células troncales diferenciadas E13.5. Explantes de tectum fueron crecidos en medio de explantes en presencia de ciclopamina 10  $\mu$ M y se cultivan durante 48 horas. Posteriormente son disociados mecánicamente, plaqueados y fijados a las 24 horas. Luego se lleva a cabo una Inmunofluorescencia anti GFAP (E18,5), a su vez las células son teñidas con DAPI. El gráfico se construye a partir del número de células GFAP positivas por sobre el total de células DAPI positivas ( $n=2$ , 2 contadores independientes). t-student  $p<0,001$ . La barra representa 50  $\mu$ m.

## 6. DISCUSIÓN

La vía de Shh representa uno de los mejores ejemplos de conservación y versatilidad en los procesos de desarrollo embrionario. El accionar de Shh ha sido implicado en la formación de más de 20 tejidos y órganos. En el sistema nervioso central en particular ha sido descrita una función temprana como morfógeno y también como mitógeno en estadios embrionarios tardíos, función corroborada desde varias aproximaciones experimentales y en diferentes modelos de vertebrados. En el telencéfalo de ratón en estadios tempranos de la embriogénesis (E9) Shh regula el patterning inicial de las estructuras dorsales y ventrales, en forma similar a su función clásica descrita en la médula espinal. En tanto, a mediados del desarrollo embrionario (E9-E12) se ha observado que se encarga de la especificación de los oligodendrocitos y postnatalmente, de mantener nichos de NSC's en la zona subventricular de esta estructura. En el diencefalo en etapas tempranas es requerido para la separación de los campos oculares bilaterales, como también en establecer el patterning diferencial en el eje antero-posterior. En cerebelo está regulando la proliferación de células granulares y en la foliación de esta estructura durante la embriogénesis tardía y postnatal. Por otro lado, se le ha involucrado en fenómenos como la generación de células gliales, la mantención de nichos de células troncales y en guía axonal. De estos antecedentes se desprende que la señal Shh influencia fuertemente el desarrollo del cerebro, siendo su efecto contexto-dependiente y la respuesta celular proliferación, diferenciación o muerte una opción finamente regulada en cada nicho neurogénico (Figura 17). En el cerebro medio, que es la zona en que se enmarca esta memoria, a la fecha sólo se describe a Shh como encargado de regular en etapas tempranas (E8,5-E12) el patterning dorso-ventral, así como la expresión del llamado organizador

del cerebro medio-posterior FGF8, que se expresa a nivel del organizador ístmico, comandando la diferenciación de neuronas dopaminérgicas a nivel del mesencéfalo ventral (M. Fuccillo y cols. 2006). Resulta interesante entonces estudiar el papel potencial de Shh en el desarrollo del cerebro medio en un contexto totalmente diferente, es decir, en su parte dorsal (tectum) y en etapas tardías del desarrollo. Determinar si Shh esta involucrado en su crecimiento y si el efecto mitógeno antes descrito para otras estructuras dorsales del SNC se mantiene en esta región. Además interesa saber que cambios regula a nivel de la diferenciación celular, más aún que estos fenómenos a la fecha no se han estudiados para el mesencéfalo. Al mismo tiempo, interesa estudiar si la regulación ejercida por Shh en el tectum es similar en cuanto a mecanismo de acción a lo observado en el laboratorio en otras estructuras dorsales del cerebro como la corteza, específicamente a la respuesta proliferativa mediada por modulación de receptores de EGF.



**Figura 17.** Diagrama de la localización y respuesta a Shh. En éste diagrama de una sección sagital de cerebro de ratón P0, se muestra la expresión capa-específica de Shh en regiones dorsales. Los resultados obtenidos en por el laboratorio para la corteza cerebral y para el tectum, durante esta memoria, son similares a los detectados en cerebelo. Estos demuestran que la vía de Shh-Gli tiene en general un papel controlando, en el cerebro dorsal, el número de células progenitoras que se generan. Las flechas representan la acción de Shh a distancia de las neuronas, éste se produce en las placas neocortical y tectal, o en la capa de Purkinje (demostrada aquí en rojo). A su vez se muestran las zonas que responden a Shh, zonas ventricular/subventricular en el neocortex y el tectum, o la capa germinal externa en el cerebelo (demostrado en azul).

## 6.1. Generación de un cultivo de células troncales de tectum.

Para poder llevar a cabo este trabajo fue necesario poner a punto diversas técnicas de cultivo celular no descritas en la literatura para el tectum al momento de comenzar esta memoria, como la generación de un cultivo de neuroesferas.

La ventana temporal elegida para obtener un cultivo de neuroesferas a partir de embriones de ratón y estudiar el fenómeno de crecimiento del tectum fue la adecuada. Esto basado en los trabajos de Edwards MA. y col. 1986 y Alvarez-Bolado G. 1999, en los cuales se muestra que entre los estadios E11,5 y P0 ocurren los mayores cambios en cuanto a proliferación y diferenciación celular en el colículo superior de ratón.

Durante el pasaje 4 en el cultivo E16,5 se muestra como el cambio de medio favorece a la expansión de este (Figura 5C). Así, en adelante los cultivos crecidos en "medio de neuroesferas tectales" obtienen una mayor cantidad de células al final de un pasaje y alcanzan un mayor número de "pasajes" que los crecidos en "medio de neuroesferas corticales", este último usado en Palma y cols. 2004. Cabe señalar que el "medio de neuroesferas tectales" está preparado en DMEM/F12 y no incorpora el suplemento N2 sino que contiene B27, este último libre de suero. Esta salvedad es necesaria ya que una posible explicación a la diferencia en los resultados en la identidad regional de los cultivos de NSC's, como en lo referente a los marcadores celulares obtenidos por los distintos autores (ver discusión más adelante), es que éstos no utilizan los mismos medios de cultivo ni las mismas concentraciones de factores de crecimiento (Santa-Olalla y col, 2003; Moses D. y cols. 2006). Así no es posible encontrar contradicciones entre experimentos en contextos diferentes ya que estos no son comparables.



Por otro lado, la obtención del cultivo desde el pasaje 1 en presencia de FGF2 solo se observa en E12,5 (no se muestran datos). En el pasaje E18,5 II, sólo después de crecer primero en presencia de EGF y FGF2, se obtiene un cultivo que se mantenga en presencia de FGF2 (Figura 5D), pero éste no prospera. Estos datos coinciden con la idea de sucesión en la respuesta a factores de crecimiento por parte de las células del mesencéfalo, primero respondiendo a FGF2 en etapas tempranas del desarrollo, pasando luego por un periodo de reacción conjunta tanto a EGF y FGF2 y por último preferentemente a EGF en etapas tardías (Santa-Olalla y Covarrubias, 1999). Así, los cultivos primarios de células de tectum sólo responden a FGF2 en estadios del desarrollo temprano como en E12,5. En los cultivos tardíos, sin embargo, no se observan grandes diferencias entre los crecidos tanto en EGF y FGF2, como en los cultivados sólo en EGF.

La obtención de los tres tipos principales de células del sistema nervioso detectada a través de inmunofluorescencias (anti O4, Tuj-1 y GFAP), sumado a la capacidad de generar neuroesferas, dan cuenta del establecimiento de un cultivo murino de células troncales multipotencial. Los ensayos de diferenciación se llevaron a cabo en los diferentes cultivos como control, solo como ejemplo se muestra un cultivo E18,5 (Figura 6). A diferencia de lo obtenido por Moses D. y cols. 2006, nos fue posible generar neuronas, sin embargo, cabe señalar que este último grupo llevó a cabo sus experimentos en células crecidas sólo en EGF, por lo que el efecto de FGF2 en la generación de neuronas debe ser considerado.

## 6.2. Ensayos Clonales de neuroesferas tectales.

Ante la inexistencia de marcadores celulares que permitan distinguir entre una célula troncal y una progenitora; y considerando además que en un cultivo de neuroesferas existen estas poblaciones heterogéneamente, es que se decide realizar un ensayo clonal. Es posible así determinar de manera directa que cantidad de células mantienen su capacidad de proliferación y corresponden a células troncales verdaderas, multipotenciales y con capacidad de generar una nueva neuroesfera *in vitro*. Los ensayos clonales se realizaron en medio de neuroesferas tectales a dilución en presencia de EGF y FGF2, de esta forma se registra como la ciclopamina (bloqueador de la vía de Shh) es capaz de inhibir el efecto de ambos factores de crecimiento, observándose una disminución en la generación de neuroesferas en aquellas crecidas en presencia de la droga (Figura 7, no se muestran gráficos de los pasajes de estos cultivos). Se observa además cómo las neuroesferas generadas en presencia de ciclopamina en un momento dado detienen su crecimiento, observándose en general un menor tamaño de éstas en comparación con las controles, a veces no alcanzando los tamaños requeridos (se discute mas adelante) para ser consideradas en el contéo.

El porcentaje de generación de neuroesferas en estadíos tempranos es similar al obtenido por Santa Olalla y cols. 2003. Por otro lado estos resultados difieren de los registrados por Moses D y cols. 2006, quienes obtienen una generación menor de neuroesferas. Esto a pesar de que en este estudio sólo se consideró como neuroesfera a aquella que cumpliera con el criterio de estar lista para un "pasaje", es decir, con un tamaño superior a los 250  $\mu\text{m}$ . Se debe tomar en cuenta que en de los casos considerados los medios de cultivo son diferentes, lo mismo ocurre con las condiciones

de densidad celular, factores importantes a la hora de generar un cultivo de neuroesferas.

### 6.3. Proliferación evaluada en cultivos de células troncales y en explantes tectales.

Las células troncales crecen en forma de neuroesferas en suspensión en el medio, pero se ha descrito que también lo hacen adheridas a una superficie cubierta de poliornitina-laminina. En presencia de estos componentes de matriz, ellas mantienen su crecimiento sin perder su calidad de células multipotenciales (Reynolds y Weiss, 1996. Palma y cols. 2004). Basándose en este antecedente se estudió en este trabajo el efecto sobre la proliferación de células troncales de tectum en presencia de ciclopamina, llevando a cabo inmunofluorescencias anti BrdU en cultivos crecidos en dichas condiciones.

Al graficar el número de células BrdU-positivas por sobre el total de células (DAPI positivas), se obtiene una real estimación de las células en división celular, viéndose afectada esta misma en presencia de ciclopamina 10  $\mu$ M. (Figura 8). En principio, este efecto de la ciclopamina podría deberse a un aumento en la muerte celular. Se han descrito efectos citóxicos para este alcaloide, pero no en NSC's (Mimeault M. y cols.; Shafae Z. y cols. 2006). De todas maneras, para descartar esta posibilidad se realizó un ensayo de TUNEL con el fin de estimar muerte celular, no encontrándose diferencias significativas entre el control y el cultivo tratado con ciclopamina 10  $\mu$ M (Figura 10). Estos resultados, sumados a los obtenidos en los ensayos clonales, son evidencia directa de que la vía de señalización de Shh en el tectum, al igual que en otros derivados dorsales de desarrollo tardío como son corteza y cerebelo, funciona como mitógeno para células troncales y progenitoras.

El trabajo en explantes tectales, por otro lado, intenta acercarse a un modelo más cercano a la situación "in vivo". En éste no se encuentra sólo una población de NSC's, sino que existen diversos tipos celulares diferenciados en proporciones que varían de acuerdo al estadio de gestación, como también precursores ya comprometidos a linajes neuronales y gliales. (Dahmane y col, 2001), conservando la organización del tejido (Figura 1). Además existen otros factores involucrados en proliferación y diferenciación, no sólo EGF y FGF. Es en estos explantes donde se llevaron a cabo experimentos de ganancia de función en presencia de Shh, y se registra un aumento en la proliferación. Sin embargo, no se puede descartar que más de una vía de señalización esté involucrada en este incremento, ya que se observa que Shh por si sólo no es capaz de generar un real aumento. Datos del laboratorio en corteza muestran que Shh es necesario pero no suficiente para generar una respuesta proliferativa. No deja de ser interesante que en los experimentos en explantes "tempranos" se observa una mayor proliferación en FGF por sobre Shh (no se muestran datos), lo que se invierte en el caso de usar explantes tardíos. A su vez en explantes tardíos crecidos en EGF se observa un aumento en la proliferación. Esto coincide con los datos de la literatura ya mencionados acerca de la posible sucesión de respuesta proliferativa a FGF y luego EGF. Datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran cómo en etapas tardías del desarrollo un cultivo cortical responde a EGF, expresa este receptor y éste se encuentra activo. Los experimentos con microesferas embebidas en Shh presentan una ventaja por sobre la aplicación directa al medio, con las microesferas es posible graduar la cantidad de Shh a disposición del explante. Mediante este experimento se pretendía generar una gradiente de concentración de Shh, emulando la gradiente que se genera desde ventral a dorsal y así determinar qué concentración de Shh es necesaria para obtener incrementos en la proliferación. Estos

experimentos no se podían realizar en cultivo de neuroesferas. Sin embargo las concentraciones usadas en estas microesferas parecieron ser muy altas. Si bien no se muestran gráficos de estos experimentos, la tendencia sigue siendo un aumento de las células BrdU positivas en presencia de Shh (Figura 9). Por las razones anteriormente expuestas, hoy en día como alternativa en el laboratorio se plantea establecer un cultivo tridimensional de células madre neuronales, en el que se pueda evaluar la proliferación y diferenciación celular de dichas células de una forma similar a como lo harían *in vivo*. Estos sistemas de cultivo tridimensional permiten mimetizar a la matriz extracelular nativa y probablemente mantener las relaciones célula – célula y célula – matriz extracelular. (O'Connor y col, 2000; O'Connor y col 2001; Fitzgerald y col 2004).

La concentración a la que la ciclopamina fue utilizada es capaz de afectar la vía de Shh en explantes tectales. Como evidencia se muestra un RT PCR, en el que el gen regulado directamente por Shh *gli1* disminuye su transcripción en explantes E17,5 tratados con la droga. En explantes E15,5 se muestra un gráfico generado a partir de mediciones de intensidad para un dato de un total de dos donde se observa la misma tendencia. Así el modelo de inhibición farmacológica de la vía shh tiene efectos a nivel transcripcional y concuerda con el modelo del código Gli donde Shh regula positivamente al gen diana *gli1*.

#### 6.4. Expresión del receptor de EGF (EGFR) en células troncales y explantes tectales.

A raíz de resultados anteriores del laboratorio se postula de que el cambio en la respuesta a los factores de crecimiento, desde FGF hacia EGF, por parte de los nichos de células troncales es generado por un aumento en la expresión del receptor de EGF. Esto se ha demostrado para la neocorteza donde existe un nivel de expresión de este

receptor en un alto porcentaje de células progenitoras durante la embriogénesis tardía. Además existe el antecedente de que la presencia conjunta de EGF y Shh, potencia la respuesta proliferativa de explantes corticales, por sobre los tratados de forma independiente con cada factor (Palma y cols. 2004). Shh podría entonces modular la proliferación, a través de la regulación de EGFR. Mediante westernblotting a partir extractos proteicos de explantes fue posible detectar una fuerte expresión de EGFR tanto en tectum como en corteza, contrario a lo que se observa en el mesencéfalo ventral/tegmentum (Figura 12). Así, se decidió determinar si el tectum se comporta como la corteza y si Shh está involucrado también en la formación de esta estructura dorsal, cooperando con la vía de EGF. Para ello se llevan a cabo experimentos de pérdida de función en células troncales tectales crecidas en presencia de ciclopamina 10  $\mu$ M. Mediante inmunofluorescencia anti EGFR es posible observar como éste, al igual que en corteza, se encuentra expresado en un alto porcentaje de las células troncales tectales control. Esto último no es de extrañar debido a que estamos en presencia de un cultivo que responde a EGF y que se encuentra en constante proliferación, además de provenir de una etapa tardía del desarrollo. La pérdida de función de Shh genera una disminución en casi del 50% en la expresión de EGFR. Estos resultados relacionan a la expresión de EGFR con la presencia de Shh pero no confirman que este último sea lo que provoque el cambio de respuesta de FGF a EGF, antes mencionado. Sin embargo, datos de laboratorio en corteza dan cuenta de un papel de modulador de la respuesta proliferativa frente a EGF, por parte de Shh, al regular no sólo la proteína sino también la actividad de la vía de EGF (datos no publicados).

## 6.5. Diferenciación en cultivo de células troncales y explantes tectales de embriones en respuesta a Shh.

Una posible interpretación de los resultados en los que existe pérdida de función, puede ser que debido al bloqueo de la vía de señalización de Shh, encargada de mantener a las células proliferando, se provoque el arresto mitótico de estas mismas, generándose un aumento en la diferenciación de neuronas y/o glía. Durante los ensayos de diferenciación en células troncales, las crecidas en ciclopamina presentaban en general un mejor aspecto en cultivo. Se observan diferencias en cuanto al número total de astrositos generados a partir de células troncales crecidas en ciclopamina, siendo éste menor en presencia de la droga (Figura 13). Por otro lado, se observa un aumento significativo en la generación de astrocitos con fenotipo lineal en presencia de ciclopamina (no se muestran datos). Estas células GFAP+, han sido consideradas progenitoras gliales, es decir, células con características de célula madre pero ya comprometidas a un linaje glial (Bonaguidi MA y cols. 2005).

Un trabajo reciente hace referencia a EGFR como el encargado de controlar la capacidad de transducir la señal de Leukemia Inhibitory Factor (LIF) como inductor de astrocitos durante el desarrollo en la corteza, sin embargo, señala que LIF no es indispensable para la generación de éstos. Así, en progenitores con ninguna (mutantes nulos) o baja (tempranos) expresión de EGFR, interpretarían a LIF para la generación de neuronas, por el contrario, progenitores con alta expresión del receptor (tardíos o sobreexpresión) darían origen a astrocitos. Cabe señalar que en este trabajo, no se consideran distinciones entre los tipos de células GFAP+ generadas (estrelladas versus lineales) (Viti J y cols. 2003). Si consideramos a la ciclopamina como un

inhibidor parcial de la expresión de EGFR, es de esperar una baja en la generación de astrocitos a partir de células troncales. En nuestro trabajo tampoco se hacen distinciones entre los tipos de astrocitos generados, y no se explica el aumento en aquellos con morfología lineal debido a que estos son sólo resultados preliminares posibles de abordar en mayor profundidad a futuro.

El porcentaje de generación de astrocitos en células troncales es similar al obtenido por Moses D. y cols. 2006, este número es mayor que el generado en los experimentos realizados con explantes. Se debe tomar en cuenta que existen diferencias entre ambas aproximaciones experimentales, lo mismo para el caso de la generación de las neuronas (que se discute más adelante). En explantes tectales se registran también diferencias entre los astrocitos generados en presencia o no de ciclopamina, observándose la misma tendencia a la disminución de estos que en los cultivos de NSC's. (Figura16).

Se ha descrito la imposibilidad de generar neuronas a partir de células troncales de la zona dorsal del mesencéfalo, sin embargo, dichos cultivos fueron de estadios más tempranos y sólo crecidos en EGF (Moses D y cols. 2006). Los experimentos aquí realizados demuestran lo contrario. Estos experimentos se realizaron en presencia de FGF2 y EGF, registrándose al igual que en el caso de los astrocitos, un porcentaje de neuronas mayor que en los explantes tectales. FGF aparece entonces, como un agente importante en la generación de neuronas a partir de células troncales, ya que no fue posible generarlas en ausencia de este factor. Además existen antecedentes en de que Shh modula también la respuesta a FGF (Brewster y col., 2000), esto nuevamente nos lleva a pensar en la vía de Shh como un agente no principal pero sí modulador de la respuesta a los diferentes factores que varían en el desarrollo.

Se utilizaron tres marcadores neuronales diferentes MAP1B, Tuj-1 y NeuroD (de este



ultimo no se muestran datos) para asegurar la identificación de neuronas. Es interesante como la ciclopamina disminuye en un 50% el número de neuronas (positivas para MAP1B), que se generan a partir de células troncales tardías (Figura 14). Se ha relacionado a Shh con la proliferación de neuronas de diferentes zonas del cerebro (Ye y cols., 1998; Dahmane N y Ruiz i Altaba, 1999; Soula y cols., 2001; Palma y cols. 2005) pero a la fecha este es el primer estudio que se muestra en el tectum.

En los ensayos de ganancia de función llevados a cabo en los explantes tectales, si bien el porcentaje de neuronas generadas en condiciones control es menor que en caso del cultivo celular, Shh aumenta dicho porcentaje. Esto último evidencia el rol de Shh en la generación de neuronas en el tectum (Figura 15). Cabe señalar que la generación de neuronas, registrada en los explantes tectales tempranos crecidos en FGF, no se diferencia del control. Sin embargo, en explantes tardíos tanto el porcentaje de neuronas, como la respuesta a este factor respecto al control, disminuye. Siguiendo un modelo de respuesta secuencial a FGF y EGF durante el desarrollo por parte de las células tectales, es de esperar una disminución en la generación de neuronas ya que los progenitores son incapaces de responder a FGF durante la embriogénesis tardía. Así, el aumento en el número de neuronas generadas en presencia de Shh puede ser explicado por un incremento en la cantidad de precursores neuronales. Esto ya sea mediante la generación seleccionada de este tipo celular a partir de las células troncales o producto de una acción mitógena preferencial sobre esta población. Pero mediante los experimentos realizados no es posible determinar en cuál de estas alternativas Shh está involucrado. Nuestros resultados con los ensayos clonales así como los datos de literatura en que se menciona a Shh como capaz de mantener nichos de NSC's en adulto apoyan la primera idea.

## 6.6. Discusión general

En etapas tardías, la ciclopamina es capaz de disminuir el efecto de FGF y EGF en la proliferación de células troncales. Por otra parte, los explantes tectales crecidos en Shh proliferan más que aquellos crecidos en EGF o FGF. Esto evidencia el posible rol de Shh en mantener proliferando a las células troncales de tectum, sin embargo no parece ser un factor indispensable en este fenómeno.

Basado en los datos obtenidos es posible suponer que FGF no tiene efecto sobre la proliferación de las células troncales tardías. Entonces la pérdida de función en la vía de Shh mediante el uso de ciclopamina tiene un efecto sobre la señalización mediada por EGF en la proliferación. Ahora, dado que los explantes tardíos crecidos en Shh, proliferan más que en sólo EGF, se debe considerar que existen diversos factores de crecimiento que se conservan en el explante y diversas poblaciones proliferando que responden de manera distinta, a diferencia de un cultivo altamente seleccionado como es el de neuroesferas troncales.

Es posible que en el tectum exista en etapas tempranas una población de células troncales que responde principalmente a FGF, comprometiéndose esta preferentemente a una población de precursores neuronales apoyado por el efecto de Shh. Más tardíamente en el desarrollo, las células troncales responden a EGF generando principalmente una población de precursores gliales, Shh tendría efecto sobre la mantención de esta población a través de sus precursores en conjunto son EGF, modulando la acción de este último. Tanto en el cultivo de células troncales como en explantes tectales Shh tiene efectos sobre la expresión de EGFR, similar a lo que ocurre en corteza.

## **7. CONCLUSIONES**

Es posible concluir que en el tectum existe una población de células troncales que en etapas tardías de desarrollo es capaz de responder a la señal de Shh aumentando su proliferación. Recapitulándose el efecto de éste descrito en otras estructuras del desarrollo tardío dorsal como corteza y cerebelo. Dicha población, al igual que en corteza responde de forma secuencial a los factores de crecimiento FGF y EGF. Shh actuaría modulando la respuesta a éstos factores de crecimiento. Además, Shh favorece la generación de neuronas.

## 8. REFERENCIAS

Agarwala, S., Sanders, T. A. & Ragsdale, C. W. (2001). Sonic Hedgehog control of size and shape in midbrain pattern formation. *Science* 291: 2147–2150.

Alexandre, C., Jacinto, A., Ingham, P.W. (1996) Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* 10(16):2003-13.

Alvarez-Bolado G, Cecconi F, Wehr R, Gruss P. (1999). The fork head transcription factor Fkh5/Mf3 is a developmental marker gene for superior colliculus layers and derivatives of the hindbrain somatic afferent zone. *Brain Res Dev Brain Res.* 5;112(2):205-15.

Anderson D.(2001) Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual. *Neuron* 30(1):19-35. Review.

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

Bai CB. and Joyner AL. (2001). Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. *Development* 128, 5161-72.

Bai CB, Stephen D, Joyner AL. (2004). All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev Cell.* 6(1):103-15.

Blaess S, Corrales JD, Joyner AL. (2006). Sonic hedgehog regulates Gli activator and repressor functions with spatial and temporal precision in the mid/hindbrain region. *Development* 133(9):1799-809.

Bonaguidi MA, McGuire T, Hu M, Kan L, Samanta J, Kessler JA. 2005. LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development*;132(24):5503-14.

Bornemann, D. J., Duncan, J. E., Staatz, W., Selleck, S. and Warrior, R. (2004). Abrogation of heparan sulfate synthesis in *Drosophila* disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. *Development* 131, 1927-38.

Brewster R, Mullor JL, Ruiz i Altaba A. (2000). Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning. *Development* 127(20):4395-405.

Chandran S, Kato H, Gerreli D, Compston A, Svendsen CN, Allen ND. (2003). FGF-dependent generation of oligodendrocytes by a hedgehog-independent pathway. *Development* 130(26):6599-609.

Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA.(2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 1;16(21):2743-8.

Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 3;383(6599):407-13.

Dahmane N., Ruiz i Altaba A. (1999) Sonic hedgehog regulates the growth and the patterning of the cerebellum. *Signaling pathway in skin tumours. 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.

Edwards MA, Caviness VS Jr, Schneider GE. (1986). Development of cell and fiber lamination in the mouse superior colliculus. *J Comp Neurol.* 15;248(3):395-409.

Fuccillo M, Joyner AL, Fishell G. (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nature Review Neuroscience.*(10):772-83. Erratum en: *Nat Rev Neurosci.* 2006 Nov;7(11):902.

Gabay L, Lowell S, Rubin LL, Anderson DJ. (2003). Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro. *Neuron.* 30;40(3):485-99.

Karlstrom, R. O., Tyurina, O. V., Kawakami, A., Nishioka, N., Talbot, W. S., Sasaki, H. and Schier, A. F. (2003). Genetic analysis of zebrafish gli1 and gli2 reveals divergent requirements for gli genes in vertebrate development. *Development* 130, 1549-64.

Kessarlis N, Jamen F, Rubin LL, Richardson WD. (2004). Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors. *Development.* 131(6):1289-98.

Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV.(2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature Neuroscience.*6(1):21-7. Erratum in: *Nature Neuroscience.*6(6):645.

Lewis P.M., Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP.(2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 105(5):599-612.

Lewis, P. M., Gritti-Linde, A., Smeyne, R., Kottmann, A. and McMahon, A. P. (2004). Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol* 270, 393-410.

Lillien L, Raphael H. (2000). BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells. *Development*.127(22):4993-5005

Litingtung, Y. and Chiang, C. (2000). Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci* 3, 979-85.

Liu A. Joyner AL. (2001). Early anterior-posterior patterning of the mid brain and cerebellum. *Annu. Rev. Neuroscience*: 869-896.

Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Grilli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron*.39(6):937-50. Erratum in: *Neuron*.40(1):189.

Mimeault M, Moore E, Moniaux N, Henichart JP, Depreux P, Lin MF, Batra SK. 2006. Cytotoxic effects induced by a combination of cyclopamine and gefitinib, the selective hedgehog and epidermal growth factor receptor signaling inhibitors, in prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 118(4):1022-31.

Moses D, Teper Y, Gantois I, Finkelstein DI, Horne MK, Drago J. Murine embryonic EGF-responsive ventral mesencephalic neurospheres display distinct regional specification and promote survival of dopaminergic neurons. (2006). *Exp Neurol*. Apr 18; (Publicación Electronica; adelanto de impresión)

Nomura T, Fujisawa H. Alteration of the retinotectal projection map by the graft of mesencephalic floor plate or sonic hedgehog. (2000). *Development* 127(9):1899-910.

Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.

O'Connor,S.M., Stenger, D., Shaffer, K., Jeffery, D., Barker, L., Ma, W. (2000) Primary neural precursor cell expansion, differentiation and cytosolic Ca<sup>2</sup> response in three-dimensional collagen gel. *Journal of Neuroscience Methods* 102, 187-195

O'Connor,S.M., Stenger, D., Shaffer, K., Jeffery, D., Barker, L., Ma, W. (2001) Survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in threedimensional agarose and collagen gel matrices. *Neuroscience Letters* 304 189-193

Oh S, Huang X, Chiang C. (2005). Specific requirements of sonic hedgehog signaling during oligodendrocyte development.*Development Dynamics*. 234(3):489-96.

Panchision D. Y McKay R. (2002). The control of neural stem cell by morphogenic signals. *Curr. Opin. Gen. and Dev*. 12, 478-487.

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(2):337-45.

Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez 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(2):335-44.

Park, H. L., Bai, C., Platt, K. A., Matisse, M. P., Beeghly, A., Hui, C. C., Nakashima, M. and Joyner, A. L. (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 127, 1593-605.

Persson M, Stamatakis D, te Welscher P, Andersson E, Bose J, Ruther U, Ericson J, Briscoe J. (2002). Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes Dev.* 16(22):2865-78.

Ruiz i Altaba A. (1998). Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development.* 125(12):2203-12.

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

Santa -Olalla J., Covarrubias L. (1999). Basic fibroblast growth factor promotes epidermal growth Factor Responsiveness and survival of mesencephalic neural precursor cells. *Journal of Neurobiology* 40(1):14-27.

Santa -Olalla J., Baizabal J.M, Fregoso M., Cárdenas M.C., Covarrubias L. (2003) The *in vivo* positional identity gene expression code is not preserved in neural stem cells grown in culture. *European J. of Neuroscience* 18:1073-1084.

Sasaki J., Nishizaki Y., Hui C., Nakafuku M., Kondoh H. (1999) Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain:implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126: 3915-3924.

Shafae Z, Schmidt H, Du W, Posner M, Weichselbaum R. 2006. Cyclopamine increases the cytotoxic effects of paclitaxel and radiation but not cisplatin and gemcitabine in Hedgehog expressing pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* Mar 22; (Publicación Electronica; adelanto de impresión).

Sheng, T., Chi, S., Zhang, X. and Xie, J. (2006). Regulation of Gli1 localization by the cAMP/protein kinase A signaling axis through a site near the nuclear localization signal. *J Biol Chem* 281, 9-12.

So PL, Yip PK, Bunting S, Wong LF, Mazarakis ND, Hall S, McMahon S, Maden M, Corcoran JP. (2006). Interactions between retinoic acid, nerve growth factor and sonic hedgehog signalling pathways in neurite outgrowth. *Dev Biol.* Jun 17; (Publicación Electronica; adelanto de impresión).



- Soula, C., Danesin, C., Kan, P., Grob, M., Poncet, C. and Cochard, P. (2001). Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: oligodendrocytes arise from Nkx2.2-expressing progenitors by a Shh-dependent mechanism. *Development* 128 1369-79.
- Tyurina, O. V., Guner, B., Popova, E., Feng, J., Schier, A. F., Kohtz, J. D. and Karlstrom, R. O. (2005). Zebrafish Gli3 functions as both an activator and a repressor in Hedgehog signaling. *Dev Biol* 277, 537-56.
- 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. *Journal of Neuroscience*; 23(8):3385-93.
- Wang, B., Fallon, J. F. and Beachy, P. A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100, 423-34.
- Wang Y, Dakubo GD, Thurig S, Mazerolle CJ, Wallace VA. (2005). Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development*.132(22):5103-13.
- Watanabe Y., Nakamura H. (2003) Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by Sonic hedgehog. *Development* 127:1131-1140.
- Wechsler-Reya, R. J. and Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 103-14.
- Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA.(1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *Journal of Neuroscience*.16(23):7599-609.
- W. Ma, W. Fitzgerald, Q.-Y. Liu, T.J. O'Shaughnessy, D. Maric, H.J. Lin, D.L. Alkon, and J.L. Barker (2004). CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels. *Experimental Neurology* 190, 276– 288
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J. L., Hynes, M. A. and Rosenthal, A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93, 755-66.
- Zhao Y, Wang Y, Wang Z, Liu H, Shen Y, Li W, Heller S, Li H. 2006. Sonic hedgehog promotes mouse inner ear progenitor cell proliferation and hair cell generation in vitro. *Neuroreport* 17(2):121-4.



## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo de tesis ha sido financiado por:

- Proyecto FONDECYT regular # 1040443