Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Rol del ácido retinoico durante la neurogénesis primaria de Xenopus Laevis

Franco, Paula Gabriela

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Franco, Paula Gabriela. (2002). Rol del ácido retinoico durante la neurogénesis primaria de Xenopus Laevis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3453_Franco.pdf

Cita tipo Chicago:
Franco, Paula Gabriela. "Rol del ácido retinoico durante la neurogénesis primaria de Xenopus Laevis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3453_Franco.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Rol del ácido retinoico durante la neurogénesis primaria de Xenopus laevis.

Lic. Paula Gabriela Franco

Director de tesis
Andrés Carrasco

Consejero de tesis
Dr. Norberto Iusem

Lugar de trabajo
Instituto de Biología Celular y Neurociencia-Facultad de Medicina-Universidad de Buenos Aires

3453

-2002-

"Rol del ácido retinoico durante la neurogénesis primaria de Xenopus laevis"

Palabras clave:
ácido retinoico, RA, neurogénesis, inducción neural, hibridización in situ, Xenopus laevis, desarrollo embrionario, placa neural, diferenciación celular, sonic hedgehog, receptor de ácido retinoico, RAR, dominante negativo, sobreexpresión, oligos morfolinos

"Retinoic acid role during Xenopus laevis primary neurogenesis"

Keywords:
retinoic acid, RA, neurogenesis, neural induction, in situ hibridization, Xenopus laevis, embryo development, neural plate, cellular differentiation, sonic hedgehog, retinoic acid receptor, RAR, dominant negative, overexpression, morpholino oligos

...Daré a conocer lo poco que he aprendido para que alguien mejor que yo pueda atisbar la verdad y, en su obra, pueda probar y criticar mi error. Así, me regocijaré, a pesar de todo, de haber sido un medio a través del cual salga a luz la verdad.

Alberto Durero

AGRADECIMIENTOS

A las instituciones que me brindaron los medios materiales necesarios para realizar este trabajo, la Universidad de Buenos Aires, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y el Instituto de Biología Celular y Neurociencia de la Facultad de Medicina.

A Andrés Carrasco, quien me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio durante todos estos años. Por ofrecerme las becas que me permitieron seguir adelante, por brindarme los medios para desarrollar esta tesis y especialmente por confiarme el proyecto RETINOICO.

A Bruce Blumberg y los integrantes de su laboratorio por los experimentos con antagonistas y agonistas de los receptores de retinoides, por los clones de los dominantes negativos y por los "morfolinos" que me enviaron.

A todos mis compañeros de laboratorio, porque cada uno de ellos me enseñó algo y me ayudó con su buen humor a transitar por las distintas etapas, Martín Riccomagno, Oscar Ocaña, María Victoria Rosato Siri, Ana Adamo, Leonel Muller, Silvio Krivokapich, Carlos Kusnier y especialmente a Martín Basch, porque nuestra amistad perdura desde nuestros primeros pasos en el laboratorio, a pesar de las distancias.

A mis amigos Ale, Javier y Carlos, por compartir los inicios en la facu y porque siguen estando.

A mis compañeras de laboratorio de siempre, Ale y Silvia. A ambas, por compartir conmigo éxitos y fracasos durante tantos años, por las charlas, los innumerables matings, las trasnoches en el lab cuando no teníamos incubadora, por años de banquito, por infinidad de in situs e infinidad de decepciones al analizar los resultados, por sufrir conmigo días de picada de carne para las ranas y días de fajina, y porque gracias a su amistad los problemas siempre fueron más fáciles de solucionar. A Silvia, porque de ella surgió la idea de estudiar la relación entre el RA y la neurogénesis y por ser a quien acudo cuando necesito aclarar mis dudas teóricas, y a Ale, por su excelente predisposición para ayudarme en todo, por enseñarme su practicidad para resolver "dificultades experimentales" y por escuchar, comprender y compartir mis catarsis.

A mis padres, Alicia y Aníbal, por ser mi guía. Porque dieron un lugar prioritario a mi educación. Por haberme ayudado en todas las formas en que una persona puede ser ayudada. Sin su incondicional apoyo y estímulo, nada hubiera sido posible.

A mis hermanos, Mari, Pablo, Lichi y Javi, por bancarme primero a mí, después a mi marido y finalmente a mi hija, y porque junto a Leo, Paulita, Oli, Fede, Georgi, Juli, Ana, Mario, Guido, Augus, Lore, Sergio, Leo (de Georgi), Leni, Florencia y Agustina son una familia hermosa, que siempre me acompaña con amor y comprensión en todos mis emprendimientos.

A Fer, por amarme y por dejarse amar, por apoyarme en todas mis decisiones, por darme lo más hermoso que tengo en la vida y por ser mi compañero de siempre en las buenas y en las malas desde hace tantos años.

Por último, a Julieta, por iluminar mi vida y abrirme la cabeza, y a esa otra personita a quien todavía no conozco...

ÍNDICE

TRABAJOS PUBLICADOS 10

ABREVIATURAS 11

RESUMEN 12

ABSTRACT 14

1. INTRODUCCIÓN 16

1.1. DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Xenopus laevis* 17
1.1.1. Establecimiento de los ejes embrionarios 17
1.1.2. Inducción de mesodermo- Modelo de los tres pasos 18
1.1.3. Gastrulación 18
1.1.4. Inducción neural 18
1.1.5. Naturaleza molecular de la inducción neural 18

1.2. NEUROGÉNESIS 18
1.2.1. Neurogénesis primaria en *Xenopus laevis* 18
1.2.2. Activación en cascada del programa de diferenciación neuronal 18

1.3. ÁCIDO RETINOICO 18
1.3.1. Requerimientos de retinoides durante la embriogénesis 18
1.3.2. Metabolismo de los retinoides 18
1.3.3. Distribución de los retinoides en el desarrollo embrionario 18
1.3.4. Proteínas que unen retinoides 18
1.3.5. Receptores de RA- Función 18
1.3.6. Rol del RA en el desarrollo embrionario 18
1.3.7. Antecedentes 18

1.4. OBJETIVOS DE ESTA TESIS 18

2. MATERIALES Y MÉTODOS 18

2.1. Reactivos 18

2.2. Mantenimiento de los animales 18

2.3. Preparación de bacterias competentes y transformación 18

2.4. Preparación de ADN plasmídico a gran escala 18

2.5. Síntesis in vitro de RNAm para inyectar 18

2.6. Obtención de embriones- Fertilización y desarrollo 18

2.7. Microinyección de embriones 18

2.8. Microinyección de morfolinos 18

2.9. Reacción para βgalactosidasa 18

2.10. Tratamientos farmacológicos de embriones 18
2.10.1. Tratamientos con RA 18
2.10.2. Tratamientos con Ro 41-5253 18
2.10.3. Tratamientos con agonistas y antagonistas 18
2.10.4. Inhibición de la proliferación celular 18

2.11. Síntesis de sondas de ARN antisentido marcadas con digoxigenina 18
2.11.1. Preparación de los Templados 18
2.11.2. Transcripción in vitro 18

2.12. Hibridización in situ 18
2.12.1. Rehidratación y permeabilización de embriones 18
2.12.2. Prehibridización e hibridización 18
2.12.3. Lavados 18
2.12.4. Revelado 18

2.13. Técnica de tinción por TUNEL en embriones enteros 18

2.14. Fotografía y procesamiento de imágenes 18

3. RESULTADOS 18

3.1. El tratamiento con RA induce la expresión de N-tubulina en la placa neural 18

3.2. Los cambios en la señal retinoide afectan toda la cascada de la neurogénesis primaria 18
3.2.1. X-MyT1 18
3.2.2. Neurogenina 18
3.2.3. X-Delta-1 18
3.2.4. Genes de prepattern Zic2 y Gli3 18
3.2.5. shh 18

3.3. El RA no es capaz de rescatar el efecto inhibitorio de Notch-ICD, Zic2 o shh sobre la neurogénesis primaria. 18

3.4. Participación de los receptores de retinoides en la regulación de la cascada de la neurogénesis primaria y su asociación con shh 18
3.4.1. La inducción de la neurogénesis primaria, así como la inhibición de la expresión de shh están mediados por los receptores RAR, en particular RARα 18
3.4.2. La anulación funcional de RARα1 aumenta la expresión de shh 18
3.4.3. El bloqueo de la síntesis de RARγ aumenta la expresión de shh 18

4. DISCUSIÓN 18

4.1. La señal retinoide determina el número de neuronas primarias que se formarán en el neuroectodermo 18

4.2. El aumento de neuronas primarias producido por RA no es debido a cambios en la proliferación o la muerte celular programada sino a su efecto sobre la diferenciación 18

4.3. Los retinoides endógenos activan la expresión de genes que promueven la neurogénesis primaria y reducen la expresión de los que la inhiben 18

4.4. Los retinoides endógenos regulan negativamente la expresión de shh 18

4.5. El tratamiento con RA inhibe la expresión de shh actuando en una ventana temporal acotada al comienzo de la gastrulación. 18

4.6. Los retinoides constituyen una señal temprana que regula los primeros pasos de la cascada de la neurogénesis primaria 18

4.7. Receptores de retinoides que participan en la regulación de la expresión de shh en el contexto de la neurogénesis primaria 18

4.7.1 La activación de RARα es suficiente para inhibir la expresión de shh y promover la neurogénesis 18

4.7.2. La competencia funcional con RARα1 desinhibe la expresión de shh 18

4.7.3. RARγ1 participa de la inhibición que los retinoides ejercen sobre shh 18

4.7.4. Rol de RA en la regulación de la neurogénesis primaria 18

5. CONCLUSIONES 18

6. BIBLIOGRAFÍA 18

TRABAJOS PUBLICADOS

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en:

"Functional association of retinoic acid and hedgehog signaling in Xenopus primary neurogenesis" *(1999). Paula G. Franco, Alejandra R. Paganelli, Silvia L. López y Andrés E. Carrasco. Development 126, 4257-4265*

Otras publicaciones relacionadas derivadas de este trabajo:

"The Alzheimer-related gene presenilin-1 facilitates sonic hedgehog signaling in Xenopus primary neurogenesis" *(2001). Alejandra R. Paganelli, Oscar H. Ocaña, María I. Prat, Paula G. Franco, Silvia L. López, Laura Morelli, Ana M. Adamo, Martín M. Riccomagno, Etsuro Matssubara, Mikio Shoji, José L. Affranchino, Eduardo M. Castaño y Andrés E. Carrasco. Mechanisms of Development 107, 119-131*

ABREVIATURAS

9cRA: ácido retinoico 9 cis
ADN: ácido desoxirribonucleico
An: animal
A-P: anteroposterior
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
ATRA: ácido retinoico all trans
A-V: animal- vegetal
bHLH: básico hélice- vuelta- hélice
BMP: proteína morfogenética del hueso
CRABP-I: Proteína celular de pegado a ácido retinoico I
CRBP-I: Proteína celular de pegado a retinoides I
D-I: derecho-izquierdo
D-V: dorso- ventral
est.: estadío
FGF: factor de crecimiento de los fibroblastos
HDAC: Complejo con actividad desacetilasa de histonas
hs: horas
HUA: hidroxiurea y afidicolina
min: minutos
Mo: morfolino
Notch ICD: versión constitutivamente activada de Notch
PPAR: receptor proliferador del peroxisoma activado
RA: ácido retinoico
RALDH: retinaldehído deshidrogenasa
RAR: receptor de ácido retinoico
RARE: elemento de respuesta al ácido retinoico
Ro: Ro 41-5253
RXR: receptor de retinoides
RXRE: elemento de respuesta a retinoides
shh: sonic hedgehog
SNC: Sistema nervioso central
temp. amb.: temperatura ambiente
TGF-β: factores de crecimiento transformantes tipo β
TR: receptor de hormona tiroidea
VAD: Síndrome de deficiencia de vitamina A
VDR: receptor de vitamina D
Veg: vegetal
vol: volumen
X-ngnr-1: neurogenina
ZPA: zona de actividad polarizante

RESUMEN

El primer paso para la construcción del sistema nervioso de los vertebrados es la formación de la placa neural. Varios reportes sugieren que la señal retinoide es esencial para el establecimiento normal del patrón neural y la diferenciación neuronal. Aunque se ha progresado mucho en este sentido, quedan aún muchas preguntas sin respuestas para tratar de elucidar el rol que los retinoides juegan durante el desarrollo embrionario.

En este trabajo, dentro del contexto de la cascada de la neurogénesis primaria de *Xenopus laevis*, exploramos la habilidad de los retinoides de regular diferentes pasos de la cascada que lleva a la diferenciación neuronal. Mostramos que el tratamiento con ácido retinoico (RA) produjo un sustancial aumento en el número de neuronas primarias que expresan N-tubulina debido a un incremento de la diferenciación neuronal sin involucrar cambios en la proliferación o muerte celular programada. Las evidencias indican que este efecto se origina en los pasos iniciales de la cascada neurogénica, ya que este tratamiento alteró el balance entre dos genes de prepattern de expresión temprana. Por un lado, se observó inducción de la expresión de Gli3, que promueve el destino neuronal y por otro, inhibición de Zic2, un represor de la neurogénesis. Además, se modificó la expresión de otros marcadores que participan en los pasos intermedios de la cascada como Neurogenina, MyT1 y X-Delta-1. Paralelamente, determinamos que los retinoides reprimen la expresión de sonic hedgehog (shh) en la línea media del embrión tanto en la placa del piso como en la notocorda y establecimos por primera vez un nexo entre shh, el RA y la neurogénesis primaria.

En experimentos de rescate fenotípico demostramos que el RA no es capaz de revertir el efecto inhibitorio de shh, Zic2 o una versión costitutivamente activa de Notch (NotchICD) sobre la neurogénesis primaria. Estos resultados, junto con el hecho de que un pulso corto de RA alrededor del comienzo de la gastrulación es suficiente para desencadenar la inhibición de la expresión de shh, sugieren que el RA participa muy tempranamente en la regulación de esta vía.

El tratamiento con agonistas y antagonistas selectivos de los receptores de ácido retinoico (RAR) nos permitió, por un lado, confirmar que la activación de los RAR es suficiente para inhibir la expresión de shh e inducir la neurogénesis y por otro,

determinar que RARα es necesario *in vivo* tanto para regular la expresión de shh, como para establecer el patrón normal de neuronas primarias.

Mediante una estrategia de dominancia negativa establecimos que el receptor RARα1 es requerido para la correcta regulación de shh, ya que cuando se interfiere con su función, la expresión de shh se desinhibe.

Finalmente, el bloqueo específico de la síntesis de RARγ1 por microinyección de un oligo morfolino antisentido produjo un aumento muy marcado de la expresión de shh, sugiriendo que esta isoforma también es necesaria para mediar la regulación negativa que los retinoides ejercen sobre la expresión de shh. Contrariamente, mostramos mediante esta misma estrategia, que el receptor RARα2.2 no es necesario para ejercer *in vivo* esta regulación.

Todos estos resultados en conjunto proveen nuevas evidencias que profundizan la comprensión del rol de los retinoides durante el desarrollo embrionario, en particular durante la neurogénesis primaria y aportan herramientas críticas para ayudar a descifrar los mecanismos moleculares que determinan la construcción en espacio y tiempo de la placa neural.

ABSTRACT

The first step in making the nervous system of a vertebrate is the segregation of the neural plate. Several reports suggest that retinoid signal is essential for normal neural patterning and neuronal differentiation. Although there was a lot of progress in this way, many questions remain without answers to elucidate the role that retinoids play during development.

In this work, inside the context of *Xenopus laevis* primary neurogenesis cascade, we explored retinoid´s ability to regulate different steps of the cascade that lead to neuronal differentiation. We show that retinoic acid (RA) treatment produced a substantial induction in the number of primary neurons that express N-tubulin due to a promotion of neuronal differentiation without involving changes in proliferation or programmed cell death. Evidences indicate that this effect originates in the initial steps of neurogenic cascade, as this treatment altered the balance between two prepattern genes with early expression. By one side, we observed an induction in Gli3 expression, a promotor of neuronal fate and by the other side, inhibition of Zic2, a repressor of neurogenesis. Furthermore, the expression of other markers that participate in the intermediate steps of the cascade, as neurogenin, MyT1 and Delta-1, was also modified. At the same time, we determined that retinoids repressed sonic hedgehog (shh) expression in the embryo midline, both in the floor plate as well as in the notochord and we established for the first time a link between shh, RA and primary neurogenesis.

In phenotypic rescue experiments, we show that RA is not capable to reverse the inhibitory effect caused on primary neurogenesis by shh, Zic2 or a constitutively active form of Notch (Notch ICD). These results, together with the fact that a short RA pulse near the beginning of gastrulation is sufficient to inhibit shh expression, suggest that RA participate very early in the regulation of these processes.

The treatment with selective agonists and antagonist of RA receptors (RAR) allowed us, first, to confirm that RAR activation is sufficient to inhibit shh expression and to induce neurogenesis, and second, to determine that RARα is required for proper shh regulation, as when we interfered with its function, shh inhibition was lost.

Finally, the specific blockade of RARγ1 synthesis, by microinjection of a morpholino antisense oligo, produced a great induction of shh expression suggesting that this isoform is also necessary to mediate the negative regulation that retinoids exert over shh expression. On the contrary, we showed by the same strategy, that RARα2.2 is not required for this regulation in vivo.

All these results together, provide new evidences to understand the role that retinoids play during development, particularly during primary neurogenesis and contribute with critical tools to decipher the molecular mechanisms that lead to neural plate construction in space and time.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Xenopus laevis*

1.1.1. Establecimiento de los ejes embrionarios

Xenopus laevis es un anfibio anuro originario de Sudáfrica, ampliamente utilizado como modelo para el estudio molecular de la embriogénesis temprana de vertebrados.

La polaridad primaria del huevo de *Xenopus* se establece durante la maduración del ovocito dentro del ovario. El ovocito es una célula asimétrica, con un hemisferio pigmentado animal (An) y un hemisferio vegetal (Veg) no pigmentado. El núcleo se encuentra desplazado hacia el polo animal y en el polo vegetal existe una importante acumulación de vitelo que servirá de reservorio alimenticio para el embrión en desarrollo. De un modo similar, se encuentran almacenados en el ovocito una gran cantidad de proteínas y ARNm maternos, así como factores morfogenéticos asimétricamente localizados que segregarán a distintas células posteriormente durante el clivaje.

Mientras que el eje animal- vegetal (A-V) se establece durante la ovogénesis, la polaridad dorso-ventral (D-V) y antero-posterior (A-P) se definen luego de la fertilización y antes de la primera mitosis. Inicialmente, el ovocito es radialmente simétrico con respecto al eje A-V y un único espermatozoide puede entrar en cualquier punto del hemisferio animal, iniciando una reorganización del citoplasma del huevo. El citoplasma cortical rota 30° con respecto al citoplasma más interno, produciendo la activación de determinantes dorsales maternos en el lado opuesto al punto de entrada del espermatozoide que desencadena una cascada de eventos que llevan a la dorsalización (Gurdon, 1992) (Fig. 1.1).

Aproximadamente 100 minutos después de la fertilización, comienza la etapa de clivaje que consiste en una serie de divisiones mitóticas meridionales y perpendiculares rápidas por las cuales el huevo se divide en muchas células pequeñas (blastómeras) que forman una blástula esférica, con una cavidad interior denominada blastocele (Fig. 1.2).

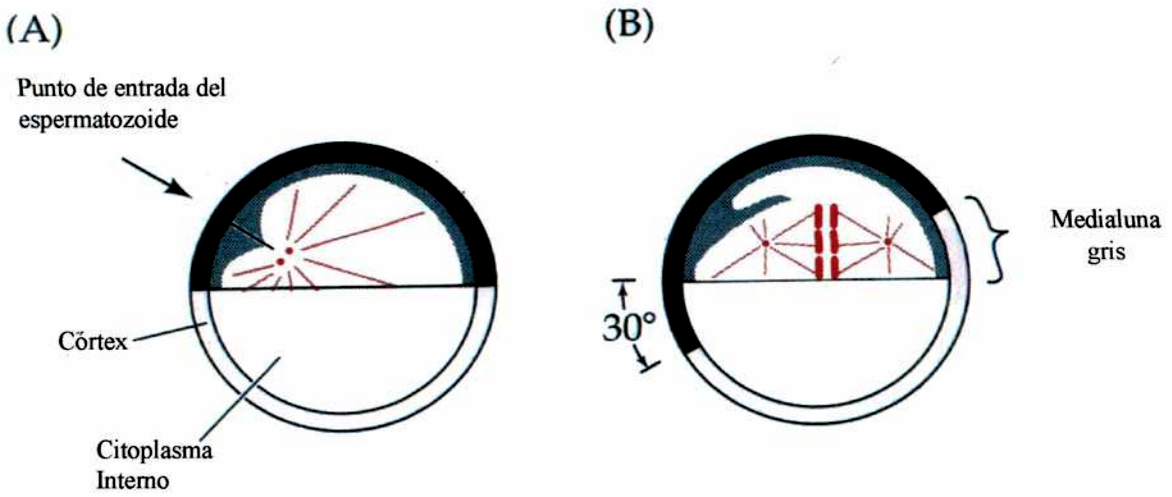


Figura 1.1. Rotación del citoplasma cortical en el huevo de *Xenopus laevis*

A: Corte de un huevo fecundado a lo largo del eje animal-vegetal (An-Veg), antes de la rotación cortical, en la mitad del primer ciclo mitótico. El huevo tiene simetría radial con respecto al eje An-Veg. El espermatozoide ha penetrado en un punto del hemisferio animal y su núcleo ha migrado al interior del huevo. La corteza se representa con un hemisferio animal muy pigmentado y un hemisferio vegetal muy transparente. B: Poco antes de que comience el clivaje, cuando se ha cumplido un 80% del primer ciclo mitótico, el citoplasma cortical rota 30° con respecto al citoplasma interno. Una región del huevo que antes estaba cubierta por el citoplasma cortical oscuro del hemisferio animal, queda ahora expuesta. El citoplasma subyacente, localizado cerca del ecuador, exactamente en el lado opuesto al punto de entrada del espermatozoide contiene gránulos de pigmento difusos por lo tanto se observa de color gris, la región se conoce como medialuna gris y marca el sitio donde se formará el labio dorsal del blastoporo, iniciando la gastrulación (extraído de Gilbert, 1994).

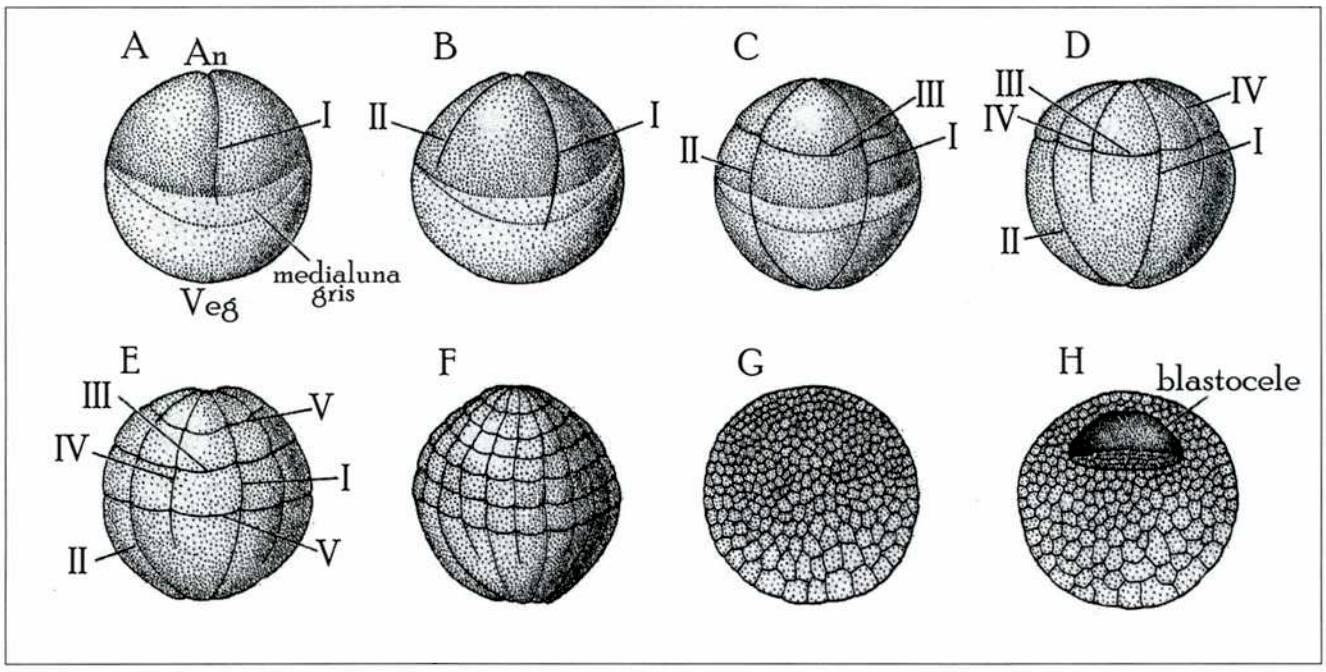


Figura 1.2. Clivaje del huevo de anfibio.
Los surcos de clivaje designados con números romanos, se numeraron siguiendo el orden de aparición. (A,B) El vitelo localizado en la región vegetal (Veg) impide el clivaje, de forma que la segunda división (II) comienza en la región animal del huevo (An) antes que la primera división (I) se complete en el citoplasma vegetal. (C) La tercera división (III) está desplazada hacia el polo animal. (D-H) Después de sucesivas divisiones, el hemisferio vegetal concluye con menor cantidad de blastómeras pero de mayor tamaño que la mitad animal. Extraído de Gilbert, 1994.

1.1.2. Inducción de mesodermo- Modelo de los tres pasos

Antes de llegar al estadío de blástula media, momento en que comienza la transcripción de genes cigóticos, ocurren una serie de interacciones inductivas que culminan en la especificación de los distintos tipos de mesodermo (Fig. 1.3). Una **primera señal** que emana de las blastómeras vegetales (endodermo prospectivo) instruye a las células del anillo ecuatorial de la blástula para que sigan un destino mesodérmico de características ventrales. Paralelamente, las células vegetales descendientes de la región de citoplasma dorsal subecuatorial activada por la rotación cortical, enriquecidas en factores dorsalizantes denominadas **"Centro de Nieuwkoop"** u **"Organizador de la blástula"**, emiten una **segunda señal** que induce la formación de mesodermo dorsal en la región ecuatorial adyacente (Nieuwkoop y Faber , 1956). Como consecuencia, alrededor de 10 horas después de la fertilización se inicia la **gastrulación**, que comienza con la formación del **labio dorsal del blastoporo**. Esta estructura con forma de ranura se genera por la invaginación de las células endodérmicas locales y constituye un centro de señales con propiedades organizadoras en el establecimiento del eje principal del embrión. Este concepto fue desarrollado por Hans Spemann e Hilde Mangold en 1924, quienes demostraron que cuando el labio dorsal es transplantado al ectodermo ventral de una gástrula aceptora, este tejido está destinado a formar parte del mesodermo anterior (cabeza) y dorsal (notocorda) y es capaz de reclutar otras células para inducir u "organizar" un eje secundario con un patrón A-P y D-V normales y un sistema nervioso bien desarrollado. Debido a estas propiedades se lo denomina **"Organizador"**, **"Organizador de Spemann"** u **"Organizador de la gástrula"** y su equivalente en aves y mamíferos es el nodo de Hensen.

El **organizador de Spemann** produce una **tercera señal** que actúa sobre las células mesodérmicas de características ventrales inicialmente inducidas, y genera distintos tipos de mesodermo intermedio (Kimelman y col., 1992, Moon y Christian, 1992). Finalmente, secreta factores capaces de inducir tejido neural.

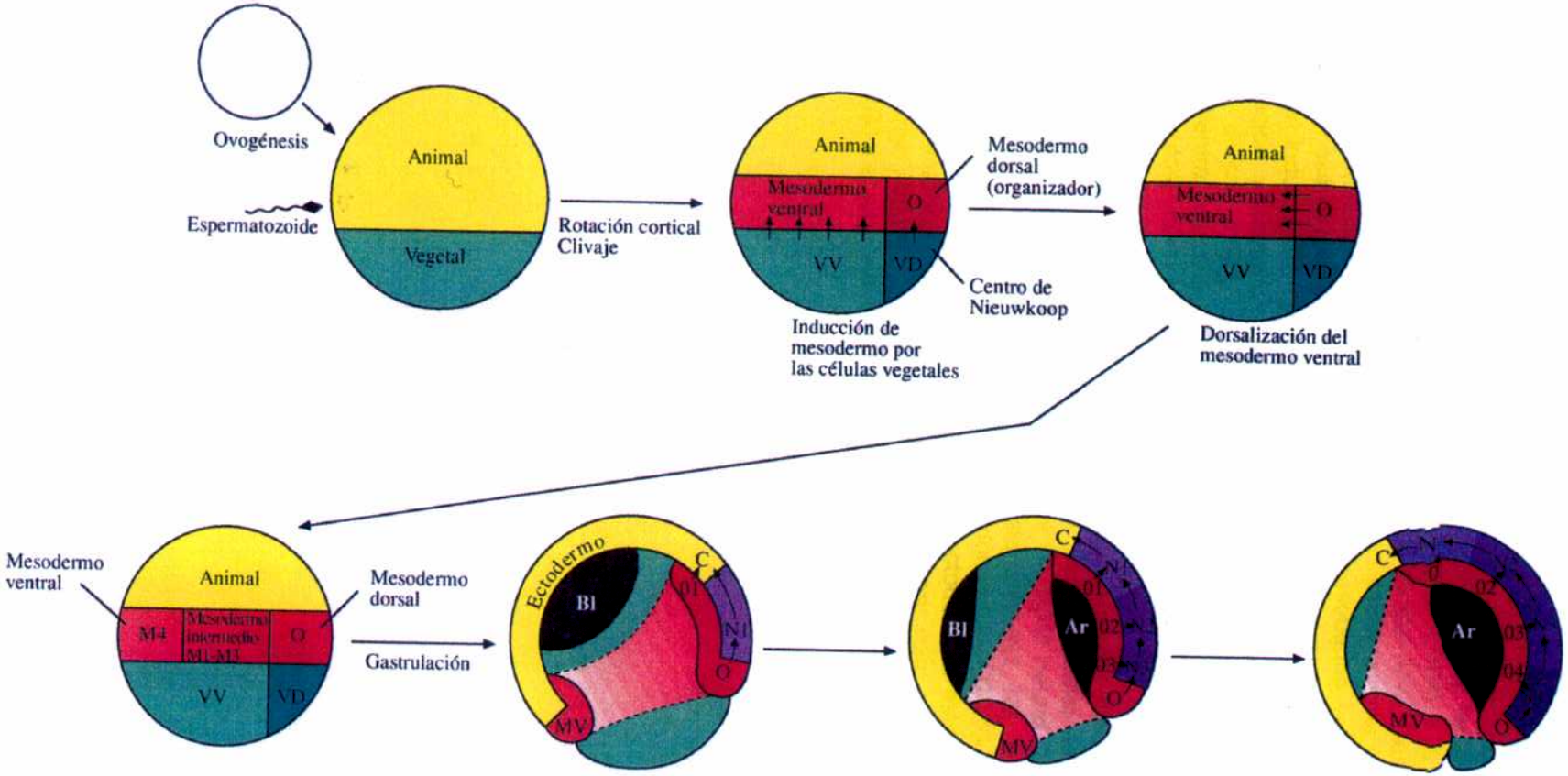


Figura 1.3. Interacciones inductivas durante el desarrollo temprano de *Xenopus laevis.*
El eje animal- vegetal se establece durante la ovogénesis. La fecundación desencadena reordenamientos del citoplasma que subdividen a la región vegetal en las áreas dorsal (VD) y ventral (VV). Durante el clivaje, las células vegetales inducen el mesodermo en la región ecuatorial. Mientras las células de la región VV inducen mesodermo de características ventrales, las células ubicadas en la región VD (denominadas Centro de Nieuwkoop) inducen el organizador de Spemann (O). Señales provenientes del organizador convierten al mesodermo ventral más cercano en mesodermo lateral o intermedio (M1-M3). Durante la gastrulación, las células del organizador formarán el mesodermo dorsal axial (O1-O4), el mesodermo lateral se mueve hacia los laterales (se muestra entre líneas de puntos) y el mesodermo ventral hacia la región ventral (MV). La invaginación del mesodermo dorsal inducela formación de tejido neural (N1-N4)a partir del ectodermo. El valor posicional anteroposterior del tejido neural inducido(N1, N2, N3, N4) se establece de acuerdo a la regionalización del mesodermo dorsal subyacente(O1, O2, O3, O4). C: Glándula de cemento, la estructura ectodérmica más anterior del renacuajo. Amarillo: ectodermo; verde: endodermo; rojo: mesodermo; violeta: neuroectodermo; Negro: cavidades del embrión. el blastocele (Bl) y el arquenterón (Ar). Modificado de Gilbert, 1994 por Silvia López.

EVENTOS TEMPRANOS QUE SE PRODUCEN DURANTE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE *Xenopus* (Fig. 1.3)

-La asimetría generada después de la **fertilización** por la **rotación cortical** produce la activación de determinantes dorsales en la región opuesta al punto de entrada del espermatozoide.

-La etapa de **clivaje** caracterizada por una sucesión de divisiones mitóticas rápidas culmina con la formación de la blástula.

-Las células vegetales secretan señales hacia las células marginales (del anillo ecuatorial) y les imparten características de mesodermo lateral y ventral.

-Las células vegetales dorsales (descendientes de la región de citoplasma dorsal activado por la rotación cortical) forman el **Centro de Nieuwkoop.**

-**El Centro de Nieuwkoop** induce a las células ecuatoriales dorsales a transformarse en **Organizador de Spemann** localizado en el labio dorsal del blastoporo.

-Se inician los movimientos morfogenéticos de la **gastrulación**. Paralelamente el Organizador imparte señales que establecen el eje anteroposterior del cuerpo y especifica distintos tipos de mesodermo.

-El ectodermo dorsal se convierte en tejido neural por señales derivadas del mesodermo dorsal.

-El tejido neural adquiere características regionales tanto en el eje A-P como en el D-V.

1.1.3. Gastrulación

La **gastrulación** es un proceso de reorganización celular que culmina en la formación de tres capas germinales. El **endodermo**, la capa más interna, que dará

origen al intestino, pulmones e hígado; el **mesodermo**, la capa intermedia, que originará el tejido conectivo, los músculos, el sistema vascular, los huesos y las gónadas; y el **ectodermo**, la capa más externa, que generará la mayoría de los tejidos del sistema nervioso central y periférico, huesos del cráneo y cartílagos branquiales.

Durante la gastrulación, las células de la **franja ecuatorial** o **zona marginal** involucionan por el labio dorsal del blastoporo hacia el interior del embrión y por otro, las células animales sufren epibolia y convergen hacia el blastoporo. Cuando las células marginales alcanzan el labio del blastoporo, se introducen y se desplazan a lo largo de la superficie interna de la capa externa de células originando la capa mesodérmica. A medida que más células van involucionando, el blastoporo se ensancha y se desarrollan los labios laterales y el labio ventral por los que pasan células precursoras mesodérmicas y endodérmicas adicionales.

Por lo tanto, los movimientos de gastrulación convierten a la blástula esférica y hueca de *Xenopus* en una gástrula de varias capas celulares que tiene una nueva cavidad, el arquenterón (Fig. 1.4).

1.1.4. Inducción neural

Tanto las células neurales como las gliales son derivadas de la capa de células ectodérmicas localizadas a lo largo de la línea media dorsal del embrión. Durante la **gastrulación**, el mesodermo dorsal se coloca por debajo de la capa ectodérmica permitiendo una de las interacciones más importantes de todo el desarrollo embrionario. En esta interacción, el mesodermo instruye al ectodermo a formar tejido neural, proceso que se conoce como **inducción neural**. El mecanismo de inducción se explica mediante un modelo de dos pasos denominado teoría de la activación- transformación, desarrollada por Nieuwkoop en 1956. En primer lugar, en la etapa de activación, el ectodermo se induce a formar neuroectodermo con características anteriores debido a señales verticales provenientes del mesodermo subyacente. Para que esta inducción ocurra, el ectodermo debe poseer la capacidad de responder a estas señales, lo que se define como "**competencia neural**". En *Xenopus*, el ectodermo pierde su habilidad de responder a los factores inductores

neurales alrededor del estadío de gástrula media (est 11) (Jacobson y Rutishauser, 1986). Posteriormente, durante la etapa de transformación, este tejido neural anterior produce un amplio espectro de estructuras anteroposteriores debido a dos tipos de señales provenientes del organizador. Por un lado, moléculas producidas por el labio dorsal del blastoporo que se transmiten horizontalmente a través del plano del ectodermo y por otro lado, señales emitidas por las estructuras derivadas del labio dorsal (notocorda y mesodermo precordal) que interactúan verticalmente con las células ectodérmicas ubicadas sobre ellas (Doniach, 1993) (Fig. 1.5). Esta transformación genera la regionalización del eje A-P del tubo neural que establece las subdivisiones que darán origen al cerebro anterior, medio y posterior así como a la médula espinal.

Como resultado de la inducción neural, se inicia la **neurulación**, un proceso por el que la capa plana de células ectodérmicas ubicadas por encima del mesodermo axial (notocorda) y del mesodermo paraxial se diferencia en tubo neural (Fig. 1.6). En este evento, las células más dorsales del ectodermo cambian su forma y se origina en primer lugar la **placa neural** rodeada por los pliegues neurales. Posteriormente, estos pliegues se van acercando hasta cerrar totalmente el **tubo neural**. Las células de la **cresta neural** ubicadas en la región que conecta el tubo neural con la epidermis finalmente migran hacia los laterales para generar neuronas perisféricas, glía, células pigmentadas de la piel y varios otros tipos celulares.

A medida que procede el desarrollo, a lo largo del eje D-V del tubo neural se diferencian varios tipos celulares. Por un lado, en la mitad ventral del tubo se generan las células de la **placa del piso** sobre la línea media ventral, las **neuronas motoras** en posiciones ventrolaterales y las **interneuronas ventrales** ubicadas un poco más dorsales. Por otro lado, en la mitad dorsal del tubo se originan las células de la **placa del techo** sobre la línea media dorsal y varias clases de **interneuronas sensoriales dorsales**. Las señales inductivas que controlan la identidad de estos tipos celulares, provienen de dos grupos celulares no neurales. La generación de tipos celulares ventrales está controlado por señales derivadas de la notocorda, un grupo de células mesodérmicas que yace bajo la línea media de la placa neural, mientras que los tipos celulares dorsales se generan en respuesta a señales derivadas del ectodermo epidérmico que bordea los márgenes laterales de la placa neural.

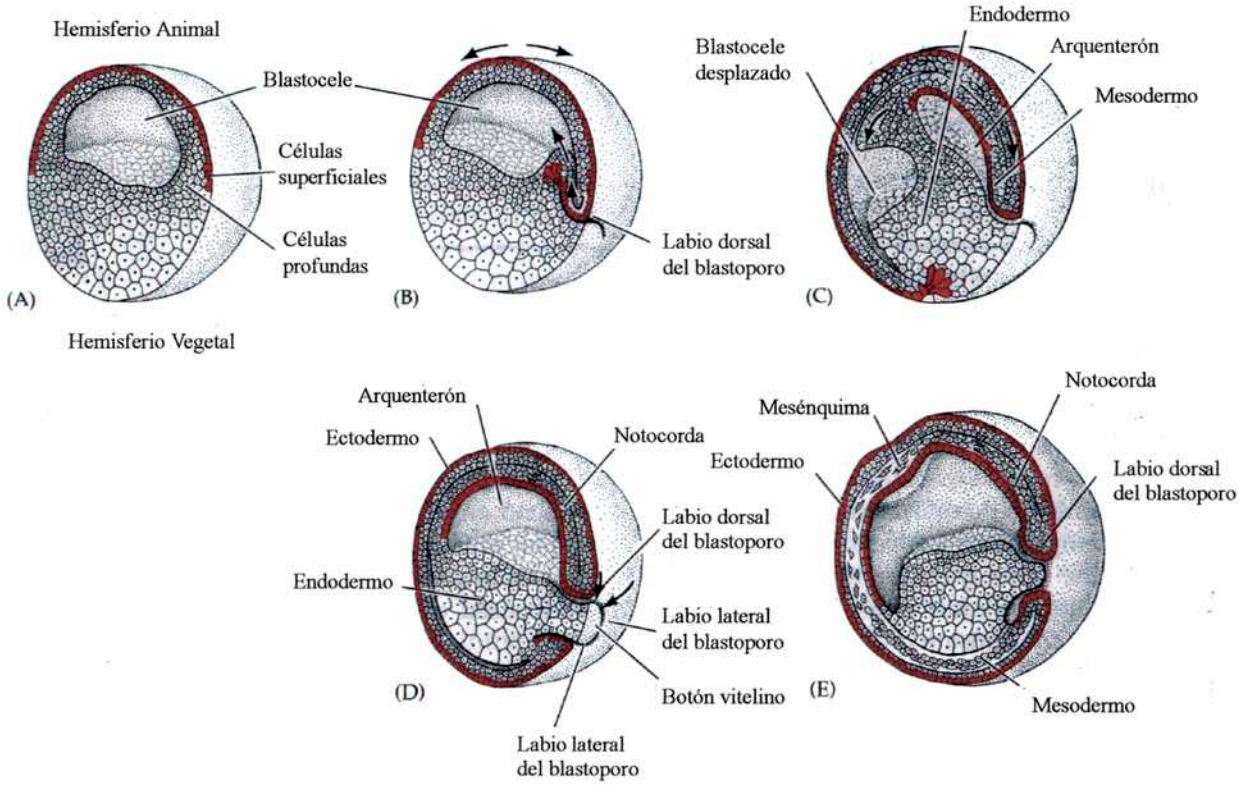


Figura 1.4. Movimientos celulares durante la gastrulación de *Xenopus laevis.*

Las secciones están cortadas a lo largo de la línea media del embrión. Las flechas indican los principales movimientos celulares. **A, B:** Gastrulación temprana. Las células en botella se mueven hacia adentro para iniciar la formación del labio dorsal del blastoporo y los precursores mesodérmicos ingresan por debajo del techo del blastocele. **C, D:** Gastrulación intermedia. El arquenterón se forma y desplaza al blastocele e ingresan células desde el labio ventral y los labios laterales del blastoporo. Las células del hemisferio animal migran hacia la región vegetal y mueven el blastoporo hacia el polo vegetal. D, E: Hacia el final de la gastrulación, el blastocele se oblitera, el embrión queda envuelto por ectodermo, el endodermo se ha internalizado y las células mesodérmicas se han localizado entre el ectodermo y el endodermo (extraído de Gilbert, 1994).

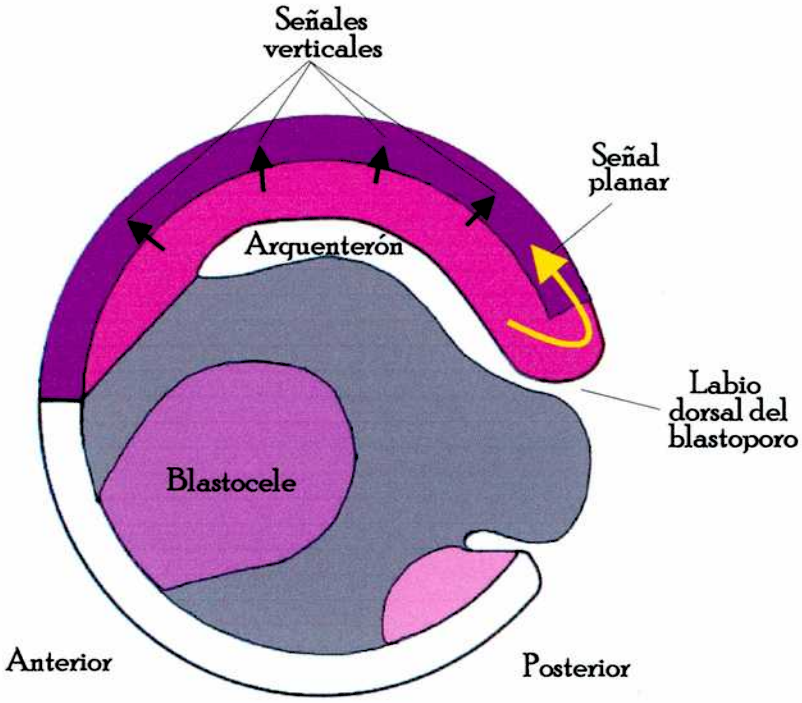


Figura 1.5. Dos vías de inducción del eje dorsal.
En el mecanismo planar, las moléculas señal se transfieren desde el tejido del labio dorsal del blastoporo a través del plano del ectodermo (flecha amarilla). En el mecanismo vertical, las moléculas solubles del cordamesodermo derivado del labio dorsal del blastoporo inducen a las células ubicadas sobre él a originar tejido neural (flechas negras). Extraído de Gilbert, 1994.

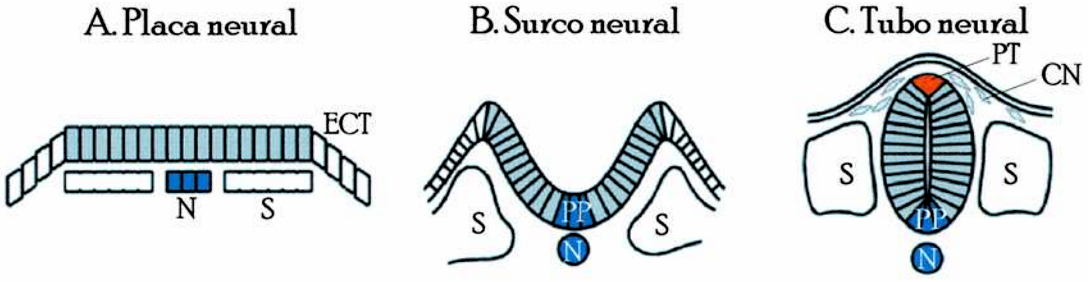


Figura 1.6. Diagrama representando la formación del tubo neural.
Estadíos del desarrollo embrionario de la médula espinal. (A) La placa neural se genera como un epitelio debajo del cual yace la notocorda (N) y el mesodermo paraxial que originará las somitas (S). Este tejido está rodeado de ectodermo epidérmico (ECT). (B) Durante la neurulación, la placa neural se pliega en la línea media originando el surco neural y en la línea media ventral se forman las células de la placa del piso (PP). (C) Se forma el tubo neural por fusión de los pliegues neurales, y en la línea media dorsal se forman las células de la placa del techo (PT). Las células de la cresta neural comienzan a migrar desde la región del tubo neural. Extraído de Tanabe y Jessell, 1996.

1.1.5. Naturaleza molecular de la inducción neural

La diferenciación celular en el sistema nervioso es la consecuencia de un complejo programa que dirige la expresión de genes específicos en células individuales. El destino celular se determina en parte por las señales a las que está expuesta la célula y en parte por el perfil de genes que expresa, entre ellos los receptores, moléculas transductoras y factores de transcripción.

Los experimentos clásicos de Spemann y Mangold en embriones de anfibios, establecieron que la formación del tejido neural depende de señales que provienen de las células mesodérmicas axiales prospectivas del organizador (células no-neurales) (Spemann y Mangold, 1924). Por décadas, la identidad de los factores inductores endógenos se mantuvo en incógnita. Sin embargo, varios estudios en embriones de *Xenopus* produjeron un avance dramático en el conocimiento de la inducción neural.

▶El cultivo de explantes de casquete animal aislados en estadío de blástula produce epidermis, demostrando que en ausencia de mesodermo, el destino del ectodermo es epidérmico (Cowan y col., 1997).

▶Si se evita la señalización intercelular por disociación de este casquete ectodérmico y se cultiva en ausencia de otros factores adicionales, al reasociar se forma tejido neural, mostrando que la potencialidad para diferenciación neural es el estado básico de las células ectodérmicas (Cowan y col., 1997).

▶Cuando se cultiva el casquete animal de células ectodérmicas expresando una versión truncada dominante negativa del **receptor de BMP**, éstas se diferencian a tejido neural, sugiriendo que el bloqueo de la señal BMP es suficiente para desencadenar la diferenciación neural (Xu y col., 1995). Por otro lado, la señal **BMP** promueve la diferenciación del ectodermo a epidermis (Sasai y col., 1995, Wilson y Hemmati-Brivanlou, 1995, Hawley y col., 1995).

▶Estos resultados llevaron a concluir que **BMP-4,** un miembro de la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes β (TGFβ), estaría actuando como un represor del destino neural y un promotor del destino epidérmico, inhibiendo a las células ectodérmicas de avanzar hacia la diferenciación neural.

▶El cuadro se completó con el descubrimiento de tres moléculas expresadas y secretadas por el Organizador –**folistatina, noggin** y **cordina**- con capacidad de inducir directamente sobre células ectodérmicas la diferenciación a tejido neural (Lamb y col., 1993, Hemmati-Brivanlou y col., 1994, Sasai y col., 1995). Posteriormente se determinó que estos inductores neurales directos actúan uniéndose a BMP-4 y antagonizando su función (Piccolo y col., 1996, Zimmerman y col., 1996, Fainsod y col., 1997).

Por lo tanto, la capacidad de una célula ectodérmica de adquirir un destino neural o uno epidérmico depende de la señal de BMP (Fig. 1.7). Los inductores neurales secretados por las células del Organizador bloquean a la proteína BMP y esta inhibición permite que las células ectodérmicas desarrollen el programa básico de **diferenciación neural**.

Esta inducción disparada por **noggin**, **cordina** o **folistatina** dirige a las células a un destino neural anterior con características de cerebro anterior y posteriormente a esta inducción neural inicial, una secuencia de eventos llevan a la regionalización del tubo neural y a la diferenciación de neuronas en un patrón preciso.

Dos sistemas de señalización independiente controlan el destino regional de las células neurales inducidas (Tanabe y Jessell, 1996). Un sistema controla el patrón a lo largo del eje A-P y tiene un rol crítico en el establecimiento de las diferentes estructuras que se originarán a partir del tubo neural (Shimamura y col., 1995). El carácter anterior del tejido neural inducido inicialmente es modificado por señales como el **ácido retinoico (RA)** y miembros de las familias **FGF** y **Wnt** que hacen que la parte posterior de la placa neural se convierta en tejido neural posterior.

Un segundo sistema de señalización modela la placa neural en el eje mediolateral, que dará origen al eje D-V del tubo neural (Fig. 1.8). Las señales inductoras que participan del establecimiento de este segundo eje son principalmente **sonic hedgehog (shh)**, una molécula de secreción derivada de la línea media ventral (Roelink y col., 1994) y señales dorsalizantes como **BMP** derivados del ectodermo epidérmico adyacente (Liem y col., 1995) que inducen patrones D-V específicos de expresión génica dentro del tubo neural (Goulding y col., 1993).

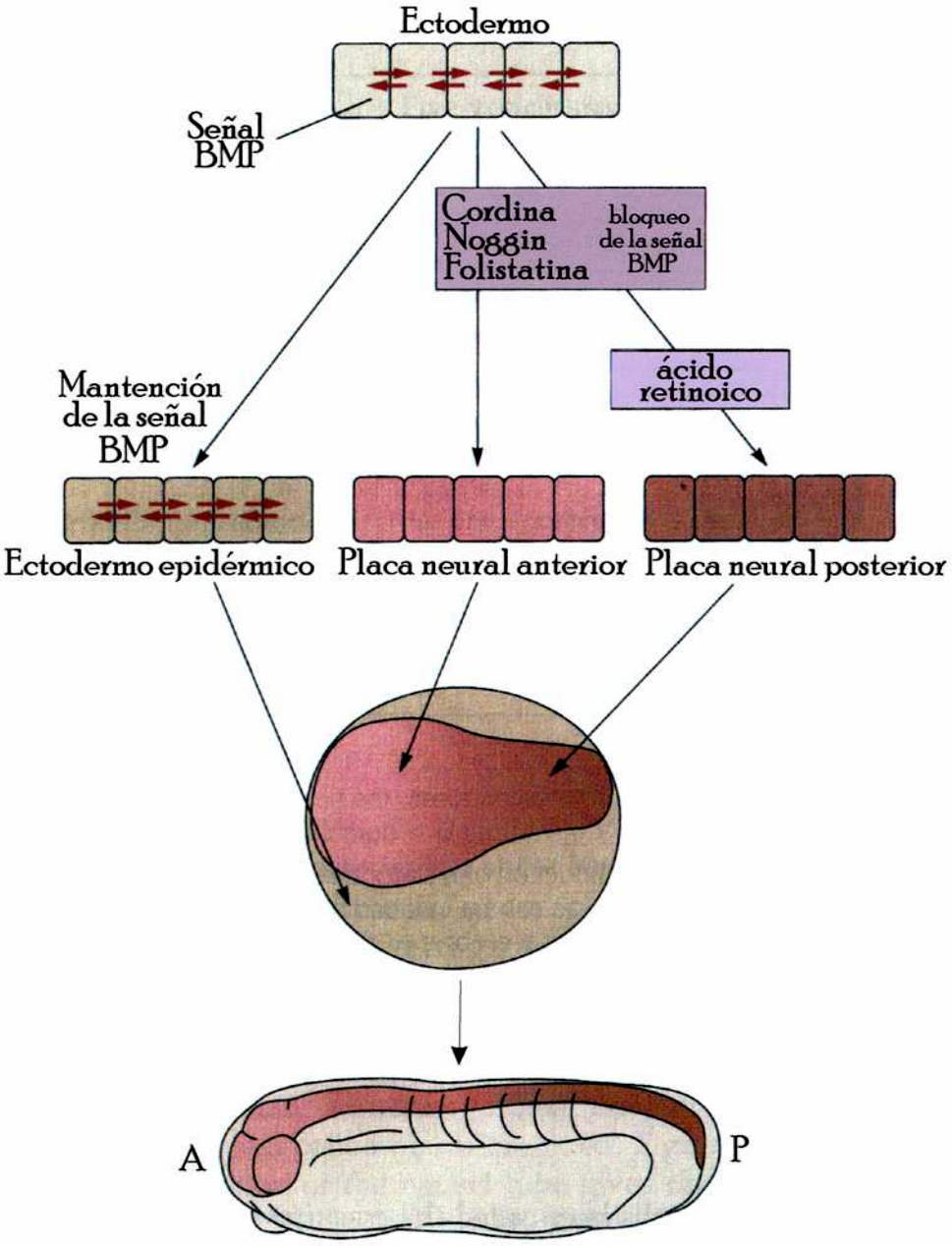


Figura 1.7. Mecanismos de inducción neural en embriones de *Xenopus*. Las células ectodérmicas de un embrión en estadío de gástrula expuestas a la señal BMP (flechas rojas) diferencian a células ectodérmicas epidérmicas. El bloqueo de la señal BMP por cordina, noggin y folistatina induce la formación de tejido con características de placa neural anterior. La exposición de este tejido a ácido retinoico lleva a la generación de placa neural posterior. Las dos figuras inferiores muestran la posición de la placa neural y el tubo neural en un embrión de Xenopus

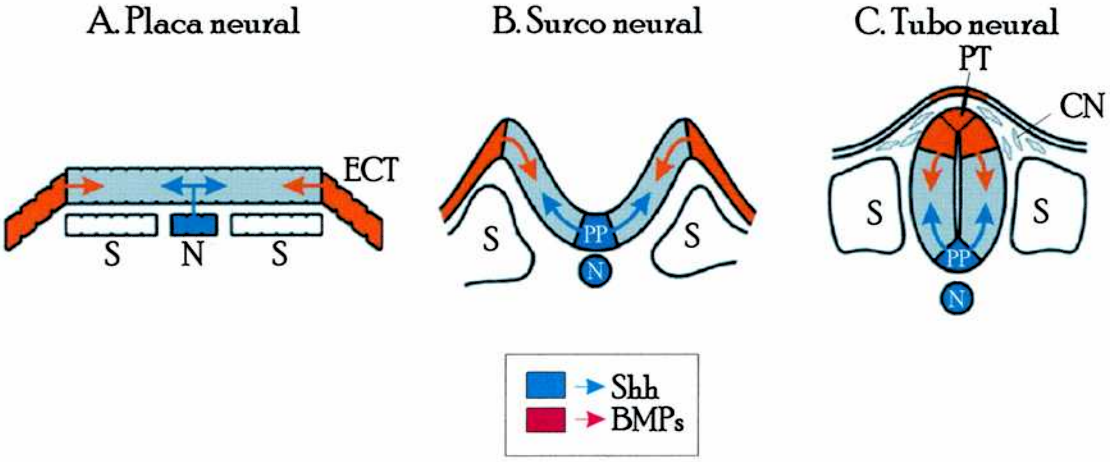


Figura 1.8. Señales inductivas que establecen el patrón dorso- ventral del tubo neural. Dos clases de proteínas proveen señales inductivas que controlan el patrón de diferenciación celular a lo largo del eje dorso- ventral del tubo neural. Sonic hedgehog (Shh) establece el patrón ventral del tubo neural y BMP-4, el dorsal. La fuente de estos factores se muestran en los estadíos secuenciales del desarrollo de la médula espinal (A-C). (A) Inicialmente, Shh se expresa en el mesodermo axial, y la señal de BMP-4 se origina en el ectodermo epidérmico que rodea los bordes laterales de la placa neural. (B) En el estadío de surco neural, Shh se expresa en las células de la placa del piso de la línea media (PP) y BMP-4 por las células del borde dorsal de los pliegues neurales. (C) Después del cierre del tubo neural, BMP-4 deja de expresarse en el ectodermo epidérmico pero se expresa en la placa del techo (PT) y en el tubo neural dorsal adyacente. En el inicio de la diferenciación neuronal, la expresión de BMP-4 persiste en el tubo neural dorsal y Shh se mantiene en la placa del piso. Extraído de Tanabe y Jessell, 1996.

1.2. NEUROGÉNESIS

La disección genética y molecular del mecanismo de la neurogénesis en *Drosophila* ha aportado mucha información sobre los procesos que operan en vertebrados.

En *Drosophila*, la selección de una única neurona a partir de una gran población de células ectodérmicas equivalentes requiere una serie de interacciones que progresivamente restringen el destino celular (Ghysen y col., 1993). El paso inicial en este proceso es la generación de una región **proneural**, un pequeño grupo de células que adquieren el potencial de producir precursores neurales. Este proceso involucra la inducción de la expresión de un grupo de factores de transcripción con dominio básico hélice vuelta hélice (bHLH), denominados **genes proneurales**, entre los que se encuentran los genes del complejo achaete scute. Sin embargo, dentro de cada región proneural, no todas las células generan neuronas y este proceso de selección involucra una señal inhibitoria lateral mediada por los **genes neurogénicos** (Campos-Ortega, 1995) que codifican para las proteínas *Delta* y *Notch*. La expresión de *Delta* está controlada por los genes proneurales y la proteína *Delta* es un ligando transmembrana que activa al receptor *Notch* en la célula vecina e inicia señales intracelulares que llevan a la represión de la expresión de genes proneurales y, como consecuencia, la inhibición de *Delta* (Kandell y col., 2000). Por lo tanto, las células ectodérmicas están sujetas a un ciclo local de retroalimentación que amplifica una diferencia inicial menor a nivel de la señal de *Notch*. Las células en las que la señal de *Notch* es relativamente débil, originarán neuronas, mientras que las células en las que la señal de *Notch* es relativamente fuerte adquirirá destinos alternativos. La señal de *Notch*, sin embargo, es un mecanismo general para imponer diferencias en grupos de células equivalentes más que un proceso destinado a la selección de identidad neuronal (Artavanis- Tsakonas y Simpson, 1991) (Fig. 1.9).

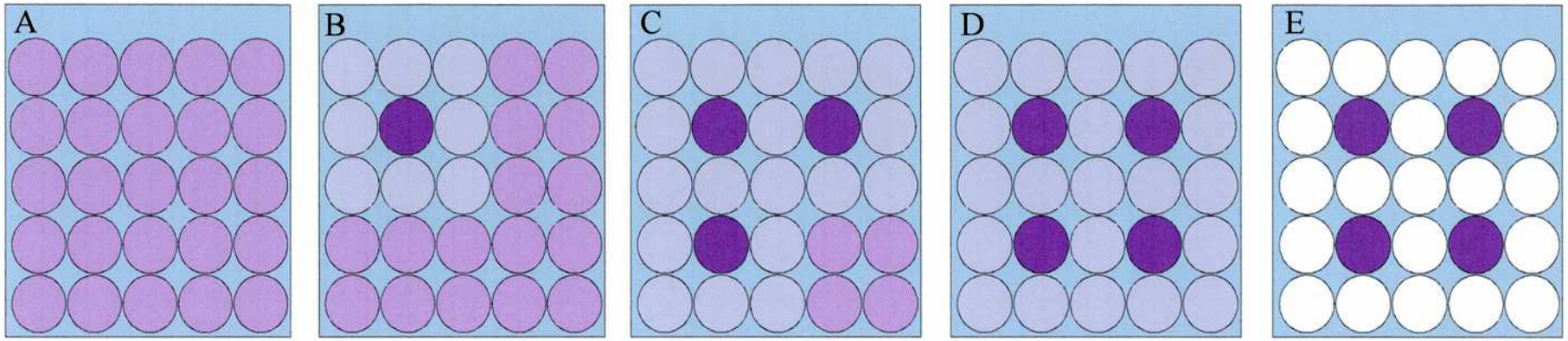


Figura 1.9. Modelo que explica el patrón espaciado de neuronas a partir de células ectodérmicas inicialmente equivalentes.
(A) Inicialmente un campo de células equivalentes emiten y reciben las mismas señales. (B) Un evento aleatorio hace que una de las células (más oscura) produzca una señal aumentada. Las células que la rodean reciben esta información y reducen su propio nivel de señal (células más claras). (C) Se genera una diferencia entre distintas regiones del neuroectodermo que hace que las células más alejadas tengan más chance de expresar una señal aumentada con respecto a sus vecinas. Aparecen por lo tanto nuevas células que emiten una señal incrementada (células oscuras). (D,E) Queda especificado el destino de las células a través de todo el campo, ya que la señal amplificada crea una población de células emisoras de señal rodeadas de células receptoras. En el caso de los genes neurogénicos, la señal emitida sería la proteína delta mientras que la molécula receptora sería Notch. Adaptado de Gilbert, 1994.

Los mecanismos que controlan la neurogénesis en vertebrados parecen haber evolucionado de un modo muy conservado respecto a *Drosophila*. Han sido identificadas varias proteínas con dominio bHLH expresadas en el tejido neural de los vertebrados que comparten características estructurales con las proteínas proneurales de *Drosophila* (Ma y col., 1996; Lee y col., 1995) y también se identificaron en vertebrados los genes neurogénicos que regulan el programa central de neurogénesis de un modo similar a sus homólogos de *Drosophila* (Coffman y col., 1990; Lindsell y col., 1995; Chitnis y col., 1995; Nye y Kopan, 1995).

1.2.1. Neurogénesis primaria en *Xenopus laevis*

La neurogénesis en los anfibios comprende dos ondas diferentes de diferenciación. La **neurogénesis primaria** que produce neuronas que median los reflejos de escape y el nado del renacuajo temprano, y la **neurogénesis secundaria** que genera posteriormente neuronas involucradas en comportamientos más complejos del renacuajo más avanzado.

En *Xenopus*, la neurogénesis produce un patrón de neuronas en tres dominios longitudinales a cada lado de la línea media dorsal de la placa neural posterior (Hartestein, 1989) que pueden ser identificados detectando N-tubulina, un marcador de diferenciación neuronal terminal (Chitnis y col., 1995). Estas bandas se denominan neuronas **laterales, intermedias** y **mediales** de acuerdo a la posición que ocupan en la placa neural y posteriormente, a medida que el tubo neural madura, estas bandas adquieren diferentes ubicaciones en el eje D-V dentro de la pared del tubo por lo que se las denomina neuronas **dorsales, intermedias** y **ventrales** respectivamente (Fig. 1.10). Las bandas más dorsales darán origen a las **neuronas sensitivas**, la franja intermedia generará las **interneuronas** y la franja más ventral, cercana a la placa del piso, se diferenciará en **motoneuronas**. Este sistema constituye un modelo útil para el estudio del desarrollo del sistema nervioso, debido al pequeño número de neuronas, su rearreglo sencillo y su rápida formación.

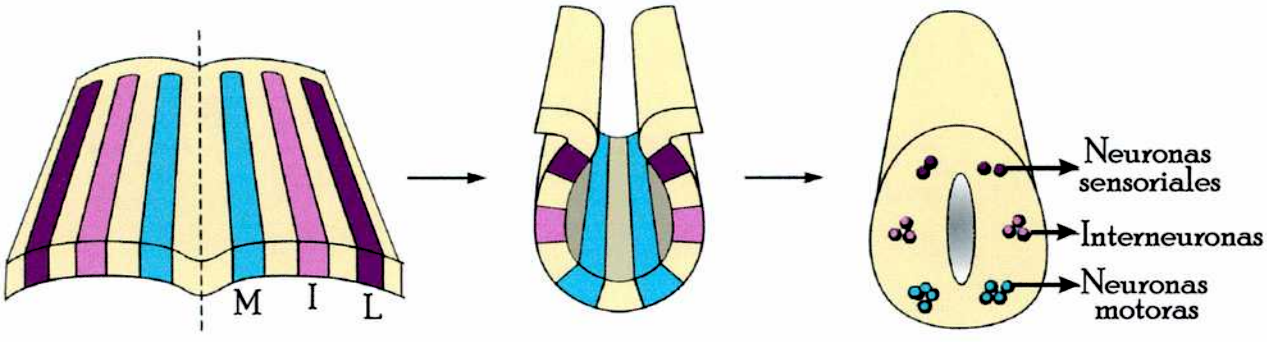


Figura 1.10. Diferenciación de las neuronas primarias y su ubicación en distintos estadíos del desarrollo. (A) En el estadío de placa neural, las neuronas se ubican en tres bandas paralelas a cada lado de la línea media dorsal (M: banda medial, I: banda intermedia, L: banda lateral). (B) En el estadío de surco neural, a medida que el tejido se pliega, las neuronas de la banda medial adquieren posiciones más ventrales, mientras que las de la banda lateral se ubican dorsalmente. (C) Dentro del tubo neural quedan localizadas las neuronas sensoriales en la región dorsal, las motoneuronas en la región ventral y las interneuronas en posiciones intermedias dentro del tubo. Extraído de Kandel y col., 2000.

1.2.2. Activación en cascada del programa de diferenciación neuronal

Luego de la inducción neural, se produce la especificación de regiones dentro del neuroectodermo y la selección de células individuales dentro de estas áreas para diferenciarse a neuronas. Esta especificación es posible debido a que una vez inducido, el neuroectodermo expresa reguladores positivos y negativos de la diferenciación que gobiernan el destino final de las neuronas primarias.

Existe muy poca información disponible sobre las vías moleculares que actúan como nexo entre inactivación de BMP y la diferenciación neuronal. Varios trabajos recientes estudian algunos genes que conectan estos dos aspectos del desarrollo neural. Este grupo de moléculas denominados "**genes de prepattern**" actúan como factores de transcripción y se activan en dominios de expresión amplios dentro de la placa neural. Algunos de ellos, como **Gli3** , **Zic1** , **Zic3** y miembros de la familia **Xiro**, promueven la diferenciación neuronal, mientras que otros, como **Zic2**, la reprimen (Gómez Skarmeta y col., 1998; Bellefroid y col., 1998; Brewster y col., 1998; Nakata y col., 1998). Ejecutando funciones opuestas, los genes de prepattern delinean los sitios donde la formación de neuronas será permitida y dónde no. La actividad combinada de los genes de prepattern controla un segundo grupo de genes expresados en un patrón más restringido, los genes **proneurales**, que son capaces de inducir la diferenciación neural. Los genes proneurales codifican para factores de transcripción con dominio bHLH. Aunque todos los genes de esta familia aislados hasta el momento pueden promover diferenciación neuronal, difieren en el momento y lugar de expresión. Los patrones de expresión de estas moléculas están definidos por un sucesivo ajuste en los límites de expresión que se correlaciona con el orden temporal de activación transcripcional. Los genes proneurales más tempranos, como **Xash3** y **neurogenina (X-ngnr-1)**, se denominan genes de **determinación neuronal** y presentan dominios de expresión más amplios que los genes que se expresan más tardíamente llamados de **diferenciación neuronal**, como **NeuroD** (Ma y col., 1996; Chitnis y col., 1996). Además, se ha demostrado que los genes de

determinación neuronal activan la expresión de los genes de diferenciación neuronal en una cascada unidireccional (Ma y col., 1996) apoyando la idea de que en el sistema nervioso central en desarrollo las células neurales atraviesan sucesivos estadíos de especificación, definidos por la activación secuencial de diferentes grupos de factores de transcripción.

Similarmente a lo que ocurre en *Drosophila*, en Xenopus, dentro de cada dominio proneural, los **genes neurogénicos, X-Delta-1** y **Xnotch-1**, controlan la densidad de neuronas primarias, generando un patrón espaciado. Este proceso, denominado **inhibición lateral**, limita el número de neuronas que se formarán y se inicia cuando unas pocas células que se seleccionan para diferenciarse a neuronas comienzan a expresar el ligando de membrana **X-Delta-1**, que actúa sobre el receptor de membrana **Xnotch-1** de las células vecinas e inhibe en ellas tanto la diferenciación neuronal como la expresión de X-Delta-1. Este efecto amplifica la mínima diferencia inicial de expresión e incrementa el contraste entre células adyacentes (Coffman y col., 1993; Chitnis, 1995; Ma y col., 1996, Chitnis y col., 1995).

Otra molécula involucrada en la selección primaria de células precursoras neuronales es **X-MyT1**, una proteína con dedos de zinc que interactúa con los factores de transcripción de la familia bHLH para promover la diferenciación neuronal. Ha sido demostrado que la expresión de **X-MyT1** está regulada positivamente por **Xngnr-1** y negativamente por la inhibición lateral y cuando **X-MyT1** se sobreexpresa promueve la diferenciación neuronal y coopera con los factores de transcripción bHLH para conferir insensibilidad a la inhibición lateral (Bellefroid y col., 1996).

Todas estas interacciones en forma de cascada de activaciones culminan en el patrón final de neuronas primarias que se caracterizan por expresar el marcador de diferenciación neuronal terminal **N-tubulina** (Fig. 1.11).

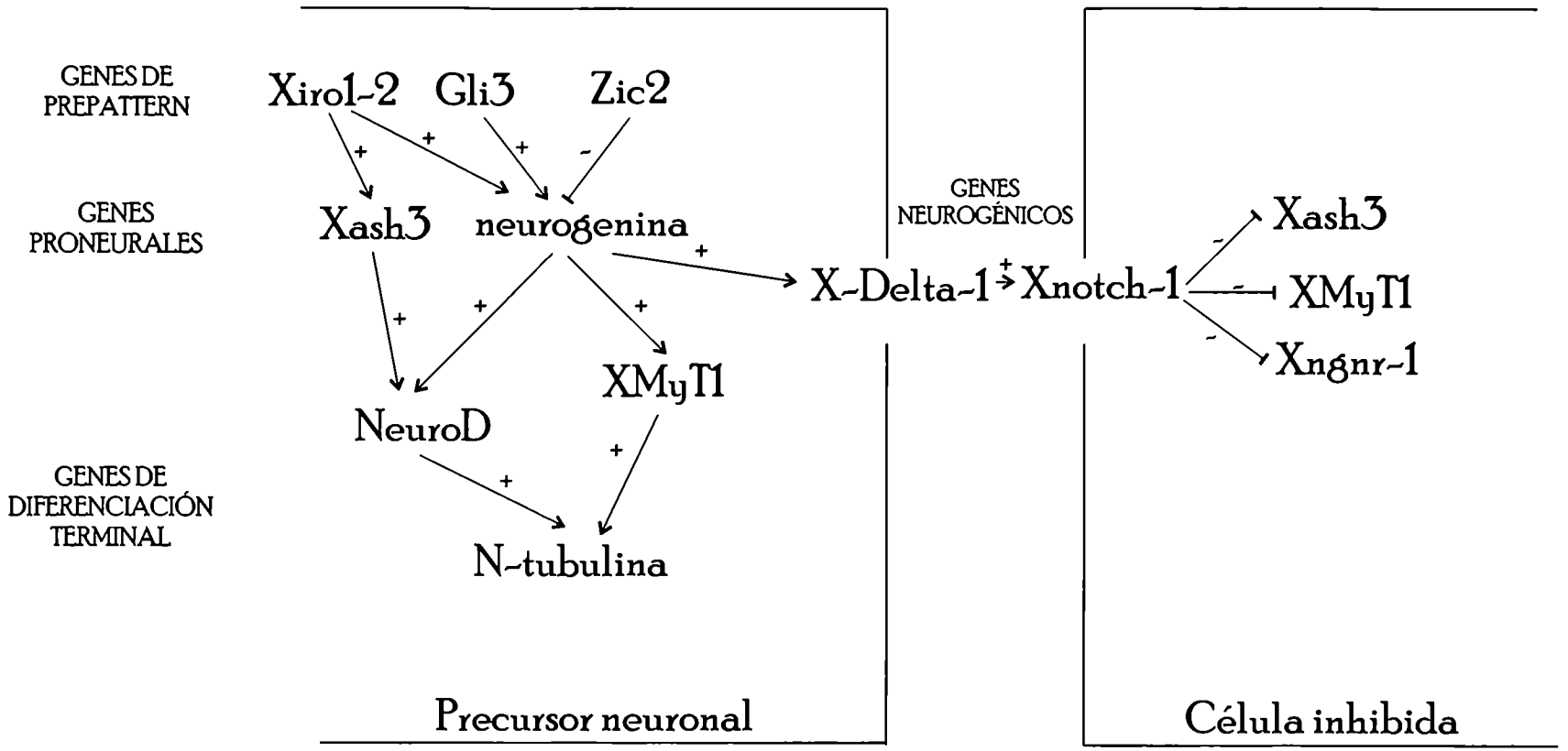


Figura 1.11. Cascada de la neurogénesis primaria.
Los genes de prepattern (Xiro 1 y 2, Gli3, Zic2) actúan activando (+) o reprimiendo(-) la expresión de los genes proneurales (Xash3, neurogenina). Éstos, a su vez, inducen la expresión de los genes de diferenciación neuronal terminal. La cascada genética culmina con la activación de N-tubulina, un marcador de neuronas. Paralelamente, la activación de X-Delta-1 en la célula destinada a ser neurona actúa sobre las células vecinas bloqueando en ellas la diferenciación neuronal mediante el mecanismo de inhibición lateral que produce dentro de la placa neural un patrón neuronal espaciado.

1.3. ÁCIDO RETINOICO

1.3.1. Requerimientos de retinoides durante la embriogénesis

La vitamina A y sus derivados, los retinoides (Fig. 1.12), son necesarios tanto para el desarrollo embrionario normal como para el mantenimiento y diferenciación del organismo adulto, participando en varios procesos asociados a la visión, la reproducción, la morfogénesis, la hematopoyesis y la función inmune (revisado por Blumberg, 1997; Ross y col., 2000).

A pesar de que la ausencia completa de vitamina A es letal, la deficiencia durante el desarrollo lleva a un espectro de defectos bien caracterizados, colectivamente denominados síndrome de deficiencia de vitamina A (VAD), que consiste en fallas en la segmentación y el crecimiento del embrión, defectos en el desarrollo del corazón, la cabeza, el sistema nervioso central (SNC), los ojos, los miembros, y alteraciones en los sistemas respiratorio, circulatorio y urogenital. Por otro lado, el exceso de vitamina A genera teratogénesis y malformaciones embrionarias en corazón, cráneo, esqueleto, miembros, cerebro, ojos, SNC, y estructuras craneofaciales. Esta similitud de respuestas a la deficiencia y al exceso de vitamina A, sugiere un rol fundamental de este nutriente durante el desarrollo embrionario, y al mismo tiempo muestra la importancia de la regulación de la homeostasis para mantener la fisiología normal del organismo intacto.

Ni las células del adulto ni las embrionarias son capaces de sintetizar retinoides de novo. Los organismos obtienen los precursores a partir de la dieta en forma de provitamina A carotenoides y retinil ésteres, que se convierten en retinol a nivel del intestino (Sakai y col., 2001).

1.3.2. Metabolismo de los retinoides

El ácido retinoico all trans (ATRA), es un retinoide capaz de sustituir la mayoría de los requerimientos de vitamina A. Mediante análisis bioquímicos se han detectado retinoides endógenos bioactivos en el embrión temprano de varios vertebrados, sin embargo su distribución espacial aún no ha sido bien establecida (Durston y col., 1989; Chen y col., 1994, Blumberg y col., 1996).

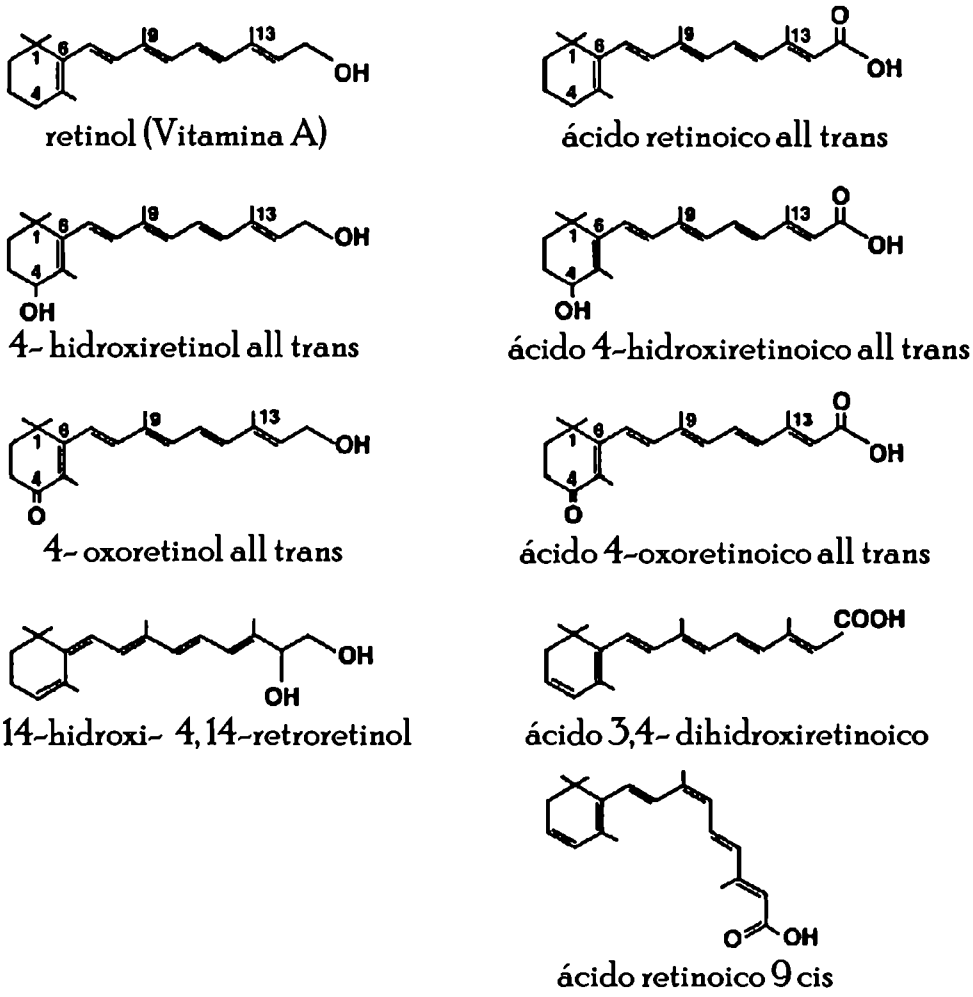


Figura 1.12. Estructura química de los retinoides naturales de mayor importancia fisiológica identificados hasta el momento.
El compuesto retinol y su producto de oxidación ácido retinoico se muestran en su configuración all trans en la hilera superior de la figura. Los derivados del retinol incluyen 4- hidroxiretinol, 4- oxoretinol y 14- hidroxi- 4,14- retroretinol. De los derivados del ácido retinoico se muestran los ácidos 4- hidroxiretinoico, 4- oxoretinoico, 3,4- dihidroretinoico y 9-cis retinoico. El ácido retinoico all trans es el ligando natural de los receptores RAR y el ácido retinoico 9 cis de los RXR, aunque este último compuesto se une a ambas familias de receptores.

El primer paso en la síntesis del RA (Fig. 1.13) es la oxidación reversible de retinol a retinaldehído, catalizada por una **retinol deshidrogenasa** ubicua (Molotkov y col., 2002) y posteriormente, una **retinaldehído deshidrogenasa** citosólica (RALDH) cataliza irreversiblemente la oxidación de retinaldehído a RA de un modo tejido específico (Niederreither y col., 1999; revisado por Duester, 2000). Aunque hasta el momento se han clonado 11 retinaldehído deshidrogenasas diferentes, RALDH-2 es la principal enzima involucrada en la síntesis de RA (Niederreither y col., 1999). En *Xenopus*, **RALDH-2** se expresa principalmente en el mesodermo posterior con un borde anterior bien definido en la gástrula correspondiente al nivel donde se formará la primer somita (Chen y col., 2001).

Por otro lado, recientemente se ha identificado la enzima embrionaria **CYP26** que específicamente produce la oxidación del RA y media su catabolismo. En *Xenopus*, Cyp26 se expresa en la placa neural anterior prospectiva y en el mesodermo precordal (Fujii y col., 1997; Hollemann y col. 1998; de Roos y col. 1999; Sakai y col., 2001). Por lo tanto, estas dos enzimas críticas regulan la disponibilidad de RA. Por un lado, RALDH-2 sería la fuente primaria de RA durante el desarrollo y por otro, CYP26 mediaría su degradación.

1.3.3. Distribución de los retinoides en el desarrollo embrionario

Embriones de varias especies han sido examinados por diversas técnicas para tratar de determinar la distribución espacial de los retinoides, y en particular del RA, durante la embriogénesis temprana. Sin embargo, no se dispone de un análisis espacial completo a lo largo de todo el desarrollo y muchos de los resultados generados han sido contradictorios (Costaridis y col., 1996; Azuma y col., 1990; Marsh-Armstrong y col., 1995; Wagner y col., 1992; Chen y col., 1992, Rossant y col., 1991; Colbert y col., 1993; Ang y col., 1996; Blumberg y col., 1996; Achkar y col., 1996; Maden y col. 1998 a). Por ejemplo, en Xenopus, análisis por HPLC revelaron la presencia de ATRA, 4-oxo-RA y 9-cis RA a partir de la fertilización (Creech-Kraft y col, 1994 a,b; Durston y col., 1989; Pijnappel y col., 1993). Los estudios de distribución espacial mostraron que en estadío 13, la concentración de ATRA es dos veces mayor en la región anterior del tronco que en la posterior y que

9 cis RA está ausente en el centro del tronco pero presente en ambos extremos (Creech-Kraft y col., 1994 a). Sin embargo, utilizando un sistema de células reporteras F9, se obtuvo el resultado opuesto con un nivel de actividad de ácido retinoico doce veces mayor en la región posterior con respecto a la anterior en estadío 12 (Chen y col., 1994). Por lo tanto, es claro que mediante estas metodologías, la distribución de los retinoides endógenos aún no ha sido resuelta.

Actualmente, debido a la recopilación de datos en base a experimentos de anulación o sobreexpresión de las enzimas que sintetizan o degradan RA, la distribución postulada originalmente en forma de gradiente con los máximos niveles de RA en la región posterior y mínimos en la región anterior (Fig. 1.14 A) fue reemplazada por nuevos modelos. Actualmente, prevalece la hipótesis de un borde de producción de RA en el límite entre la cabeza y el tronco que declina en forma de gradiente hacia la región posterior (Fig. 1.14 B) (Maden y col., 1998 a). Mientras RALDH-2 se distribuye en el mesénquima ubicado desde el límite cabeza-tronco hacia atrás, CYP26 se localiza en un dominio de la región anterior del embrión (de Roos y col., 1999; Hollemann y col., 1998). Entre estos dos dominios se establecería un gradiente de RA que determina el patrón molecular del cerebro posterior cuya característica es ser exquisitamente sensible a alteraciones en los niveles de RA (Fig. 1.14 C). Todos estos indicios sugieren que el rol del RA en la formación del eje A-P, debatido por una década, estaría regulada por sólo dos enzimas: CYP26 en la región de la cabeza y RALDH-2 en la región del tronco y en la interface entre estas dos fuerzas opuestas se establecería el cerebro posterior (Maden, 1999)

1.3.4. Proteínas que unen retinoides

Las proteínas que unen retinoides juegan un rol a nivel de la regulación del metabolismo de estas moléculas y se encuentran ampliamente distribuídas en el embrión de ratón en desarrollo (Ruberte y col., 1991; Denker y col., 1990; Vaessen y col., 1990). Generalmente, actúan como transportadores citoplasmáticos para los retinoides lipofílicos, a los que trasladan entre diferentes compartimentos subcelulares para hacerlos accecibles a distintas enzimas metabólicas.

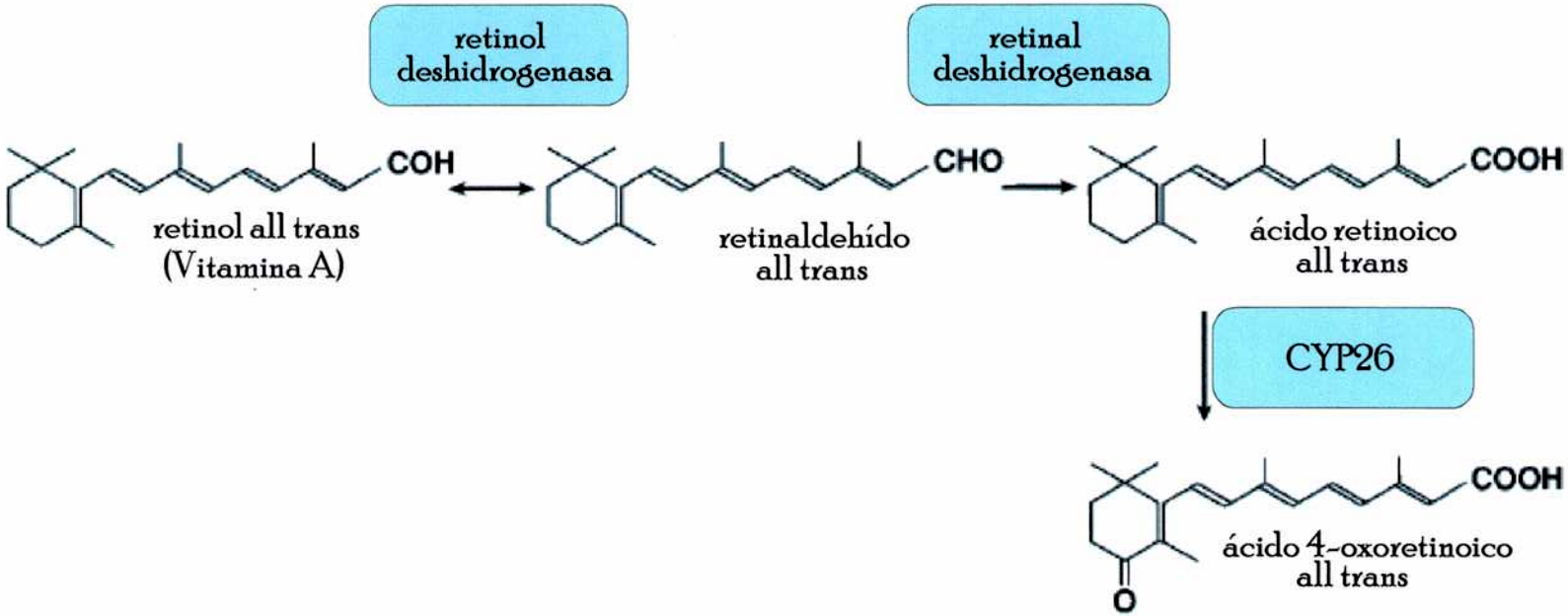


Figura 1.13. Metabolismo del ácido retinoico.
El primer paso que lleva a la síntesis de ácido retinoico es la oxidación reversible de retinol a retinaldehído. La mayor parte del retinaldehído del embrión se genera por una alcohol deshidrogenasa (retinol deshidrogenasa). Posteriormente, una retinaldehído deshidrogenasa (retinal deshidrogenasa) cataliza irreversiblemente la síntesis de ácido retinoico. Recientemente ha sido clonado un miembro de la familia del citocromo P-450 (CYP26) que cataliza irreversiblemente la oxidación del ácido retinoico y media su catabolismo.

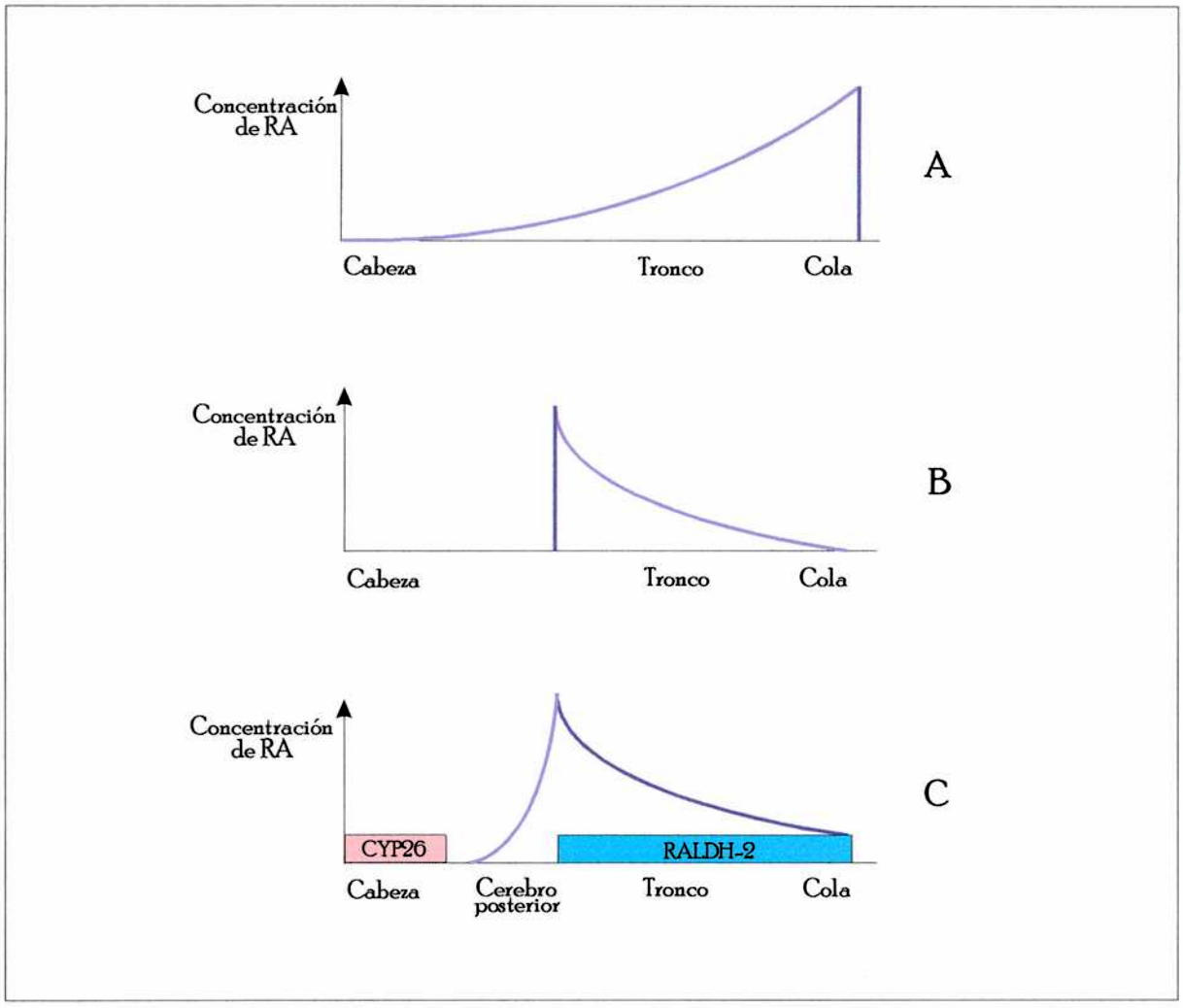


Figura 1.14. Diagramas representando los diferentes modelos de distribución de RA en el eje A-P del embrión.
(A) La representación clásica con el nivel máximo de RA en el extremo posterior y un gradiente decreciente hacia la región anterior (curva violeta), deducido a partir del efecto posteriorizante del RA sobre el embrión. (B) Distribución basada en mediciones de RA endógeno y en la distribución de la retinaldehído deshidrogenasa 2 (RALDH-2), la enzima que sintetiza RA. Ambos se localizan con un borde definido en la unión entre la cabeza y el tronco y el RA se detectó en forma decreciente hacia la región posterior. (C) Se agregaron al gráfico la distribución de las enzimas RALDH-2 (verde) y CYP26, que metaboliza RA (rosado). Esta localización genera un gradiente abrupto de RA a través del cerebro posterior, que explicaría la marcada sensibilidad de esta estructura a perturbaciones en los niveles de RA. El gradiente debería extenderse en la porción posterior del cerebro posterior para poder explicar los defectos causados por la deficiencia de vitamina A en el cerebro posterior y la expansión de la región anterior del cerebro posterior producido por la sobreexpresión de CYP26.

CRBP-I promueve la síntesis de RA mediante la presentación del retinol a la retinol deshidrogenasa. Después de la oxidación a retinaldehído, esta misma enzima hace que el retinaldehído sea accesible a la retinaldehído deshidrogenasa. Contrariamente, **CRABP-I** promueve el catabolismo del RA y presenta una distribución complementaria a la CRBP-I reflejando su acción contrastante. Sin embargo, estas proteínas no son absolutamente esenciales para el embrión, ya que la pérdida de función de la CRBP-I o la CRABP-I y –II tiene muy poco efecto en el desarrollo normal. Es también posible que existan otras proteínas alternativas de unión a los retinoides. En *Xenopus* también se ha descripto una proteína de unión al ácido retinoico (X-CRABP) de expresión materna y cigótica que presenta un pico máximo de expresión durante la gastrulación en la región dorsal del embrión y que posteriormente se expresa en el neuroectodermo y mesodermo (Dekker y col., 1994, Ho y col., 1994).

1.3.5. Receptores de RA- Función

Los efectos biológicos del RA están mediados primariamente a través de la acción de dos clases de factores de transcripción con dominios dedos de zinc de unión al ADN activables por ligando que pertenecen a la superfamilia de los receptores de hormonas nucleares (revisado en Chambon, 1996, Mangelsdorf y col., 1994). Los primeros en ser descubiertos fueron los **receptores de ácido retinoico (RARs)** que se unen al ácido retinoico all trans (ATRA) y son activados por éste. Los RARs comprenden una familia de tres genes que codifican para tres subtipos de receptores (α, β, γ). Cada subtipo presenta varias isoformas que son los productos del uso diferencial de promotores y splicing alternativo del ARNm. Posteriormente, se identificó una segunda clase de receptores de RA, los receptores **de retinoides (RXRs)**. Los RXRs pueden ser activados por ATRA pero no se unen a éste. La señal retinoide que se une a los RXRs se identificó posteriormente como **ácido retinoico 9 cis (9cRA)**. Al igual que la familia RAR, la familia RXR también contiene al menos tres subtipos (α, β, γ) que presentan varias isoformas cada uno. Mientras el ATRA es específico para los RARs, el 9cRA es un pan-agonista que se une tanto a los RARs como a los RXRs y los activa (Blumberg,

1997).

La señal retinoide se inicia *in vivo* a través de la formación de **heterodímeros RAR/RXR,** que son las unidades funcionales capaces de unirse a los elementos de respuesta al RA (RAREs) presentes en la región promotora de los genes blanco (Fig. 1.15). Como existen varias isoformas de los receptores RAR y RXR, pueden generar un amplio rango de diferentes combinaciones heterodiméricas que aportan una gran variabilidad al sistema.

Alternativamente, el RXR puede asociarse como heterodímero a varios otros receptores: el receptor de la hormona tiroidea (TR/RXR), el receptor de la vitamina D (VDR/RXR), el receptor proliferador del peroxisoma activado (PPAR/RXR), entre otros, siendo esta interacción siempre dependiente de la presencia del ligando de su compañero heterodimérico o también puede actuar como homodímero (RXR/RXR) sobre los elementos de respuesta correspondientes (RXREs). Esta complejidad en las interacciones se ve reflejada en el gran número de vías diferentes en las que participa RXR (al menos 11) (Blumberg y Evans, 1998; Ross y col., 2000).

Una característica de esta familia de receptores es su estructura modular con seis dominios que cumplen diferentes funciones (Ross y col., 2000; Egea y col., 2000). El dominio de unión al ADN, está muy altamente conservado entre los diferentes receptores. Poseen también un dominio de unión al ligando moderadamente conservado y secuencias responsables de la dimerización y de la activación transcripcional.

Los múltiples isotipos e isoformas de RAR y RXR, que se encuentran muy conservados en la evolución de los vertebrados, muestran patrones espacio-temporales de expresión diferentes entre sí, tanto en el embrión como en tejidos adultos, sugiriendo que cada subtipo de receptor individual tiene funciones específicas y probablemente múltiples.

En ratón, RARα y RXRβ se expresan de un modo más general, mientras que RARβ, RARγ, RXRα y RXRγ presentan una expresión más restringida. (Zelent y col., 1989, Dolle y col., 1990; Kastner y col., 1990; Ruberte y col., 1990; Ruberte y col., 1991).

En *Xenopus*, antes del inicio de la gastrulación se detectaron transcriptos de RARγ, RARα1, RXRγ y RXRα (Blumberg y col. 1992). Durante la gastrulación,

RARγ continúa expresándose (Ellinger-Zeigelbauer y Dreyer, 1991), pero RARα1 es reemplazado por RARα2 (Sharpe, 1992). Con respecto a los RXRs, a partir del inicio de la gastrulación no se detectan transcriptos de RXRα ni de RXRγ (Blumberg y col. 1992), pero RXRβ se encuentra presente durante todo el desarrollo temprano (Marklew y col., 1994) constituyendo el subtipo RXR predominante durante los estadíos de gástrula y néurula (Sharpe y Goldstone, 1997).

Mediante experimentos en ratón con genes reporteros bajo el control de una secuencia RARE que responde a RA, se determinó que la señalización por RAR está ausente en el tejido neural anterior durante la gastrulación a pesar de estar presentes varios receptores en esa región (Rossant, 1991), demostrando que la presencia del receptor no siempre se correlaciona con la activación de la vía.

Se ha realizado mucho esfuerzo en los últimos años para tratar de identificar las funciones específicas de los diferentes receptores retinoides durante la embriogénesis. Una de las estrategias utilizadas ha sido la evaluación de los fenotipos obtenidos por la anulación en ratón de los distintos genes RAR o RXR. Sin embargo, aunque las diferentes isoformas de los receptores tienen distribuciones únicas durante el desarrollo, la anulación de una isoforma o un subtipo específico sólo produjo efectos mínimos detectables, revelando una redundancia sorprendente entre los miembros de cada subtipo de receptor (revisado en Kastner y col., 1995; Ross y col., 2000).

Se conocen una gran número de genes que contienen elementos RARE en sus promotores y cuya expresión puede ser regulada por RA, entre ellos, moléculas asociadas a los retinoides como RARβ2, RARγ2, CRBPI, CRBPII, ADH3, CRABP2, algunos genes Hox como Hoxa-1, Hox b-1, Hoxd-4, Hoxb-6, Hoxb-8, Hoxd-11 y Hoxd-13 (Izpisua-Belmonte y col., 1991; Nohno y col., 1991) y otros targets adicionales como FGF-4 (Niswander y col., 1994), bmp-2 (Francis y col., 1994) y shh (Riddle y col., 1993) que se inducen tempranamente en respuesta at tratamiento con RA ectópico en el modelo de miembro.

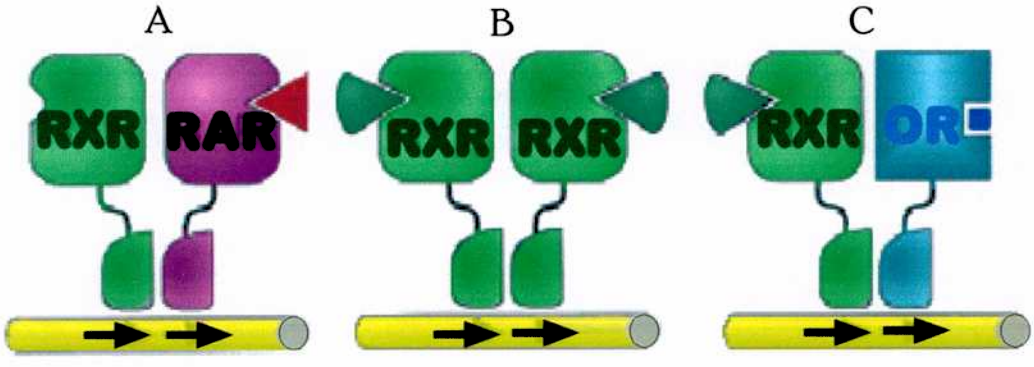


Figura 1.15. Múltiples vías de señalización mediadas por los receptores retinoides.
(A) Los receptores RAR y RXR se heterodimerizan y se unen a repeticiones directas en el ADN blanco (RAREs). En estos heterodímeros, RXR puede unirse a su ligando, dependiendo de el estado de RAR y del elemento de respuesta del ADN en particular al cual estén unidos. (B) Cuando los RXR interactúan con su ligando ácido retinoico 9 cis, se homodimerizan y se unen a repeticiones directas (RXREs) para activar la transcripción del ADN blanco. (C) El receptor RXR es un compañero heterodimérico obligado para muchos otros receptores dsependientes de ligandos (OR).

1.3.6. Rol del RA en el desarrollo embrionario

Son numerosos los modelos experimentales en los que se determinó la participación del RA en algún aspecto del desarrollo embrionario. Uno de los primeros hallazgos, mostró que la administración de RA exógeno durante el desarrollo temprano produce la **posteriorización** del embrión (Fig. 1.16). Este efecto, evidenciado por la supresión de estructuras anteriores y un incremento de las posteriores de un modo concentración dependiente se ejerce a través de la influencia del RA sobre el mesodermo y el ectodermo (Durston y col., 1989; Sive y col., 1990, Papalopulu y col., 1991, Ruiz i Altaba y Jessell, 1991; Sive y Cheng, 1991).

Esta caracterización del RA como agente posteriorizante fue sustentada luego con un descubrimiento que aportó las primeras bases moleculares de su acción. El RA regula la expresión de los genes Hox, un grupo de factores de transcripción que establecen patrones de información posicional y determinan la organización del tejido tanto durante la segmentación del cerebro posterior como en el desarrollo del miembro.

El tratamiento de embriones con RA produce un corrimiento del borde anterior de expresión de los genes Hox expresados en el cerebro posterior a una posición más cefálica en el tubo neural (Marshall y col., 1992; López y Carrasco, 1992, revisado en Carrasco y López, 1994) y la supresión de marcadores neurales anteriores como Otx2 (Ang y col., 1994; Gammill y Sive, 1997) mostrando la participación del RA en el **establecimiento del eje A-P del sistema nervioso** (Niederreither y col., 2000).

El RA también ha sido relacionado con el **establecimiento del eje A-P del miembro** (Stratford y col., 1999; Power y col., 1999). En este modelo, la administración ectópica de RA es capaz de producir duplicación de dígitos (Tickle y col., 1982). Su distribución endógena en el miembro es asimétrica, con una mayor concentración en el borde posterior (Thaller y Eichele, 1987; Scott y col., 1994; Maden y col., 1998 b) y su función en este sistema se relaciona con la regulación de la expresión de FGF-4, shh y algunos genes Hox y con la formación de la zona de actividad polarizante (ZPA), un centro ubicado en la región posterior

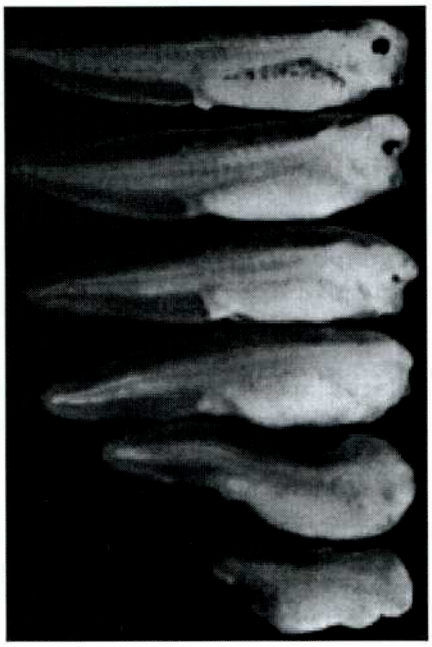
del miembro capaz de impartir información posicional al tejido circundante (Helms y col., 1996). Además, se demostró recientemente que el RA está involucrado en la **formación del eje D-V del miembro**. (Stratford y col., 1999).

También se ha establecido que el RA se requiere para el correcto **establecimiento del eje corporal derecho- izquierdo (D-I)** en ratón, zebrafish, *Xenopus* y pollo (Dersch y Zile, 1993, Tsukui y col., 1999).

Varias otras líneas de investigación relacionan al RA con la **morfogénesis de estructuras craneofaciales** (Lee y col., 2001), la **formación del endodermo** del tercer y cuarto arco branquial (Wendling y col., 2000), del oído interno (Choo y col., 1998) y medio (Mallo, 1997) y el desarrollo del paladar. Además, existen evidencias de la participación del RA durante la **cardiogénesis** (Dersch y Zile, 1993; Smith y Dickman, 1997, Niederreither y col., 2001), en la **formación del pulmón** (Packer y col., 2000), del **páncreas** (Moriya y col., 2000) y del **pronefros** (Sato y col., 2000) y se determinó que el RA es indispensable para la **morfogénesis del ojo** (revisado por McAvoy, 1980; Wagner y col., 2000).

También, se ha descripto la acción del RA sobre la **diferenciación celular** en numerosos sistemas. En piel y otros tejidos epiteliales se lo relacionó con la **diferenciación terminal de los queratinocitos** (Islam y col., 2000, Goyette y col., 2000). Por otro lado, el tratamiento con RA induce la diferenciación de células de teratocarcinoma P19 a neuronas y glia estimulando la expresión de marcadores de diferenciación neural, y origina en células de neuroblastoma en cultivo la aparición de estructuras similares a dendritas (revisado por Maden y Holder, 1992). Trabajos más recientes demostraron que el RA puede promover la diferenciación de stem cells neurales (Scheffler y col., 1999), indicando junto a otras evidencias que el RA está específicamente involucrado en el proceso de **diferenciación neuronal** (Blumberg y col., 1997; Maden y col., 1998 b, Scheffler y col., 1999, Sockanathan y Jessell, 1998).

Además de actuar como un regulador de la diferenciación en varias líneas celulares diferentes, también se describieron efectos del RA sobre el control de la **proliferación** y la **apoptosis** en varios sistemas tanto en células (Chiba y col., 1997) como en embriones (Maden y col., 1997).



Concentración de RA

Sin tratar

10^{-9} M

10^{-8} M

10^{-7} M

10^{-6} M

10^{-5} M

Figura 1.16. El tratamiento con ácido retinoico (RA) produce posteriorización del embrión.
Después de una exposición durante la gastrulación y neurulación con diferentes concentraciones de ácido retinoico (RA), los embriones se dejaron desarrollar hasta que los controles alcanzaron el estadío de larva. Se observa el efecto dosis dependiente producido sobre la región cefálica. Extraído de Gilbert, 1994.

1.3.7. Antecedentes

Contrariamente a lo que ocurre en la placa neural posterior, la expresión de N-tubulina en niveles anteriores al límite cerebro medio- cerebro posterior, no aparece hasta el cierre del tubo neural en estadío de larva. Por lo tanto el orden temporal de la neurogénesis difiere en las regiones anteriores y posteriores de la placa neural *in vivo* y puede ser considerada un rasgo temprano del patrón A-P del tubo neural (Chitnis y col., 1995). Explantes ectodérmicos neuralizados con noggin de características anteriores, no expresan N-tubulina antes de estadío 27, sin embargo después del tratamiento con RA, se induce la expresión de N-tubulina y se modifica su carácter posicional de anterior a posterior. De manera similar, el tratamiento de embriones enteros con RA induce expresión anterior prematura de N-tubulina en estadío de néurula (Papalopulu y Kintner, 1996), sugiriendo que el RA participaría de los mecanismos de **regulación temporal y espacial que controlan la neurogénesis.**

Posteriormente, otros trabajos han sustentado estos resultados, mostrando que la señal mediada a través de los los receptores de retinoides es requerida para la formación de las neuronas primarias (Blumberg, 1997; Sharpe y Goldstone, 1997, 2000) y para el correcto patrón A-P del SNC (Blumberg y col. ,1997; Kolm y col. , 1997; van der Wees y col., 1998). La inducción de la vía retinoide por microinyección de RARs constitutivamente activos en bajos niveles, convierte el tejido neural anterior en posterior, mientras que en altos niveles produce supresión de estructuras anteriores (Blumberg, 1997).

1.4. OBJETIVOS DE ESTA TESIS

Una de las cuestiones más intrigantes de la biología del desarrollo es la construcción de las formas a partir de programas genéticos que dirigen la proliferación celular, la diferenciación de los distintos tipos celulares y su ordenamiento espacial y temporal. Aunque se han descripto varias moléculas involucradas en la formación de la placa neural, aún se desconocen muchas de las interacciones moleculares que se producen durante el desarrollo que llevan a la arquitectura final del SNC.

La diversidad de roles descriptos para el RA durante la embriogénesis de los vertebrados y la alta conservación evolutiva de la función y localización de sus receptores, evidencian la importancia de este metabolito durante el desarrollo embrionario. Como la vía retinoide participa en varios aspectos del desarrollo neural normal (Maden y col., 1996, Papalopulu y Kintner, 1996, Gould y col., 1998, Sockanthan y Jessell, 1998, Toresson y col., 1999, Pierani y col., 1999), consideramos interesante investigar la participación de esta señal en la construcción de la placa neural.

La neurogénesis primaria en anfibios provee un modelo experimental con el que se puede examinar la actividad de la señal retinoide en un grupo de neuronas dentro del SNC en un estadío temprano del desarrollo y en el contexto de un organismo donde muchos de los factores que influencian la formación del tejido neural ya se conocen.

El objetivo de este proyecto es la comprensión de los mecanismos moleculares a través de los cuales el RA actúa en la cascada de la neurogénesis primaria durante el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*. En este marco, exploraremos la habilidad del RA de regular diferentes pasos de la cascada genética que lleva a la diferenciación neuronal.

Se intentará contestar las siguientes preguntas relacionadas con la función de los retinoides durante la neurogénesis primaria.

1) ¿Afecta la variación en la señal retinoide el patrón de neuronas primarias de la placa neural posterior?

2) La alteración en los niveles de retinoides ¿Modifica la expresión de moléculas que participan de la cascada genética que dispara la formación de neuronas?
3) En caso afirmativo, ¿A qué nivel de la cascada de la neurogénesis primaria actúan los retinoides?
4) ¿Cuál o cuáles son los subtipos y/o isoformas de los receptores de retinoides involucrados en estos eventos?
5) ¿En qué momento del desarrollo es requerida la señal retinoide para producir esos efectos?

Las estrategias a utilizar incluyen metodologías apropiadas para alterar la señal retinoide que abarcan: microinyección de ARNm correspondiente a dominantes negativos de los receptores de RA para bloquear la función específica de un subtipo de receptor, microinyección de morfolinos para distintos receptores capaces de bloquear específicamente su traducción, y el empleo de agonistas y antagonistas altamente específicos para activar o inhibir globalmente la función de receptores determinados e identificar su función individual. Todas estas estrategias, en combinación con los clásicos tratamientos con RA y las manipulaciones posibles en embriones de *Xenopus*, permitirán resolver los cuestionamientos planteados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

En este trabajo se utilizaron reactivos de grado analítico o biología molecular de las siguientes marcas: Merk, Carlo Erba, Mallinckrodt, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), GibcoBRL (Gaithersburg, MD, USA), BioRad (Hercules, California, USA). Las enzimas fueron provistas por New England Biolabs, Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany), Promega (Madison, WI, USA), Ambion, o Stratagene.

2.2. Mantenimiento de los animales

Los animales (*Xenopus laevis*) provistos por Nasco International, Inc., Fort Atkinson, Wisconsin, USA. fueron mantenidos en un bioterio con aire acondicionado a 18°C en cajas con agua declorinada y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y se alimentaron en base a corazón de vaca procesado dos veces por semana.

2.3. Preparación de bacterias competentes y transformación

A partir de un stock de glicerol de bacterias Xlblue (Stratagene) se realizó una siembra en una placa de Petri con medio de cultivo sólido LB + agar (1% bactotriptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7, +15 g/l agar) y se incubó a 37°C durante la noche a fin de obtener colonias aisladas. Se inoculó una colonia en 100 ml de medio líquido LB y se creció con agitación de 250 rpm hasta alcanzar una OD_{550}= 0.48. El cultivo se enfrió 10 minutos en hielo y se centrifugó a 4°C durante 5 min. a una velocidad de 3000 rpm. El pellet de bacterias se resuspendió a 0°C en 40 ml de buffer TbfI frío (30 mM Kac, 100 mM KCl, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 15% glicerol, pH 5.8 (ajustado con AcH 0.2M), esterilizado por filtración) y posteriormente se centrifugó 5 minutos a 4°C a 3000 rpm. El pellet de bacterias se resuspendió finalmente a 0°C en 4 ml de buffer TbfII preenfriado (10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM KCl, 15% glicerol, pH 6.5 (ajustado con KOH

1N), esterilizado por filtración) y se dejó reposar en hielo durante 15 minutos. Esta suspensión se dividió en alícuotas de 50 µl que fueron inmediatamente guardadas a –70°C.

Para realizar la transformación, a cada tubo de 50 µl de bacterias competentes se agregó entre 1 µl y 3 µl de cada clon madre de ADN circular, se mezcló suavemente y se incubó a 0°C durante 30 minutos. Luego se realizó un golpe térmico a 42°C durante 90 segundos y se enfrió en hielo rápidamente. Después de 2 minutos, se agregaron 300 µl de LB y se incubó a 37°C durante 45 minutos con agitación suave. Se sembraron con rastrillo entre 50 y 200 µl de este cultivo en placas de Petri conteniendo medio sólido LB- agar en presencia del antibiótico adecuado para la selección de cada clon y se incubó entre 12 y 16 horas a 37°C.

Una colonia aislada se inoculó en 2,5 ml de medio líquido LB conteniendo el antibiótico apropiado y se creció entre 12 y 16 horas a 37°C con una agitación de 250 rpm. A partir de 1,5 ml de este cultivo se realizó una mini preparación de ADN plasmídico (mini prep) en base al protocolo de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989) que se utilizó como stock de ADN. Se realizó un análisis por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en geles de agarosa para verificar el tamaño e identidad de cada clon. Paralelamente, 0.5 ml del cultivo se mezclaron con 0.5 ml de solución de glicerol (65% v/v glicerol, 0.1M SO_4Mg, 0.1mM EDTA) y se congeló inmediatamente a –70°C para ser utilizado como stock de bacterias transformadas (Ausubel y col., 1992).

2.4. Preparación de ADN plasmídico a gran escala

Partiendo de las reservas de bacterias Xlblue transformadas con cada uno de los clones se realizó una siembra con ansa en una placa de Petri con medio de cultivo sólido LB- agar en presencia del antibiótico de selección correspondiente a cada clon y se creció entre 12 y 16 horas a 37°C. Se resuspendió una colonia aislada en 100 ml de medio líquido LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubó a 37°C en un baño con agitación a 250 rpm durante 12- 16 horas. Para purificar el ADN plasmídico se utilizó el sistema Wizard Plus Midipreps (Promega) siguiendo las instruciones del fabricante.

2.5. Síntesis in vitro de RNAm para inyectar

2.5.1. Transcripción

Los RNAm para inyectar se sintetizaron *in vitro* utilizando el kit Megascript (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ARNm para inyectar fueron sintetizados a partir de los clones PCS2+nβgal (provisto por Dave Turner), pCS2+NotchICD (provisto por Thomas Hollemann), pT7TS-shh (provisto por Stephen Ekker), pCDNAI fzic2 (provisto por Ariel Ruiz i Altaba), pCDG-RAR α1-405* y pCDG-RAR α2-386* (provistos por Bruce Blumberg). La transcripción se realizó en un volumen final de 20 μl a partir de 1.5 μg de los templados de ADN lineales. Los clones fueron digeridos con la enzima de restricción correspondiente y la síntesis se realizó con la polimerasa indicada en cada caso: nβgal/ NotI/ SP6, NotchICD/ NotI/ SP6, Zic2/ Not1/ T7, shh/ BamHI/ T7, RARα2-386*/ NotI/ T7 o RARα1-405*/ NotI/ T7. Para la reacción de síntesis, una gran proporción del GTP se sustituyó por un análogo de cap que genera una fracción de transcriptos con una estructura de cap en el extremo 5´ (relación de CAP:GTP, 4:1, Ambion) que los protege de la rápida degradación que se produciría al ser inyectados en las células.

2.5.2. Purificación y cuantificación

Para purificar los productos de síntesis se utilizó el sistema RNAeasy mini kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y una dilución 1/250 de cada muestra se cuantificó espectrofotométricamente por absorbancia a 260 nm.

2.5.3. Análisis en gel

Para verificar la integridad del ARN, a 2 μl de cada preparación se le agregaron 23 μl de buffer de siembra (55% Formamida, 7.7% Formaldehído, 22.6 mM MOPS pH7, 5.4 mM acetato de sodio pH5.2, 0.5% EDTA pH8, 6.5% glycerol (preparado con Xylene Cyanol) y 0.03μg/μl Bromuro de Etidio), se calentó 15 minutos a

65°C, se enfrió en hielo y se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE1X a 90 Volts, comparando contra un marcador de peso molecular de RNA (Promega).

2.6. Obtención de embriones- Fertilización y desarrollo

Para estimular la puesta de huevos, las ranas hembras albinas se inyectaron el día anterior al experimento con 1000 UI de gonadotrofina criónica humana (Endocorion, Elea) en el saco linfático dorsal. Las hembras se mantuvieron toda la noche a 18°C en 1 litro de una solución de alta salinidad (HSB1X: 10mM Hepes, 0.41mM $ClCa_2$, 100 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM $NaHCO_3$, 0.33 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.82 mM $MgSO_4$) para que se produzca la oviposición.

A la mañana siguiente se anestesió al macho albino en 0.02% de Benzocaína en agua (Ethyl p- aminobenzoate, Sigma) durante aproximadamente 10- 15 minutos o en hielo durante 20 minutos y se realizó la extracción quirúrgica de un testículo que se colocó inmediatamente en Barth- Hepes 1X frío (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO3, 0.82 mM MgSO4, 0.33 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.41 mM CaCl2, 10 mM Hepes, pH 7.6, esterilizado por filtración).

Se colectaron los huevos en placas de vidrio, se eliminó la mayor cantidad de líquido posible y se frotó sobre ellos un trozo de testículo parcialmente disgregado con forceps durante 5 minutos. Se agregó muy poca agua y se dejó 15 a 20 minutos para permitir la fertilización. Posteriormente, se cubrió con agua y se dejó reposar 30 minutos más.

Para desprender los huevos de la gelatina que los recubre, se retiró el agua y se agregó una solución de cisteína 2% en Barth- Hepes 0.1X, pH8. Se mantuvo agitación hasta desprendimiento total de la gelatina que rodea a los huevos (3- 5 minutos), se lavó con abundante Barth- Hepes 0.1X (5 veces) y se dejó en esta solución hasta la aparición del primer surco de división.

El desarrollo de los embriones se siguió utilizando el criterio de estadíos embrionarios descripto por Nieuwkoop & Faber, (1956).

2.7. Microinyección de embriones

Todas las diluciones de las muestras a inyectar fueron realizadas con agua libre de RNAsas (para evitar degradación) y filtrada (para evitar la presencia de partículas que pudiesen tapar las agujas).

Las agujas de inyección se estiraron en un paso con un puller PC-10 (Narishige Group) a partir de capilares de vidrio (Drummond #3-00-203-G/X) y se hornearon 4 horas a 220°C. Para la microinyección se utilizó un inyector automático Drummond (Nanoject, Drummond Scientific Co.) con un chip de volumen fijo de 4.6 nl.

Con ayuda de forceps se abrió el extremo anterior de la aguja bajo lupa, se llenó el capilar por la parte posterior con aceite mineral coloreado con colorante oil red y se calzó en un micromanipulador. La carga de la aguja con la muestra se realizó por la punta del capilar y posteriormente se dejó en una gota de líquido hasta el momento de la microinyección.

Se prepararon placas de Petri plásticas de 6 cm de diámetro con un fondo de agarosa 1% en agua. Sobre esta base se colocó una malla de nylon y se cubrió con solución de inyección (Ficoll 6%, Barth 1X, Gentamicina 50 μg/ml). Luego de producirse la primera división celular, los embriones se acomodaron ordenadamente sobre esta red plástica y se colocaron bajo lupa para ser inyectados.

La microinyección de las muestras se realizó en estadío de dos células en la región animal de una o ambas blastómeras según se indica en cada caso. Para analizar la distribución del ARNm inyectado, todas las muestras fueron coinyectadas con una pequeña cantidad de ARNm de nβgal (200 pg) detectable por medición de actividad βgalactosidasa. También se realizaron inyecciones control con ARNm de nβgal en igual dosis que las muestras, para descartar efectos no específicos que puedan deberse a la toxicidad del ARNm.

Después de la microinyección, los embriones se dejaron en la solución de inyección durante 1 hora. Luego, fueron transferidos a placas conteniendo Barth 0.1X+ gentamicina (50μg/ml) sobre un colchón de agarosa (1% de agarosa en agua) y se mantuvieron en incubadora ajustando la temperatura entre 14 y 24° de acuerdo al estadío en el que se necesitaban fijar.

Una vez que los embriones alcanzaron el estadío deseado, fueron fijados en MEMFA (4% Formaldehído, 0.1M MOPS, 20mM EGTA pH 8, 0.2M $MgSO_4$) durante 1 hora con agitación, posteriormente, se lavaron exhaustivamente con PBS1X y se les realizó la tinción para actividad βgalactosidasa.

2.8. Microinyección de morfolinos

Para bloquear la síntesis específica de distintos receptores se utilizaron oligos morfolinos de 25 bases (Gene Tools, LLC) con las siguientes secuencias: **MoRARα2.2**: 5´ ATC CAA AGG AAG GTG AGT GTG TGT G 3´, **MoRARγ1**: 5´ TGC CTT GTT CTA GCT CAG TCT CTT A 3´ provistos por el laboratorio del Dr. Blumberg. Estos morfolinos se inyectaron en dosis de 5 ng y 10 ng en el hemisferio animal de una de las blastómeras en estadío de dos células. Para descartar efectos tóxicos, se inyectaron del mismo modo 5 ng o 10 ng de un morfolino control con la siguiente secuencia: **MoControl**: 5´ CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A 3´. Las inyecciones de estos oligos siempre incluyeron 200 pg de nβgal como trazador para determinar posteriormente la mitad inyectada. Posteriormente, los embriones se procesaron como se describió para la inyección de ARNm.

2.9. Reacción para βgalactosidasa

Para determinar el lado inyectado, se realizó la detección de actividad enzimática de β-galactosidasa. Luego de la fijación con MEMFA, los embriones fueron lavados 2 veces por 5 min. en PBS 1X y 2 veces por 5 min. en PTW (PBS 1X + 0.2% Tween 20). Posteriormente, se incubaron en solución de revelado (7.2 mM Na_2HPO_4, 2.8 mM NaH_2PO_4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 1 mM $MgCl_2$, 3 mM $K_3Fe(CN)_6$, 3 mM $K_4Fe(CN)_6$, pH 7.2) durante 5 min. y finalmente fueron incubados en esta misma solución conteniendo 0.027% del sustrato para

βgalactosidasa, Xgal (Boehringer), manteniendo la reacción a 37°C en oscuridad hasta el desarrollo del color azul. Los embriones procesados de este modo, se deshidrataron en alcohol etílico frío, se lavaron una vez más con etanol y se guardaron a –20°C hasta ser utilizados para hibridización *in situ*.

2.10. Tratamientos farmacológicos de embriones

2.10.1. Tratamientos con RA

En primer lugar se realizaron tratamientos de embriones con ácido retinoico all trans (RA, Sigma) a partir del estadío 8, durante toda la gastrulación hasta el momento de la fijación en estadío 14. Las dosis utilizadas para estos tratamientos fueron 0.1μM, 1μM y 10μM en Barth 0.1X y se prepararon a partir de una solución madre de RA 20mM en DMSO. Una vez que los embriones controles sin tratar del mismo grupo alcanzaron el estadío deseado, fueron lavados varias veces con Barth 0.1X y fijados en MEMFA durante 1 hora con agitación. Posteriormente, se enjuagaron exhaustivamente con PBS1X, se deshidrataron realizando dos lavados en alcohol etílico frío y se guardaron a –20°C. Como control se realizaron incubaciones de embriones en Barth 0.1X adicionado con la máxima concentración de DMSO utilizada en los tratamientos.

Una segunda serie de experimentos se llevó a cabo para determinar la ventana de tiempo en la que es necesario que el RA actúe para inhibir la expresión de shh. Para esto, embriones de *Xenopus* se trataron en estadío 10- 10 $^1/_4$ con un pulso de RA 1μM o 10μM durante 30 minutos, se lavaron inmediatamente con Barth 0.1X y se dejaron progresar en esta solución hasta el estadío 14, momento en que se fijaron. Paralelamente, se realizó un tratamiento con RA 1μM o 10μM desde el estadío 12.5 hasta el estadío 14. En todos los casos los embriones se deshidrataron en etanol y se guardaron a –20°C para ser procesados por hibridización *in situ*.

2.10.2. Tratamientos con Ro 41-5253

Los embriones se incubaron en 1.5μM, 4μM o 7.5 μM Ro (Ro, gentileza de F. Hoffman-LaRoche Ltd., Suiza) preparado en Barth 0.1X a partir de una reserva 20mM en DMSO (Apfel y col., 1992). Las exposiciones a este compuesto se realizaron desde el estadío 8 hasta el estadío 14, momento en que los embriones se fijaron para su posterior utilización en hibridización *in situ*.

2.10.3. Tratamientos con agonistas y antagonistas

Para los compuestos TTNPB, Lg268, 193109 y 194301 se utilizaron dosis de 1μM, 0.1μM y 0.01μM. En todos los casos, las diluciones se prepararon Barth 0.1X. Como la solución madre de algunos de estos compuestos se encuentra preparada en DMSO, los embriones control fueron crecidos paralelamente en Barth 0.1X suplementado con DMSO en una cantidad equivalente a la utilizada como vehículo. Estos embriones control no se diferenciaron de embriones crecidos sólo en Barth 0.1X sin adicionar.

2.10.4. Inhibición de la proliferación celular

La división celular puede ser bloqueada rápida y efectivamente incubando los embriones en una solución de hidroxiurea y afidicolina (Sigma) sin afectar la diferenciación celular (Harris y Hartenstein, 1991). El tratamiento se realizó desde el estadío 10 hasta estadío 14 en una solución conteniendo 20mM hidroxiurea y 150μM afidicolina en Barth 0.1X (preparada a partir de stocks 650mM hidroxiurea en agua y 30mM afidicolina en DMSO). En este experimento los controles sin tratar fueron incubados en Barth 0.1X suplementado con DMSO en cantidad equivalente a la utilizada como vehículo de la afidicolina.

Como control del tratamiento, paralelamente se incubaron embriones en estas mismas soluciones desde estadío 6 y se verificó el bloqueo de la división celular.

2.11. Síntesis de sondas de ARN antisentido marcadas con digoxigenina

2.11.1. Preparación de los Templados

Digestión

Los plásmidos se linealizaron con la enzima de restricción correspondiente utilizando en todos los casos aproximadamente 40μg de ADN en un volumen final de 400 μl. Se digirió el clon de N-tubulina con BamHI, X-ngnr-1 con BamHI, XMyT1 con ClaI, Delta-1 con XhoI, Gli3 con BamHI, Zic2 con BamHI y shh con KpnI. Para analizar las digestiones se sembraron 2μl de cada una de las reacciones en un gel de agarosa 1% en TBE 1X en presencia de Bromuro de Etidio y se verificó linealidad. A partir de este paso se trabajó en condiciones libres de ARNasas.

Purificación y precipitación

Para la extracción del ADN linealizado, se utilizó una mezcla 1:1 fenol:CHISAM (24 vol. cloroformo, 1 vol. alcohol isoamílico). La fase acuosa (superior) se transfirió a otro tubo y se reextrajo con 1 vol CHISAM. Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo y se agregó 1/10 vol. acetato de sodio y 2 vol. etanol 100% frío. Se mezcló por inversión y se dejó precipitando toda la noche a –20 °C. Al día siguiente, se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min. a 4 °C. El pellet se lavó 2 veces con 500 μl de etanol 70 % frío, posteriormente se centrifugó para extraer el etanol residual y los tubos se dejaron abiertos 10 min. a 37 °C. El pellet seco se resuspendió en 25μl de H_2O libre de ARNasas. Este procedimiento se realizó con cada una de las preparaciones mencionadas anteriormente.

Cuantificación

Para cuantificar los templados se realizó una dilución 1/10 de cada preparación de ADN en H_2O bidestilada, se calentó durante 10 min. a 55 °C y se enfrió durante 5

min. en hielo. Luego, 1 y 3μl de cada dilución se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE, en presencia de Bromuro de Etidio. En el mismo gel, se sembraron 3 μl de ADN marcador (fago λ digerido con Hind III) de concentración conocida para utilizar como referencia.

2.11.2. Transcripción in vitro

Síntesis

Para la síntesis se montó una reacción conteniendo: 1X buffer de transcripción (Promega), 1X DIG RNA labeling Mix (Boehringer), 40 UI RNAsin (RNAse inhibitor) (Promega), 1 μg de templado lineal precalentado a 55°C durante 15 minutos y enfriado en hielo, y 40 UI de la polimerasa correspondiente (Promega): N-tubulina/ T3, X-ngnr-1/ T3, XMyT1/ T7, Delta-1/ T7, Gli3/ T7, Zic2/ SP6, shh/ T3. Se dejaron reaccionar 2 horas a 37°C y se degradó el templado incubando con 20 UI de DNAsaI (Boehringer) durante 15 minutos a 37°C.

Purificación y análisis en gel

El producto de la reacción se purificó utilizando columnas de Sephadex G25 coarse (Pharmacia) hidratada en buffer TE + 0.1% SDS y el eluído se precipitó con 1/10 vol acetato de sodio 3M y 2 vol de etanol 100 durante toda la noche a –20 °C. Después de centrifugar a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C, el pellet se lavó con etanol 70 y se resuspendió en 22μl de agua libre de ARNasas.

El análisis en gel se realizó del mismo modo que para la síntesis de ARNs para inyectar.

2.12. Hibridización in situ

El procedimiento utilizado es una adaptación de los protocolos de Harland (1991), Haramis y Carrasco (1996), y se describe a continuación:

2.12.1. Rehidratación y permeabilización de embriones

Los embriones guardados en etanol se rehidrataron gradualmente realizando lavados de 5 min. de 75% metanol en agua con 0.1% DEPC (Sigma), 50% metanol en agua con 0.1% DEPC, 25% metanol en PTw (PBS 1X, 0.1% Tween 20) y 3 enjuagues en PTw.

Para degradar la membrana vitelina, los embriones se trataron con 2.5 μg/ml de proteinasa K (Merck) en PTw 10 min. a temp. amb. y posteriormente se lavaron 5 veces con PTw. Para bloquear cargas, se realizaron 2 lavados en 0.1M trietanolamina pH 7.8 preparada en PTw y se agregaron 2.5μl de anhídrido acético. Después de incubar 5 min. a temp. amb. se volvió a agregar 2.5 μl de anhídrido acético y se dejó otros 5 min. Se realizaron dos lavados de 5 min. en PTw. Se realizó una fijación de 20 minutos en formaldehído 4% en PTw y posteriormmente se lavó 5 veces en PTw.

2.12.2. Prehibridización e hibridización

Se reemplazó el PTw del tubo por 1 ml de PTw fresco y se agregaron 250μl de buffer de hibridización (50% formamida, 5X SSC, 1mg/ml tórula RNA, 100 μg/ml heparina, 1X Denhardt´s, 0.1% Tween 20, 0.1% CHAPS, 10 mM EDTA). Se retiró la solución, se agregaron 500μl de buffer de hibridización y se incubó durante 10 min. en un baño a 60°C. Para prehibridizar, se renovó el buffer con 500μl de buffer fresco, se agregaron 50μl de DNA de esperma de salmón (10mg/ml) desnaturalizado y se incubó al menos 3 horas a 60°C. Para la hibridización, se reemplazó la solución con 250μl de buffer de hibridización con el agregado de 25μl de DNA de esperma de salmón 10mg/ml desnaturalizado y entre 1μl y 4μl de sonda de RNA marcada con digoxigenina. Se dejó hibridizando toda la noche a 60°C con agitación suave.

2.12.3. Lavados

Se reemplazó la solución de hibridización con 500µl de solución de hibridización fresca y se incubó 10 min. a 60°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 20 min. cada uno en SSC2X a 60°C.

Para remover toda la sonda que haya quedado sin hibridizar, se incubó en SSC2X conteniendo 20µg/ml de RNAsa A y 10 UI/ml de RNAsa T1 durante 30 min. a 37°C.

Luego, se realizaron una serie de lavados en diferentes condiciones: 1 lavado en SSC2X 10 min. a temp. amb., 2 lavados de 30 min. a 60°C en SSC 0.2X con el agregado de 0.1% DEPC en el momento. Se lavó 2 veces durante 10 min. en buffer MAB (100mM ácido maleico, 150mM cloruro de sodio, pH7.5) a temp. amb., se reemplazó con 500 µl de buffer MAB con 2% de bloqueante (Boehringer) incubándose 10 min. y después de recambiar la solución 1 hora más a temp. amb. Esta solución fue reemplazada por 500µl de MAB fresco con 2% bloqueante con el agregado del anticuerpo anti-digoxigenina (acoplado a fosfatasa alcalina) en una dilución 1:2000 y se incubó a temp. amb. durante 3 horas. Para remover el exceso de anticuerpo, se lavó 3 veces en buffer MAB a temp. amb. y se dejó lavando toda la noche en buffer MAB a 4°C.

2.12.4. Revelado

Para el revelado, se lavó dos veces en buffer AP (fosfatasa alcalina) (100mM Tris pH9.5, 50 mM Cl_2Mg, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20, 5mM levamisol) y se incubó a 37°C en oscuridad con buffer AP fresco conteniendo 337 µg/ml de NBT (nitro blue tetrazolium, Sigma) y 175 µg/ml de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfato, Sigma). Una vez que se alcanzó la marca deseada, los embriones se lavaron en agua, se deshidrataron 30 min. en metanol para frenar la reacción y se dejaron en PBS1X hasta su observación y análisis.

2.13. Técnica de tinción por TUNEL en embriones enteros

Para evaluar el nivel de muerte celular programada en el embrión entero de *Xenopus*, se siguió el protocolo de TUNEL utilizado por Hensey y Gautier (1997),

que permite detectar las células que se encuentran en las últimas etapas del proceso apoptótico caracterizadas por presentar fragmentación del ADN. La técnica se basa en la incorporación de dUTP acoplado a digoxigenina en los extremos de los fragmentos de ADN mediante una transferasa terminal de deoxinucleótidos (TdT). Posteriormente, la presencia de fragmentos marcados se detecta por medio de un anticuerpo anti- digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina y la determinación de actividad fosfatasa alcalina utilizando sustratos colorigénicos. Por lo tanto, la señal final en el embrión, reflejará la localización de las células que han sufrido apoptosis.

Los embriones fijados y conservados a 4 °C en PBS1X fueron tratados con 2.5 μg/ml de Proteinasa K en PBTw (PBS1X, 0.2% Tween 20) 15 min. a temp. amb. con agitación y después de un breve lavado en PBS, se fijó en formaldehído al 4% en PBS1X durante 30 min. para inactivar la Proteinasa K. Luego, fueron lavados varias veces con PBS1X y se incubaron 60 min. en el buffer de la enzima TdT (Transferasa Terminal de desoxinucleótidos). Posteriormente, se realizó la reacción de marcación con buffer TdT conteniendo 300 U/ml de la enzima TdT (GIBCO BRL) y 1 μM dUTP-digoxigenina (Boehringer Mannheim) durante toda la noche a temp. amb. Esta reacción se detuvo incubando 2 hs a 65 °C en PBS1X conteniendo 1 mM EDTA. Luego, se realizaron 4 lavados de 60 min. con PBS1X y 1 lavado de 15 min. en PBT (PBS1X, 2 mg/ml BSA, 0.1% Triton X100). Posteriormente, se bloqueó 1 hora en buffer bloqueante (2% reactivo de bloqueo Boehringer Mannheim en MAB) y se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-dioxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (1:2000) (Boehringer Mannheim). Al día siguiente, se realizaron 6 lavados de 1 hora en PBT y durante toda la noche a 4 °C en PBT. Después de dos lavados en buffer AP se procesaron del mismo modo que para el revelado de la hibridización *in situ*.

Una vez revelados, se procedió al conteo de células marcadas en la placa neural de los embriones control y tratados con RA. De los 72 embriones control analizados, un 35% no mostró marca, mientras que el 65% restante con señal positiva arrojó un valor promedio de 9 células apoptóticas en la placa neural por embrión. Para los 65 embriones tratados con RA analizados, el 15% no mostró marca, mientras que el 85% restante con señal positiva dio un valor promedio de 11 células apoptóticas por embrión.

2.14. Fotografía y procesamiento de imágenes

El registro de resultados se llevó a cabo con una cámara fotográfica Leica *Wild* MPS48 acoplada a una lupa Leica *Wild* M420 utilizando un aumento de A:1.25X10X11X2 para los embriones y A.1.25X10X20X2 para los cortes, con una película diapositiva color Ektachrome 160T -tungsteno (Kodak). Posteriormente las imágenes a partir de las diapositivas se digitalizaron con un equipo Nikon CoolscanII y se editaron utilizando el programa Adobe Photoshop 5.5. Los paneles de imágenes se armaron utilizando el programa Corel Draw 9.0.

3. RESULTADOS

3.1. El tratamiento con RA induce la expresión de N-tubulina en la placa neural

Durante el desarrollo temprano del sistema nervioso central de *Xenopus*, la diferenciación neuronal se detecta en la región posterior del neuroectodermo en estadío de placa neural (est. 14) pero está retrasado en la región anterior hasta después del cierre del tubo neural en estadío de larva (est. 27). Un retraso similar en la diferenciación neuronal ocurre en el tejido neural anterior que se forma *in vitro* cuando explantes ectodérmicos aislados se tratan con el inductor neural noggin (Lamb y col., 1993). Papalopulu y Kintner (1996), estudiando el patrón temporal de la neurogénesis primaria, encontraron que si se cultivan los explantes ectodérmicos neuralizados con noggin en una solución conteniendo RA, la expresión de N-tubulina se adelanta al estadío de néurula (est. 14). El nivel de diferenciación neuronal temprana se incrementa marcadamente por la expresión adicional del gen proneural Xash3, sugiriendo una cooperación entre RA y Xash3 para inducir la neurogénesis temprana. En embriones enteros, el tratamiento con RA produce expresión anterior extensiva y prematura de N-tubulina en estadío de néurula (Papalopulu y Kintner, 1996). Sin embargo, no se había estudiado su efecto sobre el neuroectodermo posterior, donde normalmente ocurre la neurogénesis primaria, lo que nos llevó a evaluar la participación del RA en la cascada neurogénica en embriones enteros de *Xenopus laevis*.

Para estudiar el efecto producido por la variación en los niveles de RA sobre la expresión de N-tubulina se realizaron tratamientos con RA, o con Ro41-5253 (Ro), un antagonista de los receptores RARα y parcialmente de los RARβ (Keidel y col., 1994; López y col., 1995) para producir un aumento o una disminución de la señal retinoide respectivamente y se analizó la expresión de N-tubulina en estadío de placa neural (est. 14) por hibridización *in situ* en embriones enteros.

En los embriones control, la expresión de N-tubulina se detecta en forma salpicada, en células organizadas en tres dominios longitudinales: medial, intermedio y lateral, que corresponden a las neuronas ventrales, interneuronas y neuronas dorsales respectivamente, a cada lado de la línea media dorsal de la placa neural posterior (Fig. 3.1 A). Un segundo sitio de expresión se observa en las neuronas del ganglio trigeminal, aproximadamente a nivel del límite entre el

cerebro medio y posterior. La expresión de N-tubulina en la región anterior de la placa no se detecta antes del cierre del tubo neural en estadío de brote caudal (Fig. 3.1 A, Hartenstein, 1989; Chitnis y col., 1995). Los embriones tratados con 1μM (Fig. 3.1 B) o 10 μM (Fig. 3.1 C) de RA mostraron un marcado incremento en la expresión de N-tubulina (Tabla 1). Se observó la fusión de las bandas dorsales e intermedias de neuronas, acompañado de un incremento en el número de células marcadas y en intensidad de señal. La banda ventral fue la menos afectada.

Tabla 1 *El tratamiento con RA induce la expresión de N-tubulina*

Concentración de RA (μM)	n	Expresión N-tubulina aumentada (%)
10μM	44	100%
1 μM	24	54%

Para corroborar estos resultados, investigamos los efectos producidos por el tratamiento con Ro, antagonista de los receptores RARα y RARβ, sobre la expresión de N-tubulina. Como se esperaba, contrariamente a la administración de RA, el tratamiento con 1.5μM (Fig. 3.1 D) o 7.5μM (Fig. 3.1 E) de Ro produjo reducción en la expresión de N-tubulina (Tabla 2). Además de observarse la disminución en intensidad, se notó un espaciamiento mayor entre las bandas de neuronas en comparación con el control.

Tabla 2 *El bloqueo de la señal mediada por RARα y RARβ produce inhibición de la expresión de N-tubulina.*

Concentración de Ro (μM)	n	Expresión N-tubulina disminuída (%)
7.5μ M	10	70%
1.5μ M	12	83%

Estos resultados muestran que los retinoides endógenos regulan positivamente la expresión de N-tubulina en la placa neural *in vivo* y que este efecto estaría mediado, al menos en parte, por RARα y/o RARβ.

Como la N-tubulina es un gen de diferenciación neuronal terminal y en consecuencia es el último componente de la cascada neurogénica, decidimos evaluar otras moléculas río arriba de la N-tubulina involucradas en la neurogénesis temprana, para determinar de qué manera RA puede producir esta inducción neuronal.

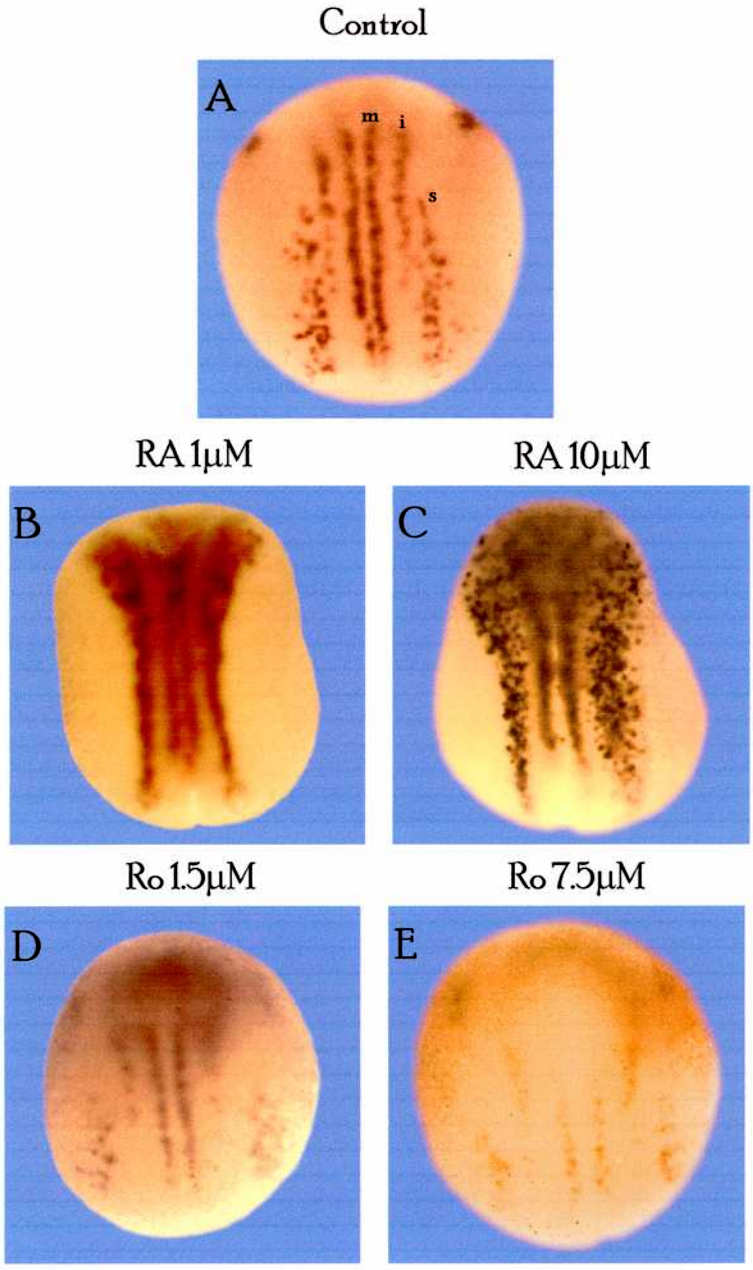


Figura 3.1. La exposición a RA durante la gastrulación aumenta el número de células que expresan N-tubulina en la placa neural, mientras que el tratamiento con el antagonista Ro, produce el resultado opuesto.
Se evaluó el efecto sobre la expresión de N-tubulina en estadío de néurula (st. 14) por hibridización in situ en embriones (A) sin tratar, o tratados con (B) 1 μM RA, (C) 10 μM RA, (D) 1.5 μM Ro o (E) 7.5 μM Ro. Todos los paneles son vistas dorsales con la región anterior hacia arriba. Los dominios de N-tubulina fueron fuertemente incrementados después de la exposición a RA. Las bandas de neuronas sensoriales e interneuronas se fusionaron tanto con 1 mM como con 10 mM RA y se desplazaron anteriormente. Ro, por el contrario, reduce la expresión de N-tubulina y las bandas de neuronas se detectan más distanciadas entre sí con respecto al control con ambas dosis analizadas. m, i, s, neuronas motoras, intermedias y sensoriales respectivamente.

3.2. Los cambios en la señal retinoide afectan toda la cascada de la neurogénesis primaria

3.2.1. X-MyT1

Ha sido demostrado que XMyT1 interactúa con los factores de transcripción de la familia bHLH y promueve la diferenciación neuronal. En la cascada de la neurogénesis primaria XMyT1 se encuentra regulado positivamente por X-ngnr-1 y negativamente por la inhibición lateral y cuando se sobreexpresa induce la expresión de N-tubulina (Bellefroid y col., 1996).

Para verificar si el tratamiento con RA modifica el patrón de expresión de X-MyT1, los embriones tratados con 1μM y 10μM RA fueron analizados por hibridización *in situ* en estadío de néurula.

Los embriones control muestran la expresión de X-MyT1 restringida a las tres bandas de células donde se diferenciarán las neuronas, las placodas trigeminales y una banda anterior y central de células, como fue descripto anteriormente (Bellefroid y col., 1996 y Fig. 3.2 A)

El tratamiento con RA resultó en un incremento de la expresión de X-MyT1 con un corrimiento notorio del límite anterior de expresión hacia el borde anterior del embrión (Tabla 3) (Fig. 3.2 B). La banda medial de expresión muestra una señal más fuerte que el control y similarmente a lo que se obtuvo con N-tubulina, las bandas intermendia y lateral de células se fusionaron y mostraron una intensidad mayor. La expresión de X-MyT1 en las placodas trigeminales fue suprimida, como se esperaba, debido a la posteriorización producida por RA. Se observaron resultados similares con dosis de 1μM o 10μM de RA.

Tabla 3 *El tratamiento con RA incrementa la expresión de XMyT-1*

Concentración de RA (μM)	n	Expresión XMyT-1 aumentada (%)
10 μM	6	100%
1 μM	8	100%

Cuando se disminuyó la señal retinoide mediante el tratamiento de los embriones con Ro, la expresión en las tres bandas se redujo (Tabla 4) y tanto la marca en las placodas trigeminales como en el dominio anterior central se incrementaron (Fig. 3.2 C).

Tabla 4 *El tratamiento con Ro reduce los niveles de expresión de XMyT-1*

Concentración de RA (μM)	n	Expresión XMyT-1 reducida (%)
1.5 μM	8	100%

Estos resultados que muestran que la regulación del RA sobre la expresión de X-MyT1 es similar a la encontrada con N-tubulina, sugieren que el incremento en la señal de N-tubulina observado en los embriones tratados con RA podría estar producido por la activación de la expresión de X-MyT1.

3.2.2. Neurogenina

Ensayamos posteriormente el efecto del RA sobre la expresión de neurogenina (X-ngnr-1), un gen proneural capaz de inducir la expresión de N-tubulina y XMyT-1.

Los embriones control expresan X-ngnr-1 en tres dominios a cada lado de la línea media dentro de la placa neural y en las placodas trigeminales (Fig. 3.2 D).

Los embriones tratados con 1μM o 10μM de RA mostraron una activación en la expresión de X-ngnr-1 (Tabla 5) y de manera similar a N-tubulina, se produjo fusión de las bandas. El borde de expresión de X-ngnr-1 se desplazó anteriormente y no se detectó la señal correspondiente a los dominios más anteriores de la placa neural debido a la posteriorización de los embriones (Fig. 3.2 E).

Tabla 5 *El tratamiento con RA induce la expresión de X-ngnr-1*

Concentración de RA (μM)	n	Expresión X-ngnr-1 aumentada (%)
10 μM	29	72%
1 μM	33	61%

Cuando analizamos los efectos producidos por el tratamiento con Ro sobre la expresión de la X-ngnr-1 en estadío de néurula, observamos un marcado incremento de la expresión en las placodas trigeminales coincidente con el efecto anteriorizante reportado previamente para Ro (López y col., 1995), y una expresión reducida en la placa neural posterior en las tres bandas de células (Tabla 6) (Fig. 3.2 F).

Tabla 6 *El tratamiento con Ro reduce la expresión de X-ngnr-1*

Concentración de Ro (μM)	n	Expresión X-ngnr-1 reducida (%)
4 μM	10	20%
1.5 μM	14	21%

Estos resultados muestran que la expresión del gen proneural X-ngnr-1 está regulado positivamente por RA de forma similar a X-MyT1 y N-tubulina en la placa neural posterior, y en consecuencia, la activación de X-ngnr-1 producida por el tratamiento con RA podría estar mediando el incremento en la expresión de estas dos moléculas.

3.2.3. X-Delta-1

Para examinar el efecto del RA sobre los genes neurogénicos, que participan del proceso de inhibición lateral, analizamos el patrón de expresión de X-Delta-1 generado en respuesta al tratamiento.

X-Delta-1 codifica para un ligando de membrana que se expresa en la célula que se diferenciará a neurona y media la inhibición lateral que previene a las células vecinas de desarrollar el destino neuronal. En estadío de néurula, los transcriptos de X-Delta-1 se hallan normalmente en los dominios longitudinales de la placa neural donde aparecen los precursores neuronales, en las placodas trigeminales y en un dominio de expresión anterior (Chitnis y col., 1995, Fig. 3.2 G). La expresión de X-ngnr-1 precede y puede activar la expresión de Xdelta-1 (Ma y col., 1996) y la sobreexpresión de X-Delta-1 produce la inhibición de la neurogénesis primaria (Chitnis y col., 1995).

Mientras la expresión en las placodas trigeminales y en el dominio más anterior fueron suprimidos por el tratamiento con RA debido a la posteriorización, la expresión de X-Delta-1 en los dominios posteriores se incrementó y se desplazó hacia la región cefálica como otros marcadores descriptos previamente (Tabla 7) (Fig. 3.2 H).

Tabla 7 *RA aumenta la expresión de X-Delta-1*

Concentración de RA (μM)	n	Expresión X-Delta-1 aumentada (%)
10 μM	16	50%
1 μM	16	38%

El tratamiento con Ro modificó el patrón de expresión de X-Delta-1 resolviendo las bandas longitudinales en una banda bilateral desplazada hacia la línea media y de menor intensidad (Tabla 8). También se observó convergencia de los dominios anteriores (Fig. 3.2 I).

Tabla 8 *Ro inhibe la expresión de X-Delta-1*

Concentración de Ro (μM)	n	Expresión X-Delta-1 disminuída (%)
1.5μ M	10	30%

Como X-Delta1 se expresa en las futuras neuronas primarias, presumimos que la expansión de los dominios de X-Delta-1 en respuesta al tratamiento con RA indicaría que más células están destinadas a la diferenciación neuronal.

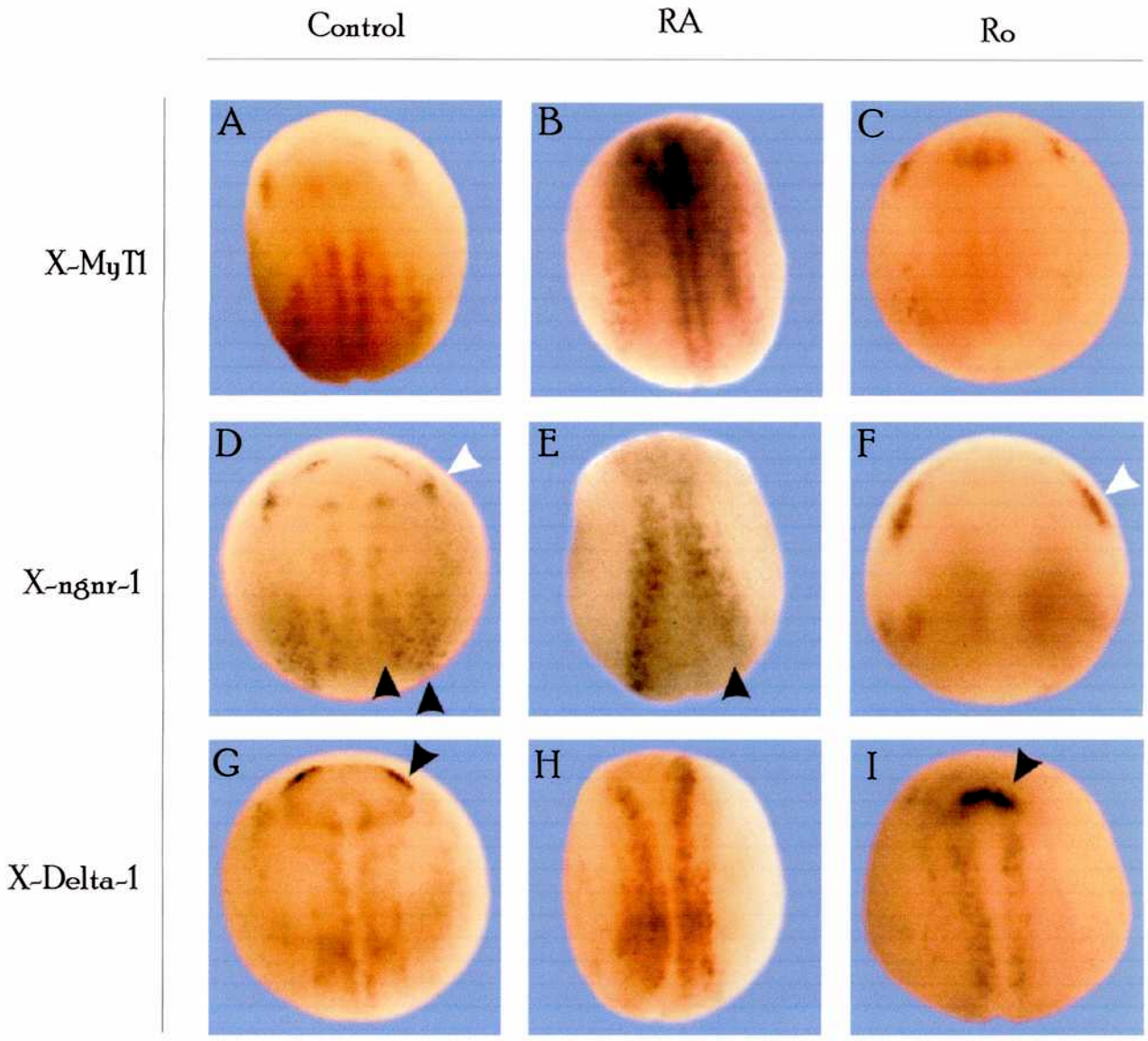


Figura 3.2. Efecto del tratamiento durante la gastrulación con RA sobre la expresión de X-MyT1, X-ngnr-1 y X-Delta-1.
Se analizó por hibridización in situ en embriones control (A,D,G), tratados con RA (B, E, H) o con Ro (C, F, I) la expresión de X-MyT1 (A-C), Xngnr-1 (D-F) o X-Delta-1 (G-I). Los dominios de expresión de XMyT1 se expandieron y se desplazaron anteriormente después del tratamiento con RA (B), mientras que Ro redujo claramente su expresión en la placa neural(C). Las bandas de expresión de X-ngnr-1 se incrementaron y se fusionaron (comparar las puntas de flecha en D y E). También se observó en los embriones tratados con RA un desplazamiento de la expresión de X-ngnr-1 hacia la región anterior, mientras que la expresión en el ganglio trigeminal (punta de flecha blanca en D) se perdió (E). El tratamiento con Ro produce una reducción en la expresión de X-ngnr-1 en la placa neural pero aumenta el dominio trigeminal (punta de flecha blanca en F). Los dominios de expresión de X-Delta-1 se incrementaron, fusionaron y desplazaron anteriormente en respuesta al tratamiento con RA (H), mientras que el dominio más anterior (punta de flecha en G) se perdió probablemente debido a la posteriorización del embrión. Ro modifica el patrón de expresión de X-Delta-1 resolviendo las bandas longitudinales en una sóla franja desplazada hacia la línea media del embrión (I), mientras que el dominio más anterior en lugar de detectarse a cada lado del embrión (punta de flecha en G), se observó fusionado sobre la línea media (punta de flecha en I).

3.2.4. Genes de prepattern Zic2 y Gli3

Como el RA puede activar la expresión del gen de diferenciación neuronal terminal N-tubulina, la proteína con dedos de zinc X-MyT1, el gen proneural temprano X-ngnr-1 y el gen neurogénico X-Delta-1, decidimos determinar el efecto de RA sobre los genes de prepattern Zic2 y Gli3 que están involucrados en la definición temprana de los dominios de diferenciación neural. Estudios previos han mostrado que Zic2 se expresa en bandas que se alternan con aquellas en las que se diferencian las neuronas primarias (Fig. 3.3 D), inhibe la neurogénesis e induce la diferenciación a cresta neural (Brewster y col., 1998). Contrariamente, Gli3 se expresa en la placa neural en forma de gradiente con los niveles más altos en los bordes laterales y ausente en la línea media (Lee y col., 1997 y Fig. 3.3 A), induce neurogénesis, inhibe la diferenciación a cresta neural y es reprimido por shh (Ruiz i Altaba, 1998).

El tratamiento con RA incrementa la expresión de Gli3 en la placa neural posterior (Tabla 9), mostrándose uniforme en el eje mediolateral, aunque continúa ausente en la línea media (Fig. 3.3 B). Como se observó para otros marcadores, el dominio anterior de expresión se redujo debido a la posteriorización.

Tabla 9 *El tratamiento con RA aumenta la expresión de Gli3*

Concentración de RA (μM)	n	Expresión Gli3 aumentada (%)
10μ M	10	100%
1 μM	10	100%

En contraste, el tratamiento con Ro inhibió la expresión de Gli3 en la placa neural posterior sin verse afectado el dominio anterior (Tabla 10) (Fig. 3.3 C).

Tabla 10 *La anulación de la señal mediada por RAR α y β inhiben la expresión de Gli3*

Concentración de Ro (μM)	n	Expresión Gli3 disminuída (%)
7.5μ M	8	63%
4 μM	9	67%

Después del tratamiento con RA, la expresión de Zic2 muestra una marcada inhibición dosis dependiente (Tabla 11). Las dosis más altas de RA generaron la pérdida casi completa de la expresión de Zic2 tanto en la placa neural anterior como en la posterior (Fig. 3.3 E), mientras que los embriones tratados con dosis más bajas redujeron la expresión posterior y perdieron totalmente la expresión anterior probablemente debido a la posteriorización por RA (Fig. 3.3 E, inserto).

Tabla 11 *El RA inhibe la expresión de Zic2*

Concentración de RA (μM)	n	Expresión Zic2 disminuída (%)
10 μM	10	100%
1 μM	10	100%

En los embriones tratados con Ro, la expresión de Zic2 se dispersó en el eje mediolateral de la placa neural posterior mostrando bandas más anchas pero difusas y más espaciadas entre sí (Tabla 12) (Fig 3.3 F). Presumimos que esa dispersión podría ser la responsable de la inhibición de la neurogénesis mediada por Ro.

Tabla 12 *El tratamiento con Ro incrementa los dominios de expresión de Zic2*

Concentración de Ro (μM)	n	Expresión Zic2 aumentada (%)
7.5 μM	10	40%
4 μM	10	30%

Todos estos resultados sugieren que los retinoides actuarían muy tempranamente en la cascada de la neurogénesis primaria regulando la actividad de los genes de prepattern, promoviendo la expresión de reguladores positivos de la neurogénesis, como Gli3, y desfavoreciendo la expresión de reguladores negativos como Zic2.

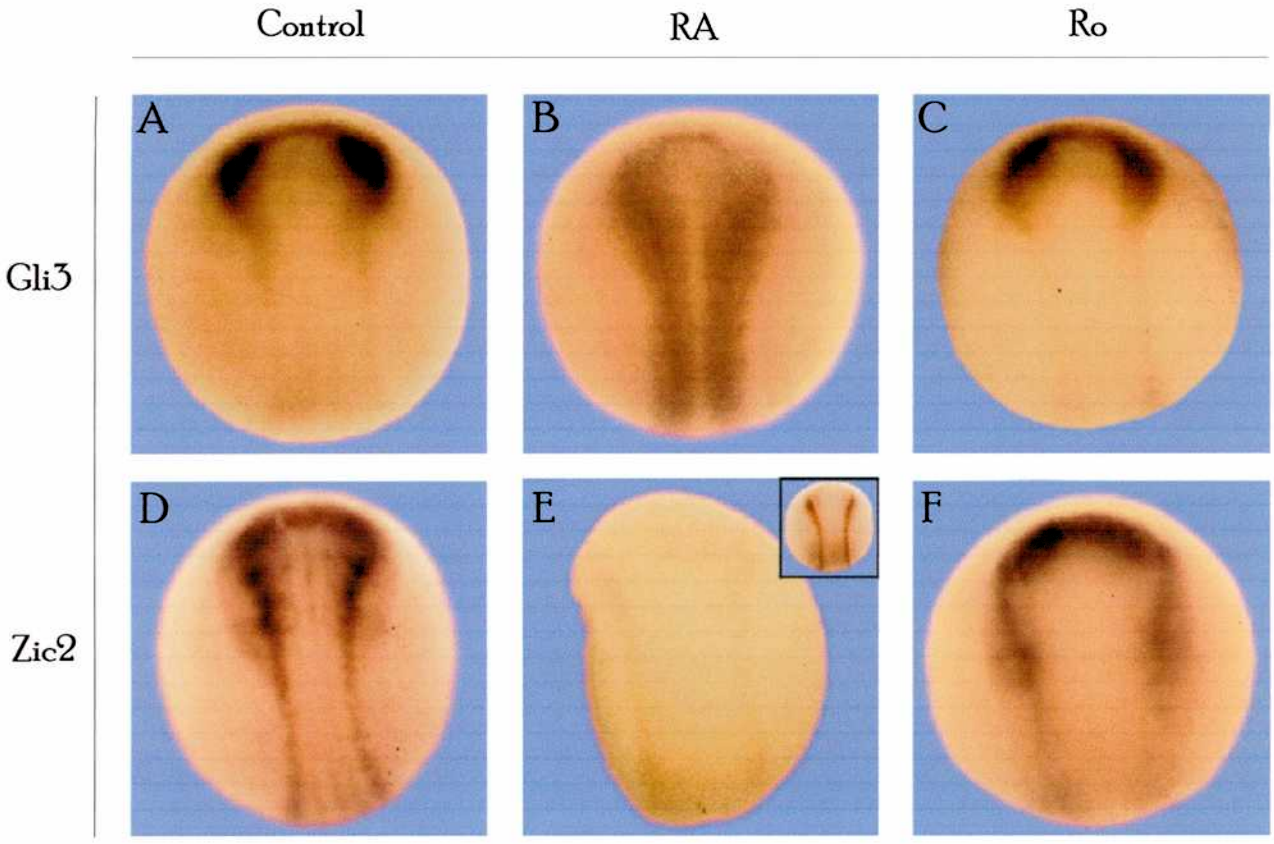


Figura 3.3. Efecto de los retinoides sobre la expresión de los genes de prepattern Gli3 y Zic2.
Se analizó por hibridización in situ la expresión de Gli3 (A-C) o Zic2 (D-F) en embriones control (A,D), o después del tratamiento con RA (B,E) o Ro (C,F). La exposición a RA resultó en una marcada expansión de Gli3 sobre el eje medio-lateral de la placa neural posterior y el dominio anterior de expresión se redujo marcadamente (B). El tratamiento con Ro mantuvo los bajos niveles de expresión de Gli3 observados en los embriones control (C). RA produjo una inhibición dosis- dependiente de la expresión de Zic2. Las dosis más elevadas de RA abolieron totalmente la expresión de Zic2 (E), mientras que las más bajas produjeron disminución del dominio posterior y pérdida del anterior (inserto en E). Tras el tratamiento con Ro se observó una dispersión de la expresión de Zic2 sobre el eje mediolateral de la placa neural posterior (F).

3.2.5. shh

Shh es una molécula de secreción expresada en estadío de néurula en la notocorda y en la placa del piso (Fig. 3.4 A) que participa del patrón dorsoventral del tubo neural induciendo células de la placa del piso y motoneuronas ventrales (Roelink y col., 1995). La inyección ectópica de shh reprime la transcripción de Gli3 en la placa neural (Ruiz i Altaba, 1998), sugiriendo un nexo entre shh y la neurogénesis primaria que aún no había sido explorado.

Estos resultados, junto con el hecho de que se ha descripto una secuencia RARE en el promotor de shh, nos llevaron a pensar que el RA podría estar ejerciendo parte de su efecto sobre la cascada de la neurogénesis a través de la regulación de la expresión de shh. Por esta razón se trataron embriones con RA y se analizó la expresión de shh por hibridización *in situ* en estadío de néurula.

Sorpresivamente, el tratamiento con RA produjo la pérdida de la señal de shh en la región anterior del embrión y una reducción de la expresión posterior (Tabla 13) (Fig. 3.4 B) evidenciando una relación entre ambas moléculas.

Secciones transversales de estos embriones revelaron que la señal disminuye tanto en la notocorda como en la placa del piso en los casos más extremos (Fig. 3.5 C) y en los embriones menos afectados sólo en la placa del piso (Fig. 3.5 B).

Tabla 13 *El tratamiento con RA inhibe la expresión de shh*

Concentración de RA (μM)	n	Expresión shh disminuída (%)
10 μM	23	100%

Contrariamente, el tratamiento con Ro produjo un aumento en la expresión de shh (Fig. 3.4 C), sugiriendo que la represión de shh por RA estaría mediada al menos en parte por RARα y/o RARβ.

Tabla 14 *El tratamiento con el antagonista Ro incrementa el nivel de expresión de shh*

Concentración de Ro (μM)	n	Expresión shh aumentada (%)
7.5 μM	8	38%

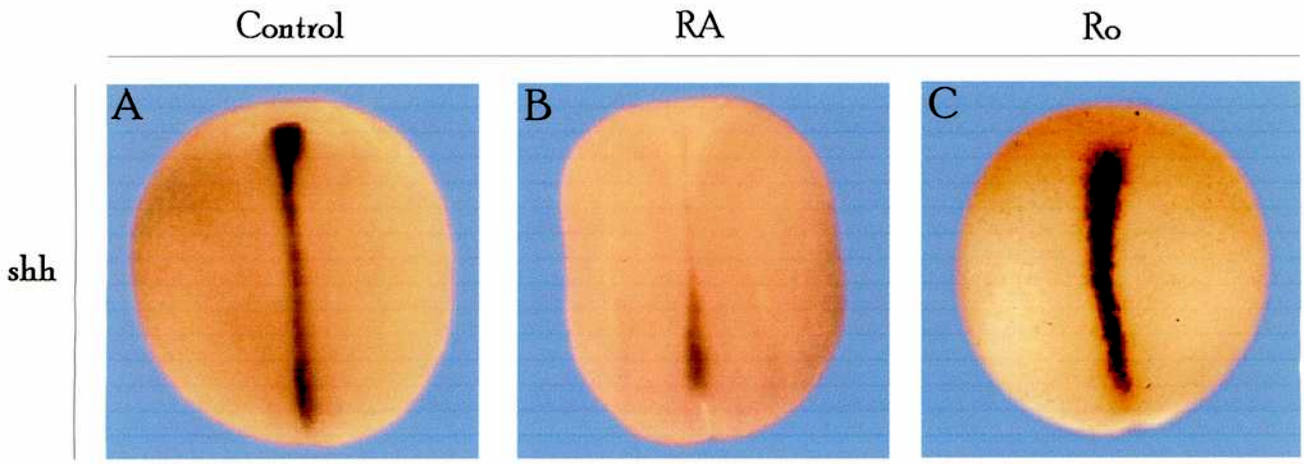


Figura 3.4. Efecto de la variación de la señal retinoide sobre la expresión de shh en estadío de néurula. Análisis por hibridización in situ de la expresión de shh en embriones control (A), tratados con RA (B) o Ro (C). Se observó una fuerte reducción a nivel posterior y supresión completa en la región anterior de la expresión de shh en respuesta al tratamiento con RA (B). Los embriones tratados con Ro mostraron un claro incremento de la señal de shh a lo largo de toda la línea media dorsal.

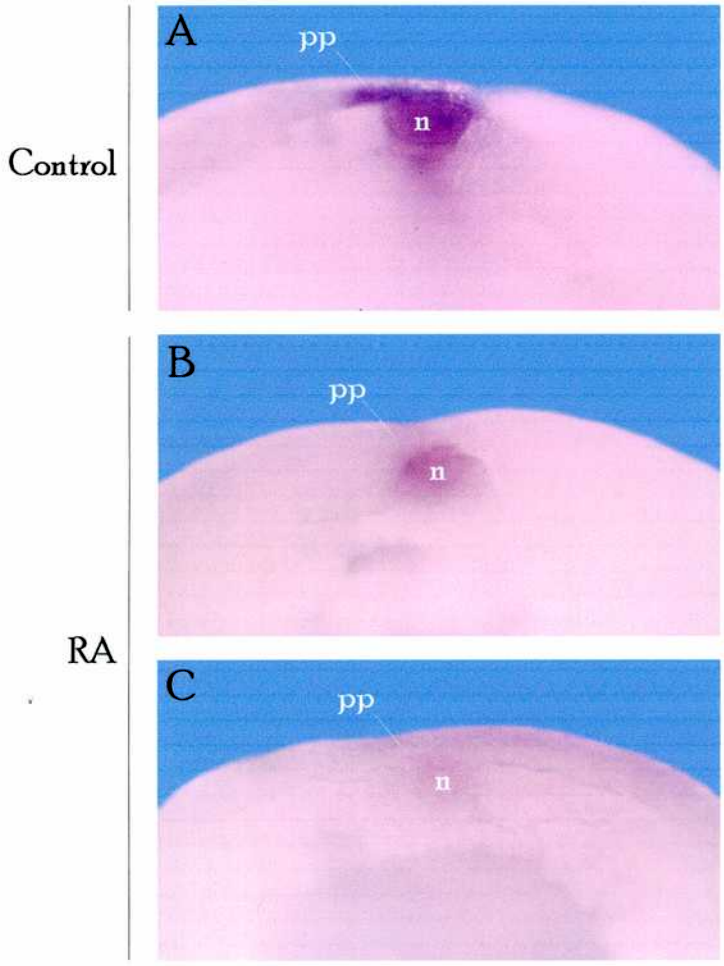


Figura 3.5. El tratamiento con RA inhibe la expresión de shh tanto en la placa del piso como en la notocorda. Cortes transversales a mano alzada de embriones control (A) o tratados con RA (B, C) en estadío de néurula (st. 14). Los embriones control muestran la expresión normal de shh en la placa del piso y notocorda (A). El tratamiento con RA produce en todos los casos la supresión de la expresión en la placa del piso (B). En los casos más severos se pierde además la expresión en la notocorda (C). Todos los cortes están orientados con la región dorsal hacia arriba. pp: placa del piso, n: notocorda.

El tratamiento con RA durante una ventana de tiempo acotada alrededor del estadío de gástrula temprana (est. 10) (ver materiales y métodos) también produjo los mismos resultados inhibitorios sobre la expresión de shh (Fig. 3.6) (72%, n= 32), mientras que el tratamiento con RA entre el estadío 12.5 y 15 no modificó su patrón de expresión (100%, n=8).

Podemos concluir que el tratamiento con RA al inicio de la gastrulación es suficiente para reprimir la expresión de shh y que esta regulación estaría mediada *in vivo*, al menos en parte, por RARα y/o RARβ.

Paralelamente, establecimos en el laboratorio, que la microinyección unilateral de ARNm de shh en embriones de *Xenopus* produce inducción de la expresión de Zic2 y disminución de la expresión de Gli3, X-ngnr-1 y N-tubulina (Franco y col., 1999; Paganelli, 2002). Estos efectos son opuestos a los obtenidos con RA e indican que ambas moléculas participan de la regulación de la cascada. Mientras el RA promueve la neurogénesis primaria, shh la reprime. Por lo tanto, la regulación negativa que el RA ejerce sobre la expresión de shh sugeriría que el efecto de RA sobre la cascada podría estar mediada por shh.

3.3. El RA no es capaz de rescatar el efecto inhibitorio de Notch-ICD, Zic2 o shh sobre la neurogénesis primaria.

Como la señal retinoide es capaz de regular la expresión de varios de los genes que participan de la neurogénesis, quisimos determinar a que nivel de la cascada neurogénica actúa. Con este fin se realizaron experimentos de rescate fenotípico mediante la microinyección de ARNm correspondiente a miembros de la cascada que se conoce producen represión de la expresión de N-tubulina y determinamos en estos embriones si el efecto inhibitorio podía ser revertido por el tratamiento con RA.

La estrategia experimental (Fig. 3.7) consiste en microinyectar embriones en estadío de dos células en una de las blastómeras con alguna de las moléculas que inhiben la neurogénesis e incubarlos en presencia o ausencia de RA. El lado inyectado puede compararse contra el lado control sin inyectar dentro del mismo embrión.

Las moléculas utilizadas en este experimento para reprimir la expresión de N-tubulina fueron, por un lado Zic2, que cuando se sobreexpresa inhibe la neurogénesis primaria (Brewster y col., 1998), por otro lado Notch ICD, una forma constitutivamente activa de Notch que dispara la inhibición lateral y reprime la diferenciación neuronal (Chitnis y col., 1995), y finalmente shh, que ha sido caracterizado como un inhibidor de la neurogénesis en nuestro laboratorio por A. Paganelli. Los ARNm correspondientes a estas tres moléculas inhibitorias se utilizaron para microinyectar unilateralmente embriones, que posteriormente fueron tratados con (Fig. 3.8 B, D, F) o sin (Fig. 3.8 A, C, E) RA, para determinar si RA es capaz de rescatar el fenotipo de N-tubulina en la mitad inyectada.

En embriones inyectados con Notch ICD sin tratar se observó inhibición de la expresión de N-tubulina en el lado inyectado (Fig. 3.8 A, 93%, n=11 para 1 ng de Notch ICD; 75%, n=14 para 0.5 ng de Notch ICD), y después del tratamiento con RA se mantuvo esta represión del lado inyectado (Fig. 3.8 B, 100%, n=10 para 1ng de Notch ICD + 10μM RA; 70%, n=10 para 1 ng Notch ICD + 1μM RA; 73%, n=11 para 0.5 ng Notch ICD + 10 μM RA; 100%, n=10 para 0.5 ng Notch ICD + 1μM RA). La sobreexpresión de Zic2 produce un efecto inhibitorio sobre la neurogénesis del lado inyectado (Fig. 3.8 C, 20%, n=22 para 2ng de Zic2; 15%, n=23 para 1 ng de Zic2) que siguió observándose cuando los embriones se trataron con RA (Fig. 3.8 D, 22%, n=23 para 1 ng de Zic2 + 10μM RA). Con shh se observó un efecto similar, los embriones sin tratar mostraron reducción de la expresión de N-tubulina del lado inyectado (Fig. 3.8 E, 17%, n=6 para 0.25 ng de shh), y después del tratamiento con RA se mantuvo esa inhibición (Fig. 3.8 F, 30%, n=10 para 0.25 ng de shh + 10μM RA). Por lo tanto, mientras que en la mitad sin inyectar se observa la inducción de la expresión de N-tubulina debida al tratamiento con RA (NIS, Fig. 3.8 B, D, F), el lado inyectado muestra en los tres casos expresión reducida o ausente de N-tubulina (IS, Fig. 3.8 B, D, F), por lo que concluímos que el RA no sería capaz de revertir el efecto inhibitorio de Notch-ICD, Zic2 o shh sobre la diferenciación neuronal.

Estos resultados sugieren que RA estaría actuando en la cascada neurogénica río arriba de shh, Zic2 y la inhibición lateral. En otras palabras, RA es incapaz de activar la expresión de N-tubulina cuando ésta ya está inhibida debido a un incremento en los niveles de shh, Zic2 o NotchICD.

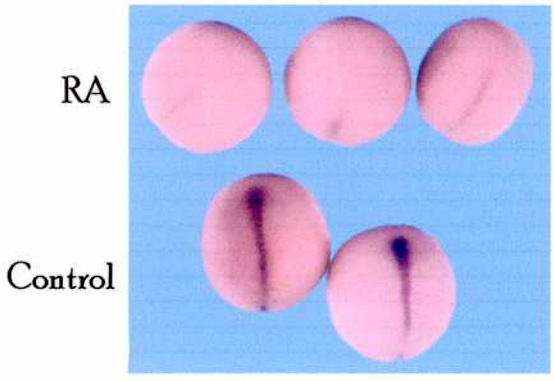


Figura 3.6. Un pulso de 30 minutos con RA alrededor del estadío 10 es suficiente para inhibir la expresión de shh en estadío de néurula.
Los tres embriones ubicados en la hilera superior corresponden a los tratamientos con RA, mientras que los dos embriones de la hilera inferior son controles. Et tratamiento con RA durante 30 minutos produce la reducción en la expresión de shh a lo largo de la línea media dorsal del embrión en estadío de néurula. Todos los embriones están orientados con la región anterior hacia arriba y son vistas dorsales.

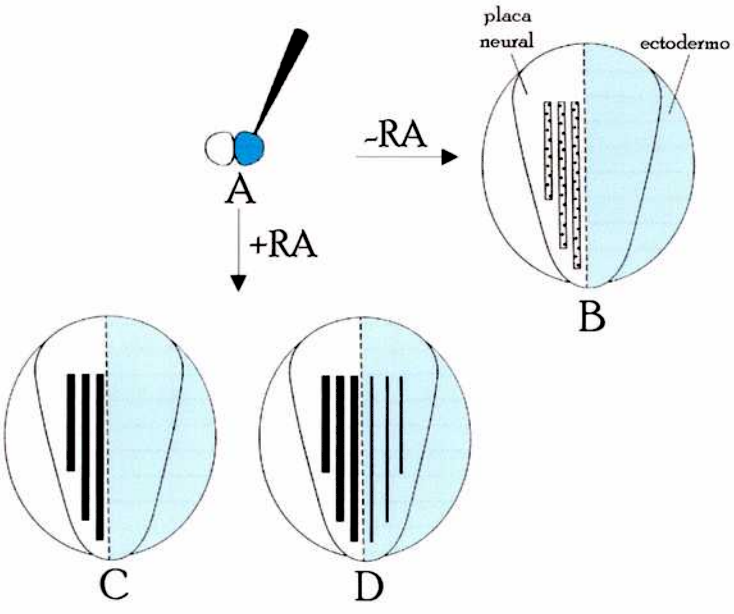


Figura 3.7. Esquema de la estrategia utilizada para realizar los experimentos de rescate fenotípico.
Los embriones en estadío de dos células (A) se inyectarán en una de las dos blastómeras con la molécula inhibitoria X coinyectada con βgalactosidasa (azul). Posteriormente se incubarán en ausencia (-RA) o en presencia de RA (+RA) durante la gastrulación y se analizarán por hibridización in situ para N-tubulina en estadío de néurula. La mitad del embrión sin inyectar (blanca) se utiliza como control dentro del mismo embrión. Los embriones inyectados con X, pero sin tratar con RA (B), presentarán un patrón normal de N-tubulina del lado sin inyectar (mitad blanca) y reducción de la expresión del lado inyectado (mitad azul). Por otro lado, los embriones inyectados con X y tratados con RA, mostrarán del lado sin inyectar (blanco) el efecto inductor del RA sobre la formación de las neuronas primarias, mientras que del lado inyectado (azul) podrán desarrollar una de dos alternativas (C, D). Una posibilidad es que la mitad inyectada con la molécula X (azul) mantenga la inhibición a pesar del tratamiento, en cuyo caso concluiremos que RA no es capaz de rescatar el fenotipo de N-tubulina (C). Alternativamente, el reestablecimiento de la expresión de N-tubulina indicaría que RA puede rescatar el efecto que X produce sobre la neurogénesis (D).

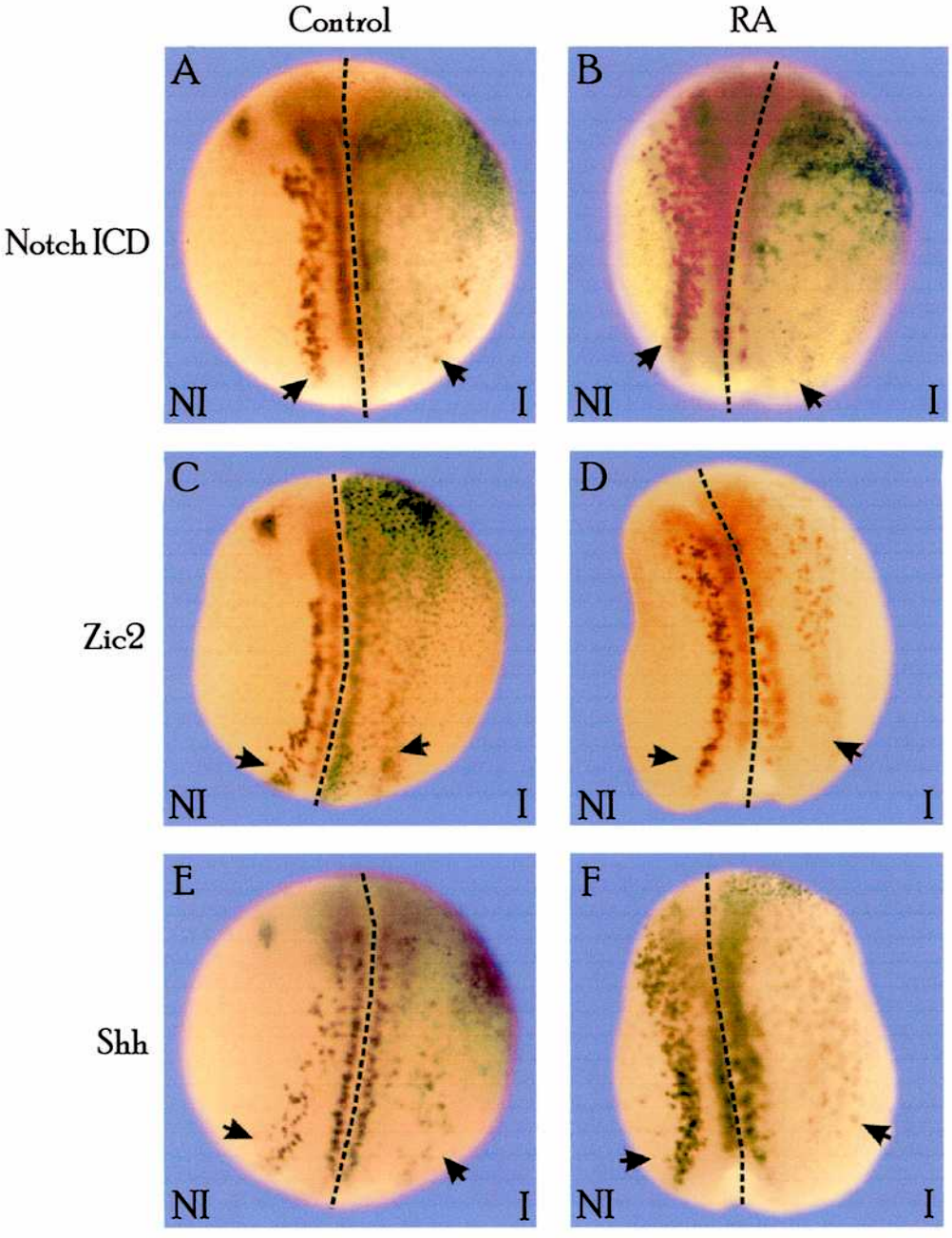


Figura 3.8. RA actúa por encima de la inhibición lateral, Zic2 y shh en la cascada de la neurogénesis primaria.
Los embriones fueron coinyectados unilateralmente con ARNm de nβgal como trazador junto con ARNm de Notch ICD (A-B), Zic2 (C, D) o shh (E, F) y se dejaron desarrollar sin tratamiento (A, C, E) o se incubaron durante la gastrulación con RA (B, D, F). Se reveló la distribución del ARNm de N-tubulina por hibridización in situ en estadío de néurula. Todas son vistas dorsales con la región anterior hacia arriba. Las flechas marcan las bandas de neuronas sensoriales. Tanto la inyección de Notch ICD (A), la de Zic2 (C), como la de shh (E) producen una reducción en la expresión de N-tubulina. Todos los embriones tratados con RA (B, D, F) muestran el aumento previamente descripto en la expresión de N-tubulina del lado no inyectado. Sin embargo, en estos embriones no se produce del lado inyectado el rescate de la expresión de N-tubulina en ninguno de los tres casos (B, D, F). Línea de puntos: línea media dorsal, I: lado inyectado (tinción azúl), NI: lado no inyectado.

3.4. Participación de los receptores de retinoides en la regulación de la cascada de la neurogénesis primaria y su asociación con shh

Las principales estrategias utilizadas históricamente para analizar la función de la vitamina A durante el desarrollo embrionario han sido el tratamiento con exceso o depleción de RA, y estudios de sobreexpresión o anulación génica de los receptores de retinoides, sin embargo, nuevos modelos se están desarrollando para estudiar más profundamente los eventos del desarrollo que dependen de los retinoides.

La relación hallada entre el RA, shh y la neurogénesis primaria nos llevó a evaluar, empleando otras metodologías diponibles, la participación de los diferentes receptores de retinoides en la regulación que el RA ejerce sobre esta vía. Por un lado, empleando una aproximación farmacológica, bloqueamos o activamos distintos subtipos de receptores de retinoides con agonistas o antagonistas sintéticos. En segundo lugar, interferimos con la función de una isoforma de receptor mediante una estrategia de dominancia negativa y finalmente, utilizando oligos morfolinos antisentido, estudiamos el bloqueo de la traducción de isoformas específicas de los receptores.

Algunos trabajos previos demostraron que la señal mediada por los receptores de retinoides es requerida para la formación de las neuronas primarias. La coinyección de RXRβ y RARα2 produce neuronas primarias ectópicas (Sharpe y Goldstone, 1997), mientras que el bloqueo de la función de RARα por dominancia negativa resulta en la reducción o pérdida de neuronas primarias (Blumberg y col., 1997; Sharpe y Goldstone, 1997; 2000).

3.4.1. La inducción de la neurogénesis primaria, así como la inhibición de la expresión de shh están mediados por los receptores RAR, en particular RARα

Para comprender con mayor profundidad el rol que los retinoides juegan durante el desarrollo neural y determinar cuales son los receptores que participan

de la regulación de la expresión de shh y la cascada neurogénica, en primer lugar utilizamos una aproximación farmacológica mediante el bloqueo o la activación específica de los distintos subtipos de receptores de retinoides utilizando agonistas o antagonistas. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Blumberg quien ha caracterizado varios de estos compuestos sintéticos.

La activación de los receptores se realizó tratando a los embriones con el agonista general de RAR, TTNPB (Zavacki y col., 1997; Blumberg y Evans, 1998; Klein y col., 1996), y el de RXR, Lg268 (Love y col., 2002).

Para el bloqueo de los receptores se utilizaron dos clases de antagonistas específicos que difieren en su habilidad de afectar la transcripción basal: los antagonistas neutrales, que simplemente bloquean la capacidad de RAR de unirse al RA, resultando en la pérdida de activación (Klein y col., 1996) y los agonistas inversos que también bloquean la interacción con RA, pero además estabilizan el complejo receptor- correpresor (Klein y col., 1996, 2000), llevando a la represión de la transcripción basal a partir de los promotores a los que se une RAR.

En este estudio, se utilizaron el antagonista neutral selectivo para RARα, 194301 y el agonista inverso de los RAR, 193109 (Johnson y col., 1995, Klein y col., 1996; Koide y col., 2001, Soprano y col., 2001). Se ha demostrado previamente que la interacción de estos compuestos sintéticos con el RAR no impide la formación de los heterodímeros con los RXR, ni afecta el pegado al ADN (Klein y col., 2000).

Después de cada tratamiento, se estudió la expresión de algunos de los miembros de la cascada de la neurogénesis primaria para establecer, en primer lugar las consecuencias de la alteración en la expresión de cada tipo de receptor, en segundo lugar, confirmar los resultados obtenidos con RA y Ro y finalmente para determinar cuál o cuáles son los receptores que median estos efectos.

El tratamiento con TTNPB (agonista RAR) produjo un incremento en la expresión de N-tubulina, aunque no tan marcado como con RA (Fig. 3.9 K) (83%, n=12 para 10^{-6} M; 53%, n=19 para 10^{-8} M). La diferencia en la intensidad de respuesta podría deberse a su menor afinidad por el receptor y potencia de acción de este compuesto con respecto al RA.

Similarmente, en los embriones tratados con TTNPB, la expresión de X-ngnr-1 se incrementó en niveles similares a los obtenidos con RA (Fig. 3.9 L)

(80%, n=15 para 10^{-6} M). Estos resultados sugieren que el aumento en la señal mediada por los receptores RARs es suficiente para producir la activación de la diferenciación neuronal terminal.

La expresión de Gli3 también aumentó en la placa neural posterior después del tratamiento con este agonista del mismo modo que con RA (Fig. 3.9 M) (100%, n= 18 para 10^{-6} M), aunque el dominio anterior de expresión de Gli3 no se vio afectado en estos embriones. Sin embargo, la señal de Zic2 no disminuyó tras el tratamiento con TTNPB como se esperaba (Fig. 3.9 N) (100% expresión normal, n=13 para 10^{-6} M). Esta falta de fenotipo en el patrón de Zic2 podría deberse a la moderada reducción observada en el patrón de expresión de shh tras el tratamiento con TTNPB, en comparación con la fuerte reducción obtenida con RA (Fig. 3.9 O) (100%, n=14 para 10^{-6}M).

Estos resultados en conjunto muestran que la activación de los receptores RAR utilizando un agonista diferente produce resultados similares al RA sobre la expresión de los marcadores más tardíos de la cascada neurogénica y efectos más leves sobre los marcadores más tempranos.

Por otro lado, el tratamiento con Lg268, un agonista de los RXR, produjo un incremento en la expresión de N-tubulina y X-ngnr-1, sugiriendo que la activación de los RXRs también es suficiente para producir la activación de la diferenciación neuronal. (Fig. 3.9 P-Q) (N-tubulina, 100%, n=13 para 10^{-6} M, 80%, n=20 para 10^{-8} M; X-ngnr-1, 100%, n=15 para 10^{-6} M).

La expresión de Gli3 se incrementó levemente en los embriones tratados con el agonista RXR (Lg268) al igual que con RA (Fig. 3.9 R) (100%, n=17 para 10^{-6} M). Sin embargo, la expresión de Zic2, contrariamente a lo que se obtuvo con RA, se incrementó tanto en los dominios anterior como posterior de la placa neural (Fig. 3.9 S) (85%, n=20 para 10^{-6} M). El tratamiento con Lg268 tampoco produjo cambios sobre la expresión de shh (Fig. 3.9 T) (85% sin cambio, 10% disminución, n=15 para 10^{-6} M), sugiriendo que la activación de los receptores RXR no es suficiente para reproducir los efectos del RA sobre la expresión de los marcadores más tempranos de la cascada.

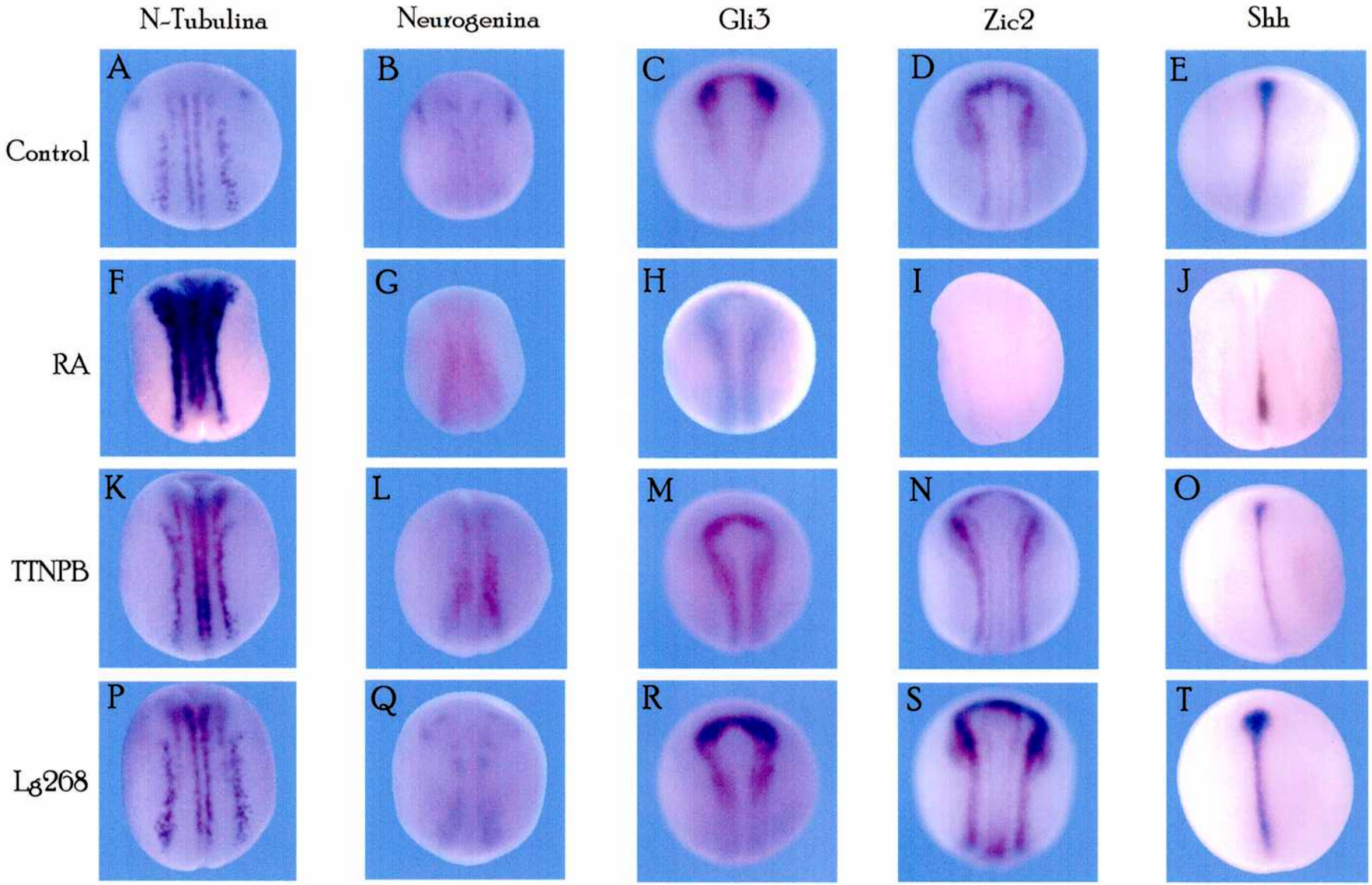


Figura 3.9. Efecto del tratamiento con agonistas de los receptores de retinoides sobre la neurogénesis primaria.
Hibridización in situ para diferentes marcadores de la cascada de la neurogénesis primaria en embriones tratados con TTNPB (agonista RAR)(K-O) y Lg268 (Agonista RXR)(P-T) en estadío de néurula. Estos resultados fueron comparados con embriones sin tratar (A-E) o tratados con RA (F-J). Los marcadores estudiados fueron N-tubulina (A,F,K,P); Neurogenina (B,G,L,Q); Gli3 (C,H,M,R); Zic2 (D,I,N,S) y Shh (E,J,O,T).

Cuando se bloqueó la señal mediada por los RARs utilizando el agonista inverso 193109 así como cuando se bloqueó solamente el receptor RARα con el antagonista 194301, la expresión de N-tubulina se inhibió de una manera comparable con el tratamiento con Ro como era esperado (Fig. 3.10 K, P) (100%, n=12 para 10^{-6} M de 193109; 70%, n=23 para 10^{-8} M de 193109; 100%, n=11 para 10^{-6} M de 194301; 100%, n=20 para 10^{-8} M de 194301). La expresión de X-ngnr-1 disminuyó levemente en intensidad y se produjo un ensanchamiento de la expresión y una mayor separación entre las bandas al igual que con Ro (Fig. 3.10 L, Q) (100%, n= 20 para 10^{-6} M de 193109; 100%, n=10 para 10^{-6} M de 194301). Estos resultados muestran en líneas generales que los tres antagonistas (Ro, 194301 y 193109) producen efectos inhibitorios similares sobre la neurogénesis, sugiriendo que la inducción de N-tubulina y X-ngnr-1 generada por el RA está, al menos en parte, mediada por los receptores RAR y específicamente los RARα.

La anulación de la señal mediada por todos los RAR, utilizando el agonista inverso 193109 y de RARα, con el antagonista 194301 generó, contrariamente a lo esperado, un aumento en la expresión de Gli3 tanto en la región posterior de la placa como en la anterior, produciendo resultados contradictorios con respecto a los generados por Ro (Fig. 3.10 M, R) (100%, n=16 para 10^{-6} M de 193109; 100%, n=20 para 10^{-6} M de 194301).

Tanto el tratamiento con 193109 como con 194301 aumentaron marcadamente la expresión de Zic2 (Fig. 3.10 N, S) y shh (Fig. 3.10 O, T) (Zic2, 70%, n=23 para 10^{-6} M de 193109; 85%, n=20 para 10^{-6} M de 194301; shh, 100%, n=14 para 10^{-6} M de 193109; 63%, n=19 para 10^{-6} M de 194301). En ambos casos, esta inducción fue mucho más efectiva que con Ro. Estos resultados sugieren que el control inhibitorio que ejerce el RA sobre la expresión de Zic2 y shh estaría mediado al menos en parte por los receptores RAR y en particular por RARα.

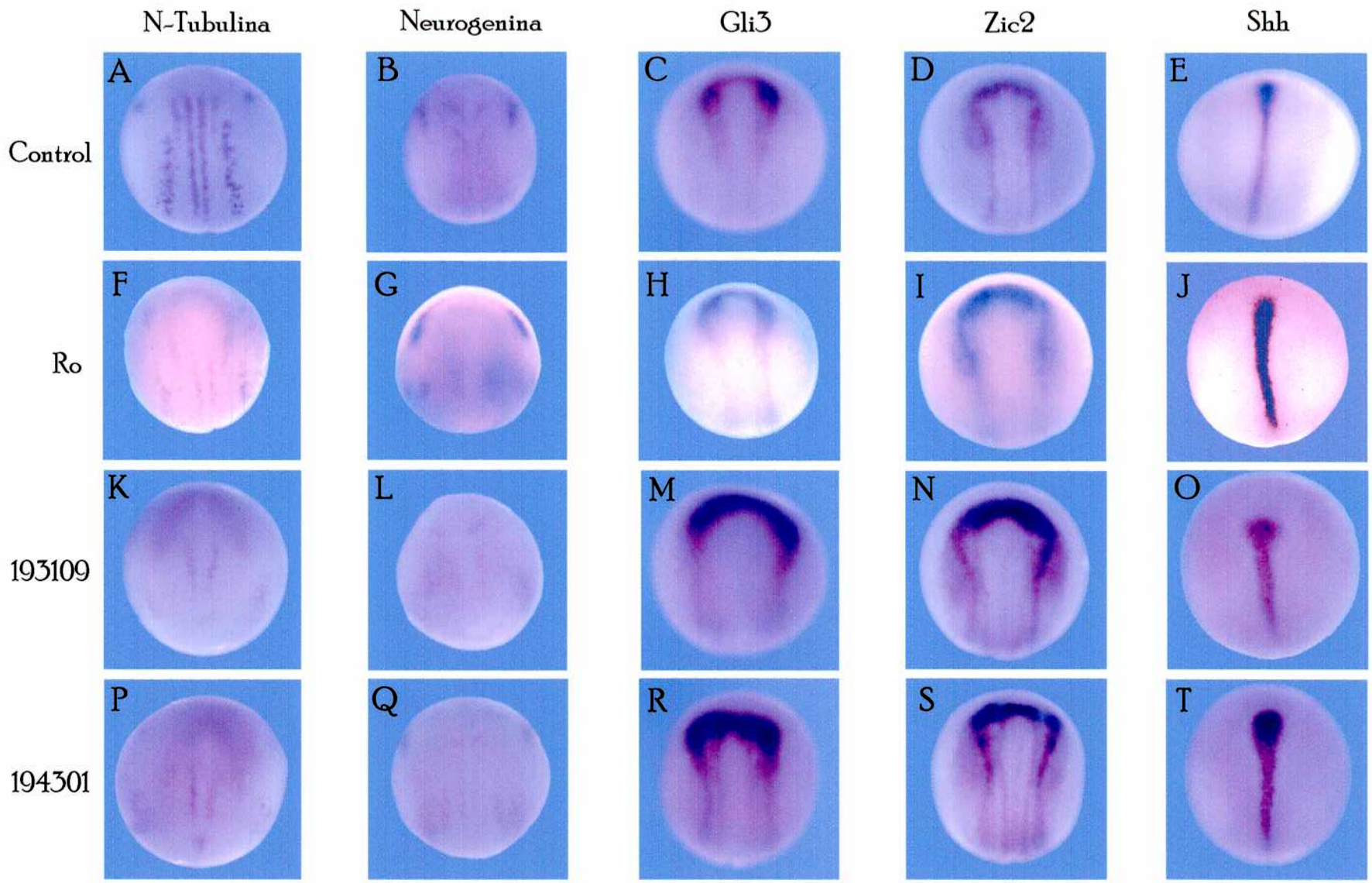


Figura 3.10. Efecto del tratamiento con antagonistas de los receptores de retinoides sobre la neurogénesis primaria.
Embriones control (A-E), tratados con Ro (F-J), con 193109 (K-O) o con 194301 (P-T) fueron procesados para hibridización in situ con distintos marcadores de la neurogénesis primaria, N-tubulina (A,F,K,P), Neurogenina (B,G,L,Q), Gli3 (C,H,M,R), Zic2 (D,I,N,S) y Shh (E,J,O,T) en estadío de néurula. Todos los embriones están orientados con la región anterior hacia arriba y son vistas dorsales.

3.4.2. La anulación funcional de RARα1 aumenta la expresión de shh

Para estudiar más profundamente el nuevo nexo hallado entre RA y shh en relación con la neurogénesis primaria, y basados en el hecho de que la inhibición de la expresión de shh parecería estar mediada por el receptor RARα, realizamos experimentos en los que la señal mediada por RARα1 se anuló por microinyección de una construcción dominante negativa capaz de competir por los blancos endógenos (Fig. 3.11).

Esta estrategia se basa en la utilización de un receptor truncado en la región de transactivación (dominante negativo: RARα1 405*), capaz de unirse al ligando y heterodimerizar con los RXR, pero incapaz de producir activación transcripcional, compitiendo de este modo con los receptores endógenos normales.

Se ha demostrado previamente que la sobreexpresión de RARα1 405* en embriones de *Xenopus* produce una reducción en el número de neuronas N-tubulina positivas en la placa neural (Blumberg y col., 1997). Utilizando este modelo como control, microinyectamos unilateralmente embriones con ARNm codificante para esta versión dominante negativa de RARα1 (RARα1 405*) y observamos la disminución de la expresión de N-tubulina esperada en la mitad inyectada (Fig. 3.12 C) (94%, n=31 para 0.5 ng). Cuando se inyectaron embriones con esta misma construcción, pero en ambas blastómeras, y se analizó el patrón de shh por hibridización *in situ*, se observó un aumento de la expresión coincidente con los resultados obtenidos con el tratamiento farmacológico de los embriones con antagonistas de los receptores de retinoides (Fig. 3.12 F) (100%, n=30 para 0.5 ng).

No se observaron cambios en la expresión de N-tubulina ni de shh cuando los embriones fueron inyectados con RNAm de nβgal (Fig. 3.12 A,D) o de una versión inactiva del receptor RARα, RARα2 386* (Fig. 3.12 B,E) (N-tubulina, 100%, n=50 para 0.5 ng de RAR386*; 100%, n= 52 para 0.5 ng de nβgal; shh, 100%, n= 46 para 0.5 ng de RARα2 386*; 100%, n=32 para 0.5 ng de nβgal).

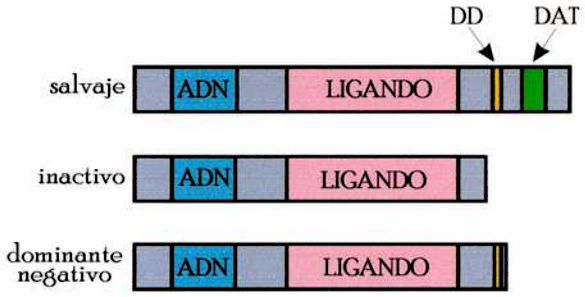


Figura 3.11. Esquema de las construcciones utilizadas en este estudio.
El diagrama muestra la estructura del receptor RARα salvaje, la versión inactiva que carece de los dominios de dimerización y activación transcripcional, y el dominante negativo que carece sólo del dominio de activación transcripcional. Como el receptor inactivo no es capaz de dimerizar, no puede unirse al DNA. En cambio, el dominante negativo se dimeriza y se une al DNA, pero no produce transactivación del gen blanco, compitiendo de este modo con el receptor salvaje endógeno. ADN: dominio de unión al ADN, LIGANDO: dominio de unión al ligando, DD: dominio de dimerización, DAT: dominio de activación transcripcional.

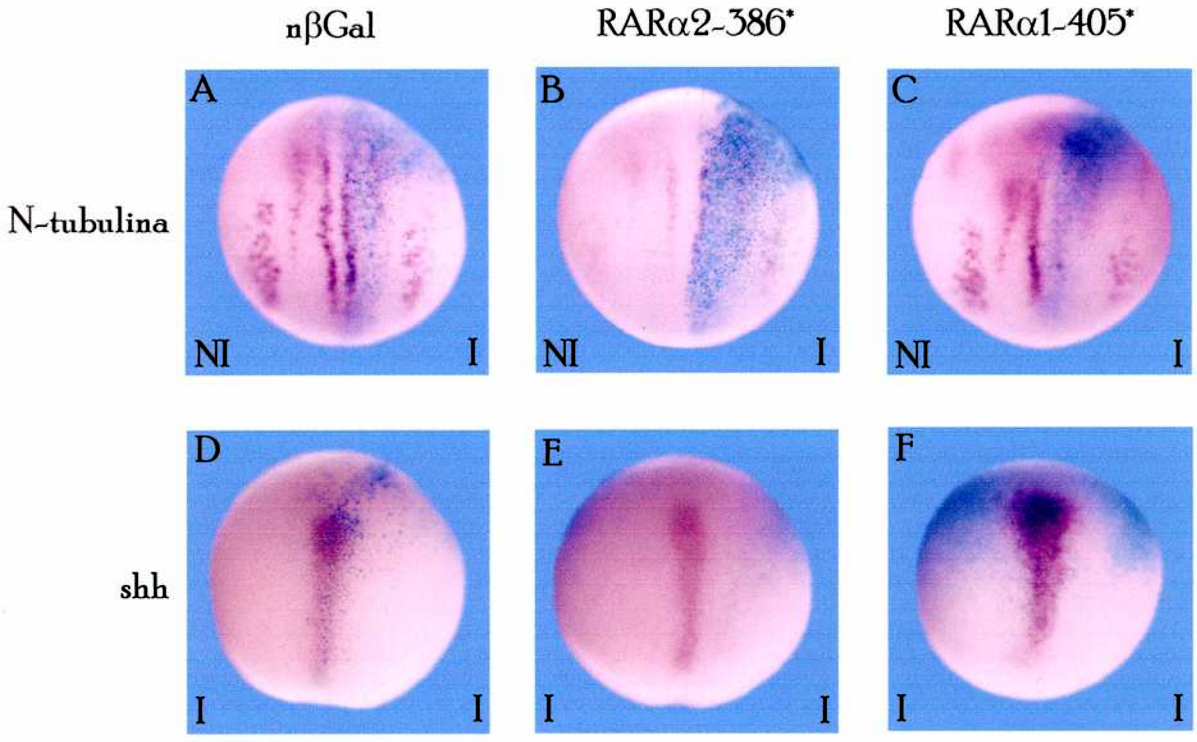


Figura 3.12. El dominante negativo de RARα1 (RARα1-405*) induce la expresión de shh.
Análisis por hibridización in situ de embriones en estadío de néurula para los marcadores N-tubulina (A-C) o shh (D-F). La inyección de mRNA codificante para nβgal (A, D), el receptor inactivo RARα2-386* (B, E), o el dominante negativo RARα1-405* (C, F) se realizó en estadío de dos blastómeras en una de las células, en el caso del análisis para N-tubulina, o en ambas, en los embriones donde se estudió la expresión de shh. El color azul indica actividad de βgalactosidasa. El análisis de N-tubulina se llevó a cabo como un control de la función de la construcciones inyectadas y arrojó resultados coincidentes con los publicados previamente. Tanto la inyección unilateral de nβgal (A), como la del receptor inactivo RAR386* (B) no produjeron cambios sobre la expresión de N-tubulina del lado inyectado, mientras que la expresión del receptor dominante negativo RARα1-405* (C) produjo inhibición. El análisis de la expresión de shh, muestra un claro aumento de la señal en respuesta a la inyección de RARα1-405* (F), mientras que los controles nβgal (D) o RARα2-386* (E) no mostraron alteraciones con respecto a embriones sin inyectar. I: lado inyectado, NI: lado no inyectado.

3.4.3. El bloqueo de la síntesis de RARγ aumenta la expresión de shh

Una nueva aproximación experimental surgida recientemente ha sido de gran utilidad para el estudio de la función génica. Esta metodología consiste en la utilización de un oligonucleótido antisentido denominado "morfolino" (Mo), que es capaz de unirse e inactivar secuencias específicas de ARN (Summerton, 1999, Ekker, 2000, Heasman y col., 2000).

Los "morfolinos" se componen de 4 unidades diferentes, cada una conteniendo una de las cuatro bases (A,C,G,T) unida a un anillo "morfolino". Se sintetizan de 18 a 25 unidades de longitud y se diseñan complementarios a la región ubicada alrededor del sitio de iniciación de la traducción, incluyendo el codón AUG. Son sumamente estables, resistentes a degradación por nucleasas, específicos, no son tóxicos y su alta efectividad para bloquear la traducción a partir de los ARNm se debe exclusivamente a un mecanismo de bloqueo estérico.

En el laboratorio del Dr. Blumberg se diseñaron "morfolinos" específicos contra RARα1, RARα2.1, RARα2.2, RARγ1 y RARγ2 y se estudió su efectividad corroborando *in vitro* la inhibición de la expresión del ARNm correspondiente. Experimentos preliminares basados en el análisis del desarrollo A-P del embrión, demostraron que la microinyección de MoRARα1 y de MoRARα2.2 producen en estadío 38, fenotipos muy similares entre sí. Las estructuras anteriores incluyendo la glándula de cemento se reducen o se pierden completamente, mientras que las estructuras de la cola no se ven particularmente afectadas. Este fenotipo posteriorizado con ausencia de desarrollo cefálico es muy similar al producido por el tratamiento con RA y puede ser rescatado por coinyección con el receptor salvaje correspondiente. (Koide y col., 2001 y comunicación personal del Dr. Blumberg). Esta contradicción que muestra similitud en los fenotipos producidos por el aumento en los niveles de RA y la anulación de la síntesis de los receptores RARα1 y RARα2.2, refleja el requerimiento de una represión activa mediada por estos dos receptores sin interacción con el ligando para el establecimiento de las estructuras cefálicas (Koide y col., 2001). En contraste, MoRARγ1 produce un acortamiento sustancial del eje corporal del embrión, y aunque son similares a nivel del efecto de reducción de las estructuras cefálicas, la mayoría de los embriones presentan glándula de cemento. No se obtuvieron fenotipos del eje A-P con MoRARα2.1 o MoRARγ2 (comunicación personal).

Para confirmar nuestros resultados con shh, aplicamos esta novedosa estrategia utilizando los "morfolinos" correspondientes a RARα2.2 y RARγ1 gentilmente provistos por el Dr. Blumberg. La inyección unilateral de 5 ng o 10 ng de MoControl o MoRARα2.2 no produjo cambios en la expresión de shh (Fig. 3.13 A, B) (MoControl, 100%, n= 24 para 5 ng; MoRARα2.2, 94%, n= 32 para 5 ng). Por otro lado, los embriones inyectados con 5 ng de MoRARγ1 muestran un marcado aumento en la expresión de shh (Fig. 3.13 C) (77%, n= 13), mientras que una dosis de 10 ng no fue tolerada por los embriones.

Estos resultados muestran que la inhibición específica de la síntesis de RARγ1 es suficiente para que se active la expresión de shh en la línea media, mientras que no ocurre lo mismo con la isoforma RARα2.2.

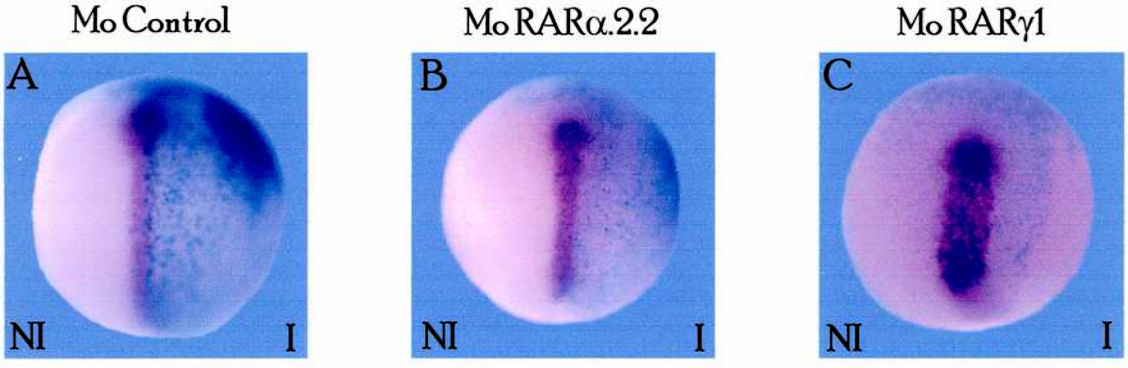


Figura 3.13. La inyección de un morfolino que bloquea de la traducción del receptor RARγ1 induce la expresión de shh en estadío de néurula..
Hibridización in situ para shh de embriones inyectados con Mo control (Mo control)(A), el morfolino de RARα2.2 (Mo RARα2.2)(B), o el morfolino de RARγ1 (Mo RARγ1)(C). La inyección de un morfolino control no alteró la expresión de shh respecto de embriones sin inyectar (A). Aunque la inhibición de la síntesis de RARα2.2 no produjo cambios sobre el patrón de shh (B), el bloqueo de RARγ1 indujo fuertemente su expresión (C). I: lado inyectado, NI: lado no inyectado.

4. DISCUSIÓN

Para determinar los efectos de los retinoides *in vivo* en la placa neural posterior, examinamos en este trabajo su rol en la diferenciación neuronal, evaluando en embriones intactos la modificación de la expresión génica en respuesta al tratamiento con RA.

4.1. La señal retinoide determina el número de neuronas primarias que se formarán en el neuroectodermo

La placa neural está dividida en un dominio anterior y uno posterior que difieren en su ritmo de diferenciación neuronal. En el dominio anterior, que incluye el cerebro anterior y medio prospectivos, la diferenciación neuronal no ocurre hasta después del cierre del tubo neural, mientras que en el dominio posterior, que abarca el cerebro posterior y la médula, las neuronas primarias son detectadas en la placa neural poco después de la gastrulación.

Trabajos previos han demostrado que el RA controla el momento de la diferenciación neuronal tanto en la placa neural anterior de embriones enteros como en explantes neuralizados (Papalopulu y Kintner, 1996). Estos resultados nos llevaron a preguntarnos si el tratamiento con RA podría modificar la expresión genética en el dominio posterior de la placa neural donde normalmente ocurre la neurogénesis primaria.

Con el objeto de estudiar el rol de los retinoides durante la neurogénesis primaria, hemos analizado en embriones enteros, la expresión de diferentes genes involucrados en la cascada neurogénica en respuesta al tratamiento con RA. Determinamos que un incremento en la concentración de RA durante la gastrulación produce la inducción de la expresión de N-tubulina tanto en los dominios anterior como posterior de la placa neural *in vivo* y en contraste, el tratamiento con el antagonista de los receptores RARα y parcialmente de RARβ, Ro41-5253 (Ro), produce una disminución en la expresión de N-tubulina. Estos resultados sugieren, por un lado, que la señal retinoide es suficiente para que un mayor número de precursores neuronales expresen marcadores de diferenciación neuronal en la placa neural, y por otro, que esta regulación estaría mediada *in vivo* al menos en parte por los receptores RARα y/o RARβ.

Resultados similares se reportaron para la inyección de formas dominantes negativas de RARα1 (Blumberg y col., 1997) y RARα2 (Sharpe y Goldstone, 1997) que bloquean la vía de señalización del RA y producen la pérdida de neuronas primarias y la reducción en la expresión de N-tubulina. Otros resultados mostraron que la coinyección de ARNm sintéticos codificantes para RARα y RXRβ salvajes resultó en un mayor número de neuronas primarias, amplificándose el efecto con el agregado de RA y sugiriendo que el aumento en la señalización retinoide promueve la inducción del número de células que sufren neurogénesis primaria (Sharpe y Goldstone, 2000). En el mismo sentido, el tratamiento con citral, un inhibidor de la síntesis de RA, suprime la formación de neuronas primarias que expresan N-tubulina confirmando por una vía diferente la relación de los retinoides con la neurogénesis (Sharpe y Goldstone, 2000).

La inducción de neuronas primarias debida al aumento en la señal retinoide no se produce en el ectodermo no neural, mostrando que el RA necesita de la interacción con otros factores localizados específicamente en la placa. Dentro de la placa neural, la expresión de N-tubulina no se induce homogéneamente en todo el territorio, sino que aumenta a partir de los dominios normales de expresión. La distribución en la placa neural de co-activadores y co-represores que median la señal retinoide aún no se conoce pero podría explicar la respuesta diferencial dentro del neuroectodermo.

4.2. El aumento de neuronas primarias producido por RA no es debido a cambios en la proliferación o la muerte celular programada sino a su efecto sobre la diferenciación

La diferenciación, proliferación y muerte celular programada de las células neurales son rasgos fundamentales del desarrollo del SNC de vertebrados. El RA se conoce como un regulador de la diferenciación en varias líneas celulares y también actúa en el control de la proliferación celular y la apoptosis en varios sistemas (Chiba y col., 1997, Maden y col., 1997).

En base a estos antecedentes, quisimos evaluar si el aumento en el número de neuronas primarias observado después del tratamiento con RA se debía a una

mayor diferenciación neuronal de las células de la placa o si era la consecuencia de un incremento del número de células en general. Existen dos mecanismos posibles para producir un aumento en la cantidad de células: inducción de la proliferación o disminución de la muerte celular programada.

La división celular en *Xenopus* puede ser rápida y efectivamente bloqueada con una mezcla de hidroxiurea y afidicolina (HUA) sin afectar la diferenciación (Harris y Hartenstein, 1991). Trabajos previos muestran en embriones coinyectados con ARNm de RAR y RXR, que la formación de neuronas primarias no depende de un incremento en la proliferación de los precursores, ya que las células positivas para N-tubulina se inducen cuando estos embriones se cultivan en HUA (Sharpe y Goldstone, 1997).

Llevamos a cabo un análisis similar realizando un tratamiento con HUA para examinar la contribución de la proliferación celular al fenotipo producido por el RA. Se estudió la expresión de N-tubulina por hibridización *in situ* en estadío de néurula temprana (est. 13), momento en que comienza a expresarse este marcador. En embriones control se observó el patrón de expresión incipiente de N-tubulina característico de este estadío (Fig. 4.1 A). Cuando los embriones se cultivaron en presencia de HUA, la expresión de N-tubulina no se vió afectada en comparación con el control debido a que el bloqueo de la división celular en estos estadíos no altera significativamente los procesos de diferenciación celular (Fig. 4.1 B) (100%, n=4). El tratamiento con RA produjo, al igual que en las néurulas más avanzadas, un aumento en el número de neuronas (Fig. 4.1 C) (100%, n=16). Cuando se realizó el tratamiento con una combinación de RA y HUA también se observó una inducción en la expresión de N-tubulina (Fig. 4.1 D) (100%, n=8), sugiriendo que el incremento en el número de neuronas primarias producido por RA no es debido a un aumento en la proliferación de los precursores neurales, ya que en estos embriones se induce la N-tubulina a pesar de estar bloqueada la división celular.

Paralelamente, se evaluó el posible rol inhibitorio del RA sobre la apoptosis en la placa neural analizando el patrón de tinción por la técnica de TUNEL en estadío de néurula (est. 14). Nuestros resultados muestran que la muerte celular programada no sólo no fue inhibida por el tratamiento con RA, sino que se observó aumento en el número de células marcadas (Fig. 4.2 B) con respecto al control (Fig. 4.2 A) (var materiales y métodos).

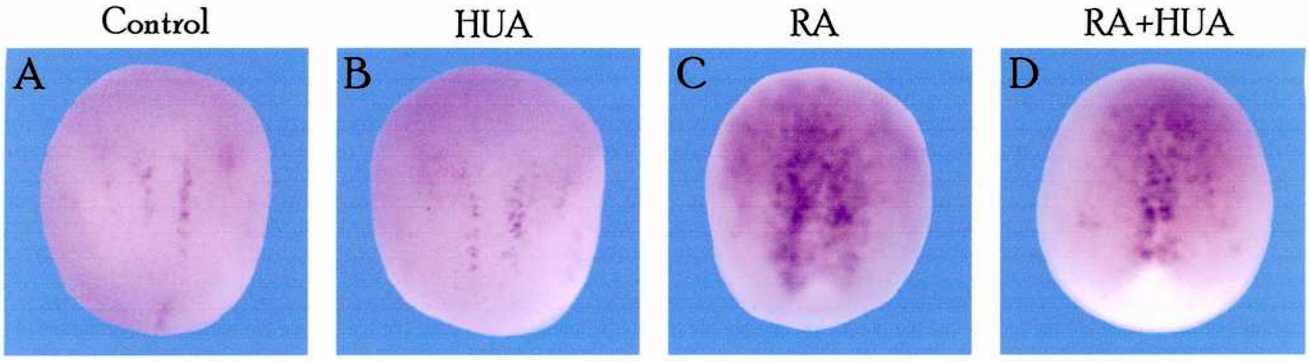


Figura 4.1. RA induce la expresión de N-tubulina sin involucrar un aumento en la proliferación celular.
Embriones en estadío 9-10, se trataron con DMSO (Control), HUA, RA o una combinación de RA+HUA y se analizaron por hibridización in situ para N-tubulina en estadío 13. (A) Expresión incipiente de N-tubulina en estadío 13 en un embrión control. (B) La expresión de N-tubulina no se alteró cuando los embriones fueron tratados durante la gastrulación con HUA que bloquea fuertemente de la división celular, mientras que el tratamiento con RA (C) produce en este estadío un aumento en el patrón de expresión de este marcador. Aún en presencia de HUA, RA es capaz de producir una marcada inducción de la expresión de N-tubulina(D).

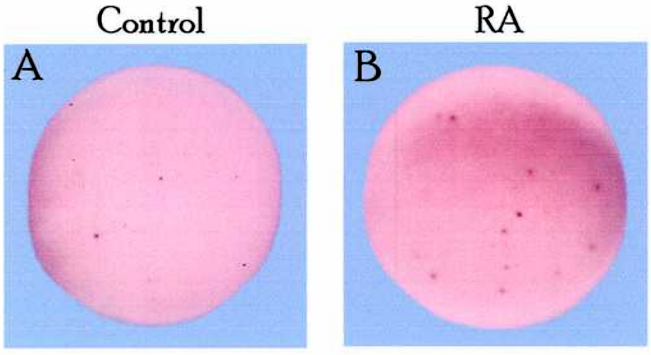


Figura 4.2. El tratamiento con RA no produce cambios en el patrón de muerte celular programada.
Técnica de TUNEL en embriones enteros. Néurulas control (A) o tratadas con RA (B) durante la gastrulación muestran patrones similares de apoptosis en la placa neural.

Este resultado muestra que la inducción de células positivas para N-tubulina generada por RA no es debida a una disminución en los niveles de apoptosis.

Todos estos datos en conjunto sugieren que el efecto producido por RA sobre la neurogénesis se debería exclusivamente a un efecto positivo sobre la diferenciación celular y no involucraría cambios en los mecanismos de proliferación o apoptosis.

4.3. Los retinoides endógenos activan la expresión de genes que promueven la neurogénesis primaria y reducen la expresión de los que la inhiben

También describimos en este trabajo el efecto del tratamiento con RA sobre la expresión de genes que producen un incremento en la diferenciación neuronal como X-ngnr-1, X-MyT1 y Gli3, mostrando una regulación positiva del RA sobre toda la cascada de la neurogénesis primaria. La deleción del espaciamiento entre las bandas neuronales, sugiere que el RA estaría modificando la actividad de los genes de prepattern, dirigiendo la placa neural hacia un territorio proneural más uniforme. De hecho, RA produce una expansión de la expresión de Gli3 en la placa neural posterior y al mismo tiempo una marcada reducción de Zic2, un gen que inhibe la diferenciación neuronal. La participación de los retinoides en la cascada de la neurogénesis primaria se confirmó mediante el bloqueo de la señal de RA con Ro, que produce los cambios opuestos en los patrones de expresión de estos genes. Este tratamiento produjo una reducción en la expresión de X-ngnr-1, X-MyT1 y X-Gli3, mientras que las bandas de expresión de Zic2 se ensancharon, mostrando que la actividad de los receptores RARα y/o RARβ es necesaria para establecer el patrón correcto de estos marcadores.

El tratamiento con RA también incrementa la densidad de células positivas para XDelta-1. Presumimos que este efecto produce una disminución del contraste entre células vecinas, permitiendo que más precursores se transformen en neuronas.

4.4. Los retinoides endógenos regulan negativamente la expresión de shh

La familia de proteínas Gli actúa como mediador de la señal de shh en vertebrados. Como la inyección de DNA de shh en embriones de *Xenopus* reprime la transcripción de Gli3 en la placa neural (Lee y col., 1997, Ruiz i Altaba, 1998), y en base a nuestros resultados que muestran la inducción de Gli3 en respuesta al tratamiento con RA, exploramos la relación entre RA y shh. El tratamiento con RA durante la gastrulación y el posterior análisis de la expresión de shh en estadío de néurula por hibridización *in situ* mostró sorpresivamente una inhibición muy marcada de la expresión de shh tanto en la placa del piso como en la notocorda.

En ratón y en zebrafish, se ha estudiado el promotor de shh y se determinó que HNF3β y los RARs son reguladores directos de la actividad a partir de esa región que contiene secuencias de pegado para HNF3β así como elementos de respuesta a RAR (RAREs) (Chang y col., 1997; Epstein y col., 1999). Sin embargo, los RAR han sido caracterizados como activadores de la transcripción, y no como represores, por lo que no podemos explicar la inhibición de la expresión de shh por un mecanismo directo.

Existen varios sistemas en los que se ha descripto un nexo molecular entre RA y shh. En esbozo de miembro de pollo y en zebrafish se observó la inducción de shh en respuesta al tratamiento con RA (Helms y col., 1994; Chang y col., 1997; Niswander y col., 1994; Riddle y col., 1993), mientras que durante la morfogénesis facial en pollo se demostró que la expresión de shh se inhibe con dosis teratogénicas de RA (Helms y col., 1997). Por otro lado, las vías de señalización de los retinoides y shh convergen en el control de lefty, un gen clave durante el establecimiento de la asimetría D-l en ratón.

Además, mutaciones en el gen shh humano, ocasionan un síndrome conocido como holoprosencefalia, que se caracteriza por presentar defectos en las estructuras ventrales del cerebro anterior. Los casos más severos muestran fallas en la separación de los hemisferios cerebrales, ciclopía (un solo ojo en la línea media) y prosboscis (estructura nasal primitiva), mientras que casos intermedios presentan características como microcefalia o un único incisivo maxilar central (Roessler y

col., 1996). Similarmente, la administración de RA en estadíos tempranos del desarrollo embrionario en ratón también producen malformaciones craneofaciales homologables a la holoprosencefalia (Sulik y col., 1995), sugiriendo otro nexo funcional entre estas dos moléculas.

El análisis de la expresión de shh en embriones deficientes en vitamina A, tanto en pollo como en codorniz, mostró que a pesar de la marcada reducción de la expresión de shh en los esbozos de los miembros con respecto a los embriones control, sigue presente en las estructuras de la línea media, notocorda y placa del piso ventral (Stratford y col., 1999), sugiriendo que son diferentes los controles que operan sobre la expresión de este gen en diferentes tejidos.

Paralelamente, en nuestro laboratorio, se determinó que la sobreexpresión unilateral de RNAm de shh en embriones de *Xenopus* produce una inhibición de la neurogénesis primaria, evidenciada por la represión de N-tubulina y Gli3 y por la activación de la expresión de Zic2 en la mitad del embrión inyectada (Franco y col., 1999; Paganelli, 2002). Por lo tanto, el hecho de que el RA y shh producen efectos opuestos sobre la cascada de la neurogénesis primaria es coincidente con el hallazgo de un nexo de regulación negativa de RA sobre la expresión de shh.

4.5. El tratamiento con RA inhibe la expresión de shh actuando en una ventana temporal acotada al comienzo de la gastrulación.

El efecto inhibitorio producido por el RA sobre la expresión de shh fue analizado en embriones tratados con RA en distintos momentos del desarrollo embrionario para establecer las ventanas de tiempo en las que el RA es capaz de actuar. Tanto el tratamiento de los embriones desde estadío 8 a estadío 14 como el tratamiento en estadío 10 durante 30 minutos producen una disminución en la expresión de shh. Sin embargo, el tratamiento de embriones desde estadío 12.5 a 14 no produce cambios en la expresión de shh. Estos resultados muestran en primer lugar, que un breve pulso de RA alrededor del inicio de la gastrulación sería suficiente para inhibir la expresión de shh y por otro lado que durante los estadíos de gástrula tardía el RA pierde la capacidad de disparar esa represión. Por lo tanto, existiría una ventana temporal alrededor del estadío 10 en la cual el RA es capaz de

ejercer su efecto inhibitorio sobre la expresión de shh que coincide con el momento en que shh comienza a expresarse, ya que tanto el ARNm de shh así como la proteína se detectan por hibridización in situ e inmunohistoquímica respectivamente en el labio dorsal del blastoporo en estadío 10.5 (Paganelli, 2002).

Una ventana de acción similar ha sido previamente descripta para otros efectos producidos por el RA. Por un lado, la habilidad del RA de suprimir el desarrollo anterior del embrión declina al final de la gastrulación (est. 12.5) (Durston y col., 1989; Sive y col., 1990) y por otro lado, el tratamiento en estadío de blástula tardía (est. 9) produce inducción de la expresión de N-tubulina en la región cefálica durante la neurulación, mientras que no se observa el fenotipo si los embriones se tratan en estadío de gástrula tardía (est. 12.5) (Papalopulu y Kintner, 1996).

4.6. Los retinoides constituyen una señal temprana que regula los primeros pasos de la cascada de la neurogénesis primaria

Todas las correlaciones observadas entre el aumento o la disminución de la señal retinoide y la alteración de la expresión génica de los marcadores que participan en la cascada de la neurogénesis primaria muestran la participación de los retinoides en este proceso. Varias son las evidencias que indican a que nivel de la cascada estarían actuando los retinoides.

1) El tratamiento con RA no sólo afecta la expresión de los genes de diferenciación neuronal más tardíos, sino que también modifica los patrones de los genes proneurales e incluso los genes de prepattern que funcionan en los pasos más tempranos del desarrollo neural. Por otro lado, el bloqueo de la señal retinoide mediada por los receptores RARα y RARβ utilizando el antagonista Ro, también produce cambios en la expresión de estos marcadores tempranos, indicando que la señal retinoide es necesaria para establecer el patrón genético correcto en las primeras etapas de la cascada neurogénica.

2) Cuando la señal retinoide se mantiene elevada mediante el tratamiento de embriones con RA, se reprime la expresión de shh y Zic2 y se incrementa el número de neuronas final. Sin embargo, el tratamiento con RA sobre embriones

que sobreexpresan shh o Zic2 por microinyección, produce el fenotipo de reducción neuronal, confirmando que los retinoides estarían actuando por encima de estas dos moléculas. Similarmente, el RA no es capaz de rescatar el efecto inhibitorio que Notch ICD produce sobre la neurogénesis, sustentando la idea que los retinoides estarían participando antes que se dispare el mecanismo de inhibición lateral. Por lo tanto, nuestros resultados indican que RA no estaría actuando directamente sobre las moléculas más tardías de la cascada, sino que participaría en las etapas iniciales.

3) Otra evidencia importante surge de los resultados que muestran que un pulso de 30 minutos alrededor del estadío 10 con RA es suficiente para inhibir la expresión de shh, sustentando la idea de que el RA sólo se requiere muy tempranamente para actuar sobre la regulación de este marcador. En el mismo sentido, otros trabajos determinaron que el RA induce expresión anterior prematura de N-tubulina cuando los embriones se cultivan en estadío de blastula tardía (est. 9) o gástrula temprana (est. 10), pero no produce el mismo efecto si se aplica durante estadíos de gastrula tardía (est. 12.5), sugiriendo que el efecto inductor del RA sobre la diferenciación neuronal se observa cuando éste actúa durante una ventana temporal temprana (Papalopulu y Kintner, 1996).

Todos estos resultados en conjunto indicarían que la señal retinoide no sería solamente requerida para la diferenciación neuronal terminal, sino que el RA estaría actuando *in vivo* en las etapas más tempranas de la cascada de la neurogénesis primaria.

4.7. Receptores de retinoides que participan en la regulación de la expresión de shh en el contexto de la neurogénesis primaria

4.7.1 La activación de RARα es suficiente para inhibir la expresión de shh y promover la neurogénesis

Por un lado, mediante una aproximación farmacológica determinamos los efectos producidos por el tratamiento con un agonista RAR (TTNPB), un agonista RXR (Lg268), un agonista inverso de los RAR (193109) y un antagonista de

RARα (194301) sobre la expresión de varios marcadores de la cascada neurogénica (Tabla 15).

Tabla 15 Efecto de varios tratamientos sobre la expresión de marcadores de la neurogénesis.

		N-tubulina	X-ngnr-1	Gli3	Zic2	shh
Agonistas	RA	++	+	+	--	--
	TTNPB	+	+	++	=	-
	Lg268	+	+	++	+	=
Antagonistas	Ro	-	-	-	+	++
	193109	-	-	+	++	++
	194301	-	-	+	++	++

Los efectos se clasificaron en: (+) inducción, (-) inhibición y (=) sin cambios.

Nuestros resultados indican que el efecto del RA sobre la expresión de los marcadores de la cascada de la neurogénesis primaria estaría mediada por los RAR, ya que cuando estos receptores fueron activados utilizando el agonista TTNPB, se produjeron fenotipos similares sobre la expresión de los marcadores más tardíos de la cascada como Neurogenina y N-tubulina, correspondientes a los grupos de genes proneurales y de diferenciación terminal respectivamente. La expresión de Zic2 no se alteró en respuesta al tratamiento con TTNPB, probablemente debido a la leve reducción de la expresión de shh observada. Sin embargo, la expresión de Gli3 se incrementó en la placa neural posterior, modificándose de este modo el balance entre estas dos moléculas de prepattern que determinan los territorios donde ocurrirá la neurogénesis. Por lo tanto, la activación de los RAR con un agonista diferente al RA es suficiente para reprimir la expresión de shh y promover la neurogénesis.

La activación de los receptores RXR mediante el tratamiento con Lg268 produjo resultados similares al RA tanto para N-tubulina como para X-ngnr-1. Sin embargo, la expresión de los marcadores más tempranos no siguió el mismo patrón. Aunque la expresión de Gli3 aumentó, la expresión de Zic2 se incrementó contrariamente a lo que produce el RA, y la de shh no se modificó, probablemente

evidenciando efectos sobre otras vías en las que participan los RXR. Este resultado sugiere que la inhibición de la expresión de shh no es el único mecanismo por el que se activa la neurogénesis, ya que en este caso, Lg268, que activa los receptores RXR, es capaz de inducir el número de neuronas, incrementando al mismo tiempo la expresión de shh.

El bloqueo de los RAR en general (193109) o el de RARα (194301) inhibieron la expresión de N-tubulina y X-ngnr-1. Estos resultados son coincidentes con los tratamientos con Ro y sugieren que es suficiente el bloqueo de los RAR y en particular de RARα para inhibir la formación de las neuronas primarias. Esta inhibición siempre se correlacionó con una expresión aumentada de shh y del gen de prepattern inhibitorio Zic2, a pesar de que paralelamente se observó un leve aumento en la expresión de Gli3 en la placa neural posterior. Cabe resaltar aquí, la importancia del balance entre estas dos moléculas, siendo la relación entre los niveles de expresión de estas dos moléculas y no la expresión de cada una de ellas individualmente, lo que generaría el efecto final sobre la neurogénesis.

Podemos concluir a partir de estos experimentos farmacológicos que la activación de los receptores RAR produce: 1) inhibición de la expresión de shh, 2) desbalance entre los genes de prepattern Gli3, que se induce y Zic2, que no se modifica, y finalmente 3) incremento en la expresión de X-ngnr-1 y N-tubulina, llevando consecuentemente a un mayor número de neuronas primarias en la placa neural posterior. Contrariamente, tanto la anulación de los receptores RAR como la de RARα en particular producen 1) inducción de shh, 2) desbalance entre Gli3, que se incrementa levemente y Zic2 que se induce fuertemente y 3) inhibición en la expresión de X-ngnr-1 y N-tubulina.

Con estos resultados confirmamos utilizando un agonista diferente al RA que la activación de los receptores RAR es suficiente para inducir la formación de neuronas primarias, y mediante el uso de antagonistas determinamos que la activación de los receptores RAR y particularmente RARα es necesaria *in vivo* para que se establezca el patrón normal neuronal.

Además, se desprende de estos datos que la regulación de la expresión de shh, que participa en la regulación de la cascada de la neurogénesis tempranamente, estaría del mismo modo mediada por los RAR y en particular RARα

4.7.2. La competencia funcional con RARα1 desinhibe la expresión de shh

Otra estrategia apropiada para estudiar la anulación de la función de una molécula es la dominancia negativa, que es particularmente útil en el caso de receptores con estructura modular como los RAR.

En trabajos previos se demostró que la microinyección unilateral de una versión dominante negativa del receptor RARα1 (RARα1 405*) en embriones de *Xenopus*, produce la pérdida de expresión de N-tubulina (Blumberg y col., 1997). Estos resultados son coincidentes con la inhibición de la neurogénesis producida por el bloqueo de RARα con el antagonista 194301.

Enfocando nuestro análisis hacia la relación entre la vía retinoide y shh en el contexto de la neurogénesis, decidimos evaluar utilizando esta estrategia, si la regulación de shh también puede ser modificada utilizando esta construcción dominante negativa capaz de competir con el receptor salvaje endógeno.

Demostramos con este experimento que la interferencia con la función normal de RARα1 produce una fuerte activación de la expresión de shh que no se observa cuando se expresa una versión inactiva del receptor RARα2 (RARα2-386*).

Podemos concluir, utilizando una metodología independiente, que el receptor RARα1 participa de la represión producida por la vía retinoide sobre la expresión de shh. Sin embargo, no puede descartarse que el receptor dominante negativo RARα1 405* además de estar inhibiendo la señal mediada por RARα1 sea capaz de bloquear la activación de otros receptores.

4.7.3. RARγ1 participa de la inhibición que los retinoides ejercen sobre shh

La utilización de "morfolinos" es una estrategia cada vez más utilizada para el estudio de la anulación de la síntesis de un RNA mensajero determinado. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la simple remoción de RARγ1

utilizando esta metodología molecular produce un aumento en la expresión de shh, mientras que la anulación de RARα2.2 no produce el mismo efecto. Esto indicaría que RARγ1 sería uno de los receptores que participan *in vivo* de la regulación negativa de los retinoides sobre la expresión de shh.

Los resultados previos con los experimentos de dominancia negativa sugirieron que la represión de shh está al menos en parte mediada por el receptor RARα, y en particular RARα1. Esta nueva aproximación experimental con morfolinos indica que RARγ1 también estaría implicado en la regulación de shh. Como el efecto de los retinoides sobre la expresión de shh se produce en una ventana de tiempo acotada a los estadíos de blástula tardía y gástrula temprana, era de esperar que la regulación de shh *in vivo* estuviese mediada por receptores de expresión temprana. Nuestros resultados se sustentan con los patrones de expresión de estos receptores. Mientras RARα1 es de expresión materna y se expresa durante las primeras etapas del desarrollo, esta isoforma es reemplazada durante la gastrulación por RARα2 (Sharpe, 1992). RARγ1 por el contrario, es de expresión materna y permanece expresándose durante toda la gastrulación (Ellinger-Zeigelbauer y Dreyer, 1991), siendo un buen candidato para participar de este mecanismo regulatorio.

Los resultados obtenidos por la microinyección de estos mismos "morfolinos" sobre el establecimiento de eje A-P muestran que mientras la anulación de la isoforma RARα2.2 produce pérdida de estructuras cefálicas sin alterar las posteriores o con defectos parciales en el tronco, la eliminación de RARγ1 muestra defectos más drásticos sobre todo el eje A-P, sugiriendo que RARγ1 podría participar de procesos regulatorios más posteriores, mientras que la isoforma RARα2.2 estaría mayormente involucrada en el desarrollo cefálico (Comunicación personal del Dr. Blumberg).

4.7.4. Rol de RA en la regulación de la neurogénesis primaria

Mientras que el aumento en la señal retinoide inhibe la expresión de shh en la línea media del embrión e induce la neurogénesis, el tratamiento con antagonistas para el receptor RARα (Ro y 194301), el bloqueo de la señal de

RARα1 mediante la expresión de un dominante negativo y la anulación de RARγ1 utilizando un "morfolino" antisense produjeron el aumento de la expresión de shh y la inhibición de la expresión de N-tubulina, sugiriendo que los receptores RARα1 y RARγ1 son necesarios *in vivo* para participar del control de la expresión de shh y la neurogénesis primaria. Proponemos que cuando la regulación negativa que los retinoides ejercen sobre shh se ve impedida por disminución de la señal retinoide mediada por estos receptores, el equilibrio se desplaza hacia un aumento en la función de shh que se correlaciona con una disminución de la diferenciación de las neuronas primarias.

En el embrión normal, shh se expresa en la línea media dorsal, lo que demuestra que los retinoides endógenos no bloquean completamente su expresión. Este hecho muestra que debe ser establecido un balance preciso entre la vía retinoide y shh para generar el patrón normal de neuronas. Como el RA no es capaz de rescatar el efecto inhibitorio de shh sobre la neurogénesis, sugerimos una cascada de interacciones donde los retinoides endógenos estarían actuando muy tempranamente, promoviendo la neurogénesis primaria al menos en parte mediante la inhibición de la expresión de shh (Fig. 4.3).

Mientras el RA se ha caracterizado como un factor que promueve la diferenciación celular en numerosos sistemas y en particular la diferenciación neuronal, shh es una molécula con propiedades proliferativas (Johnson y col., 1994; Wechsler-Reya y Scott, 1999; Dahmane y Ruiz i Altaba, 1999; Wallace, 1999; Franco y col., 1999; Paganelli y col., 2001; Dahmane y col., 2001). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio confirman esta inducción de la proliferación, ya que la inyección unilateral de embriones con ARNm de shh produjo supresión de la neurogénesis primaria, aumento en el número de células en las tres capas germinales y un agrandamiento de la placa neural del lado inyectado. Además de la inhibición de la neurogénesis primaria y la simultánea activación de la proliferación celular, encontramos que la neurogénesis secundaria en estadíos de larva (est. 32) fue estimulada en el tubo neural ventral después de la inyección de shh, mostrando un efecto diferencial sobre los precursores neuronales primarios y secundarios (Franco y col., 1999; Paganelli, 2002).

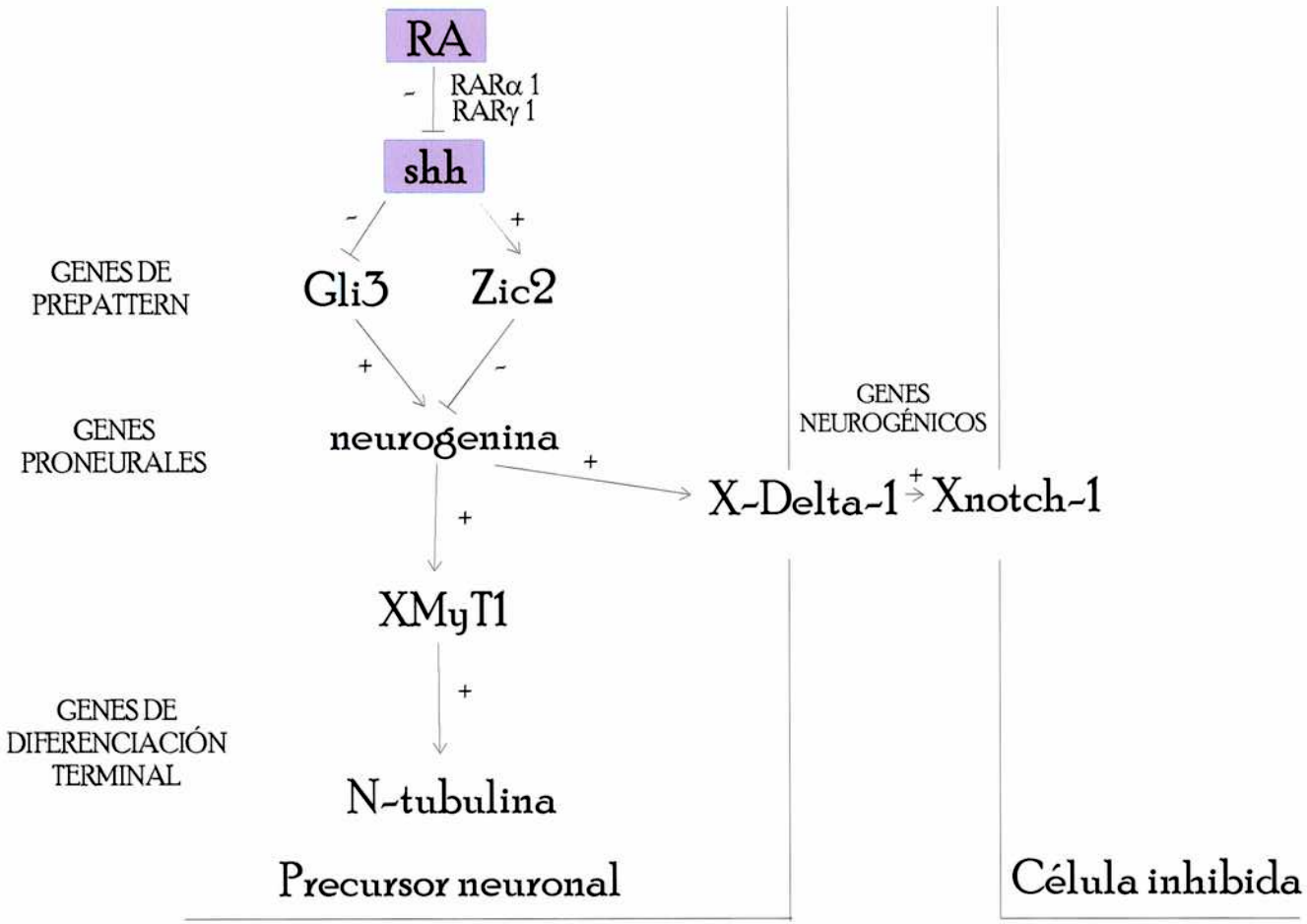


Figura 4.3. Modelo propuesto en base a las interacciones moleculares que involucran la vía de los retinoides con la señalización de shh y que llevan a la diferenciación terminal de neuronas primarias.
Un aumento en la señal retinoide en etapas tempranas produce disminución de la expresión de shh y consecuentemente una inducción en el número de neuronas primarias. El incremento de la neurogénesis se verifica por el efecto de este tratamiento sobre la expresión de varios marcadores que participan en la cascada. Gli3, neurogenina, XMyT1 y N-tubulina se inducen mientras que Zic2 se reprime. Esta señal estaría mediada al menos en parte por los receptores RARα1 y RARγ1.

Sugerimos que el establecimiento del patrón neuronal de la placa estaría determinado *in vivo* por el balance entre estas dos fuerzas opuestas. Por un lado, la vía retinoide que induciendo la diferenciación lleva a las células hacia un destino neuronal, y por otro lado shh que estaría apartando algunas células precursoras de la diferenciación prematura, manteniendo su estado proliferativo y reservándolas para sucesivas ondas de formación neuronal.

A pesar de los avances logrados en el entendimiento de los procesos que llevan a la construcción de un organismo, queda aún mucho por explorar. En 1894, Wilhelm Roux decía: *"La investigación causal de los organismos no puede completarse nunca, ya que cada nueva causa descubierta sólo origina nuevas preguntas sobre la causa de esta causa."*

5. CONCLUSIONES

He presentado en esta tesis un análisis basado en los efectos del ácido retinoico (RA) sobre la construcción en tiempo y espacio de la placa neural de los vertebrados. De este estudio se desprenden varias conclusiones que abren nuevos interrogantes:

-Además del rol que los retinoides juegan en el establecimiento del patrón axial, se mostró en este trabajo la participación de esta vía en la diferenciación de las neuronas primarias *in vivo*.

-Se estableció que un aumento en la señal retinoide produce la inducción de neuronas primarias en la placa neural posterior, mientras que el bloqueo de esta señal inhibe el número de neuronas.

- Se concluyó que esta inducción en el número de neuronas es debida a el efecto del RA sobre la diferenciación celular y no requeriría cambios en la proliferación o la muerte celular programada.

-Se determinó que la variación en los niveles de retinoides también afecta la expresión de otros miembros que participan en la cascada de la neurogénesis primaria.

-Se describió por primera vez en este trabajo la relación entre RA, shh y la neurogénesis. Nuestros resultados muestran que RA inhibe la expresión de shh y paralelamente shh reprime la neurogénesis primaria.

-Mediante experimentos de rescate fenotípico, se estableció que RA actúa por encima de shh, Zic2 o la inhibición lateral ya que no es capaz de revertir los efectos inhibitorios que producen sobre la neurogénesis, sugiriendo que RA participaría en los pasos iniciales de la cascada neurogénica.

-Se definió una ventana temporal alrededor del inicio de la gastrulación en la que el RA ejercería su efecto inhibitorio sobre la expresión de shh, coincidente con el

momento en que se requiere un pulso de retinoides para producir inducción de la expresión de N-tubulina.

-Se determinó utilizando distintas estrategias que los receptores de retinoides RARα1 y RARγ1 son responsables, al menos en parte, de la regulación negativa que los retinoides ejercen *in vivo* sobre la expresión de shh.

-Se estableció en este trabajo una nueva función del RA, esencial para el desarrollo temprano del sistema nervioso central que involucra la vía mediada por shh. Regulando la cascada de la neurogénesis primaria, ambas señales estarían participando de la construcción de la placa neural.

PAULA FRANCO

DR. ANDRES E. CARRASCO
INVESTIGADOR INDEPENDIENTE
CONICET

6. BIBLIOGRAFÍA

ACHKAR, C., DERGUINI, F., BLUMBERG, B., LANGSTON, A., LEVIN, A., SPECK, J., EVANS, R., BOLADA, J., NAKANISHI, K., BUCK, J. Y GUDAS, L. (1996). *4-oxoretinol, a new natural ligand and transactivator of the retinoic acid receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4879- 4880*

ANG, S., CONLON, R., JIN, O. Y ROSSANT, J. (1994). *Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse Otx2 in ectoderm explants. Development 120, 2979-2989*

ANG, H., DELTOUR, L., HAYAMIZU, T., ZGOMBIC-KNIGHT, M. Y DUESTER, G. (1996). *Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. J. Biol. Chem. 271, 9526-9534*

APFEL,C., BAUER, F., CRETTAZ, M., FORNI, L., KAMBER, M., DAUFMANN, F., LEMOTTE, P., PIRSON, W. Y KLAUS, M. (1992). *A retinoic acid receptor α antagonist selectively counteracts retinoic acid effects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7129-7133*

ARTAVANIS- TSAKONAS, S. Y SIMPSON, P. (1991). *Choosing a cell fate: a view from the Notch locus. Trends Genet 7:403-8*

AUSUBEL, F., BRENT, R., KINGSTON, R., MOORE, D., SEIDMAN, J., SMITH, J. Y STRUHL, K. *(1992). Short protocols in Molecular Biology. Second edition. John Willey & Sons, Inc., New York.*

AZUMA, M., SEKI, T. Y FUJISHITA, S. (1990). *Changes of egg retinoids during the development of Xenopus laevis. Vision Res. 30, 1395-1400*

BELLEFROID, E., BOURGUIGNON, C., HOLLEMANN, T., KINTNER, C. Y PIELER, T. (1996). *X-MyT1, a Xenopus C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. Cell 87, 1191-1202*

BELLEFROID, E., KOBBE, A., GRUSS, P., PIELER, T., GURDON, J. Y PAPALOPULU, N. (1998). *Xiro3 encodes a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois genes and functions in neural specification. Embo J. 17, 191-203*

BLUMBERG, B., MANGELSDORF, D., DYCK, J., BITTNER, D., EVANS, R. Y DE ROBERTIS, E. (1992). *Multiple retinoid-responsive receptors in a single cell: families of retinoid "X" receptors and retinoic acid receptors in the Xenopus egg. Proc Natl Acad Sci U S A.89:2321-5*

BLUMBERG, B., BOLADO, J., DERGUINI, F., CRAIG, A., MORENO, T., CHARKRAVARTI, D., HEYMAN, R. BUCK, J. Y EVANS, R. (1996). *Novel RAR ligands in Xenopus embryos. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 93: 4873-4878*

BLUMBERG, B. (1997). *An essential role for retinoid signaling in anterioposterior neural specification and neuronal differentiation. Cell and Developmental Biology, 8:417-428*

BLUMBERG, B., BOLADO, J., MORENO, T., KINTNER, C., EVANS, R. Y PAPALOPULU, N. (1997). *An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. Development 124, 373-379*

BLUMBERG, B. Y EVANS, R. (1998). Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. Genes Dev 1998 Oct 15;12(20):3149-55

BREWSTER, R., LEE, J. Y RUIZ I ALTABA, A. (1998). *Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. Nature 393, 579-583*

CAMPOS-ORTEGA, J. (1995). *Genetic mechanisms of early neurogenesis in Drosophila melanogaster. Mol Neurobiol 10:75-89*

CARRASCO, A. Y LÓPEZ, S. (1994). *The puzzle of Hox genes. Int. J. Dev. Biol. 38: 557-564*

CHAMBON, P. (1996). *A decade of molecular biuology of retinoic acid receptors. FASEB J. 10, 940-954*

CHANG, B., BLADER, P., FISCHER, N., INGHAM, P. Y STRAHLE, U. (1997). *Axial (HNF3β) and retinoic acid receptors are regulators of the zebrafish sonic hedgehog promoter. Embo J. 16, 3955-3964*

CHEN, Y., HUANG, L. Y SOLURSH, M. (1992). *Retinoic acid is enriched in Hensen's node and is developmentally regulated in the early chick embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10056- 10059*

CHEN, Y., HUANG, L. Y SOLRUSH, M. (1994). *A concentration gradient of retinoids in the early Xenopus laevis embryo. Dev. Biol. 161, 70-76*

CHEN, Y., POLLET, N., NIEHRS, C. Y PIELER, T. (2001). *Increased XRALDH2 activity has a posteriorizing effect on the central nervous system of Xenopus embryos. Mech Dev. 101:91-103*

CHIBA, H., CLIFFORD, J., METZGER, D. Y CHAMBON, P. (1997). *Specific and redundant functions of retinoid X receptor/ retinoic acid receptor heterodimers in differentiation, prolifareation and apoptosis in F9 embryonal carcinoma cells. J. Cell Biol. 139, 735-747*

CHITNIS, A., HENRIQUE, D., LEWIS, J., ISH-HOROWICZ, D. Y KINTNER, C. (1995). *Primary neurogenesis in Xenopus embryos regulated by a homologue of the Drosophila neurogenic gene Delta. Nature 375:761-6*

CHITNIS, A. (1995). *The role of Notch in lateral inhibition and cell fate specification. Mol Cell Neurosci. 6:311-21*

CHITNIS, A. Y KINTNER, C. (1996). *Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition affects the pattern of primary neurons in Xenopus embryos. Development 122, 2295-2301*

CHOO, D., SANNE, J. Y WU D. (1998). *The differential sensitivities of inner ear structures to retinoic acid during development. Dev. Biol. 204, 136-50*

COFFMAN, C., HARRIS, W. Y KINTNER, C. (1990). *Xotch, the Xenopus homolog of Drosophila notch. Science 249:1438-41*

COFFMAN, C., SKOGLUND, P., HARRIS, W. Y KINTNER, C. (1993). *Expression of an extracellular deletion of Xotch diverts cell fate in Xenopus embryos. Cell 73, 659-671*

COLBERT, M., LINNEY, E. Y LAMANTIA, A. (1993). *Local sources of of retinoic acid coincide with retinoid-mediated transgene activity during embryonic development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6572-6576*

COSTARIDIS, P., HORTON, C., ZEITLINGER, J. HOLDER, N. Y MADEN, M. (1996). *Endogenous retinoids in the zebrafish embryo and adult. Dev. Dynam. 205, 41-51*

COWAN, W., JESSELL, T. Y ZIPURSKY, S. (1997). *Molecular and Cellular approaches to neural development. New York, Oxford. Oxford University press.*

CREECH-KRAFT, J., SCHUH, T., JUCHAU, M. Y KIMELMAN, D. (1994a). *The retinoid X receptor ligand, 9-cis retinoic acid, is a potential regulator of early Xenopus development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3067-3071*

CREECH-KRAFT, J., SCHUH, T., JUCHAU, M. Y KIMELMAN, D. (1994b). *Temporal distribution, localization and metabolism of all-trans-retinol, didehydroretinol and all-trans-retinal during Xenopus development. Biochem. J. 301, 111-119*

DAHMANE, N. Y RUIZ-I-ALTABA, A. (1999). *Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. Development 126:3089-3100*

DAHMANE, N., SANCHEZ, P., GITTON, Y., PALMA, V., SUN, T., BEYNA, M., WEINER, H. Y RUIZ I ALTABA, A. (2001) *The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. Development 128:5201-12*

DEKKER, E., VAESSEN, M., VAN DEN BERG, C., TIMMERMANS, A., GODSAVE, S., HOLLING, T., NIEUWKOOP, P., GEURTS VAN KESSEL, A. Y DURSTON, A. (1994). *Overexpression of a cellular retinoic acid binding protein (xCRABP) causes anteroposterior defects in developing Xenopus embryos. Development 120: 973-85*

DENKER, L., ANNERWALL, E., BUSCH, C. Y ERIKSSON, U. (1990). *Localization of specific retinoid- binding sites and expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in the early mouse embryo. Development 110: 343-352*

DE ROOS, K., SONNEVELD, E., COMPAAN, B., TEN BERGE, D., DURSTON, A. Y VAN DER SAAG, P. (1999). *Expression of retinoic acid 4-hydroxylase (CYP26) during mouse and Xenopus laevis embryogenesis. Mech Dev.82:205-11*

DERSCH, H. Y ZILE, M. (1993). *Induction of normal cardiovascular development in the vitamin A-deprived quail embryo by natural retinoids. Dev Biol.160:424-33*

DOLLE, P., RUBERTE, E., LEROY, P., MORRISS-KAY, G. Y CHAMBON, P. (1990). *Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. Development 110: 1133-51*

DONIACH, T. (1993). *Planar and vertical induction of anteroposterior pattern during the development of the amphibian central nervous system. J Neurobiol. 24: 1256-1275*

DUESTER, G. (2000). *Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. Eur. J. Biochem. 267, 4315-24*

DURSTON, A., TIMMERMANS, J., HAGE, W., HENDRIKS, H., DEVRIES, N., HELDEVELD, M. Y NIEUWKOOP, P. (1989). *Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. Nature 340, 140-144*

EGEA, P., KLAHOLZ, B. Y MORAS, D. (2000). *Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. FEBS Lett. 476:62-7*

EKKER, S. (2000). *Morphants: A new systematic vertebrate functional genomics approach. Yeast 17, 302-306*

ELLINGER-ZEIGELBAUER, H. Y DREYER, C. (1991). *A retinoic acid receptor expressed in the early development of Xenopus laevis. Genes and Dev. 5: 94-104*

EPSTEIN, D., MCMAHON, A. Y JOYNER, A. (1999). *Regionalization of Sonic hedgehog transcription along the anteroposterior axis of the mouse central nervous system is regulated by Hnf3-dependent and -independent mechanisms. Development 126:281-92*

FAINSOD, A., DEISSLER, K., YELIN, R., MAROM, K., EPSTEIN, M., PILLEMER, G., STEINBEISSER, H. Y BLUM, M. (1997). *The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. Mech Dev. 63:39-50*

FRANCIS, P., RICHARDSON, M., BRICKELL, P. Y TICKLE, C. (1994). *Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. Development. 120:209-18*

FRANCO, P., PAGANELLI, A., LÓPEZ, S. Y CARRASCO, A. (1999). *Functional association of retinoic acid and hedgehog signaling in Xenopus primary neurogenesis. Development 126, 4257-4265*

FUJII, H., SATO, T., KANEKO, S., GOTOH, O., FUJII-KURIYAMA, Y., OSAWA, K., KATO, S. Y HAMADA, H. (1997). *Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. EMBO J. 16:4163-73*

GAMMILL, L. Y SIVE, H. (1997). *Identification of otx2 target genes and restrictions in ectodermal competence during Xenopus cement gland formation. Development 124, 471-481*

GHYSEN, A., DAMBLY-CHAUDIERE, C., JAN, L. Y, JAN, Y. (1993). *Cell interactions and gene interactions in peripheral neurogenesis. Genes Dev 7:723-33*

GÓMEZ-SKARMETA, J., GLAVIC, A., DE LA CALLE-MUSTIENES, E., MODOLELL, J. Y MAYOR, R. (1998). *Xiro, a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. Embo J. 17, 181-190*

GOULD, A., ITASAKI, N. Y KRUMLAUF, R. (1998). *Initiation of rhombomeric Hoxb4 expression requires induction by somites and a retinoid pathway. Neuron 21:39-51.*

GOULDING, M., LUMSDEN, A. Y GRUSS, P. (1993). *Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal chord. Development 117, 1001-1016*

GOYETTE, P., FENG CHEN, C., WANG, W., SEGUIN, F. Y LOHNES, D. (2000). *Characterization of retinoic acid receptor-deficient keratinocytes. J Biol Chem. 275 :16497-505*

GURDON, J. (1992). *The generation of diversity and pattern in animal development. Cell. 68:185-99*

HARAMIS, A. Y CARRASCO, A. *(1996). Whole-mount in situ hibridization and detection of RNAs in vertebrate embryos and isolated organs. En Current Protocols in Molecular Biology. (ed. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J. Smith, J. y Struhl, K.), pp. 14.9.1- 14.9.8. John Wiley & Sons, Inc.*

HARLAND, R. (1991). *In situ hibridization: an improved whole-mount method for Xenopus embryos. Meth. Cell Biol. 36, 685-695*

HARRIS, W. Y HARTENSTEIN, V. (1991). *Neuronal determination without cell division in Xenopus embryos. Neuron 6:499-515*

HARTENSTEIN, V. (1989). *Early neurogenesis in Xenopus: the spatio-temporal pattern of proliferation and cell lineages in the embryonic spinal cord. Neuron 3:399-411*

HAWLEY, S., WUNNENBERG-STAPLETON, K., HASHIMOTO, C., LAURENT, M., WATABE, T., BLUMBERG, B. Y CHO, K. (1995). *Disruption of BMP signals in embryonic Xenopus ectoderm leads to direct neural induction. Genes Dev. 9:2923-35*

HEASMAN, J., KOFRON, M. Y WYLIE, C. (2000). *Beta-catenin signaling activity dissected in the early Xenopus embryo: A novel antisense approach. Dev. Biol. 222, 124-134*

HELMS, J., THALLER, C. Y EICHELE, G. (1994). *Relationship between retinoic acid and sonic hedgehog, two polarizing signals in the chick wing bud. Development 120, 3267-3274*

HELMS, J., KIM, C., EICHELE, G. Y THALLER, C. (1996). *Retinoic acid signaling is required during early chick limb development. Development 122:1385-94*

HELMS, J., KIM, C., HU, D., MINKOFF, R., THALLER ,C. Y EICHELE, G. (1997). *Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. Dev Biol. 187:25-35*

HEMMATI-BRIVANLOU, A., KELLY, O. Y, MELTON, D. (1994). *Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. Cell 77:283-95.*

HENSEY, C. Y GAUTIER, J. (1997). *A developmental timer that regulates apoptosis at the onset of gastrulation. Mech Dev. 69:183-95*

HO, L., MERCOLA, M. Y GUDAS, L. (1994). *Xenopus laevis cellular retinoic acid-binding protein: temporal and spatial expression pattern during early embryogenesis. Mech Dev. 47: 53-64*

HOLLEMANN, T., CHEN, Y., GRUNZ, H., PIELER, T. (1998). *Regionalized metabolic activity establishes boundaries of retinoic acid signalling. EMBO J. 17:7361-72*

ISLAM, T., SKARIN, T., SUMITRAN, S. Y TOFTGARD, R. (2000). *Retinoids induce apoptosis in cultured keratinocytes. Br J Dermatol 143 :709-19*

IZPISUA-BELMONTE, J., TICKLE, C., DOLLE, P., WOLPERT, L., DUBOULE, D. (1991). *Expression of the homeobox Hox-4 genes and the specification of position in chick wing development. Nature. 350:585-9*

JACOBSON, M. Y RUTISHAUSER, U. (1986). *Induction of neural cell adhesion molecule (NCAM) in Xenopus embryos. Dev Biol 116:524-31*

JOHNSON, R., LAUFER, E., RIDDLE, R. Y TABIN, C. (1994). *Ectopic expression of sonic hedgehog alters dorsal- ventral patterning of somites. Cell 79, 1165- 1173*

JOHNSON, A., KLEIN, E., GILLETT, S., WANG, L., SONG T., PINO, M. Y CHANDRARATNA, R. (1995). *Synthesis and characterization of a highly potent and effective antagonist of retinoic acid receptors. J. Med. Chem. 38, 4764-4767*

KANDELL, E., SCHUARTZ, J. Y JESSELL, T. (2000). *Principles of neural science. Fourth edition. McGraw-Hill Companies, Inc.*

KASTNER, P., KRUST, A., MENDELSOHN, C., GARNIER, J., ZELENT, A., LEROY, P., STAUB, A. Y CHAMBON, P. (1990). *Murine isoforms of retinoic acid receptor gamma with specific patterns of expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 87: 2700-4*

KASTNER, P., MARK, M. Y CHAMBON, P. (1995). *Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life. Cell, 83, 859-869*

KEIDEL, S., LEMOTTE, P. Y APFEL, C. (1994). *Different agonist- and antagonist-induced conformational changes in retinoic acid receptors analyzed by protease mapping. Mol Cell Biol. 14:287-98*

KIMELMAN, D., CHRISTIAN, J. Y MOON, R. (1992). *Synergistic principles of development: overlapping patterning systems in Xenopus mesoderm induction. Development 116:1-9*

KLEIN, E., PINO, N., JOHNSON, A., DAVIES, P., NAGPAL, S., THACHER, S., KRASINSKI, G. Y CHANDRARATNA, R. (1996). *Identificatrion and functional separation of retinoic acid neutral antagonists and inverse agonists. J.Biol. Chem. 271: 22691- 22696*

KLEIN, E., WANG, J., KHALIFA, B., GAVIGAN, S. Y CHANDRARATNA, R. (2000). *Recruitment of nuclear receptor corepressor and coactivator to the retinoic acid receptor by retinoid ligands. Influence of DNA-heterodimer interactions. J. Biol. Chem. 275: 19401- 19408*

KOIDE, T., DOWNES, M., CHANDRARATNA, R., BLUMBERG, B. Y UMESONO, K. (2001). *Active repression of RAR signaling is requires for head formation. Genes Dev. 15:2111-2121*

KOLM, P., APEKIN, V. Y SIVE, H. (1997). *Xenopus hindbrain patterning requires retinoid signaling. Dev Biol. 192:1-16*

LAMB, T., KNECHT, A., SMITH, W., STACHEL, S., ECONOMIDES, A., STAHL, N., YANCOPOULOS, P. Y HARLAND, R. (1993). *Neural induction by the secreted polypeptide noggin. Science 262, 713-718*

LEE, J., HOLLENBERG, S., SNIDER, L., TURNER, D., LIPNICK, N. Y WEINTRAUB, H. (1995). *Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. Science 268:836-44*

LEE, J., PLATT, K., CENSULLO, P. Y RUIZ I ALTABA, A. (1997). *Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. Development 124, 2537-2552*

LEE, S., FU, K., HUI, J. Y RICHMAN, J. (2001). *Noggin and retinoic acid transform the identity of avian facial prominences. Nature 414, 909-912*

LIEM, K., TREMML, G., ROELINK, H. Y JESSELL, T. (1995). *Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. Cell 82, 969-979*

LINDSELL, C., SHAWBER, C., BOULTER, J. Y WEINMASTER, G. (1995). *Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. Cell 80:909-17*

LÓPEZ, S. Y CARRASCO, A. (1992). *Retinoic acid induces changes in the localization of homeobox proteins in the A-P axis of Xenopus laevis embryos. Mech. Dev. 36, 153-164*

LÓPEZ, S., DONO, R., ZELLER, R. Y CARRASCO, A. (1995). *Differential effects of retinoic acid and a retinoid antagonist on the spatial distribution of the homeoprotein Hoxb-7 in vertebrate embryos. Dev. Dyn. 204, 457-471*

LOVE, J., GOOCH, J., BENKO, S., LI, C., NAGY, L., CHATTERJEE, V., EVANS, R. Y SCHWABE, J. (2002). *The structural basis for the specificity of retinoid- X receptor-selective agonists: new insights into the role of helix H12. J. Biol. Chem. 277, 11385-91*

MA, Q., KINTNER, C. Y ANDERSON, D. (1996). *Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. Cell 87:43-52*

MADEN, M. Y HOLDER, N. (1992). *Retinoic acid and the development of the central nervous system. BioEssays 14:431-438*

MADEN, M., GALE, E., KOSTETSKII, I. Y ZILE, M. (1996). *Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. Curr Biol. 6:417-26*

MADEN, M., GRAHAM, A., GALE, E., ROLLINSON, C. Y ZILE, M. (1997). *Positional apoptosis during vertebrate CNS development in the absence of endogenous retinoids.* Development 124:2799-805

MADEN, M., SONNEVELD, E., VAN DER SAAG, P. Y GALE, E. (1998b). *The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. Development 125, 4133-4144*

MADEN, M. (1999). *Heads or tails? Retinoic acis will decide. BioAssays 21, 809-812*

MADEN, M., SONNEVELD, E., VAN DER SAAG, P. Y GALE, E. (1998a). *The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. Development:125:4133–4144*

MALLO, M. (1997). *Retinoic acid disturbs mouse middle ear development in a stage-dependent fashion. Dev Biol. 184:175-86*

MANGELSDORF, D., UMESONO, K. Y EVANS, R. (1994). *The retinoid receptors. en The Retinoids: Biology, Cxhemistry and Medicine 2nd Ed. (Raven, New York), pp. 319-349*

MARK, M., GHYSELINCK, N., WENDLING, O., DUPE, V., MASCREZ, B., KASTNER, P. Y CHAMBON, P. (1999). *A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse. Proc Nutr Soc. 58:609-13*

MARKLEW, S., SMITH, D., MASON, C. Y OLD, R. (1994). *Isolation of a novel RXR from Xenopus that most closely resembles mammalian RXR beta and is expressed throughout early development. Biochim Biophys Acta. 1218:267-72*

MARSHALL, H., NONCHEV, S., SHAM, M.H., MUCHAMORE, I., LUMSDEN, A. Y KRUMLAUF, R. (1992). *Retinoic acid alters hindbrain Hox code and induces transformation of rhombomeres 3/3 into a 4/5 identity. Nature 360: 737-741*

MARSH- ARMSTRONG, N., MCCAFFERY, P., HYATT, G., ALONSO, L. DOWLING, J., GILBERT, W. Y DRAGER, U. (1995) *Retinoid acid in the anteroposterior patterning of the zebrafish trunk. Roux's Arch. Dev. Biol. 205, 103-113*

MCAVOY, J. (1980). *Induction of the eye lens. Differentiation 17, 137-149.*

MOLOTKOV, A., FAN, X., DELTOUR, L., FOGLIO, M., MARTRAS, S., FARRES, J., PARES, X. Y DUESTER, G. (2002). *Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously- expressed alcohol deshydrogenase Adh3. Proc. Natl. Acad. Sci. en prensa*

MOON, R. Y CHRISTIAN, J. (1992). *Competence modifiers synergize with growth factors during mesoderm induction and patterning in Xenopus. Cell 71:709-12*

MORIYA, N., KOMAZAKI, S. Y ASASHIMA, M. (2000). *In vitro organogenesis of pancreas in Xenopus laevis dorsal lips treated with retinoic acid. Dev. Growth Differ. 42, 175-185*

NAKATA, K., NAGAI, T., ARUGA, J. Y MIKOSHIBA, K. (1998). *Xenopus Zic family and its role in neural crest development. Mech Dev. 75, 43-51*

NIEDERREITHER, K., SUBBARAYAN, V., DOLLÉ, P. Y CHAMBON, P. (1999). *Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. Nature Genet. 21, 444-448*

NIEDERREITHER, K., VERMOT, J., SCHUHBAUR, B., CHAMBON, P. Y DOLLÉ, P. (2000). *Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. Development 127, 75-85*

NIEDERREITHER, K., VERMOT, J., MESSADDEQ, N., SCHUHBAUR, B., CHAMBON, P. Y DOLLÉ, P. (2001). *Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. Development 128, 1019-1031*

NIEUWKOOP, P. Y FABER, J. (1956). *Normal table of Xenopus laevis. Amsterdam: North-Holly Publishing Company*

NISWANDER, L.; JEFFREY, S.; MARTIN, G. Y TICKLE, C. (1994). *A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. Nature 371: 609-612*

NOHNO, T., MUTO, K., NOJI, S., SAITO, T. Y TANIGUCHI, S. (1991). *Isoforms of retinoic acid receptor beta expressed in the chicken embryo. Biochim Biophys Acta. 1089:273-5*

NYE, J. Y KOPAN, R. (1995). *Developmental signaling. Vertebrate ligands for Notch. Curr Biol 5:966-9*

PACKER, A., MAILUTHA, K., AMBROZEWICZ, L. Y WOLGEMUTH, D. (2000). *Regulation of the Hoxa4 and Hoxa5 genes in the embryonic mouse lung by retinoic acid and TGFbeta1: implications for lung development and patterning. Dev Dyn. 217:62-74*

PAGANELLI, A. (2002). *Estudio de la función de la familia de genes hedgehog durante la neurogénesis en Xenopus laevis. Tesis doctoral- Facultad de Farmacia y Bioquímica.*

PAPALOPULU, N., CLARKE, J., BRADLEY, L., WILKINSON, D., KRUMLAUF, R., HOLDER, N. (1991). *Retinoic acid causes abnormal development and segmental patterning of the anterior hindbrain in Xenopus embryos. Development. 113:1145-58*

PAPALOPULU, N. Y KINTNER, C. (1996). *A posteriorising factor, retinoic acid, reveals that anteroposterior patterning controls the timing of neuronal differentiation in Xenopus neuroectoderm. Development 122, 3409-3418*

PICCOLO, S., SASAI, Y., LU, B. Y DE ROBERTIS, E. (1996). *Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. Cel 86:589-98*

PIERANI, A., BRENNER-MORTON, S., CHIANG, C. Y JESSELL, T. (1999). *A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. Cell 97:903-15*

PIJNAPPEL, W., HENDRIKS, H., FOLKERS, D., VAN DEN BRINK, C., DEKKER, E., EDELENBOSCH, C., VAN DER SAAG, P. Y DURSTON, A. (1993). *The retinoid ligand 4-oxo retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. Nature 366, 340-344*

POWER, S., LANCMAN, J Y SMITH, S. (1999). *Retinoic acid is essential for shh/hoxd signaling during rat limb outgrowth but not for limb initiation. Dev. Dyn. 216, 469-480*

RIDDLE, R., JOHNSON, R., LAUFER, E. Y TABIN, C. (1993). *Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. Cell 75:1401-16*

ROELINK, H., AUGSBURGER, A., HEEMSKERK, J., KORZH, V., NORLIN, S., RUIZ I ALTABA, A., TANABE, Y., PLACZEK, M., EDLUND, T., JESSELL, T. Y DODD, J. (1994). *Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. Cell 76, 761-775*

ROELINK, H., PORTER, J., CHIANG, C., TANABE, Y., CHANG, D., BEACHY, P. Y JESSELL, T. (1995). *Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of Sonic hedgehog autoproteolysis. Cell 81, 445-455*

ROESSLER, E., BELLONI, E., GAUDENZ, K., JAY, P., BERTA, P., SCHERER, S., TSUI, L. Y MUENKE, M. (1996). *Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencefaly. Nat. Genet. 14, 357-360*

ROSS, S., MCCAFFERY, P., DRAGER, U. Y DE LUCA, L. (2000). *Retinoids in embryonal development. Physiol Rev. 80:1021-54*

ROSSANT, J. (1991). Gene disruption in mammals. Curr Opin Genet Dev. 1:236-40

ROSSANT, J., ZIRNGIBL, R., CADO, D., SHAGO, M. Y GIGUÈRE, V. (1991). *Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. Genes Dev. 5, 1333-1344*

RUBERTE, E., DOLLE, P., KRUST, A., ZELENT, A., MORRISS-KAY, G. Y CHAMBON, P. (1990). *Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. Development 108: 213-22*

RUBERTE, E., DOLLE, P., CHAMBON, P. Y MORRISS-KAY, G. (1991). *Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. Development 111:45-60*

RUIZ I ALTABA, A. Y JESSELL, T. (1991). *Retinoic acid modifies mesodermal patterning in early Xenopus embryos. Genes Dev. 5, 175-187*

RUIZ I ALTABA, A. (1998). *Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. Development 125, 2203-2212*

SAKAI, Y., MENO, C., FUJII, H., NISHINO, J., SHIRATORI, H., SAIJOH, Y., ROSSANT, J. Y HAMADA, H. (2001). *The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the anterio-posterior axis within the mouse embryo. Genes Dev. 15:213-25*

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. Y MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.*

SASAI, Y., LU, B., STEINBEISSER, H. Y DE ROBERTIS, E. (1995). *Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in Xenopus. Nature. 377:757*

SATO, A., ASASHIMA, M., YOKOTA, T. Y NISHINAKAMURA, R. (2000). *Cloning and expression pattern of a Xenopus pronephros-specific gene, XSMP-30. Mech Dev. 92:273-5*

SCHEFFLER, B., HORN, M., BLUMCKE, I., LAYWELL, E., COOMES, D., KUKEKOV, V. Y STEINDLER, D. (1999). *Marrow-mindedness: a perspective on neuropoiesis. Trends Neurosci. 1999 Aug;22(8):348-57*

SCOTT, W., WALTER, R., TZIMAS, G., SASS, J., NAU, H. Y COLLINS, M. (1994). *Endogenous status of retinoids and their cytosolic binding proteins and limb buds of chicks vs mouse embryos. Dev. Biol. 165, 397-409*

SHARPE, C. (1992). *Two isoforms of retinoic acid receptor alpha expressed during Xenopus development respond to retinoic acid. Mech. Dev. 39: 81-93*

SHARPE, C. Y GOLDSTONE, K. (1997). *Retinoid receptors promote primary neurogenesis in Xenopus. Development 124, 515-523*

SHARPE, C. Y GOLDSTONE, K. (2000). *The control of Xenopus embryonic primary neurogenesis is mediated by retinoid signalling in the nerectoderm. Mech. Dev. 91, 69-80*

SHIMAMURA, K., HARTIGAN, D., MARTINEZ, S., PUELLES, L., RUBENSTEIN, J. (1995). *Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. Development 121:3923-33*

SIVE, H., DRAPER, B., HARLAND, R. Y WEINTRAUB, H. (1990). *Identification of a retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in Xenopus laevis. Genes Dev. 4, 932-942*

SIVE, H. Y CHENG, P. (1991). *Retinoic acid perturbs the expression of Xhox.lab genes and alters mesodermal determination in Xenopus laevis. Genes Dev. 5, 1321-1332*

SMITH, S., Y DICKMAN, E. (1997). *New insights into retinoid signaling in cardiac development. Trends Cardiovasc. Med. 7, 53-58*

SOCKANATHAN, S. Y JESSELL, T. (1998). *Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons. Cell 94:503-14*

SOPRANO, D., GAMBONE, C., SHEIKH, S., GABRIEL, J., CHANDRARATNA, R., SOPRANO, K. Y KOCHHAR, D. (2001). *The synthetic retinoid AGN 193109 but not retinoic acid elevates CYP1A1 levels in mouse embryos and Hepa-1c1c7 cells. Toxicol Appl Pharmacol 174: 153-9*

SPEMANN, H., Y MANGOLD, H. (1924). *Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. Roux's Arch. Entw. Mech. 100: 599-638*

STRATFORD, T., LOGAN, C., ZILE, M. Y MADEN, M.. (1999). *Abnormal anteroposterior and dorsoventral patterning of the limb bud in the absence of retinoids. Mech Dev. 81:115-25*

SULIK, K., DEHART, D., ROGERS, J. Y CHERNOFF, N. (1995). *Teratogenicity of low doses of all-trans retinoic acid in presomite mouse embryos. Teratology 51: 398-403*

SUMMERTON, J. (1999). *Morpholino antisense oligomers: The case for an Rnase H-independent structural type. Biochem. Biophys. Acta 1489, 141-158*

TANABE, Y. Y JESSELL, T. (1996). *Diversity and pattern in the developing spinal cord. Science 274: 1115-1123*

THALLER, C. Y EICHELE, G. (1987). *Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. Nature 327, 625-628*

TICKLE, C., ALBERTS, B., WOLPERT, L.Y LEE, J. (1982). *Local application of retinoic acid to the limb bond mimics the action of the polarizing region. Nature 296, 564-566*

TORESSON, H., MATA DE URQUIZA, A., FAGERSTROM, C., PERLMANN, T. Y CAMPBELL, K. (1999). *Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. Development 126:1317-26*

TSUKUI, T., CAPDEVILA, J., TAMURA, K., RUIZ-LOZANO, P., RODRÍGUEZ- ESTEBAN, C., YONEI-TAMURA, S., MAGALLÓN, J., CHANDRARATNA, R., CHIEN, K. BLUMBERG, B., EVANS, R. E IZPISÚA BELMONTE, J. (1999). *Multiple left-right asymmetry defects in Shh-/- mutant mice unveil a convergence of the Shh and retinoic acid pathways in the control of lefty-1. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 11376-11381*

VAESSEN, M., MEIJERS, J., BOOTSMA, D. Y VAN KESSEL, G. (1990). *The cellular retinoic acid-binding protein is expressed in tissues associated with retinoic- acid-induced malformations. Development 110: 371-378*

VAN DER WEES, J., SCHILTHUIS, J., KOSTER, C., DIESVELD-SCHIPPER, H., FOLKERS, G., VAN DER SAAG, P., DAWSON, M., SHUDO, K., VAN DER BURG, B. Y DURSTON, A. (1998). *Inhibition of retinoic acid receptor-mediated signalling alters positional identity in the developing hindbrain. Development 125:545-56*

WAGNER, M., HAN, B. Y JESSELL, T. (1992). *Regional differences in retinoid release from embryonic neural tissue detected by an in vitro reporter assay. Development 116, 55-66*

WAGNER, E., MCCAFFERY, P. Y DRÄGER, U. (2000). *Retinoic acid in the formation of the dorsoventral retina and its central projections. Dev. Biol. 222, 460-470*

WALLACE, V. (1999). *Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. Curr Biol. 9:445-8*

WECHSLER-REYA, R. Y SCOTT, M. (1999). *Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by sonic hedgehog. Neuron 22, 103-114*

WENDLING, O., DENNEFELD, C., CHAMBON, P. Y MARK, M.. (2000). *Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches. Development 127:1553-62*

WILSON, P. Y HEMMATI-BRIVANLOU, A. (1995). *Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. Nature 376:331-3*

XU, R., KIM, J., TAIRA, M., ZHAN, S., SREDNI, D. Y KUNG, H. (1995). *A dominant negative bone morphogenetic protein 4 receptor causes neuralization in Xenopus ectoderm. Biochem Biophys Res Commun. 212:212-9*

ZAVACKI, A., LEHMANN, J., SEOL, W., WILLSON, T., KLIEWER, S., MOORE, D. (1997). *Activation of the orphan receptor RIP14 by retinoids. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:7909-14*

ZELENT, A., KRUST, A., PETKOVICH, M., KASTNER, P., CHAMBON, P. (1989). *Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. Nature 339: 714-7*

ZIMMERMAN, L., DE JESUS-ESCOBAR, J. Y HARLAND, R. (1996). *The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. Cell 86:599-606*