

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN  
HOMEODOMINIO  $A1x3$  POR ÁCIDO FÓLICO  
Y SU PARTICIPACIÓN EN EL  
CIERRE DEL TUBO NEURAL CRANEAL  
DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO**

TESIS DOCTORAL

Sita C. Lakhwani Lakhwani

Madrid, 2005

Reg. F.17. 25613

30cm



Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la  
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral  
con la censura de Sobresaliente Cum laude<sup>9</sup>  
Madrid, 19/1/2006

EL PRESIDENTE

J. Blum

SECRETARIA

[Signature]

1.º Vocal

[Signature]

El alumno

[Signature]

2.º vocal

[Signature]

3.º vocal

[Signature]

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN  
HOMEODOMINIO  $A1x3$  POR ÁCIDO FÓLICO Y SU  
PARTICIPACIÓN EN EL  
CIERRE DEL TUBO NEURAL CRANEAL DURANTE EL  
DESARROLLO EMBRIONARIO**

Memoria que presenta la licenciada en Farmacia  
SITA C. LAKHWANI LAKHWANI para optar al grado  
de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director: Dr. Mario Vallejo Fernández de la Reguera  
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM  
Madrid, 2005



MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN  
Y CIENCIA



Dr. Mario Vallejo  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
"ALBERTO SOLS"

D. Mario Vallejo Fernández de la Reguera, Doctor en Medicina y Cirugía e Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas adscrito al Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" de Madrid,

CERTIFICA:

Que Sita Lakhwani Lakhwani, Licenciada en Farmacia por la Universidad de La Laguna (Tenerife), ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado:

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN HOMEODOMINIO A1x3 POR ÁCIDO FÓLICO Y SU PARTICIPACIÓN EN EL CIERRE DEL TUBO NEURAL CRANEAL DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.

El que suscribe considera el trabajo realizado satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, expide el presente certificado en Madrid a 26 de noviembre de 2005.

Fdo.: Mario Vallejo Fernández de la Reguera  
Profesor Honorario de la Universidad Autónoma de Madrid.



*A todos los que desde más  
cerca o más lejos me han  
ayudado a "construir" esta tesis*

*"No nos hace falta valor para emprender ciertas cosas porque sean difíciles, si no que son difíciles porque nos falta valor para emprenderlas"*

Lucio Anneo Séneca

## INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| Resumen .....   | 1         |
| Summary .....   | 2         |
| Abreviaturas .....  | 3         |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>4</b>  |
| 1. MORFOGÉNESIS DEL TUBO NEURAL .....   | 5         |
| 1.1. Neurulación .....  | 5         |
| 1.1.1. Formación de la placa neural .....   | 5         |
| 1.1.2. Plegamiento de la placa neural .....   | 6         |
| 1.1.3. Cierre del tubo neural .....   | 7         |
| 1.2. Eventos celulares específicos de la neurulación a nivel craneal .....                    | 8         |
| 1.2.1. Expansión del mesénquima craneal .....   | 9         |
| 1.2.2. Migración de las células de la cresta neural .....                                     | 10        |
| 1.2.3. Equilibrio entre apoptosis, proliferación y diferenciación celular .....               | 10        |
| 2. DEFECTOS DEL CIERRE DEL TUBO NEURAL .....  | 11        |
| 2.1. Definición .....   | 11        |
| 2.2. Clasificación .....  | 11        |
| 2.3. Importancia clínica .....  | 13        |
| 2.3.1. Incidencia .....   | 13        |
| 2.3.2. Factores de riesgo .....   | 13        |
| 3. MECANISMOS MOLECULARES QUE REGULAN EL CIERRE DEL TUBO NEURAL .....                         | 15        |
| 3.1. <i>Cart1</i> <sup>-/-</sup> .....  | 15        |
| 3.2. <i>Cited2</i> <sup>-/-</sup> .....   | 16        |
| 3.3. <i>Twist</i> <sup>-/-</sup> .....  | 17        |
| 3.4. <i>Spotch (Pax3)</i> .....   | 17        |
| 4. ÁCIDO FÓLICO .....   | 18        |
| 4.1. Descubrimiento y estructura .....  | 18        |
| 4.2. Importancia fisiológica .....  | 19        |
| 4.3. Vías metabólicas .....   | 20        |
| 4.4. Receptores/transportadores de folatos .....  | 20        |
| 4.5. Papel del ácido fólico en la prevención de los defectos del cierre del tubo neural ..... | 21        |
| 5. ALX3 .....   | 22        |
| 5.1. Identificación .....   | 23        |
| 5.2. Expresión .....  | 24        |
| 5.3. Función .....  | 25        |
| <b>OBJETIVOS .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>28</b> |
| 1. Cultivo de células RC2.E10 .....   | 29        |
| 2. Curvas de crecimiento de células RC2.E10 en distintas condiciones de cultivo .....         | 29        |
| 3. RT-PCR en células RC2.E10 .....  | 30        |
| 4. Southern Blot .....  | 31        |
| 5. Western Immunoblot .....   | 32        |
| 6. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en gel (EMSA) .....                     | 32        |
| 7. Plásmidos .....  | 33        |
| 8. Transfecciones transitorias / Ensayos luciferasa .....                                     | 34        |
| 9. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones de ratón .....  | 34        |
| 10. Obtención del suero de rata para cultivo de embriones de ratón .....                      | 36        |

|   |           |
|---|-----------|
| 11. Depleción de ácido fólico del suero de rata .....   | 36        |
| 12. RT-PCR en embriones de ratón .....  | 37        |
| 13. Síntesis de una ribosonda específica para detectar mRNA de <i>Alx3</i> de ratón mediante hibridación <i>in situ</i> .....                                     | 37        |
| 14. Hibridación <i>in situ</i> no radiactiva en embriones de ratón .....  | 38        |
| 15. Ensayo TUNEL <i>in situ</i> en embriones de ratón .....   | 39        |
| 16. Genotipado de las camadas nacidas de cruces ( <i>Alx3</i> <sup>+/-</sup> x <i>Alx3</i> <sup>+/-</sup> ) .....   | 39        |
| <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>41</b> |
| 1. Desarrollo de un sistema de cultivo celular para evaluar las acciones del ácido fólico <i>in vitro</i> .....   | 42        |
| 2. El ácido fólico regula selectivamente la expresión de genes homeodominio en la línea celular RC2.E10 .....   | 45        |
| 3. El ácido fólico activa la transcripción del gen que codifica <i>Alx3</i> .....   | 46        |
| 4. Desocupación de elementos diana para <i>Alx3</i> en ausencia de ácido fólico .....   | 49        |
| 5. Activación transcripcional ejercida por <i>Alx3</i> y ácido fólico .....   | 51        |
| 6. Desarrollo de embriones de ratón incubados <i>ex utero</i> .....   | 53        |
| 7. El ácido fólico aumenta la expresión de <i>Alx3</i> en el mesénquima de la región cefálica .....   | 55        |
| 8. Importancia de <i>Alx3</i> para el cierre del tubo neural .....  | 57        |
| 9. El déficit de <i>Alx3</i> incrementa el número de células apoptóticas en la región cefálica embrionaria .....  | 60        |
| 10. Importancia de <i>Alx3</i> en los efectos del ácido fólico .....  | 62        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>65</b> |
| 1. El ácido fólico regula la expresión de <i>Alx3</i> .....   | 66        |
| 2. Participación de <i>Alx3</i> en los mecanismos que controlan el cierre del tubo neural craneal .....   | 69        |
| 3. <i>Alx3</i> es un efector directo del ácido fólico .....   | 70        |
| 4. <i>Alx3</i> participa en el cierre del tubo neural craneal a través de un mecanismo extrínseco a nivel del mesénquima de la región anterior de la cabeza ..... | 74        |
| 5. Implicaciones clínicas de la participación de <i>Alx3</i> en la regulación del cierre del tubo neural craneal .....  | 76        |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>   | <b>78</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>80</b> |



## RESUMEN

---

En la presente tesis doctoral se documenta el hallazgo de que la expresión del gen que codifica el factor de transcripción de tipo homeodominio *Alx3* requiere la presencia de ácido fólico, y se describen experimentos que indican que *Alx3* participa en los mecanismos que regulan el cierre del tubo neural durante el desarrollo embrionario.

Se sabe desde hace años que la administración suplementaria de ácido fólico durante el período periconcepcional disminuye en un 70% la incidencia de los defectos congénitos del cierre del tubo neural en humanos, pero se desconoce el mecanismo por el que esta vitamina ejerce dicho efecto. Estudios con modelos animales han puesto de manifiesto que los defectos del cierre del tubo neural producidos por la inactivación de genes que codifican determinados factores de transcripción son prevenidos por el ácido fólico a través de mecanismos independientes de sus acciones metabólicas que aún no se han identificado. En este trabajo hemos investigado si la acción preventiva del ácido fólico sobre estos defectos obedece a la inducción de la expresión de factores de transcripción que participan en este proceso morfogénético.

Realizando estudios *in vitro* llevados a cabo en una línea celular de origen neural, así como ensayos de cultivo de embriones de ratón *ex utero*, hemos comprobado que la expresión del gen *Alx3* es específicamente dependiente de la presencia de niveles de ácido fólico adecuados, de manera que en ausencia de éste *Alx3* es indetectable tanto *in vitro* como *in vivo*.

Este hallazgo representa el descubrimiento de un nuevo mecanismo biológico del ácido fólico que tiene especial importancia ya que, como también se pone de manifiesto en este trabajo, *Alx3* participa en la regulación del cierre del tubo neural craneal durante el desarrollo del sistema nervioso central. En efecto, una proporción de los embriones de ratón deficientes en *Alx3*, generados mediante inactivación del gen por recombinación homóloga, muestran un defecto en el cierre de esta estructura durante el desarrollo embrionario que se asocia a un incremento anómalo en el número de células apoptóticas localizadas en la región anterior del mesénquima craneofacial. Además, hemos observado que las acciones facilitadoras que ejerce el ácido fólico sobre el cierre del tubo neural en el ratón requieren la expresión de *Alx3*, lo que indica que *Alx3* forma parte del mecanismo de acción del ácido fólico.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que *Alx3* participa en los mecanismos de cierre del tubo neural craneal y que la acción favorecedora del ácido fólico sobre este proceso se debe, al menos en parte, a la estimulación de la expresión de *Alx3* por esta vitamina.



## SUMMARY

---

The present study reports the finding of the requirement of folic acid for the expression of the gene encoding the homeodomain transcription factor *Alx3*. Experiments are also described that show the involvement of *Alx3* in the mechanisms that regulate the closure of the cranial neural tube during embryonic development.

It has been known for years that periconceptional administration of folic acid reduces the incidence of neural tube defects in humans by 70%, but the mechanisms responsible for this preventive effect remain unknown. Studies carried out using animal models have revealed that neural tube defects caused by inactivation of genes encoding certain transcription factors can be prevented by folic acid via hitherto unidentified mechanisms that are independent of its metabolic functions. In the present study we have investigated whether the preventive effect of folic acid is due to the induction of the expression of transcription factors involved in this morphogenetic process.

Using *in vitro* assays with a cell line from neural origin, as well as assays performed with mouse embryos cultured *ex utero*, we have observed that *Alx3* gene expression is specifically dependent on the availability of adequate levels of folic acid, so that in its absence *Alx3* is undetectable both *in vitro* and *in vivo*.

This finding represents the discovery of a new biological mechanism of folic acid, which has special relevance because, as it is also shown in this study, *Alx3* is part of the regulatory mechanisms of neural tube closure during central nervous system development. Thus, a proportion of *Alx3*-deficient mouse embryos, generated by gene inactivation via homologous recombination, exhibit defects on the closure of the cranial neural tube associated to an abnormally increased number of apoptotic cells in the anterior region of the craniofacial mesenchyme. Furthermore, we have observed that the expression of *Alx3* is required for the promotion of neural tube closure by folic acid, indicating that *Alx3* is part of the mechanism of action of this vitamin.

Taken together, these results indicate that *Alx3* participates in the mechanisms that regulate the cranial neural tube closure and that the facilitatory role of folic acid on this process is due, at least in part, to the stimulation of *Alx3* expression.

## ABREVIATURAS

---

|                |  |
|----------------|--|
| <b>AF:</b>     | Ácido fólico   |
| <b>bHLH:</b>   | Factor de transcripción básico hélice-lazo-hélice            |
| <b>BMP:</b>    | Proteína morfogenética de hueso (Bone morphogenetic protein) |
| <b>bp:</b>     | Pares de bases   |
| <b>BSA:</b>    | Albúmina sérica bovina                                       |
| <b>cDNA:</b>   | Ácido desoxirribonucleico copia                              |
| <b>DHF:</b>    | Dihidrofolato  |
| <b>DMEM:</b>   | Dulbecco's minimum essential médium                          |
| <b>DNA:</b>    | Ácido desoxirribonucleico                                    |
| <b>E:</b>      | Día embrionario  |
| <b>EDTA:</b>   | Ácido etilendiaminotetraacético                              |
| <b>EMSA:</b>   | Ensayo de retardo de la movilidad electroforética            |
| <b>FBP:</b>    | Proteína de unión a folatos (Folate binding protein)         |
| <b>GAT:</b>    | Glicina-Adenosina-Timidina                                   |
| <b>HEPES:</b>  | Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico            |
| <b>PBS:</b>    | Solución salina tamponada con fosfato                        |
| <b>PCR:</b>    | Reacción en cadena de la polimerasa                          |
| <b>RFC:</b>    | Transportador de folatos reducidos (Reduced folate carrier)  |
| <b>RNA:</b>    | Ácido ribonucleico   |
| <b>mRNA:</b>   | Ácido ribonucleico mensajero                                 |
| <b>r.p.m.:</b> | Revoluciones por minuto                                      |
| <b>RT-PCR:</b> | Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa    |
| <b>SAH:</b>    | S-adenosilhomocisteína                                       |
| <b>SAM:</b>    | S-adenosilmetionina  |
| <b>SSC:</b>    | Solución salina de citrato sódico (Saline sodium citrate)    |
| <b>SDS:</b>    | Dodecilsulfato de sodio (Sodium dodecyl sulfate)             |
| <b>THF:</b>    | Tetrahidrofolato   |
| <b>tRNA:</b>   | Ácido ribonucleico de transferencia                          |

# *Introducción*

---

## 1. MORFOGÉNESIS DEL TUBO NEURAL

---

### 1.1. Neurulación

Durante el desarrollo embrionario en los mamíferos, uno de los principales procesos morfogénéticos que tiene lugar es la formación del tubo neural, una estructura dorsal que constituye el primordio del sistema nervioso central del adulto. El tubo neural se forma a partir de la placa neural, una región especializada del ectodermo dorsal, mediante un proceso denominado neurulación, que se puede dividir en tres etapas diferenciadas que se solapan tanto espacial como temporalmente (Colas y Schoenwolf, 2001). Estas etapas, resumidas gráficamente en la figura 1, son las siguientes:

- 1.1.1. Formación de la placa neural
- 1.1.2. Plegamiento de la placa neural para formar el surco neural
- 1.1.3. Cierre del surco neural para formar el tubo neural

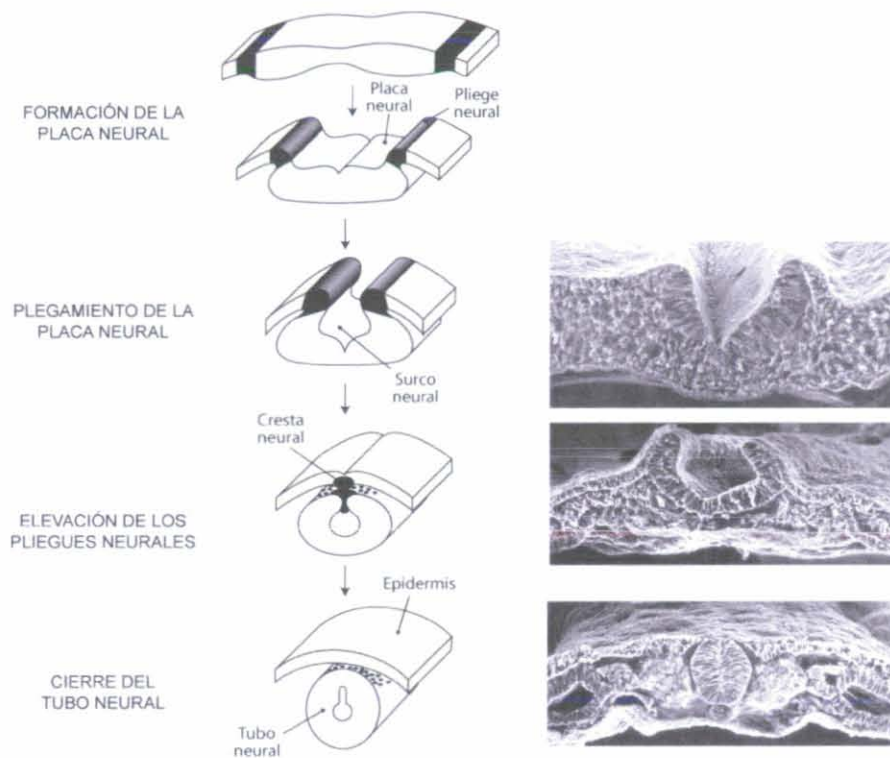
#### 1.1.1. Formación de la placa neural

La placa neural se forma como consecuencia de la diferenciación de un grupo de células de la capa ectodérmica del embrión. Durante varias décadas se aceptó el modelo de inducción neural postulado por Spemann y Mangold en 1924, según el cual el destino natural de las células del ectodermo es su diferenciación a tejido epidérmico y sólo se diferencian a un fenotipo neural, para formar la placa neural, cuando son inducidas por señales positivas procedentes de una región del mesodermo dorsal subyacente denominada organizador de Spemann (Spemann, 1924). Desde finales de los años 80, sin embargo, diversos trabajos han evidenciado que en ausencia de señales externas, las células del ectodermo embrionario están predispuestas para diferenciarse a tejido neural, y es la especificación epidérmica, y no la neural, la que sí requiere señales inductoras para tener lugar (Grunz y Tacke, 1989; Sato y Sargent, 1989). En la actualidad se acepta este modelo de "diferenciación neural por defecto" (Chang y Hemmati-Brivanlou, 1998; Hemmati-Brivanlou y Melton, 1997).

En este proceso, las proteínas morfogénéticas de hueso (BMPs, bone morphogenetic proteins) desempeñan un papel fundamental en la elección del destino celular. La señalización por BMP4 bloquea la expresión de marcadores neurales e



induce la diferenciación epidérmica y es la supresión local de esta señal, lograda por antagonistas de BMPs (noggin, folistatina, cordina), la que lleva a la formación de tejido neural (Wilson y Hemmati-Brivanlou, 1995). De este modo, las células del neuroectodermo y las del mesodermo dorsal adyacente experimentan una serie de cambios en su morfología y adquieren un aspecto más elongado y estrecho; como resultado de ello, las células de la placa neural (neuroectodermo) se distinguen del ectodermo superficial, que dará lugar a la epidermis.



**FIGURA 1.** Esquema representativo de las diferentes etapas de la formación del tubo neural en mamíferos. Inicialmente, la placa neural se dobla formando los pliegues neurales que se elevan y se aposicionan en la línea media del embrión donde posteriormente se fusionan para formar el tubo neural que queda recubierto por la epidermis superficial. En negro se representan los precursores ectodérmicos de la cresta neural y en color los de la epidermis.

### 1.1.2. Plegamiento de la placa neural

Durante esta etapa, la placa neural en formación continúa su engrosamiento apicobasal y, además, se estrecha mediolateralmente y se elonga en dirección rostrocaudal. El plegamiento de la placa neural permite la formación de los pliegues neurales en los extremos laterales de la misma. A continuación, se produce la elevación y convergencia de estos pliegues hacia la línea media dorsal del embrión. La elevación de los pliegues neurales forma un espacio curvo en la línea media de la



placa neural denominado surco neural, que constituirá el lumen del tubo neural tras el cierre de éste.

En la región craneal, estos dos procesos morfogénéticos dependen de fuerzas extrínsecas condicionadas por la expansión del mesénquima subyacente, que a su vez se debe a una mayor proliferación celular y a un aumento de la producción de matriz extracelular (Solursh y Morriss, 1977).

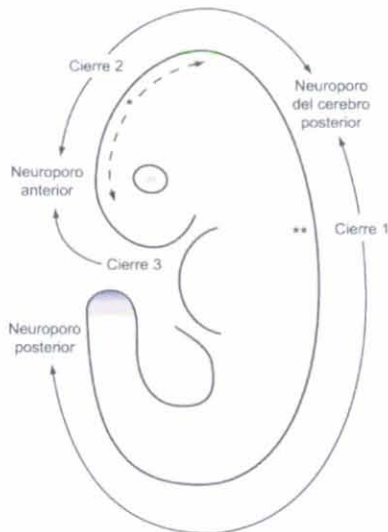
Coordinadamente, se producen cambios en la morfología de las células del neuroepitelio que constituyen una fuerza intrínseca importante a la hora de modificar la configuración de la placa neural (Sadler, 1998). Los microtúbulos son importantes para incrementar la altura de las células de la placa neural, permitiendo así que el neuroepitelio de la zona media cambie su morfología típicamente cuboidal y adquiera un aspecto columnar. Asimismo, microtúbulos y microfilamentos contribuyen de manera notable a la elevación y posterior unión de los pliegues neurales (Smith y Schoenwolf, 1997).

### 1.1.3. Cierre del tubo neural

El tubo neural se cierra cuando los pliegues neurales de ambos lados se acercan a la línea media dorsal del embrión, entran en contacto y se adhieren el uno al otro. Así, el neuroectodermo se cierra para formar el tubo neural y se separa del ectodermo superficial que se diferenciará para dar lugar a la epidermis dorsal del embrión. En humanos, el cierre del tubo neural se completa, normalmente, alrededor del día 28 de la gestación. En el ratón, el proceso de cierre tiene lugar durante los días 8.5-10 del desarrollo embrionario.

El cierre del tubo neural no ocurre de manera simultánea a lo largo de todo el neuroepitelio. En el ratón, se inicia en el estadio de 6-7 somitas (E8.5) en el denominado punto de cierre 1, localizado en el límite entre el cerebro posterior y el inicio de la región cervical de la médula espinal, y desde este sitio se extiende rostral y caudalmente (Figura 2). El punto de cierre 2 se sitúa en el límite entre el cerebro anterior y el cerebro medio y desde aquí también progresa bidireccionalmente. El punto de cierre 3 se localiza en el extremo rostral del cerebro anterior y desde ahí avanza en dirección dorsocaudal para encontrarse con el cierre que tiene lugar en dirección rostral desde el punto 2, lo que lleva al cierre del neuroporo anterior. A su vez, el cierre en dirección caudal desde el punto 2 se encuentra con el iniciado en dirección rostral desde el punto 1. La extensión caudal del cierre desde el punto 1 continúa a lo largo de la región espinal durante un período de 36 horas,

completándose finalmente a nivel del neuroporo posterior, evento que marca el final de la neurulación.



**FIGURA 2.** Cierre del tubo neural en el embrión de ratón. En la figura se muestran las diferentes regiones donde se inicia el cierre del tubo neural en la región craneal (Cierre 1 (\*\*), Cierre 2 (\*) y Cierre 3). Las flechas indican la dirección del cierre a partir de cada uno de estos puntos. El área sombreada corresponde a la porción más caudal del embrión, en la que el tubo neural se forma mediante la epitelización y condensación de las células mesenquimáticas. Tomada de la revisión (Copp et al., 2003)

Las posiciones de los puntos de cierre 1 y 3 parecen ser invariables entre las distintas cepas de ratones, y ambos se distinguen también en el embrión humano; en cambio, la posición del punto de cierre 2 es polimórfica. En algunas cepas de ratones, este sitio de cierre es relativamente caudal y se localiza en el cerebro medio, mientras que otras cepas presentan este sitio localizado más rostralmente en el cerebro anterior (Copp et al., 2003; Juriloff et al., 1991).

## 1.2. Eventos celulares específicos de la neurulación a nivel craneal

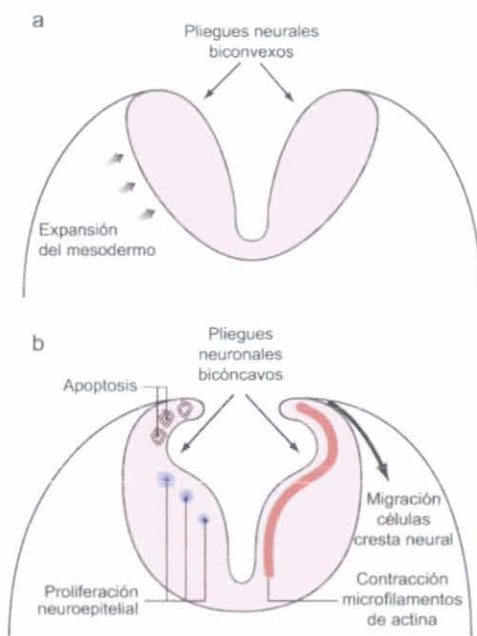
Durante el desarrollo de la región cefálica tienen lugar diversos fenómenos celulares que difieren de los que ocurren en la región espinal y que resultan esenciales para la correcta elevación y aposición de los pliegues neurales exclusivamente en la región craneal. Estos fenómenos incluyen la expansión del mesénquima craneal, la migración de las células de la cresta neural y el balance entre proliferación celular y apoptosis a nivel del neuroepitelio.

Habida cuenta que una gran proporción de los defectos del cierre del tubo neural que se observan como consecuencia de la inactivación de diferentes genes en el ratón ocurren a nivel craneal, y que su conocimiento es importante para la interpretación de los resultados presentados en esta tesis, a continuación describimos cada uno de estos procesos.



### 1.2.1. Expansión del mesénquima craneal

Durante el cierre del tubo neural, la elevación de los pliegues neurales craneales comienza con una fase inicial en la que el mesénquima subyacente experimenta una marcada expansión producida por una rápida proliferación celular así como por un notable aumento del espacio extracelular, fenómenos que proporcionan una importante fuerza mecánica que facilita la elevación de la placa neural y la posterior aposición y convergencia de los pliegues neurales craneales (Morriss y Solursh, 1978; Solursh y Morriss, 1977).



**FIGURA 3.** Eventos celulares específicos en la neurulación a nivel craneal. **a)** La expansión del mesénquima contribuye a la elevación de los pliegues neurales. **b)** Los pliegues neurales adoptan una morfología biconcava que permite la aposición de sus extremos apicales en la línea media dorsal del embrión. En cada una de las etapas del proceso se indican los diferentes fenómenos celulares que tienen lugar. Tomada de la revisión (Copp et al., 2003).

En la región del cerebro medio, en particular, esta fase de la neurulación craneal genera pliegues neurales biconvexos que sobresalen hacia fuera al ser “empujados” por el mesénquima (Figura 3, a). En una segunda fase, la expansión de dicho mesénquima contribuye a que los bordes de los pliegues neurales adquieran una morfología biconcava y se aproximen a la línea media dorsal hasta que finalmente los extremos apicales de ambos pliegues entran en contacto (Figura 3, b) (Morriss-Kay, 1981).

Esta progresión en dos fases de la neurulación craneal no ocurre en la región espinal, ya que a este nivel la expansión del mesodermo paraxial no contribuye a la elevación de los pliegues neurales. Efectivamente, diferentes estudios han demostrado que la eliminación experimental del mesodermo paraxial no es capaz de bloquear el cierre de los pliegues neurales espinales (van Straaten et al., 1993), al contrario de lo que ocurre en la neurulación craneal (Chen y Behringer, 1995; Zhao et al., 1996).

### 1.2.2. Migración de las células de la cresta neural

Durante la elevación y convergencia de los pliegues neurales craneales, en el ratón, o durante la fusión de los mismos, en el pollo, se forma una población adicional de células ectodérmicas, las células de la cresta neural, que desde aquí migran a diferentes localizaciones donde contribuyen al desarrollo del sistema nervioso periférico y de diversas estructuras esqueléticas de la cabeza y el cuello (Figura 2) (García-Castro y Bronner-Fraser, 1999).

Así, la migración de las células de la cresta neural y el cierre del tubo neural craneal son dos procesos relacionados tanto espacial como temporalmente. En la región craneal, la transición de la morfología biconvexa inicial de la placa neural a la morfología bicóncava necesaria para el cierre del tubo neural depende del inicio de la migración de las células de la cresta neural craneal. En el cerebro medio y en el cerebro posterior, las células de la cresta neural comienzan a separarse de los ápices de los pliegues neurales y empiezan a migrar cuando éstos convergen en la línea media dorsal del embrión (Morriss-Kay, 1987). En la región espinal, en cambio, no se establece esta relación entre la migración de las células de la cresta neural y el cierre del tubo neural; a este nivel, las células de la cresta neural comienzan a migrar varias horas después de que el cierre del tubo neural espinal haya concluido (Erickson y Weston, 1983).

### 1.2.3. Equilibrio entre apoptosis, proliferación y diferenciación celular

Durante la neurulación, la apoptosis constituye un fenómeno celular crítico tanto en aspectos fisiológicos como en alteraciones patológicas relacionadas con el cierre del tubo neural y el desarrollo temprano del cerebro. En los extremos de los pliegues neurales la apoptosis desempeña un papel fisiológico de marcada importancia ya que una vez que los pliegues neurales han entrado en contacto y se han adherido entre sí, se requiere el remodelamiento del epitelio a nivel de la línea media dorsal para romper la continuidad entre el neuroepitelio y el ectodermo superficial en cada lado y permitir así que ambos tejidos ectodérmicos continúen de manera separada a lo largo de la línea media del embrión (Weil et al., 1997). Sin embargo, en ciertos modelos animales con defectos del cierre del tubo neural craneal se ha descrito una apoptosis anormalmente elevada en las células del neuroepitelio en desarrollo (Barbera et al., 2002; Ikeda et al., 2001).

Por otro lado, durante la neurulación el neuroepitelio es enteramente proliferativo. Las células comienzan a salir del ciclo celular, iniciándose la



diferenciación neuronal, sólo después de que el cierre del tubo neural se haya completado en cada nivel del eje corporal. Pero en ocasiones este balance entre proliferación y diferenciación celular se encuentra alterado. Así, la proliferación celular excesiva se encuentra implicada en algunos casos de defectos del cierre del tubo neural. El "sobrecrecimiento" neuroepitelial se ha descrito en relación al fenotipo de exencefalia de ciertos mutantes en los que, tras un análisis más exhaustivo, se ha observado un ciclo celular anormalmente prolongado (Wilson, 1980).

## **2. DEFECTOS DEL CIERRE DEL TUBO NEURAL**

---

### **2.1. Definición**

Los defectos del cierre del tubo neural constituyen una serie de anomalías congénitas que se producen cuando el tubo neural abierto, propio de las etapas incipientes del desarrollo embrionario, no concluye el proceso normal de cierre adecuadamente. Estos defectos pueden abarcar desde una abertura pequeña en el conducto vertebral posterior, usualmente de carácter subclínico, hasta la falta de cierre de todo el tubo neural, que produce el tipo más grave de defecto, la craneorraquisquis.

### **2.2. Clasificación**

Atendiendo a los distintos cuadros clínicos que producen, distinguimos los siguientes tipos de defectos del cierre del tubo neural: encefalocele, anencefalia y espina bífida.

- **Encefalocele**

El encefalocele es la herniación o protrusión de parte del encéfalo y las meninges a través de un defecto craneal. Se localiza sobre todo en la región occipital y en menor proporción en las regiones parietal, frontal y sincipital. Las manifestaciones clínicas dependen de la zona del cerebro herniada, siendo las más frecuentes alteraciones visuales, microcefalia, retraso mental y crisis convulsivas; los encefalocelos sincipitales tienen, además, manifestaciones nasales y auditivas. El



pronóstico es variable, dependiendo, por un lado, del tamaño, la localización y el tipo de tejido cerebral herniado, y por otro, del número, el tipo y la severidad de las malformaciones asociadas.

- Anencefalia

Es una malformación congénita que se presenta cuando el tubo neural queda abierto en la región cefálica. Se caracteriza por la falta de cierre en la parte posterior del cráneo y ausencia de huesos en las regiones laterales y anterior de la cabeza; en consecuencia, el tejido neural queda expuesto (exencefalia) y degenera.

Clínicamente se caracteriza por la ausencia de la bóveda craneal y del cerebro sustituido por un tejido nervioso anómalo con quistes al descubierto o bajo la piel. Es un cuadro incompatible con la vida. Alrededor del 30% de los casos terminan en aborto espontáneo. En los casos en que el embarazo llega a término, el 75% nacen muertos y el resto únicamente sobreviven unas pocas horas, días o semanas.

- Espina bífida

Con este término se describen una serie de defectos congénitos causados por el cierre defectuoso del tubo neural en la región espinal. Como consecuencia de ello, el conducto vertebral no se forma adecuadamente y las membranas espinales y la propia médula protruyen a través del espacio que queda abierto por la ausencia de los arcos vertebrales. Las localizaciones más comunes de este tipo de malformaciones son las áreas lumbar y sacra del conducto espinal.

Existen diferentes tipos de espina bífida:

- *Espina bífida occulta*

Se trata de un defecto producido cuando la médula espinal no es capaz de separarse de los tejidos adyacentes en la región caudal. Como consecuencia de ello, se impide la movilidad de la médula espinal que queda atrapada dentro del canal vertebral. No provoca alteraciones graves, aunque es frecuente la sensación de debilidad en las piernas.

- *Meningocele*

Es la forma menos común. El cordón espinal no se cierra adecuadamente y como consecuencia de ello protruye un quiste formado por las meninges y líquido cefalorraquídeo. Normalmente, los nervios no se ven dañados, por lo que apenas se presentan alteraciones funcionales.

- *Espina bífida quística (mielomeningocele)*

En ésta, la forma más severa, la falta de cierre del tubo neural impide que los arcos vertebrales se formen adecuadamente, dando lugar a la formación de un quiste visible que contiene membranas, líquido cefalorraquídeo, nervios y parte de la médula espinal. Se acompaña de parálisis y pérdida de sensibilidad por debajo de la región dañada. Muchos niños y adultos con esta patología presentan problemas en el control de los esfínteres.

## 2.3. Importancia clínica

### 2.3.1. Incidencia

Las malformaciones congénitas ocupan el segundo lugar entre las causas de muerte en niños menores de un año. Entre ellas, los defectos del cierre del tubo neural se sitúan en el segundo lugar en frecuencia, tras las alteraciones cardíacas. Presentan una incidencia de 1 a 3 por cada 1000 recién nacidos vivos, aunque estas cifras varían según la localización geográfica.

En general, los defectos del tubo neural son esporádicos. Sin embargo, una vez que aparecen, el riesgo de afectación en un segundo embarazo es más elevado que el riesgo poblacional o de primera aparición. Los cálculos en cuanto al peligro de reaparición oscilan entre un 3 y un 8%.

### 2.3.2. Factores de riesgo

Entre las circunstancias que contribuyen a incrementar el riesgo de aparición de defectos del cierre del tubo neural cabe destacar la existencia de antecedentes familiares con este tipo de defectos, especialmente anencefalia o espina bífida, ya que la probabilidad de aparición en hermanos de individuos afectados es hasta diez veces superior a la observada en la población general.

Otro de los factores de riesgo que se asocia con una mayor incidencia de espina bífida o anencefalia es la ingesta inadecuada de folatos naturales, o de su forma sintética, el ácido fólico, una vitamina del grupo B, antes y durante los primeros meses de gestación. Diversos ensayos clínicos, así como estudios comparativos con diferentes suplementos vitamínicos, han puesto de manifiesto que la falta de consumo de ácido fólico o complejos multivitamínicos que lo contienen, incrementa de dos a ocho veces el riesgo de tener un hijo afectado (Czeizel y Dudas, 1992; Wald, 1991).



Aún así, todavía se desconoce el mecanismo responsable de esta asociación entre defectos del tubo neural y folatos.

Además del ácido fólico, otros nutrientes, en particular la vitamina B12, se han asociado con los defectos del cierre del tubo neural. Aunque existen estudios que no muestran diferencias en los niveles séricos de vitamina B12 en madres de niños afectados frente a madres control (Mills et al., 1992; Molloy et al., 1985; Thorand et al., 1996), en otros estudios se detectaron niveles inferiores a lo normal asociados a defectos del tubo neural (Groenen et al., 2004; Kirke et al., 1993; Wald et al., 1996). Esta controversia ha sido el motivo de una revisión reciente en la cual se concluyó que existe una asociación moderada entre la existencia de bajos niveles séricos maternos de vitamina B12 y un mayor riesgo de defectos del cierre del tubo neural (Ray y Blom, 2003).

El consumo de fármacos antiepilépticos durante el embarazo también se asocia al desarrollo de este tipo de anomalías congénitas. La exposición del feto durante el segundo mes de gestación a fármacos de este tipo, tales como ácido valproico y carbamazepina, ampliamente prescritos, se asocia con un incremento de 10 a 20 veces en la incidencia de defectos del tubo neural. El mismo estudio evidenció una mayor incidencia de embarazos afectados tras la administración de cotrimoxazol, antibiótico constituido por la asociación de sulfametoxazol y trimetoprim, éste último con actividad antagonista del ácido fólico (Medveczky et al., 2004).

Por último, se ha observado que la diabetes pregestacional incrementa entre dos y diez veces el riesgo de tener hijos con defectos del sistema nervioso central así como otro tipo de malformaciones congénitas (por ejemplo, embriopatía diabética). No se conoce con claridad el mecanismo de este efecto teratogénico, aunque se relaciona con el grado de control metabólico materno. Existen evidencias de que el riesgo de malformaciones congénitas en la progenie de mujeres diabéticas se asocia con niveles altos de glucosa en sangre durante el primer trimestre del embarazo, aunque se desconoce si esta hiperglucemia es directamente teratogénica o si sirve como marcador para otros agentes teratógenos como cuerpos cetónicos o radicales libres de oxígeno. No obstante, estudios llevados a cabo en ratones indican que el exceso de glucosa en sangre altera la expresión de genes implicados en el desarrollo embrionario (Mitchell et al., 2004).

### 3. MECANISMOS MOLECULARES QUE REGULAN EL CIERRE DEL TUBO NEURAL

---

En general se conoce poco acerca de los mecanismos implicados en la regulación del cierre del tubo neural, pero se han llevado a cabo estudios encaminados a dilucidar el papel de ciertos genes durante el desarrollo embrionario mediante la introducción de alelos mutantes generados por recombinación homóloga en el ratón. En estos estudios se han identificado genes, muchos de ellos codificadores de proteínas que participan en la regulación de la transcripción, cuya delección produce alteraciones del cierre del tubo neural. Así, estos estudios han proporcionado las primeras evidencias en firme de la participación de diversos factores de transcripción en la regulación del cierre del tubo neural.

Más de 80 modelos genéticos de ratón presentan defectos del cierre del tubo neural, y los estudios y análisis por mutagénesis que se llevan a cabo en la actualidad hacen que este número siga en aumento.

El examen de los genes cuya disrupción causa defectos del tubo neural ha permitido identificar vías de señalización y funciones celulares que resultan esenciales para el correcto cierre del tubo neural. A continuación se describen algunos de los más relevantes por su relación con los estudios realizados en la presente tesis doctoral.

#### 3.1. *Cart1*

*Cart1* (Cartilage homeoprotein 1) es un gen homeobox que codifica una homeoproteína de la clase Paired que pertenece al grupo I de factores de transcripción tipo *aristaless*. Durante la embriogénesis en el ratón, *Cart1* se expresa inicialmente en el día E8.0 en el mesénquima de la cabeza y en días posteriores también se detecta en los arcos branquiales, en el primordio de las extremidades y en diferentes cartílagos, pero no se detecta su expresión en el tubo neural (Zhao et al., 1993).

La inactivación génica de *Cart1* provoca un complejo síndrome congénito caracterizado por el cierre anómalo del tubo neural que causa acrania y meroanencefalia (Zhao et al., 1996). La lesión primaria que inicia este síndrome craneofacial es la pérdida de células mesenquimáticas como consecuencia de una apoptosis anormalmente elevada en la región anterior de la cabeza; inicialmente se bloquea el cierre del tubo neural en la región del cerebro anterior, posteriormente esta



región se cierra pero el tubo neural queda abierto en el límite entre el cerebro anterior y el cerebro medio dando lugar al fenotipo de acrania/meroanencefalia característico de estos mutantes. Es importante destacar que el tratamiento prenatal de los ratones mutantes de *Cart1* con ácido fólico suprime este fenotipo, hecho que proporciona una evidencia experimental del papel protector del ácido fólico en la prevención de los defectos del cierre del tubo neural (Zhao et al., 1996). Asimismo, estos resultados constituyen la primera evidencia de que el tratamiento con ácido fólico puede compensar un defecto genético.

### 3.2. *Twist*

Este gen codifica un factor de transcripción que contiene un dominio básico hélice-lazo-hélice (bHLH). En el ratón, *twist* se expresa inicialmente en el día embrionario E7.5 en el mesodermo anterolateral de la cabeza y en el día E8.0 se detecta su expresión en los somitas y en la somatopleura de la placa lateral (Wolf et al., 1991). Aunque no se detecta su expresión ni en la placa ni en el tubo neural, sí existen niveles altos de mRNA de *twist* en las células del mesénquima de la cabeza y los arcos branquiales. El patrón de expresión de *twist* durante la embriogénesis en el ratón indica que en vertebrados esta proteína es necesaria para la regulación de genes implicados en la especificación o diferenciación del mesodermo y en el desarrollo del mesénquima en la región craneal (Chen y Behringer, 1995).

Los embriones mutantes deficientes de *twist* presentan defectos en el mesénquima de la cabeza, arcos branquiales, somitas y primordio de las extremidades. Estos embriones mueren durante el desarrollo embrionario en el día de gestación E11.5. La malformación más llamativa que presentan estos ratones es el fallo del cierre del tubo neural específicamente en la región craneal, mientras que la región más dorsal del cerebro posterior y el conducto espinal sí se forman adecuadamente. Esta observación resultó relativamente inesperada ya que *twist* no se expresa en el tubo neural. Sin embargo, se expresa de manera abundante en el mesénquima craneal subyacente. Así, Chen y cols. (Chen y Behringer, 1995) analizaron las funciones de *twist* y comprobaron que regula la morfología y el comportamiento de las células del mesénquima de la cabeza, tejido que actúa como lugar de soporte o apoyo para los pliegues neurales y desempeña un importante papel en el cierre del tubo neural craneal.



### 3.3. *Cited2*

Los genes de la familia CITED (CBP/p300-Interacting Transactivators with glutamic acid (E)/aspartic acid (D)-rich C-terminal domain) codifican proteínas nucleares que interaccionan con proteínas que se unen al DNA y actúan así como cofactores transcripcionales.

En el ratón, *Cited2*, también denominado *Mrg1/p35srj*, se expresa en tejidos de origen mesodérmico (islotos sanguíneos, miocardio en desarrollo, septum transversum, mesodermo presomítico, somitas y mesénquima craneal), así como en el neuroectodermo craneal y en las células de la cresta neural craneal.

Los ratones deficientes de *Cited2* mueren antes del nacimiento, entre los días de gestación E13.5 y E18.5, y presentan exencefalia como consecuencia del fallo en la fusión de los pliegues neurales en el límite entre el cerebro anterior y el cerebro medio y en la región del cerebro posterior. La causa más probable de estos defectos en el tubo neural craneal es la apoptosis masiva que se observa en las células del neuroectodermo de estas regiones.

El tratamiento prenatal con ácido fólico reduce significativamente el fenotipo exencefálico en los embriones *Cited2*<sup>-/-</sup> tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, no se observan anomalías en el metabolismo de los folatos en estos embriones. Ésta es la primera evidencia genética, por tanto, de que el ácido fólico puede reducir la incidencia de los defectos del cierre del tubo neural mediante un mecanismo independiente de la reparación de un defecto metabólico (Barbera et al., 2002).

### 3.4. *Splotch (Pax3)*

*Pax3* codifica un factor de transcripción tipo homeodominio perteneciente a la familia Paired. Se expresa justo antes del cierre del tubo neural a lo largo del neuroepitelio dorsal, desde el prosencéfalo hasta el margen anterior del neuroporo posterior (Goulding et al., 1991). Asimismo, *Pax3* se expresa en algunos derivados de la cresta neural, tales como los ganglios espinales, ganglios de la raíz dorsal, y mesodermo presomítico, así como en algunas estructuras craneofaciales derivadas de la cresta neural.

El ratón mutante *splotch (Sp)* presenta una mutación espontánea en el gen *Pax3*. Se trata de un modelo animal establecido para el estudio de los defectos del cierre del tubo neural. Inicialmente *Sp* se identificó como un mutante espontáneo en una colonia de ratones y posteriormente se ha comprobado mediante análisis genético

que otros muchos mutantes, algunos espontáneos como *Sp-delayed* ( $Sp^d$ ) y otros inducidos por radiación X como *Sp-retarded* ( $Sp^r$ ),  $Sp^{1H}$  y  $Sp^{2H}$ , son alélicos a *Sp* (Epstein et al., 1991).

Las bases metabólicas para la prevención de los defectos del cierre del tubo neural por ácido fólico se han investigado ampliamente en el ratón *splotch* ( $Sp^{2H}$ ) que presenta una deleción interna de 32 nucleótidos en el gen homeodominio *Pax3*. Los embriones homocigotos para esta mutación ( $Sp^{2H}/Sp^{2H}$ ) desarrollan exencefalia y/o espina bífida en combinación con ciertas anomalías asociadas a la cresta neural que incluyen, entre otras, defectos cardíacos.

Los embriones  $Sp^{2H}/Sp^{2H}$  muestran, además, alteraciones en el metabolismo de los folatos, tal y como evidenciaron los resultados obtenidos con estos ratones en el test de supresión de deoxiuridina (Fleming y Copp, 1998).

Se ha observado que el aporte suplementario de ácido fólico en la dieta materna no sólo reduce la incidencia de los defectos del cierre del tubo neural en estos embriones, sino que también normaliza el metabolismo dependiente de los folatos.

No obstante, aún no se ha identificado el mecanismo celular por el cual el ácido fólico ejerce su efecto preventivo en los embriones *splotch*, aunque como en otros mutantes que responden a ácido fólico, se ha comprobado que los defectos del cierre del tubo neural se producen como consecuencia de una muerte celular excesiva. Esta idea es consistente con la observación de que la inhibición farmacológica de la función de *p53* o su deleción génica en los embriones  $Sp^{2H}/Sp^{2H}$ , a través de la generación de embriones dobles mutantes ( $Sp^{2H}/Sp^{2H}$ ,  $p53^{-/-}$ ), rescata muchos de los defectos del cierre del tubo neural producidos por la mutación  $Sp^{2H}$  (Pani et al., 2002).

## 4. ÁCIDO FÓLICO

---

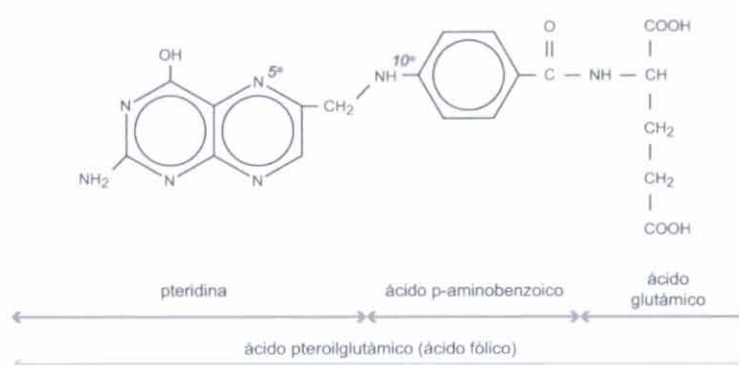
### 4.1. Descubrimiento y estructura

En 1931, Lucy Wills demostró que la administración de extracto de levadura resultaba efectivo frente a la anemia macrocítica tropical en la India y denominó "Factor Wills" al factor responsable de ello (Wills, 1931). Diversos trabajos contribuyeron al aislamiento de este factor así como a la elucidación de su estructura química. Finalmente, en 1941, Mitchell y cols. (Mitchell, 1941) propusieron el término



“ácido fólico” para identificar a un factor de crecimiento presente en alta concentración en las hojas de espinacas (el término ácido fólico deriva del latín *folium* (hoja)).

Todos los folatos tienen en común la estructura del ácido pteroilglutámico (PteGlu), molécula constituida por un anillo de pteridina unido mediante un puente metileno a un residuo de ácido p-aminobenzoico que a su vez se une por enlace amida a un residuo de ácido glutámico. Los distintos folatos difieren en el estado de oxidación del anillo de pteridina, en la naturaleza de las sustituciones presentes en las posiciones N5 y N10 y en el número de residuos de ácido glutámico conjugados entre sí para formar una cadena de poliglutámico (Figura 4).



**FIGURA 4.** Estructura química del ácido fólico. En la figura aparecen sombreadas las posiciones N5 y/o N10 de la molécula, a las cuales se pueden unir diferentes sustituyentes para dar lugar a los distintos derivados de este compuesto.

## 4.2. Importancia fisiológica

El ácido fólico es esencial para la síntesis de los ácidos nucleicos y participa en el metabolismo de ciertos aminoácidos. Actúa como coenzima de numerosas enzimas que participan en la biosíntesis de purinas y pirimidinas e interviene en el catabolismo de la histidina y la glicina, en la interconversión glicina-serina y en la síntesis de la metionina.

Es un nutriente esencial para la vida celular cuyo déficit produce anemia megaloblástica como consecuencia de la alteración en la síntesis de DNA en las células de la médula ósea.

Por otro lado, la deficiencia de ácido fólico se relaciona con un aumento de los niveles plasmáticos de homocisteína que se asocia directamente con un mayor riesgo de trastornos vasculares tales como arterioesclerosis y trombosis venosa.

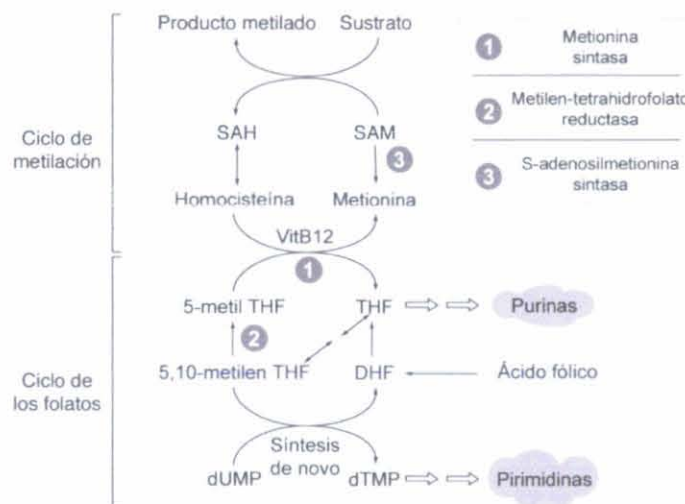


El déficit de folatos también se ha relacionado con ciertos tipos de cáncer (cervical, bronquial, de colon, mamario), enfermedad de Alzheimer, trastornos afectivos, síndrome de Down, abortos recurrentes y preeclampsia (Lucock, 2000).

### 4.3. Vías metabólicas

En la célula, los distintos derivados del ácido fólico participan como coenzimas en diversas reacciones de transferencia de unidades monocarbonadas que tienen lugar en el interior de la célula (Figura 5):

- Interconversión serina-glicina
- Biosíntesis de nucleótidos de purina y de pirimidina
- Ciclo de remetilación de la homocisteína: biosíntesis *de novo* de metionina folato-dependiente



**FIGURA 5.** Principales rutas metabólicas en las que participa el ácido fólico o derivados, fundamentalmente como coenzimas en reacciones que requieren la transferencia de unidades de un átomo de carbono. SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; THF: tetrahidrofolato; DHF: dihidrofolato; dUMP: deoxiuridinmonofosfato; dTMP: deoxitimidinmonofosfato; vitB12: vitamina B12

### 4.4. Receptores / transportadores de folatos

En los mamíferos, la captación celular de los folatos está mediada por dos tipos de proteínas de membrana: el transportador de folatos reducidos (reduced-folate carrier, RFC) y las proteínas de unión a folatos (folate-binding proteins, FBPs), comúnmente denominadas receptores de folatos.

El transporte de los folatos al interior de las células está mediado por el transportador de folatos reducidos (RFC) a través de un mecanismo endocítico. Este transportador presenta una baja afinidad por los folatos, que se encuentran en el medio extracelular en concentraciones relativamente bajas. Por ello, es necesario que los receptores de folatos (FRs o FBPs), que presentan mayor afinidad por el ácido fólico, *unan estas moléculas y aumenten su concentración y disponibilidad en la vecindad de los transportadores en la membrana plasmática* (Sabharanjak y Mayor, 2004; Saitsu et al., 2003).

Las proteínas de unión a folatos (FRs o FBPs) se encuentran ancladas a la superficie de la célula a través de péptidos glicosilfosfatidilinositol (GPI). En humanos se han clonado cuatro isoformas de los receptores de folatos (FR $\alpha$ , FR $\beta$ , FR $\gamma$  y FR $\delta$ ), mientras que en el ratón sólo se han identificado tres (FBP1, FBP2 y FBP3) (Sabharanjak y Mayor, 2004; Saitsu et al., 2003). Se ha identificado, asimismo, un receptor de folatos de alta afinidad sin modificaciones GPI presente en el plasma cuyos niveles aumentan en situaciones de déficit de folatos y promueve la estabilización del tetrahidrofolato (Antony et al., 1982).

Numerosas evidencias sugieren que FBP1 desempeña importantes funciones durante la embriogénesis. *Fbp1* presenta una marcada expresión en las regiones más dorsales de los pliegues neurales, donde tiene lugar la fusión de los mismos durante el cierre del tubo neural. También se expresa en los rombómeros 2 y 6 (Saitsu et al., 2003), lo que sugiere su implicación en el desarrollo de las células de la cresta neural. Los embriones de ratón deficientes en *Fbp1*, efectivamente, presentan severas anomalías morfológicas *que afectan al prosencéfalo, mesencéfalo, vesícula ótica, placoda ótica y arcos branquiales*. Es importante señalar que el aporte suplementario de ácido fólico rescata este fenotipo, probablemente mediante la difusión pasiva de este compuesto al interior de las células (Piedrahita et al., 1999).

#### **4.5. Papel del ácido fólico en la prevención de los defectos del cierre del tubo neural**

La relación que existe entre la dieta y los defectos del cierre del tubo neural es conocida desde hace muchos años. En 1964 los resultados obtenidos en una serie de estudios comparativos llevados a cabo con diferentes nutrientes permitieron identificar



al ácido fólico como un factor relacionado con este tipo de defectos congénitos (Hibbard, 1964).

Posteriormente, los estudios de intervención, en los que se ha determinado el efecto de la suplementación materna con ácido fólico durante la gestación sobre la prevalencia de los defectos del cierre del tubo neural en los hijos, han sido definitivos para establecer el papel preventivo del ácido fólico en las primeras etapas de la gestación. El más significativo fue el realizado en 1991 por el Medical Research Council (MRC) del Reino Unido para evaluar el papel de la suplementación con ácido fólico en la prevención de los defectos del tubo neural (Wald, 1991). En este estudio participaron mujeres de alto riesgo, esto es, que ya habían tenido un embarazo afectado por defectos del tubo neural y que planeaban una nueva gestación, en la que se determinó que la suplementación diaria con 4 mg de ácido fólico en el período periconcepcional reduce el riesgo de recurrencia de los defectos del tubo neural en un 72% de los casos.

El estudio descrito fue un ensayo de *recurrencia*, es decir, se evaluaba la capacidad del ácido fólico de prevenir un embarazo afectado por defectos del tubo neural en mujeres que ya habían tenido con anterioridad uno o más embarazos afectados, y que, por tanto, formaban parte de un grupo considerado de alto riesgo. Posteriormente, Czeizel y Dudas (Czeizel y Dudas, 1992) evaluaron la capacidad del ácido fólico para prevenir la *ocurrencia* de los defectos del tubo neural, esto es, un primer embarazo afectado. En éste y otros estudios se ha demostrado una reducción significativa del riesgo de ocurrencia de defectos del tubo neural con dosis que van desde 0,4 mg/día hasta 1 mg/día (Kirke et al., 1992; Milunsky et al., 1989; Werler et al., 1993).

En la actualidad, las autoridades sanitarias establecen como recomendación general para mujeres en edad fértil la suplementación diaria con 0,4 mg de ácido fólico para prevenir la ocurrencia de defectos del tubo neural.

A pesar de que los suplementos vitamínicos de ácido fólico han sido utilizados ampliamente desde hace más de diez años, aún hoy se desconoce el mecanismo o mecanismos subyacentes por los que el ácido fólico previene la ocurrencia de los defectos congénitos del cierre del tubo neural. La identificación de modelos animales con defectos del cierre del tubo neural prevenibles mediante el aporte suplementario de ácido fólico proporciona una herramienta de enorme utilidad en la investigación de dichos mecanismos de prevención.



## 5. *Alx3*

---

En el presente trabajo hemos abordado el estudio del gen homeodominio *Alx3* como una posible diana del ácido fólico, y hemos analizado la implicación de *Alx3* en los mecanismos que regulan el cierre del tubo neural craneal durante el desarrollo embrionario en el ratón. Por ello, en este apartado realizamos una descripción de este gen, así como de su patrón de expresión y su función durante el desarrollo embrionario.

### 5.1. Identificación

*Alx3* es un gen tipo homeodominio de la clase Paired, un importante grupo de genes que codifican proteínas con funciones relevantes durante el desarrollo embrionario y que se caracterizan por la presencia de un homeodominio homólogo al codificado por el gen *paired* de *Drosophila*.

La primera identificación de un fragmento de cDNA que codifica el homeodominio de *Alx3* se llevó a cabo en la línea celular de insulinoma de hámster HIT T15 M2.2.2 en un estudio de búsqueda de factores reguladores del gen de insulina (Rudnick et al., 1994). Posteriormente, mediante un análisis de secuencia a partir de una genoteca de cDNA de embrión de ratón de 16.5 días de gestación (E16.5) se clonó el cDNA completo del gen homólogo de ratón (ten Berge et al., 1998). Más recientemente, *Alx3* fue identificado en humanos (Wimmer et al., 2002). En nuestro laboratorio se aisló un cDNA que codifica la proteína homóloga *Alx3* de rata y se comprobó el alto grado de coincidencia de la secuencia de *Alx3* en las diferentes especies estudiadas (Perez-Villamil et al., 2004).

Dentro de la clase Paired, *Alx3* se incluye en un subgrupo de genes caracterizado por la presencia en la región carboxi-terminal de un dominio conservado conocido como OAR o dominio *aristaless*. Este grupo incluye los genes *Prx1* y *Prx2*, (Lu et al., 1999; ten Berge et al., 1998), *Alx3* (Rudnick et al., 1994; ten Berge et al., 1998), *Alx4* (Qu et al., 1997) y *Cart1* (Zhao et al., 1993). Las proteínas codificadas por los genes *Alx3*, *Alx4* y *Cart1* presentan homeodominios prácticamente idénticos, así como una elevada similitud de secuencia en la región localizada entre el homeodominio y el dominio *aristaless*.

Estas homeoproteínas se unen preferentemente de manera cooperativa formando homo- o heterodímeros a elementos consenso en el DNA constituidos por dos motivos 5'-TAAT-3' separados por tres nucleótidos denominados elementos P3 (TAATNNNATTA) (Qu et al., 1999; Tucker y Wisdom, 1999; Wilson et al., 1993), característica que ha sido confirmada en nuestro laboratorio específicamente para *Alx3* (Perez-Villamil et al., 2004).

## 5.2. Expresión

Estudios de hibridación *in situ* han demostrado que durante el desarrollo embrionario en el ratón, *Alx3* se expresa a partir del día 8 de gestación. En este estadio, así como en E8.5 y E9.0, su expresión se detecta en la membrana alantoidea y en la región próxima al primordio de la cola.

Entre los días de gestación E9.0 y E9.5 se observa un marcado cambio en el patrón de expresión de *Alx3*, que en este estadio del desarrollo embrionario se expresa de manera predominante en el mesénquima cefálico anterior, en múltiples áreas del mesodermo lateral y en la pared abdominal (Meijlink et al., 1999).

Conocido el importante papel que desempeñan los genes homeodominio de la familia *aristales* en la morfogénesis de las estructuras esqueléticas craneofaciales y de las extremidades, a continuación describimos con más detalle el patrón de expresión de *Alx3* en los estadios críticos del desarrollo de estas estructuras en el ratón.

En la región craneofacial, en el día embrionario E9.5, *Alx3* muestra una marcada expresión en el mesénquima del proceso frontonasal subyacente a las placodas nasales. Posteriormente, en los días E10.5 y E11.0 se expresa en las regiones lateral y medial del mesénquima del proceso nasal. Desde E9.5 a E11.0, se detecta su expresión en el arco mandibular distal y posteriormente, en los días E12.5-E14.5, en el mesénquima derivado de la cresta neural en el proceso nasal, en ambas mandíbulas en desarrollo y en la parte distal de la lengua (ten Berge et al., 1998).

A nivel de las extremidades, a partir de E9.5, *Alx3* se expresa en el mesénquima del primordio de las extremidades anteriores, que en este estadio ya han comenzado a formarse. A nivel del futuro primordio de las extremidades posteriores, la expresión de *Alx3* está restringida a las regiones más anteriores (ten Berge et al., 1998).



### 5.3. Función

El estudio de distintos modelos animales que presentan mutaciones en los genes homeodominio de la familia *aristalless* ha permitido identificar algunas de las funciones de estos genes en la morfogénesis de las estructuras esqueléticas durante el desarrollo embrionario.

En efecto, la inactivación de algunos de estos genes provoca defectos en la morfogénesis craneofacial y de las extremidades (Beverdam et al., 2001; Qu et al., 1998; ten Berge et al., 1998; Zhao et al., 1996). Además, el análisis de estos mutantes ha establecido, en ocasiones, funciones redundantes para algunos de estos genes.

Los ratones con mutaciones en *Alx4* presentan polidactilia preaxial, anomalías leves del esqueleto craneofacial y gastrosquisis, defecto caracterizado por la herniación del intestino a través de la pared abdominal (Qu et al., 1998). Un elevado porcentaje de los ratones *Cart1*<sup>-/-</sup> muestran defectos del cierre del tubo neural craneal. Como ya hemos dicho, *Alx3*, *Alx4* y *Cart1* están altamente relacionados entre sí y, de hecho, comparten ciertas funciones durante la morfogénesis en el ratón. No obstante, a diferencia de los anteriores, los ratones *Alx3*<sup>-/-</sup> se desarrollan con aparente normalidad y no se ha descrito hasta la fecha ningún defecto fenotípico en ellos, por lo que la falta de *Alx3* probablemente sea compensada por otros genes con funciones redundantes. En efecto, los ratones dobles mutantes *Alx3/Alx4* presentan severas anomalías craneofaciales que no se observan en los mutantes individuales, lo que confirma que estos genes ejercen funciones redundantes en la morfogénesis de las estructuras esqueléticas craneofaciales (Beverdam et al., 2001).



# Objetivos

---

## OBJETIVOS

---

La hipótesis a evaluar en el trabajo que constituye la presente tesis doctoral es que el ácido fólico favorece el cierre del tubo neural durante el desarrollo embrionario mediante la inducción de la expresión de factores de transcripción que participan en este proceso.

Para evaluar esta hipótesis, los objetivos propuestos son los siguientes:

1. Determinar la posible existencia de genes que codifican factores de transcripción cuya expresión es regulada por el ácido fólico.
2. Determinar si la regulación de la expresión del gen homeodominio *A/x3* durante el desarrollo embrionario *in vivo* está condicionada por la disponibilidad de niveles adecuados de ácido fólico.
3. Determinar la participación del *A/x3* en la regulación del cierre del tubo neural durante el desarrollo embrionario.
4. Determinar si la estimulación de la expresión de *A/x3* forma parte del mecanismo de acción del ácido fólico durante el cierre del tubo neural.

## *Materiales y métodos*

---



## 1. CULTIVO DE CÉLULAS RC2.E10

---

Las células RC2.E10 constituyen una línea monoclonal establecida en nuestro laboratorio a partir de cultivos primarios de corteza cerebral de ratas Sprague-Dawley de 16 días de gestación (Schwartz y Vallejo, 1998). Se trata de una línea celular inmortalizada condicionalmente por expresión de un alelo mutante del oncogen SV40T (simian virus 40-large T antigen) sensible a temperatura. Estas células se caracterizan por la expresión endógena, entre otros, del factor de transcripción tipo homeodominio Alx3, detectable mediante técnicas de inmunohistoquímica, western blot y RT-PCR (Pérez-Villamil, 1996).

Las células RC2.E10 se cultivaron en medio RPMI 1640 sin ácido fólico (Invitrogen™) suplementado con suero fetal bovino (10%). El contenido de ácido fólico del suero se eliminó mediante tratamiento con una resina de intercambio iónico AG1-X8 (Bio-Rad) siguiendo un procedimiento descrito en detalle en el apartado 16 de esta sección. Para compensar la deficiencia metabólica de ácido fólico, el medio de cultivo se suplementó con solución GAT, compuesta por glicina (200  $\mu$ M), adenosina (100  $\mu$ M) y timidina (10  $\mu$ M) (Sigma Chemical Co.) (Zhao et al., 1998). Igualmente, se añadieron antibióticos (penicilina, 100 IU/ml y estreptomycin, 100  $\mu$ g/ml) y fungizona (2.5  $\mu$ g/ml). Las células se incubaron a 33°C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5%.

## 2. CURVAS DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS RC2.E10 EN DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO

---

Las células RC2.E10 se sembraron en placas de cultivo de 60 mm de diámetro a una densidad inicial de  $5 \times 10^4$  células por placa y se mantuvieron a 33°C en las diferentes condiciones de cultivo y durante el número de días especificado.

Las condiciones de cultivo estudiadas fueron las siguientes:

- Medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (DMEM).
- Medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (RPMI).
- Medio RPMI sin ácido fólico suplementado con suero fetal bovino deplecionado de ácido fólico (RPMI (-AF)).

- Medio RPMI sin ácido fólico suplementado con suero fetal bovino deplecionado de ácido fólico al que añadimos ácido fólico exógeno a una concentración equivalente a la que contiene el medio RPMI comercial (RPMI (-AF) + 2.3  $\mu$ M AF).
- Medio RPMI sin ácido fólico suplementado con suero fetal bovino deplecionado de ácido fólico al que añadimos solución GAT (glicina, 100  $\mu$ M; adenosina, 200  $\mu$ M; timidina, 10  $\mu$ M) (RPMI (-AF) + GAT).

Cada 24 horas las células del grupo experimental correspondiente se tripsinizaron, se recogieron tras centrifugación y se contaron con un hemocitómetro. El medio de cultivo de las células que permanecían cultivadas se cambió cada 2 días.

### **3. RT-PCR EN CÉLULAS RC2.E10**

---

Las células RC2.E10 se sembraron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro; un grupo de placas se mantuvo en ausencia de ácido fólico, mientras otras se trataron con ácido fólico (0.1  $\mu$ M) durante 24 horas, transcurridas las cuales se procedió a la extracción del RNA total de las células con TriReagent (Molecular Research Center, Inc.), reactivo comercial que combina fenol y tiocianato de guanidina.

A continuación, 5  $\mu$ g de RNA se hibridaron con oligo(dT)<sub>15</sub> y se incubaron con la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) para sintetizar el cDNA correspondiente.

La amplificación por PCR a partir de los cDNAs obtenidos se llevó a cabo con la polimerasa Taq y se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (Robel et al., 1995):

|               | Oligonucleótido directo          | Oligonucleótido reverso         |
|---------------|----------------------------------|---------------------------------|
| <i>Otx1</i>   | 5'-ATCTGGAGCCCGGCCTCC-3'         | 5'-TGCTTGGATTACAAGGAGCCC-3'     |
| <i>Otx2</i>   | 5'-CCATGACCTATACTCAGGCTTCAGG-3'  | 5'-CTTCCACCCAGGGATATGGAGCTTC-3' |
| <i>Idx1</i>   | 5'-CCACCATGAATAGTGAGGAGCA-3'     | 5'-GGCGAGCGGGGGCACTTC-3'        |
| <i>Alx3</i>   | 5'-GGCATCCCCTCTCCATGTATG-3'      | 5'-CAAAAGTGAGGCCAGACCTAAG-3'    |
| <i>Emx1</i>   | 5'-GTGCATGTGCCTGGCTGGCTGGGTGC-3' | 5'-GAGGCGGCCTTCGTGAGTGGCTT-3'   |
| <i>Dlx2</i>   | 5'-TCCACGGCTACGGACAG-3'          | 5'-GACCTTGAGCCTGAAAT-3'         |
| <i>Dlx5</i>   | 5'-ACAGCCATGTCTGCTTAGACCAGAG-3'  | 5'-CCAGTATCAGTATCACGGCGTGAA-3'  |
| <i>Dlx4</i>   | 5'-AAGAAGCTCCTGAAACAG-3'         | 5'-CTAGGTTTGGTCCTTCTTT-3'       |
| <i>Actina</i> | 5'-GACGATATGGAGAAGATTTGGCA-3'    | 5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCTAGG-3'   |

Las condiciones de PCR fueron: 95°C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos de 96°C/30s, 55°C/30s y 75°C/30s, y una incubación a 72°C durante 5 min para la amplificación de *Otx1*, *Otx2*, *Idx1*, *Alx3*, *Dlx4* y *actina*; 95°C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos de 96°C/30s, 60°C/30s y 75°C/30s, y una incubación a 72°C durante 5 min para *Dlx2* y *Dlx5* y 95°C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos de 96°C/30s, 65°C/30s y 75°C/30s y una incubación a 72°C durante 5 min para *Emx1*.

#### 4. SOUTHERN BLOT

Una alícuota de la reacción de RT-PCR llevada a cabo con los oligonucleótidos específicos para *Alx3* se resolvió en un gel de agarosa al 1%, se transfirió sobre una membrana de nylon, se hibridó con una sonda marcada radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP cuya secuencia (5'-CCCTCATTAAATTGGAC-3') corresponde a los nucleótidos 1307-1324 del gen de *Alx3* de rata (GenBank: AY488087) y finalmente se sometió a autorradiografía a -70°C.

En paralelo, se llevó a cabo el mismo procedimiento con una alícuota de la reacción de RT-PCR realizada para *actina*. Como sonda para hibridar el producto de PCR se utilizó un oligonucleótido interno con la siguiente secuencia: 5'-CACACGCAGCTCATTGTAGAAAGT-3'.



## 5. WESTERN INMUNOBLOT

---

Las células RC2.E10 sembradas en placas de cultivo de 100 mm de diámetro se trataron con concentraciones crecientes de ácido fólico ( $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , 1 y  $10 \mu\text{M}$ ) durante 48 horas. A continuación, se prepararon extractos de proteínas celulares totales mediante sonicación en una solución compuesta por HEPES (50 mM), pirofosfato sódico (10 mM), fluoruro sódico (100 mM), EDTA (2 mM), ortovanadato sódico (2 mM), tritón x-100 al 1%, glicerol al 10% y los inhibidores de proteasas PMSF (2mM), aprotinina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y leupeptina (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad) frente a una curva patrón utilizando BSA.

Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en un gel desnaturizante de poliácridamida al 10% y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa. Se emplearon 10  $\mu\text{g}$  de proteína por carril. La inmunorreactividad de la homeoproteína Alx3 se detectó con un antisuero primario específico generado en conejo (dilución 1:5000) (Perez-Villamil et al., 2004) seguido por una incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo generado en cabra conjugado con peroxidasa (dilución 1:10000) (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc).

Las proteínas Dlx4 y CREB se detectaron con los correspondientes antisueros primarios específicos generados en conejo (dilución 1:10000 en ambos casos). La expresión de  $\beta$ -actina se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón (dilución 1:7000) (Sigma).

Las bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando un sistema de detección por quimioluminiscencia (Amersham).

## 6. ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL (EMSA)

---

Las células RC2.E10 se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro. Un grupo de placas se mantuvo en ausencia de ácido fólico, mientras otras se trataron con ácido fólico ( $0.1 \mu\text{M}$ ) durante 48 horas. Los ensayos de unión proteína-DNA se llevaron a cabo con extractos nucleares (15  $\mu\text{g}$  de proteína) obtenidos de dichas células en presencia de los inhibidores de proteasas pepstatina A (1 mg/ml), leupeptina (10 mg/ml), aprotinina (10 mg/ml) y p-aminobenzamidina (0.1 mM) mediante el

procedimiento descrito por Schreiber y cols. (Schreiber et al., 1989). Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad) frente a una curva patrón utilizando BSA como estándar.

Como sonda se utilizó un oligonucleótido cuya secuencia corresponde a un elemento P3, reconocido de manera específica por proteínas homeodominio Alx/Pax, cuya secuencia ha sido descrita con anterioridad (Wilson et al., 1993).

Para generar dicha sonda se utilizaron oligonucleótidos sintéticos de doble cadena con extremos 5'-GATC. El marcaje radioactivo se llevó a cabo mediante una reacción de incorporación de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP catalizada por la enzima Klenow.

Como competidor específico se utilizó este mismo oligonucleótido sin marcar en un exceso que correspondía a cien veces la concentración molar del oligonucleótido marcado, y como competidor inespecífico se empleó un oligonucleótido de secuencia no relacionada, APRE-M6, descrito anteriormente (Ron y Habener, 1992).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados son las siguientes:

P3: 5'- GATCCTGAGTCTAATTGAATTACTGTACA -3'

APRE-M6: 5'- GATCCACAGTTGTGATTTCAACCTGACCAGA -3'

Las reacciones de unión a DNA se llevaron a cabo en presencia de 2  $\mu$ g de ácido poli(deoxiinosínico-deoxicitidílico) y competidores tanto específicos como inespecíficos con 15000 cpm de sonda marcada en un volumen total de reacción de 20  $\mu$ l en presencia de HEPES (pH 7.9) (20 mM), MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM), KCl (70 mM), ditiotreitól (1mM), EDTA (0.3 mM) y glicerol al 10%.

Asimismo, se añadió, cuando fue necesario, un antisuero primario que reconoce específicamente la homeoproteína Alx3. Este antisuero, o bien el correspondiente suero preimmune control, fueron incubados con los extractos nucleares 15 minutos antes de añadir la sonda.

## 7. PLÁSMIDOS

---

Los plásmidos 3XP3TK-Luc y 3XP5TK-Luc utilizados en las transfecciones transitorias se construyeron mediante ligación de tres copias en tándem de los oligonucleótidos P3 o P5 (Wilson et al., 1993) en el sitio de restricción BamHI del vector pT81luc, que contiene el gen testigo luciferasa bajo el control de un promotor mínimo del gen de la timidina kinasa del virus herpes simplex (Perez-Villamil et al., 2004).



El vector de expresión de Alx3, pcDNA3-Alx3, contiene el cDNA completo de Alx3 de rata clonado en el plásmido de expresión pcDNA3 (Perez-Villamil et al., 2004).

## 8. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS / ENSAYOS LUCIFERASA

---

Las células RC2.E10 se transfectaron con lipofectamina (Gibco Invitrogen Corp.) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Estas células crecen en monocapa y al alcanzar una confluencia en torno al 80% se tripsinizaron y se sembraron en placas de cultivo de 60 mm de diámetro a una densidad de  $5 \times 10^5$  células por placa. Tras una incubación de 16 horas, las células se transfectaron con una mezcla de lipofectamina, 15  $\mu$ g del plásmido testigo (3XP3TK-Luc o 3XP5TK-Luc) y 2.5  $\mu$ g del vector de expresión del factor de transcripción Alx3 (pcDNA3-Alx3) o el vector vacío (pcDNA3) como control, en 1 ml de medio RPMI sin ácido fólico libre de suero; tras 4 horas de incubación se añadieron 3 ml de medio RPMI sin ácido fólico suplementado con 10% de suero fetal bovino deplecionado de ácido fólico; a continuación, se procedió a añadir a cada grupo experimental el correspondiente tratamiento con ácido fólico.

La actividad luciferasa se midió 48 horas después de la transfección, utilizando para ello una solución tampón de lisis (Promega) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Todos los valores están expresados como media aritmética  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado.

## 9. CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES DE RATÓN

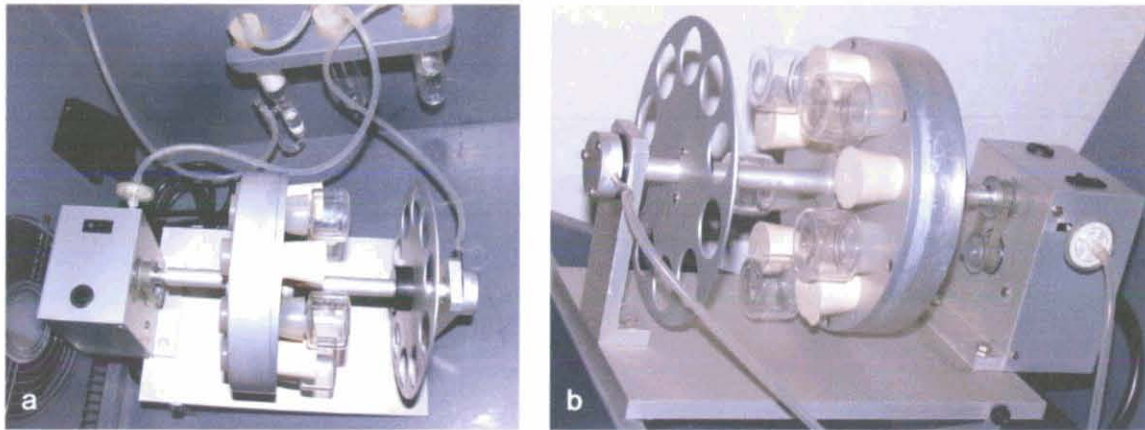
---

Utilizamos un sistema de cultivo en rotación (BTC Engineering, Inglaterra) descrito en detalle por Copp y cols. (Copp, 1990), en el que las cámaras de cultivo son viales cilíndricos de cristal en los cuales se introducen 4 ml de medio de cultivo, en nuestro caso suero de rata (Figura 6).

Cada uno de los viales se acopla mediante un adaptador de silicona a un tambor hueco (diámetro aproximado 15 cm). Durante la incubación, el tambor se mantiene en rotación a 30-60 r.p.m. en torno a un eje horizontal y una mezcla de gases (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub>) pasa continuamente por su interior y llega a cada vial a través del adaptador de silicona. Esto permite la oxigenación continua del medio



de cultivo que está constantemente expuesto a la fase gaseosa y, además, favorece la respiración de los embriones al mantenerlos girando suavemente en dicho medio. Todo este sistema se encuentra en el interior de una cámara opaca termostatazada que mantiene la temperatura a 37°C (Figura 6).



**FIGURA 6.** (a): Sistema de cultivo de embriones de ratón *in vitro* (BTC Engineering, Inglaterra) (b): Detalle del tambor rotatorio donde se acoplan los viales en los que cultivamos los embriones en el volumen adecuado de suero de rata. Obsérvense las conducciones por las que se posibilita la circulación de gases por el interior del sistema

Para nuestros experimentos utilizamos embriones de ratón de 8.5 días de gestación que cultivamos durante 24 horas en ausencia o en presencia de ácido fólico.

Para obtener los embriones de la edad gestacional apropiada se realizaron cruces durante la noche y la mañana en la que se encontró el tapón vaginal se determinó como día 0.5 de gestación (E0.5). En el día E8.5 las hembras gestantes se sacrificaron mediante dislocación cervical, se extrajo el útero y se mantuvo en solución salina a 37°C. Se retiró la decidua para extraer los embriones dentro del saco visceral amniótico intacto y cada uno de ellos se cultivó en 4 ml de suero de rata a 37°C durante 24 horas en el sistema de rotación descrito anteriormente.

El suero de cultivo se suplementó con mioinositol (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y con solución GAT (glicina, 200  $\mu\text{M}$ ; adenosina, 100  $\mu\text{M}$  y timidina, 10  $\mu\text{M}$ ) y, según el grupo experimental, con ácido fólico dando una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ .

## **10. OBTENCIÓN DEL SUERO DE RATA PARA CULTIVO DE EMBRIONES DE RATÓN**

---

El suero de rata empleado para el cultivo de los embriones de ratón se obtuvo mediante centrifugación inmediata de la sangre extraída de la arteria mesentérica de ratas Sprague-Dawley macho de aproximadamente 350-400 gramos de peso. Para ello, las ratas se anestesiaron mediante la inhalación controlada de halotano (Fluothane®); una vez anestesiadas, se procedió a abrir la pared abdominal del animal y se localizó la arteria mesentérica de la cual se extrajo la sangre que fue sometida inmediatamente a una primera centrifugación a 3500 r.p.m durante 15 minutos. Tras esta centrifugación, en cada tubo se observó el paquete de células rojas depositadas en el fondo y sobre éste el suero, en ocasiones embebido en un coágulo blanco de fibrina. Se recogió este suero, con cuidado de no tocar la fase roja, y se pasó a un nuevo tubo. Se centrifugó nuevamente el suero a 3500 r.p.m. durante 10-15 minutos. Tras esta segunda centrifugación se observó un pequeño depósito residual de células rojas en el fondo del tubo; descartando dicho depósito, se procedió a recoger el suero limpio con una pipeta Pasteur y se pasó a un tubo nuevo, almacenando así todo el suero obtenido en la sesión de sangría en alícuotas de 5-10 ml a -70°C.

## **11. DEPLECIÓN DEL ÁCIDO FÓLICO DEL SUERO DE RATA**

---

Antes de su uso para cultivo, se descongeló el suero y se incubó con una resina de intercambio iónico AG1-X8 (BioRad) (40 µg/ml) durante una noche en agitación continua a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 1 hora a 4°C, se recogió el sobrenadante y se centrifugó de nuevo a 3000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se filtró el suero con un filtro de jeringa de 0.45 µm de diámetro de poro.

El contenido en ácido fólico antes (72.5 nM) y después (<4nM) fue determinado por la Dra. Elena Alonso (Dpto. de Fisiología, Morfología y Ciencias de la Alimentación, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo CEU, Madrid).

Tras este proceso el suero se inactivó por calor incubándolo a 56°C durante 40 minutos. A continuación se añadieron antibióticos (penicilina, 100 IU/ml y estreptomina, 100 µg/ml), mio-inositol (10 µg/ml) y solución GAT (glicina, 200 µM; adenosina, 100 µM y timidina, 10 µM) (Zhao et al., 1998).



## 12. RT-PCR EN EMBRIONES DE RATÓN

Cultivamos embriones de ratón E8.5 durante 24 horas (E8.5 → E9.5) en ausencia o en presencia de ácido fólico (0.1  $\mu$ M ó 1  $\mu$ M). A continuación, extrajimos el RNA total de los embriones cultivados en cada una de las condiciones descritas con TriReagent (Molecular Research Center, Inc.).

Posteriormente, 2  $\mu$ g de RNA se hibridaron con oligo(dT)<sub>15</sub> y se incubaron con la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) para sintetizar el cDNA correspondiente.

La amplificación por PCR a partir de los cDNAs obtenidos se llevó a cabo con la polimerasa Taq y se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

|               | Oligonucleótido directo              | Oligonucleótido reverso             |
|---------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Aix3</i>   | 5'-CAGGATCCAGCGTGAGCGTTATGGGAAGAT-3' | 5'-CAGAATTCGAGCCAGCCCTAAGAACCACA-3' |
| <i>Cart1</i>  | 5'-GACAGCAGCGTGAAGTATGGAATC-3'       | 5'-GCATGACGTAACCACAGAACCAC-3'       |
| <i>Cited2</i> | 5'-GCAGAAATCGCAAAGACGGAAG-3'         | 5'-AGTGTATGTGCTCGCCCATGAG-3'        |
| <i>Twist</i>  | 5'-ATTCAGACCCTCAAAGTGGCGG-3'         | 5'-TCAGTGGCTGATTGGCAAGAC-3'         |
| <i>Actina</i> | 5'-ACGACATGGAGAAGATCTGGCA-3'         | 5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCTAGG-3'       |

Las condiciones de PCR fueron, en todos los casos, 95°C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos de 95°C/30s, 55°C/30s y 72°C/30s y, finalmente, una incubación a 72°C durante 5 min.

## 13. SÍNTESIS DE UNA RIBOSONDA ESPECÍFICA PARA DETECTAR RNAm DE *Aix3* DE RATÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Mediante RT-PCR a partir de RNA de cabeza de embriones de ratón de 13 días de gestación (E13.0) amplificamos un fragmento de aproximadamente 800 pares de bases del cDNA de *Aix3* de ratón con los oligonucleótidos correspondientes (oligonucleótido sentido: 5'-CAGGATCCAGCGTGAGCGTTATGGGAAGAT-3'; oligonucleótido antisentido: 5'-CAGAATTCGAGCCAGCCCTAAGAACCACA-3'; posiciones 777-1582 del cDNA de *Aix3* de ratón, secuencia GeneBank: NM\_077441).



A continuación, clonamos el producto de PCR obtenido en los sitios de restricción BamHI y EcoRI del vector pBluescript KS(+).

Posteriormente, esta construcción se utilizó como DNA molde en una reacción de PCR que llevamos a cabo con oligonucleótidos internos al fragmento clonado a los cuales añadimos las secuencias de los sitios de unión de las RNA polimerasas SP6 y T7 (oligonucleótido sentido: 5'-GAATTTAGGTGACACTATAGA AAGCGTGAGCGTTATGGGAAGA-3'; oligonucleótido antisentido: 5'-TGTAATACGACTC ACTATAGGGTCAAACGAGGCTTGGGGACTT-3'; posiciones: 777-1129 del cDNA de *Alx3* de ratón).

De este modo, obtuvimos un producto de PCR de aproximadamente 400 pares de bases que utilizamos como DNA molde para sintetizar las ribosondas sentido y antisentido mediante las correspondientes reacciones con las RNA polimerasas SP6 y T7 respectivamente utilizando en la reacción una mezcla de ribonucleótidos que contiene ATP, GTP, CTP, UTP y UTP-digoxigenina.

#### 14. HIBRIDACIÓN *IN SITU* NO RADIATIVA EN EMBRIONES DE RATÓN

---

Se siguieron las indicaciones de Nieto y *cols.* (Nieto et al., 1996) con algunas modificaciones. Brevemente, los embriones se disecaron en PBS, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 16 horas a 4°C, se deshidrataron gradualmente en concentraciones crecientes de metanol en PBS y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización. Posteriormente, los embriones se rehidrataron en concentraciones decrecientes de metanol, se lavaron en PBS, se trataron con proteinasa K (10 µg/ml) durante 7-8 minutos, se prehibridaron durante 90 minutos a 70°C (formamida al 50%, SSC 5X pH 4.5, tRNA (50 µg/ml), SDS al 1%, heparina (0,05 mg/ml)) y se hibridaron con las ribosondas correspondientes durante una noche a 70°C. Al día siguiente, se lavaron tres veces con formamida al 50% / 5X SSC pH 4.5 a 70°C y tres veces con formamida al 50% / 2X SSC pH 4.5 a 65°C, a continuación se bloquearon durante 90 minutos en suero de oveja al 10% y se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (1:2000) (Roche Diagnostics Corp.) durante una noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron los embriones en solución NTMT (NaCl, 100 mM; Tris HCl pH9.5, 0.1 M; MgCl<sub>2</sub>, 50 mM y Tween 20 al 1%) y las sondas hibridadas se detectaron mediante incubación con los sustratos cloruro de 4-nitrozultetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (Roche Diagnostics Corp.).

## 15. ENSAYO TUNEL *IN SITU* EN EMBRIONES DE RATÓN

Los ensayos TUNEL se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante del kit utilizado para su realización (Apoptag Detect; Chemicon International) con algunas modificaciones. Los embriones se disecaron, se fijaron y se deshidrataron tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Antes de utilizarse en el experimento, se rehidrataron en concentraciones decrecientes de metanol y se lavaron en PBS. Se trataron con proteinasa K (10 µg/ml) durante 7-8 minutos, se equilibraron y se incubaron con la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) durante 1 hora a 37°C. A continuación se paró la reacción y los embriones se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa durante 30-45 minutos a temperatura ambiente. La inmunotinción se realizó incubando los embriones con diaminobencidina.

## 16. GENOTIPADO DE LAS CAMADAS NACIDAS DE LOS CRUCES (*Alx3*<sup>+/-</sup> x *Alx3*<sup>+/-</sup>)

Tanto los ratones silvestres (*Alx3*<sup>+/+</sup>) como los ratones deficientes en el gen que codifica el factor de transcripción *Alx3* (*Alx3*<sup>-/-</sup>) que utilizamos en nuestros experimentos son de la cepa C57BL/6J. Los ratones *Alx3*<sup>-/-</sup> fueron proporcionados por el Dr. Frits Meijlink (Netherlands Institute for Developmental Biology, Utrecht, Holanda).

Para el genotipado de los ratones utilizamos el kit comercial REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma).

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR fueron los siguientes:

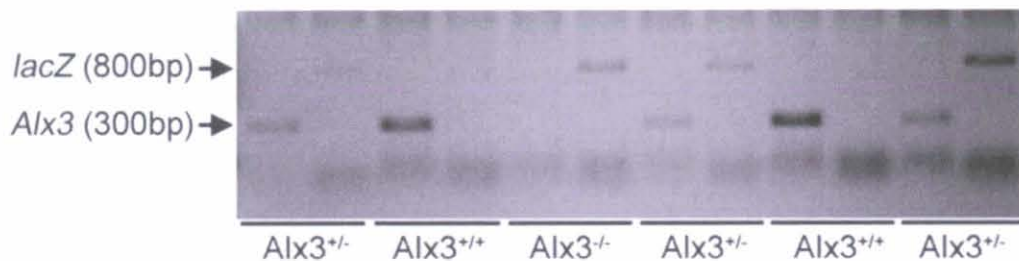
|             | Oligonucleótido directo           | Oligonucleótido reverso        |
|-------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| <i>Alx3</i> | 5'-GAGGCTCAAGAACAAGGAAGGA-3'      | 5'-CTAGGAGCAGGTCAGAGCAGGAAG-3' |
| <i>lacZ</i> | 5'-TCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAAT-3' | 5'-AGACCAACTGGTAATGGTAGCGAC-3' |

Las condiciones de PCR para la amplificación de *Alx3* fueron: 95°C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos de 95°C/30s, 57°C/30s y 72°C/30s y, finalmente, una incubación a 72°C durante 5 min. El tamaño del producto de PCR es de aproximadamente 300 pares de bases.

Las condiciones de PCR para la amplificación de *Alx3* fueron: 95°C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos de 95°C/30s, 57°C/30s y 72°C/30s y, finalmente, una incubación a 72°C durante 5 min. El tamaño del producto de PCR es de aproximadamente 300 pares de bases.

Las condiciones de PCR para la amplificación de *lacZ* fueron: 95°C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos de 95°C/30s, 55°C/30s y 72°C/30s y, finalmente, una incubación a 72°C durante 5 min. El tamaño del producto de PCR es de aproximadamente 800 pares de bases.

En la figura 7 se muestra un ejemplo del patrón de bandas obtenido en cada uno de los genotipos tras resolver los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%.



**FIGURA 7.** Genotipado de las camadas nacidas de cruces (*Alx3*<sup>+/-</sup> x *Alx3*<sup>+/-</sup>) mediante PCR a partir de ADN genómico. El alelo silvestre se identificó mediante la amplificación de *Alx3* y el alelo mutante a través de la amplificación de *lacZ*.



# Resultados

---

## 1. DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CULTIVO CELULAR PARA EVALUAR LAS ACCIONES DEL ÁCIDO FÓLICO *IN VITRO*

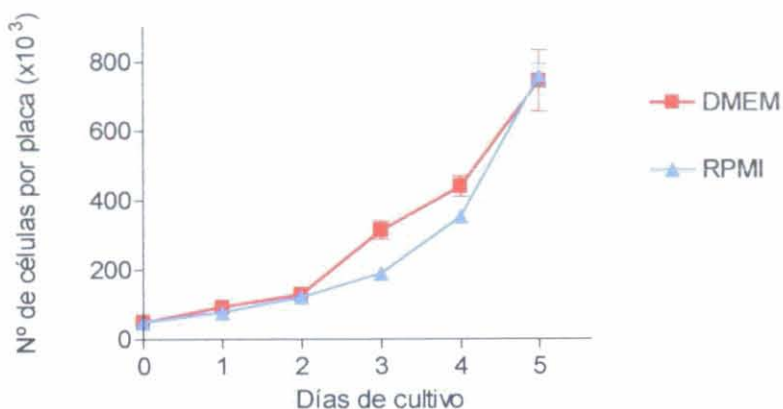
---

Con el fin de comprobar si existen factores de transcripción cuya expresión es regulada por ácido fólico, optamos inicialmente por la utilización de un abordaje *in vitro* haciendo uso de una línea celular de origen neural mantenida en cultivo. El empleo de este tipo de sistema permite un control óptimo de las condiciones experimentales que deberán ser modificadas para añadir ácido fólico o eliminarlo totalmente. Asimismo, el cultivo de una línea celular *in vitro* es fácilmente manipulable y las observaciones y resultados obtenidos en este tipo de sistemas son relativamente fáciles de evaluar al tratarse de una población homogénea de células.

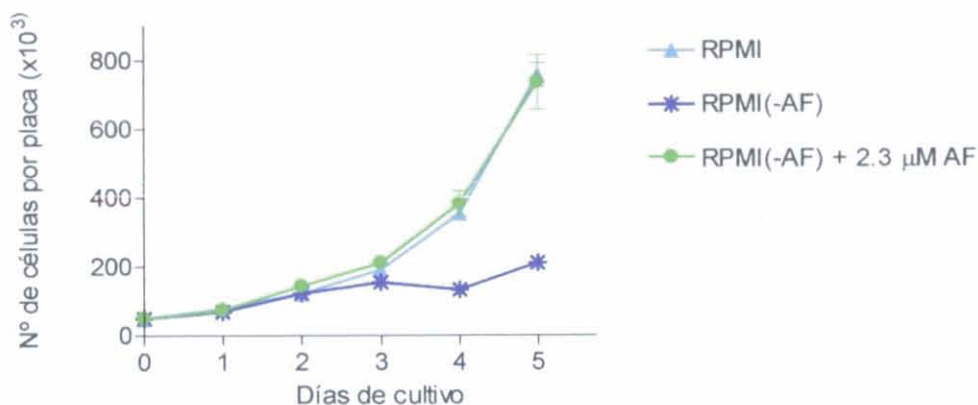
En nuestros estudios utilizamos la línea celular RC2.E10, una línea monoclonal establecida a partir de cultivos primarios de corteza cerebral fetal de rata (Schwartz y Vallejo, 1998). La elección de la línea RC2.E10 como sistema de trabajo se basó en que siendo una línea celular de origen neural embrionario, se maximizan las posibilidades de que contenga la maquinaria molecular necesaria que permita al ácido fólico ejercer sus posibles acciones sobre distintos factores de transcripción en el sistema nervioso del embrión.

Para poder manipular la concentración de ácido fólico presente en el medio de cultivo y así evaluar las posibles acciones de esta vitamina, fue necesaria la utilización de medio RPMI, ya que es el único medio de cultivo disponible comercialmente que puede adquirirse sin ácido fólico. Por esta razón sustituimos el medio DMEM, en el que se habían venido cultivando estas células desde su generación en nuestro laboratorio (Schwartz y Vallejo, 1998), por medio RPMI y evaluamos el crecimiento celular en estas nuevas condiciones de cultivo.

Como se observa en la figura 8, el ritmo de crecimiento de las células RC2.E10 en medio RPMI no difiere significativamente del observado cuando cultivamos estas células en medio DMEM.



**FIGURA 8.** Curvas de crecimiento de las células RC2.E10 cultivadas durante cinco días en medio DMEM (■) o en medio RPMI (▲), ambos suplementados con suero fetal bovino al 10%. Los valores representados corresponden a la media aritmética +/- error estándar de cinco experimentos independientes llevados a cabo por duplicado.



**FIGURA 9.** Curvas de crecimiento de las células RC2.E10 cultivadas durante cinco días en distintas condiciones: medio RPMI (RPMI, ▲), medio RPMI sin ácido fólico (RPMI(-AF), \*), o medio RPMI sin ácido fólico al que añadimos de forma exógena ácido fólico en una concentración equivalente a la que contiene el medio comercial (RPMI(-AF) + 2.3 µM AF, ●). En las tres condiciones descritas, el medio de cultivo se suplementó con suero fetal bovino carente de ácido fólico. Los valores representados corresponden a la media aritmética +/- error estándar de cinco experimentos independientes llevados a cabo por duplicado.

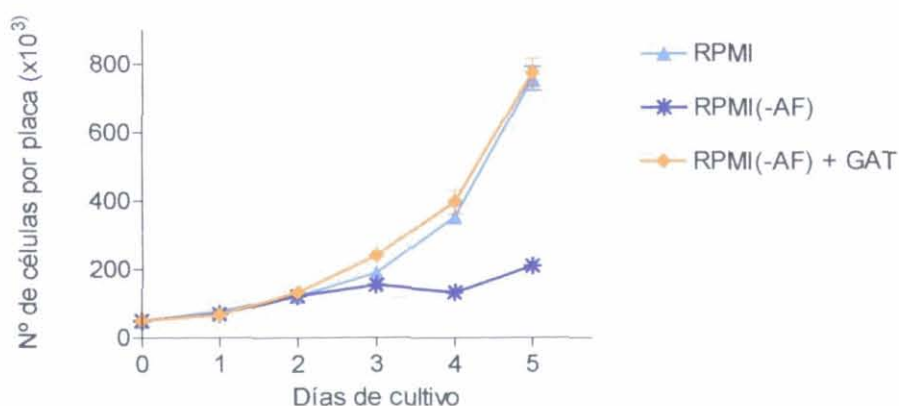
A continuación, realizamos cultivos en medio RPMI sin ácido fólico suplementado con suero fetal bovino normal o bien en medio RPMI normal suplementado con suero fetal bovino deplecionado de ácido fólico y comprobamos que las células RC2.E10 crecen con normalidad en ambas condiciones (datos no mostrados), lo cual indica que el ácido fólico contenido bien en el medio de cultivo o en el suero utilizado para suplementarlo es suficiente para cubrir las necesidades metabólicas de las células. Por el contrario, cuando cultivamos las células en



condiciones de ausencia total de ácido fólico observamos una marcada inhibición de la proliferación que se hace evidente a partir del tercer día de cultivo (Figura 9). A partir del quinto día se observó una disminución del número de células adheridas a cada placa, lo que indica muerte celular que afectó a la población completa de células en el plazo de una semana desde el inicio del cultivo (datos no mostrados).

Comprobamos que las alteraciones observadas en el crecimiento de las células RC2.E10 en las condiciones de cultivo anteriores se deben exclusivamente a la falta de ácido fólico, ya que la adición de éste de forma exógena a una concentración equivalente a la que contiene el medio RPMI comercial ( $2.3 \mu\text{M}$ ) permite que las células RC2.E10 muestren un ritmo de crecimiento normal (Figura 9).

Para investigar la existencia de factores de transcripción cuya expresión depende de la concentración de ácido fólico, necesitamos disponer de un sistema celular que sea viable en ausencia de éste. El ácido fólico es fundamental para la síntesis de purinas y pirimidinas y para el metabolismo de algunos aminoácidos en el que interviene como paso limitante la síntesis de glicina. Por tanto, para compensar el déficit metabólico producido por la falta de esta vitamina, cultivamos las células RC2.E10 en medio carente de ácido fólico suplementado con una solución que contiene glicina ( $100 \mu\text{M}$ ), adenosina ( $200 \mu\text{M}$ ) y timidina ( $10 \mu\text{M}$ ), a la que nos referiremos en lo sucesivo como GAT (Zhao et al., 1998).



**FIGURA 10.** Curvas de crecimiento de las células RC2.E10 cultivadas durante cinco días en distintas condiciones: medio RPMI (RPMI,  $\triangle$ ), medio RPMI sin ácido fólico (RPMI(-AF),  $*$ ), medio RPMI sin ácido fólico al que añadimos solución GAT (glicina  $100 \mu\text{M}$ , adenosina  $200 \mu\text{M}$ , timidina  $10 \mu\text{M}$ ) (RPMI(-AF) + GAT,  $\triangle$ ). En las tres condiciones descritas, el medio de cultivo se suplementó con suero fetal bovino carente de ácido fólico. Los valores representados corresponden a la media aritmética  $\pm$  error estándar de cinco experimentos independientes llevados a cabo por duplicado.

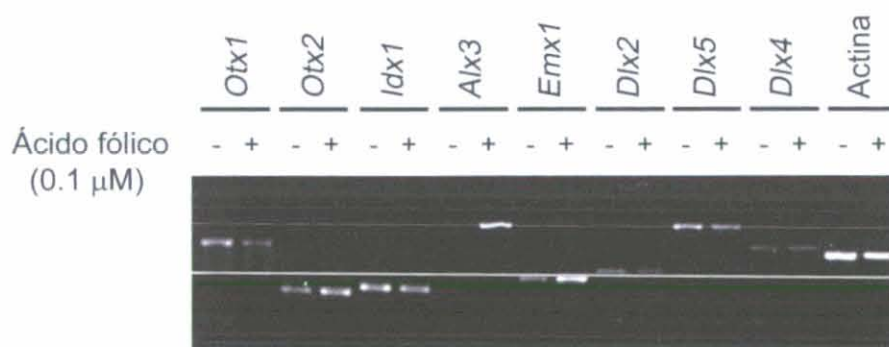
Comprobamos que la adición de solución GAT al medio de cultivo carente de ácido fólico (RPMI(-AF) + GAT) rescata la capacidad de crecimiento y proliferación de las células RC2.E10, que en estas condiciones no difieren de las que muestran cuando se cultivan en presencia de ácido fólico (Figura 10).

Por lo tanto, la sustitución del ácido fólico por solución GAT en el medio de cultivo nos permite disponer de un sistema celular en el cual las necesidades metabólicas dependientes de ácido fólico están cubiertas aun en ausencia de éste.

## 2. EL ÁCIDO FÓLICO REGULA SELECTIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE GENES HOMEODOMINIO EN LA LÍNEA CELULAR RC2.E10

Con el fin de determinar la existencia de genes que codifican factores de transcripción tipo homeodominio cuya expresión en las células RC2.E10 pueda estar regulada por ácido fólico, llevamos a cabo experimentos de RT-PCR a partir de RNA total obtenido de dichas células.

Para ello, cultivamos las células RC2.E10 en ausencia de ácido fólico (RPMI(-AF) + GAT) o en estas mismas condiciones añadiendo ácido fólico (0.1  $\mu$ M) durante 24 horas. A partir del RNA total extraído de las células cultivadas en ausencia o en presencia de ácido fólico analizamos la expresión de mRNA de los genes homeodominio *Otx1*, *Otx2*, *Idx1*, *Alx3*, *Emx1*, *Dlx2*, *Dlx5* y *Dlx4*, ya que todos ellos se expresan en el sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario (Boncinelli et al., 1993; Cecchi y Boncinelli, 2000; Cecchi et al., 2000; Robinson y Mahon, 1994; Robledo et al., 2002; Schwartz et al., 2000).



**FIGURA 11.** Análisis de la expresión de mRNA de diferentes genes homeodominio en respuesta a ácido fólico mediante RT-PCR a partir de RNA total extraído de células RC2.E10 cultivadas en ausencia de ácido fólico (-) o en presencia de una concentración 0.1  $\mu$ M del mismo (+). Como control de carga del experimento analizamos la expresión de actina.



Como se observa en la figura 11, detectamos la expresión de todos estos genes en las células RC2.E10 cultivadas en ausencia de ácido fólico, con la excepción de *Aix3*, que fue prácticamente indetectable. Este hallazgo es llamativo, ya que hemos descrito con anterioridad que *Aix3* se expresa constitutivamente en las células RC2.E10 en cantidades claramente detectables (Perez-Villamil et al., 2004). Seguidamente observamos que la adición de ácido fólico al medio de cultivo no altera de manera significativa los niveles de mRNA de *Otx2*, *Idx1*, *Dlx2*, *Dlx5* y *Dlx4*. La expresión de *Otx1*, en cambio, experimenta una apreciable disminución en las células cultivadas en presencia de ácido fólico, mientras que los niveles de mRNA de *Emx1* se ven ligeramente incrementados (Figura 11). Sin embargo, el efecto más llamativo lo observamos en los niveles de expresión de *Aix3*. En las células cultivadas en ausencia de ácido fólico *Aix3* resulta prácticamente indetectable, mientras que en las células que se trataron con ácido fólico se observa una marcada expresión de este gen (Figura 11).

Estos resultados muestran que el ácido fólico tiene la capacidad de modificar selectivamente la expresión de determinados genes homeodominio en la línea celular RC2.E10, y de estimular de manera especialmente significativa la expresión de *Aix3*.

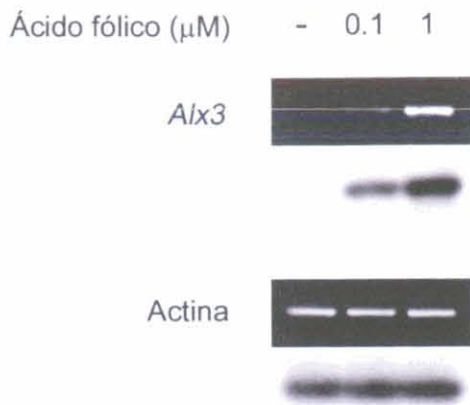
### 3. EL ÁCIDO FÓLICO ACTIVA LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN QUE CODIFICA *Aix3*

---

Los resultados obtenidos en los experimentos descritos en el apartado anterior condicionaron nuestra atención sobre el estudio de la regulación de *Aix3* por ácido fólico. Para profundizar en este aspecto, cultivamos las células RC2.E10 en ausencia de ácido fólico o en presencia de diferentes concentraciones del mismo (0.1 ó 1  $\mu$ M), y analizamos la expresión de mRNA de *Aix3* en cada una de estas condiciones mediante RT-PCR.

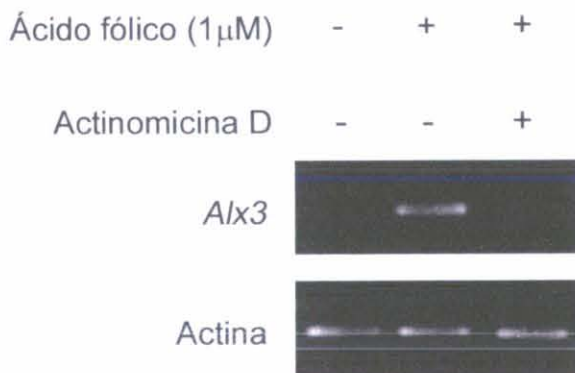
Estos experimentos demostraron que la expresión de *Aix3* en presencia de una concentración de ácido fólico de 1  $\mu$ M es significativamente mayor que la que se observa en presencia de 0.1  $\mu$ M (Figura 12). Así, estos resultados evidencian que el ácido fólico estimula la expresión de mRNA del gen homeodominio *Aix3* en las células RC2.E10 de una manera dosis-dependiente.





**FIGURA 12.** Análisis de la expresión de *A/x3* en células RC2.E10 en ausencia de ácido fólico (-) o en presencia de concentraciones crecientes del mismo (0.1 ó 1  $\mu\text{M}$ ) mediante RT-PCR a partir de RNA total y posterior hibridación mediante Southern Blot con una sonda específica cuya secuencia corresponde a un fragmento interno del producto amplificado.

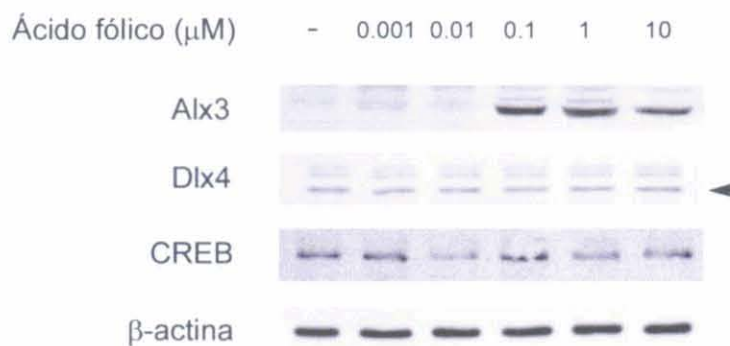
A partir de estos resultados, analizamos si el incremento que observamos en los niveles de expresión de mRNA de *A/x3* en respuesta al ácido fólico se debe a un mecanismo transcripcional. Para ello, antes de tratar las células con ácido fólico, las dividimos en dos grupos experimentales. En el primero de ellos las células se trataron únicamente con ácido fólico, mientras que en el segundo grupo las células se trataron con actinomicina D, una droga que inhibe la acción de la RNA polimerasa, previamente a la adición de ácido fólico a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ .



**FIGURA 13.** Análisis de la implicación de un mecanismo transcripcional en la respuesta de *A/x3* al ácido fólico. RT-PCR a partir de RNA total de células RC2.E10 sin tratar (-) o tratadas con actinomicina D (+) previamente a la estimulación con ácido fólico (1  $\mu\text{M}$ ). Como control de carga se analizó la expresión de  $\beta$ -actina.

Como se observa en la figura 13, la expresión de *A/x3* en las células RC2.E10 responde a la presencia de ácido fólico, tal y como ya habíamos comprobado en experimentos anteriores. Cuando pretratamos las células con actinomicina D, comprobamos que la estimulación producida por el ácido fólico sobre la expresión de mRNA de *A/x3* se ve abolida. Este resultado confirma que el ácido fólico estimula la transcripción del gen *A/x3*.

A continuación, para comprobar si el aumento en los niveles de mRNA se acompaña del correspondiente incremento en la síntesis de Alx3, llevamos a cabo experimentos de western inmunoblot con extractos proteicos totales obtenidos de células RC2.E10 cultivadas en ausencia de ácido fólico o en presencia de concentraciones crecientes del mismo.



**FIGURA 14.** Western Inmunoblot que muestra la expresión endógena de la homeoproteína Alx3 en las células RC2.E10 en ausencia (-) o en presencia de concentraciones crecientes de ácido fólico (0.001, 0.01, 0.1, 1 ó 10  $\mu\text{M}$ ). Asimismo, se analizaron otros factores de transcripción de expresión endógena en estas células (Dlx4, CREB). Como control de carga se analizó  $\beta$ -actina.

Como puede observarse en la figura 14, en las células RC2.E10 cultivadas en ausencia de ácido fólico la expresión de la homeoproteína Alx3 resulta prácticamente indetectable. Asimismo, la adición de ácido fólico al medio de cultivo en concentraciones inferiores a 0.1  $\mu\text{M}$  no induce la expresión de Alx3. Sin embargo, sí se aprecia un incremento significativo en la expresión de Alx3 en presencia de concentraciones de ácido fólico iguales o superiores a 0.1  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, una vez detectada la presencia de Alx3, los niveles de esta proteína no incrementan proporcionalmente con la concentración de ácido fólico como ocurre con el mRNA, lo cual sugiere la existencia de mecanismos adicionales de control.

Este efecto del ácido fólico es específico sobre Alx3 ya que, como puede observarse en la figura 14, la ausencia o presencia del mismo no altera la expresión de las proteínas Dlx4 y CREB, utilizadas como control.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos anteriormente mediante RT-PCR y confirman que en las células RC2.E10 el ácido fólico en concentraciones iguales o superiores a 0.1  $\mu\text{M}$  estimula la expresión de Alx3 mediante un mecanismo transcripcional.

#### 4. DESOCUPACIÓN DE ELEMENTOS DIANA PARA Alx3 EN AUSENCIA DE ÁCIDO FÓLICO

Habida cuenta que Alx3 es una homeoproteína de la familia Paired que se une de forma específica a elementos diana de tipo P3 en el DNA (Copp et al., 2003; Qu et al., 1999; Tucker y Wisdom, 1999; Wilson et al., 1993), nos planteamos comprobar si el incremento producido por el ácido fólico en los niveles de Alx3 se refleja en su unión específica al DNA. Para ello llevamos a cabo ensayos de retardo de la movilidad electroforética en gel (EMSA) con extractos nucleares de células RC2.E10 cultivadas en ausencia o en presencia de ácido fólico utilizando como sonda un oligonucleótido cuya secuencia corresponde a un elemento P3 (TAATNNNATTA).

Ácido fólico (0.1  $\mu$ M)    -    +



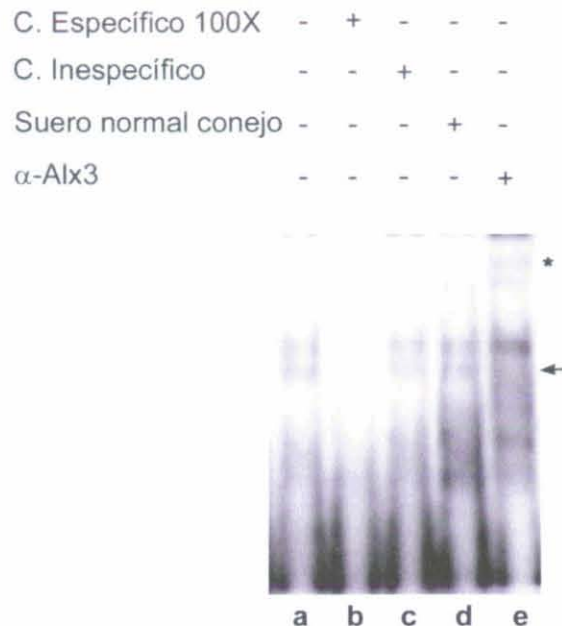
**FIGURA 15.** Ensayo de retardo de la movilidad electroforética en gel con extractos nucleares de células RC2.E10 cultivadas en ausencia de ácido fólico (carril **a**) o en presencia de una concentración 100 nM del mismo (carril **b**) para evaluar la unión específica de las proteínas nucleares expresadas en las células RC2.E10 sobre el elemento P3 en el DNA en respuesta al ácido fólico.

Observamos que utilizando extractos nucleares de células cultivadas en ausencia de ácido fólico no se detectan complejos proteicos unidos al DNA (Figura 15, carril **a**). Por el contrario, los extractos nucleares de células cultivadas con ácido fólico (0.1  $\mu$ M) contienen proteínas que reconocen el oligonucleótido P3 (Figura 15, carril **b**).

A continuación, comprobamos que la unión proteína-DNA que observamos en estos experimentos es específica de la secuencia. Para ello realizamos ensayos similares en presencia de un exceso del oligonucleótido P3 sin marcar o de un oligonucleótido de secuencia no relacionada.



**FIGURA 16.** Ensayo de retardo de la movilidad electroforética en gel con extractos nucleares de células RC2.E10 cultivadas en presencia de ácido fólico 0.1  $\mu$ M sobre la sonda que corresponde al elemento P3 (carril **a**). Analizamos la especificidad de la unión proteína-DNA en presencia de competidor específico (carril **b**) o de competidor inespecífico (carril **c**) que se añadieron a una concentración cien veces mayor que la de la sonda. Para identificar a Alx3 en el complejo detectado, se añadió a la reacción de unión un antisuero que reconoce específicamente dicha proteína (carril **e**), o un suero preinmune de conejo como control (carril **d**). La flecha indica el complejo que contiene Alx3. Obsérvese la aparición de una banda "superretardada" en presencia del antisuero anti-Alx3, indicada por un asterisco.



La unión de las proteínas nucleares al elemento P3 marcado radiactivamente se ve abolida en presencia de un exceso del mismo oligonucleótido frío (Figura 16, carril b), sin embargo, la adición en exceso de un oligonucleótido de secuencia no relacionada no altera dicha unión (Figura 16, carril c). Estos resultados confirman, por tanto, que la unión de las proteínas nucleares expresadas en las células RC2.E10 al elemento P3 es una unión específica.

A continuación, con el fin de verificar si la homeoproteína Alx3 forma parte del complejo proteico detectado en los extractos nucleares de células cultivadas en presencia de ácido fólico, llevamos a cabo la reacción de unión proteína-DNA en presencia de un antisuero que reconoce específicamente Alx3. Como control, llevamos a cabo una reacción similar en presencia de suero preinmune de conejo.

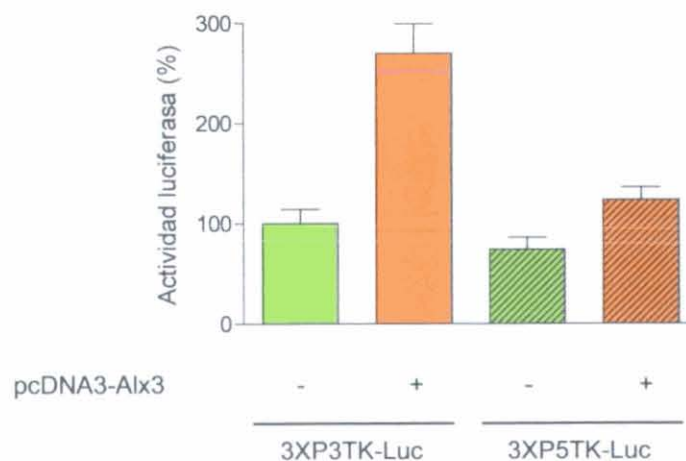
En la figura 16 podemos observar que la adición del antisuero anti-Alx3 a los extractos nucleares de células RC2.E10 incubados con la sonda P3 produce la desaparición de la banda inferior del complejo de unión detectado sobre dicha sonda y la aparición simultánea de una banda de menor movilidad electroforética que corresponde al complejo proteína-DNA que contiene Alx3 (Figura 16, carril e).

Estos resultados sugieren que la disminución de los niveles de Alx3 en ausencia de ácido fólico tiene como consecuencia la desocupación de elementos reguladores que pudieran alterar la expresión de genes diana controlados por esta proteína. Para profundizar en esta cuestión, se realizaron los experimentos descritos en el siguiente apartado.

## 5. ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL EJERCIDA POR Alx3 Y ÁCIDO FÓLICO

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio quedó determinado que mientras que la unión de Alx3 a un elemento P3 obedece a una cinética cooperativa que favorece la formación de dímeros, la unión a un elemento P5, en el que los sitios de unión TAAT están separados por cinco nucleótidos en vez de tres, se realiza de forma monomérica (Perez-Villamil et al., 2004). Por tanto, la capacidad de transactivación de Alx3 desde elementos P3, evaluada en fibroblastos, es significativamente mayor que la que tiene lugar desde elementos P5 (Perez-Villamil et al., 2004). Con objeto de evaluar la capacidad de transactivación transcripcional de Alx3 a partir de sus sitios diana en el DNA en ausencia de ácido fólico, cotransfectamos células RC2.E10 con pcDNA3-Alx3, un vector de expresión que codifica el cDNA completo de Alx3 de rata, y con los plásmidos 3XP3TK-Luc o 3XP5TK-Luc, en los que la expresión del gen testigo luciferasa se encuentra bajo el control de tres copias en tándem de los elementos de unión P3 o P5.

En consonancia con los resultados descritos en el párrafo anterior, Alx3 incrementa la actividad luciferasa generada por 3XP3TK-Luc aproximadamente 2-3 veces (Figura 17), mientras que no es capaz de aumentar significativamente la actividad generada por 3XP5TK-Luc (Figura 17).

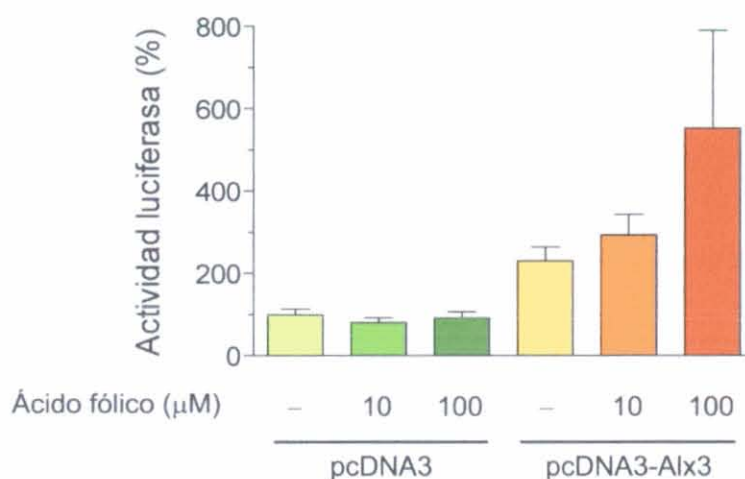


**FIGURA 17.** Niveles de actividad luciferasa mostrados por células RC2.E10 cotransfectadas de forma transitoria con las construcciones testigo 3XP3TK-Luc (izquierda) o 3XP5TK-Luc (derecha) y el vector de expresión de la homeoproteína Alx3 pcDNA3-Alx3 (+), o el vector vacío pcDNA3 como control (-). Los valores representados en la gráfica corresponden a la media aritmética  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado.



Estos resultados indican que la ausencia de ácido fólico no altera la capacidad de transactivación específica de Alx3, y reflejan que, aun en ausencia de ácido fólico, Alx3 se une cooperativamente a los elementos P3 y de este modo es capaz de activar la transcripción génica, mientras que su unión como monómero a los elementos P5 no resulta suficiente para producir tal activación transcripcional, como se determinó anteriormente (Perez-Villamil et al., 2004).

A continuación, para evaluar el efecto de la adición de ácido fólico, cotransfectamos transitoriamente células RC2.E10 con la construcción testigo 3XP3TK-Luc y el vector de expresión pcDNA3-Alx3, o el vector vacío pcDNA3 como control, en presencia de dos concentraciones diferentes de esta vitamina (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M).



**FIGURA 18.** Niveles de actividad luciferasa mostrados por células RC2.E10 cotransfectadas de forma transitoria con la construcción testigo 3XP3TK-Luc y el vector de expresión de la homeoproteína Alx3 pcDNA3-Alx3, o con el vector vacío pcDNA3 como control, en ausencia de ácido fólico (-) o en presencia de concentraciones crecientes del mismo (10 ó 100  $\mu$ M). Los valores representados en la gráfica corresponden a la media aritmética  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado.

Como se observa en la figura 18, en ausencia de Alx3 exógeno (pcDNA3), el tratamiento de las células con ácido fólico no produce cambios significativos en la actividad luciferasa generada por 3XP3TK-Luc. Sin embargo, cuando sobreexpresamos Alx3 (pcDNA3-Alx3), la actividad luciferasa generada se incrementa ligeramente cuando las células se mantienen en presencia de ácido fólico a una concentración de 10  $\mu$ M, y más significativamente cuando tratamos las células con una concentración 100  $\mu$ M (Figura 18).



Estos resultados indican que la capacidad de transactivación de *Alx3* se ve incrementada en presencia de ácido fólico, lo cual puede deberse al incremento de los niveles de *Alx3* endógeno por el mismo, ya que en virtud de la cinética de unión cooperativa a P3 su interacción con el *Alx3* generado por pcDNA3-*Alx3* podría tener carácter sinérgico.

Dada la enorme importancia del papel que desempeña el ácido fólico en la prevención de los defectos congénitos del cierre del tubo neural (Czeizel y Dudas, 1992; Wald, 1991) y la circunstancia de que se desconoce por completo el mecanismo por el cual ejerce esta acción, nos planteamos analizar si la expresión de *Alx3* durante el desarrollo embrionario *in vivo* se encuentra también condicionada por los niveles disponibles de ácido fólico. Para ello, utilizamos un sistema de cultivo de embriones de ratón *ex utero* que describimos en el apartado siguiente.

## 6. DESARROLLO DE EMBRIONES DE RATÓN INCUBADOS EX UTERO

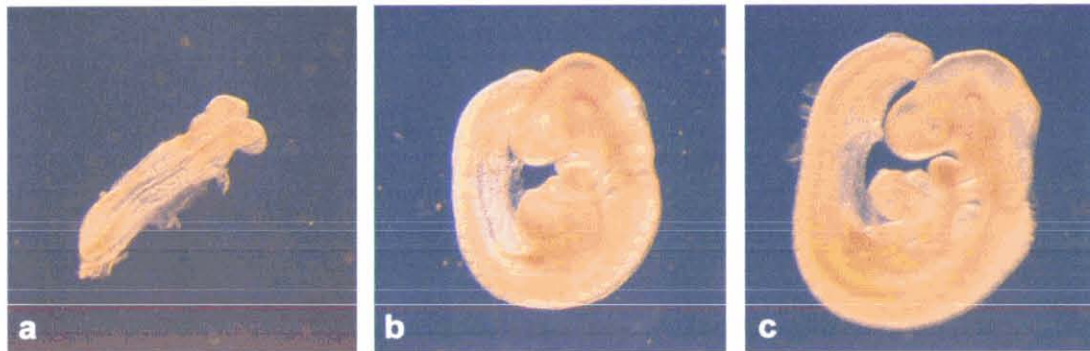
---

La expresión de *Alx3* durante el desarrollo embrionario en el ratón aparece con gran intensidad en torno al día 9 de gestación (E9.0) en la región anterior del mesénquima cefálico (ten Berge et al., 1998). Por tanto, centramos nuestra atención en este estadio del desarrollo para evaluar el posible efecto del ácido fólico sobre la expresión de *Alx3*. Para ello, incubamos embriones de 8.5 días de gestación durante 24 horas *ex utero*, utilizando un sistema similar al empleado por otros investigadores que han estudiado diversos aspectos de los mecanismos que regulan el cierre del tubo neural (Fleming y Copp, 1998; Fleming et al., 1997).

En primer lugar, para validar el sistema de trabajo realizamos una serie de ensayos con embriones de ratón extraídos mediante cesárea en el día de gestación E8.5 y los cultivamos durante 24 horas (E8.5 → E9.5) en suero de rata previamente tratado con una resina de intercambio iónico y suplementado con mio-inositol (10 µg/ml), solución GAT y ácido fólico (100 µM), condiciones de cultivo en las que realizaremos los sucesivos experimentos mientras no se especifique lo contrario.

Los embriones de ratón de edad E8.5 presentan un número de somitas que oscila entre 6 y 12, y aún no han rotado axialmente (Figura 19, a). Tras 24 horas en cultivo, comprobamos que el desarrollo embrionario tiene lugar con aparente normalidad, ya que los embriones aumentan su tamaño y complejidad morfológica, incluyendo el inicio del desarrollo del corazón, cuyo latido fue comprobado al finalizar

el período de cultivo para asegurar la viabilidad de los embriones (Figura 9, b). Comprobamos también que durante las 24 horas en cultivo se produce la rotación axial de los embriones que incrementan significativamente su grado de desarrollo, tal y como evidencian su aumento de tamaño, el incremento del número de somitas (véanse Tablas I y II), su desarrollo cefálico y el cierre del tubo neural (Figura 19, a y b). Por tanto, los embriones de ratón extraídos de la madre en el día de gestación E8.5 y mantenidos en cultivo durante 24 horas (E8.5 → E9.5) presentan un grado de desarrollo que no difiere significativamente del que muestran los embriones que se desarrollan en el útero materno hasta el día E9.5, si bien el tamaño es algo más reducido (Figura 19, b y c). No obstante, comprobamos que este retraso no afecta al cierre del tubo neural, proceso morfogenético objeto de nuestro estudio.

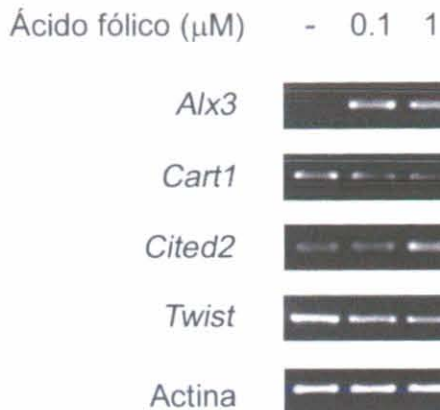


**FIGURA 19.** Comparación del nivel de desarrollo de un embrión de ratón extraído de la madre en el día de gestación E8.5 (a), un embrión cultivado durante 24 horas (E8.5 → E9.5) *ex utero* en suero de rata (b) y un embrión desarrollado *in utero* hasta el día de gestación E9.5 (c).

Para analizar si la expresión de *Alx3* *in vivo* varía en respuesta a ácido fólico llevamos a cabo experimentos de RT-PCR a partir de RNA extraído de embriones de ratón cultivados durante 24 horas (E8.5 → E9.5). Los embriones se cultivaron en suero de rata tratado con una resina de intercambio iónico para producir la depleción de ácido fólico, suplementado con mio-inositol y solución GAT.

Como puede observarse en la figura 20, en los embriones de ratón que se cultivaron en suero de rata deficiente de ácido fólico la expresión de mRNA del gen homeodominio *Alx3* resulta prácticamente indetectable. Sin embargo, la adición de ácido fólico al suero produjo un incremento significativo de la expresión de *Alx3* (Figura 20).





**FIGURA 20.** RT-PCR a partir de RNA total obtenido de embriones de ratón E8.5 cultivados durante 24 horas (E8.5  $\rightarrow$  E9.5) en ausencia (-) o en presencia de ácido fólico (0.1 ó 1  $\mu\text{M}$ ). Se analizó la expresión del gen homeodominio *Alx3*, así como de otros genes que han sido implicados en la regulación del cierre del tubo neural, tales como *Cart1*, *Cited2* y *Twist*. Como control de carga se analizó la expresión de actina.

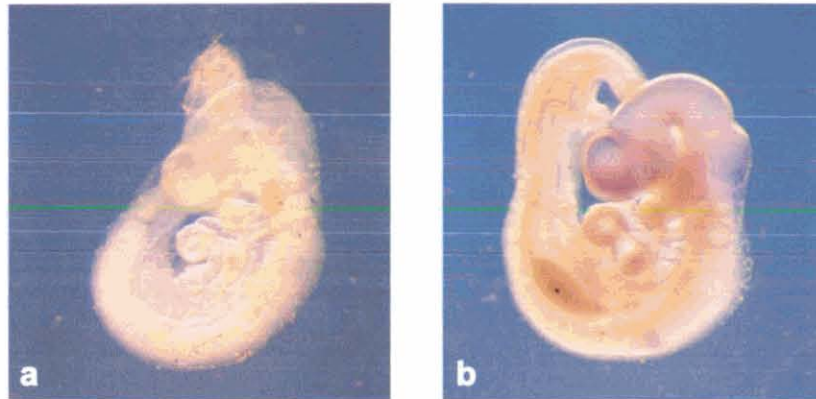
La inducción producida por el ácido fólico sobre la expresión de *Alx3* es específica ya que no observamos tal efecto cuando analizamos la expresión de otros genes relacionados que se expresan en la región cefálica del embrión, tales como los que codifican el factor de transcripción tipo homeodominio *Cart1*, el coactivador transcripcional *Cited2* y el factor de transcripción bHLH *Twist*, implicados todos ellos en la regulación del cierre del tubo neural (Barbera et al., 2002; Chen y Behringer, 1995; Zhao et al., 1996) (Figura 20).

Estos resultados confirman que el ácido fólico estimula la expresión del gen homeodominio *Alx3 in vivo* durante el desarrollo embrionario.

## 7. EL ÁCIDO FÓLICO AUMENTA LA EXPRESIÓN DE *Alx3* EN EL MESÉNQUIMA DE LA REGIÓN CEFÁLICA

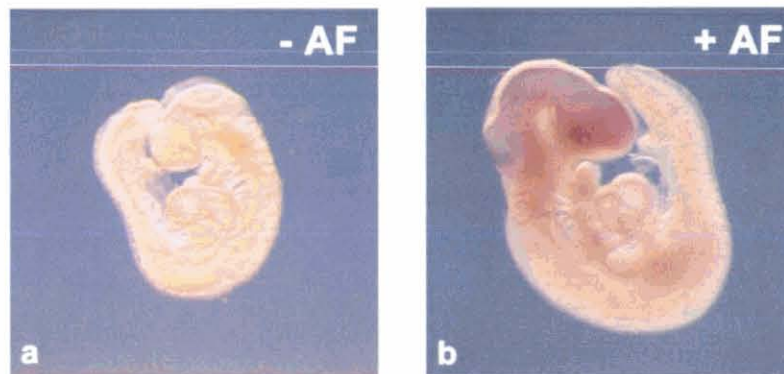
Mediante experimentos de hibridación *in situ* no radiactiva sobre embriones de ratón realizados con una ribosonda antisentido específica (T7-m*Alx3*ribo) comprobamos, como era de esperar de acuerdo con los datos publicados por otros investigadores (Meijlink et al., 1999; ten Berge et al., 1998), que la expresión de *Alx3* en embriones de 9.5 días de edad gestacional se localiza fundamentalmente en el mesénquima de la región anterior de la cabeza (Figura 21, b). También detectamos la expresión de *Alx3*, aunque menos intensa, en ciertas regiones del mesodermo lateral, tal y como había sido descrito en trabajos anteriores (ten Berge et al., 1998).





**FIGURA 21.** Hibridación *in situ* no radiactiva realizada sobre embriones de ratón de edad embrionaria E9.5 con sondas específicas frente al mRNA de *Alx3* de ratón. **a:** Hibridación control realizada con la sonda sentido (SP6-mAlx3ribo). **b:** Hibridación realizada con la sonda antisentido (T7-mAlx3ribo) mostrando la expresión de *Alx3* en la región cefálica.

Para analizar si la expresión de *Alx3* en la región cefálica del embrión depende de la presencia de ácido fólico, realizamos hibridaciones *in situ* en embriones de 8.5 días de gestación incubados *ex utero* durante 24 horas (E8.5 → E9.5) en ausencia o en presencia de ácido fólico.



**FIGURA 22.** Detección de la expresión de mRNA del gen homeodominio *Alx3* *in vivo* en respuesta a ácido fólico mediante hibridación *in situ* no radiactiva realizada sobre embriones de ratón cultivados durante 24 horas (E8.5 → E9.5), **a:** en ausencia de ácido fólico, **b:** en presencia de ácido fólico (100  $\mu$ M).

En los embriones que cultivamos en ausencia de ácido fólico no se detecta apenas expresión de mRNA de *Alx3* (Figura 22, a). En cambio, en presencia de ácido fólico (100  $\mu$ M) los embriones sí muestran una fuerte expresión de *Alx3* que se localiza fundamentalmente en la región del mesénquima anterior de la cabeza. En estos embriones también observamos la expresión de *Alx3*, aunque menos intensa, en diversas regiones del mesodermo lateral (Figura 22, b).

Por tanto, estos resultados indican que la expresión de *Alx3* durante el desarrollo embrionario requiere la presencia de ácido fólico. Habida cuenta de la importancia del ácido fólico para el cierre del tubo neural, y de que *Alx3* se expresa durante un estadio crítico para este proceso en el mesénquima cefálico que, como vimos en la introducción, desempeña un importante papel durante el cierre del tubo neural craneal (Morriss-Kay, 1981), decidimos analizar si *Alx3* se encuentra implicado en los mecanismos que regulan el cierre del tubo neural durante el desarrollo embrionario.

## 8. IMPORTANCIA DE *Alx3* PARA EL CIERRE DEL TUBO NEURAL

Para evaluar la posible implicación de la homeoproteína *Alx3* en la regulación del cierre del tubo neural craneal, analizamos el fenotipo de embriones de ratón en los que se ha inactivado el gen mediante recombinación homóloga.

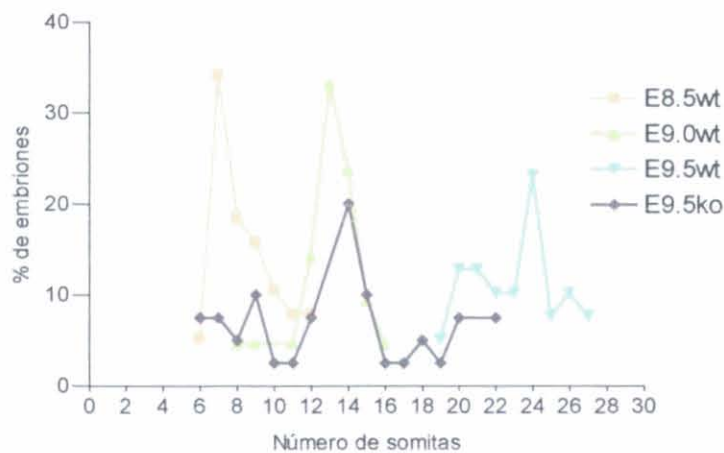
Iniciamos nuestro análisis en el día de gestación E9.5 y observamos que todos los embriones control (*Alx3*<sup>+/+</sup>) presentan el tubo neural cerrado y los pliegues neurales fusionados a lo largo del neuroeje. Sin embargo, los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> presentan el tubo neural sin cerrar completamente en el mismo día de gestación (Tabla I).

Al analizar el número de somitas de los embriones de sendos genotipos (Tabla I y Figura 23), comprobamos que los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> presentan una gran dispersión en su grado de desarrollo, que es considerablemente menor que el de los embriones normales. Así, comprobamos que el número de somitas de los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> a los 9.5 días de gestación oscila entre 6 y 22, mientras que el de los embriones control oscila entre 19 y 27, como corresponde a un estadio normal de desarrollo (véase "The Edinburgh Mouse Atlas: Staging Criteria", <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/Databases/Anatomy/MAstaging.shtml>). De los 40 embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> evaluados, 34 (85%) presentan un nivel de desarrollo por debajo de lo normal. De ellos, la mitad presenta un número de somitas que oscila entre 6 y 12, que corresponde a un estadio del desarrollo propio de embriones de 8.5 días de gestación (Tabla I y Figura 23).

Estos resultados indican que el déficit de *Alx3* puede producir un retraso generalizado del desarrollo en una proporción de embriones. Por ello, continuamos a continuación nuestro análisis en aquellos embriones con un número de somitas suficiente para esperar que el tubo neural craneal deba encontrarse cerrado.

| Nº somitas | E8.5 $Alx3^{+/+}$<br>(n=38) |            | E9.0 $Alx3^{+/+}$<br>(n=21) |            | E9.5 $Alx3^{+/+}$<br>(n=39) |            | E9.5 $Alx3^{-/-}$<br>(n=40) |            |
|------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|------------|
|            | TN abierto                  | TN cerrado | TN abierto                  | TN cerrado | TN abierto                  | TN cerrado | TN abierto                  | TN cerrado |
| 6          | 2                           |            |                             |            |                             |            | 3                           |            |
| 7          | 13                          |            |                             |            |                             |            | 3                           |            |
| 8          | 7                           |            | 1                           |            |                             |            | 2                           |            |
| 9          | 6                           |            | 1                           |            |                             |            | 4                           |            |
| 10         | 4                           |            |                             |            |                             |            | 1                           |            |
| 11         | 3                           |            |                             | 1          |                             |            | 1                           |            |
| 12         | 2                           | 1          |                             | 3          |                             |            | 3                           |            |
| 13         |                             |            |                             | 7          |                             |            |                             |            |
| 14         |                             |            |                             | 5          |                             |            | 6                           | 2          |
| 15         |                             |            |                             | 2          |                             |            | 3                           | 1          |
| 16         |                             |            |                             | 1          |                             |            |                             | 1          |
| 17         |                             |            |                             |            |                             |            |                             | 1          |
| 18         |                             |            |                             |            |                             |            |                             | 2          |
| 19         |                             |            |                             |            |                             |            | 2                           | 1          |
| 20         |                             |            |                             |            |                             |            | 5                           | 3          |
| 21         |                             |            |                             |            |                             |            | 5                           |            |
| 22         |                             |            |                             |            |                             |            | 4                           | 3          |
| 23         |                             |            |                             |            |                             |            | 4                           |            |
| 24         |                             |            |                             |            |                             |            | 9                           |            |
| 25         |                             |            |                             |            |                             |            | 3                           |            |
| 26         |                             |            |                             |            |                             |            | 4                           |            |
| 27         |                             |            |                             |            |                             |            | 3                           |            |

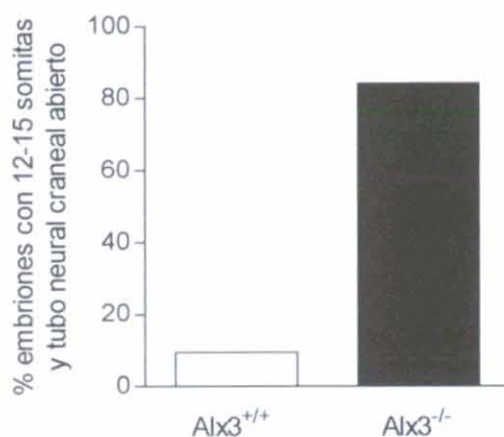
**TABLA I.** Análisis del número de somitas y del grado relativo de cierre del tubo neural en embriones E9.5  $Alx3^{-/-}$  en comparación con embriones normales de diferentes estadios embrionarios (E8.5, E9.0 y E9.5). En la tabla se indica el número de embriones con el tubo neural abierto o cerrado que presentan el número de somitas correspondiente. La zona sombreada de la tabla corresponde al intervalo de desarrollo (entre 12 y 15 somitas) en el que resulta evidente el retraso en el cierre del tubo neural craneal en los embriones  $Alx3^{-/-}$ .



**FIGURA 23.** Distribución del nivel de desarrollo, determinado por el número de somitas, de los embriones  $Alx3^{-/-}$  en el día embrionario E9.5, en comparación con el de los embriones normales en diferentes estadios del desarrollo, E8.5, E9.0 y E9.5. En la gráfica se representa el porcentaje de embriones con el número de somitas correspondiente en los diferentes días embrionarios analizados. Los datos representados en esta gráfica corresponden a los mostrados en la Tabla I.

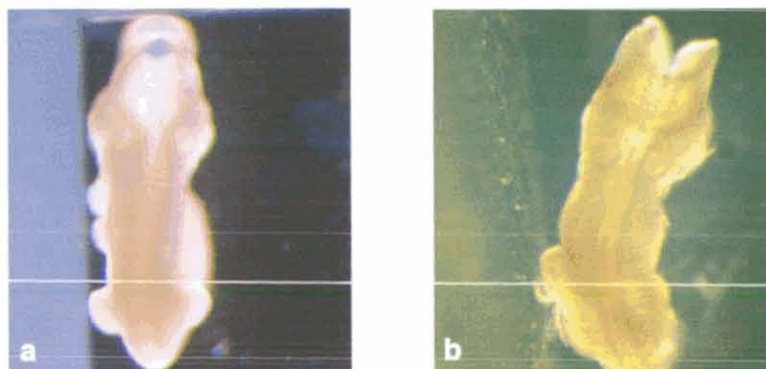


Así, determinamos que en los ratones normales ( $Alx3^{+/+}$ ) utilizados como control, el tubo neural craneal puede observarse completamente cerrado en algunos embriones a partir de un estadio de 11-12 somitas y en todos los embriones a partir de 13 somitas (Tabla I). Por el contrario, observamos una proporción significativa de embriones  $Alx3^{-/-}$  con el tubo neural abierto en un estadio de desarrollo de hasta 15 somitas. Comparativamente, la proporción de embriones con un grado de desarrollo comprendido entre 12 y 15 somitas que presenta el tubo neural craneal abierto es significativamente mayor en animales  $Alx3^{-/-}$  que en sus controles (Figura 24)



**FIGURA 24.** Porcentaje de embriones con un grado de desarrollo entre 12 y 15 somitas que presentan el tubo neural craneal abierto. Obsérvese que en este estadio sólo un 9.5% de los embriones control ( $Alx3^{+/+}$ ) (n=21) no han cerrado el tubo neural frente a un 84.2% en el caso de los embriones  $Alx3^{-/-}$  (n=19).

Estos datos indican que una proporción de los embriones  $Alx3^{-/-}$  presenta un defecto específico caracterizado por la presencia del tubo neural craneal abierto en un estadio del desarrollo en el que esta estructura ya se ha cerrado en los embriones normales, tal y como se observa en la figura 25, lo cual sugiere que  $Alx3$  puede estar implicado en los mecanismos que regulan el cierre del tubo neural.



**FIGURA 25.** Comparación del cierre del tubo neural craneal entre un embrión normal (a) y un embrión  $Alx3^{-/-}$  (b). Obsérvese que los embriones  $Alx3^{-/-}$  aún presentan el tubo neural craneal abierto (b) en un estadio del desarrollo embrionario ( $\geq 12$ -13 somitas) en el que ya se ha cerrado en los embriones normales (a).

A la vista de las diferencias que observamos en el grado de desarrollo de los embriones  $Alx3^{-/-}$  en el día de gestación 9.5 con respecto a los embriones control, y tras comprobar que una proporción de ellos muestran un retardo significativo del mismo, consideramos si como consecuencia de ello se ve comprometida la viabilidad de los embriones más retrasados durante el desarrollo y, por lo tanto, mueren antes de nacer. Esta idea viene apoyada por la observación de que el genotipo de los ratones nacidos de cruces entre individuos heterocigotos ( $Alx3^{+/-}$  x  $Alx3^{+/-}$ ) no sigue una distribución mendeliana, ya que el porcentaje de crías  $Alx3^{-/-}$  es sensiblemente inferior a lo esperado (Tabla II).

| Genotipo                           | $Alx3^{+/+}$ | $Alx3^{+/-}$ | $Alx3^{-/-}$ |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Nº ratones<br>( $n_{total} = 58$ ) | 17           | 31           | 10(*)        |
| % de individuos                    | 30%          | 53%          | 17%          |

**Tabla II.** Análisis genotípico de la descendencia nacida viva de los cruces entre individuos heterocigotos ( $Alx3^{+/-}$  x  $Alx3^{+/-}$ ). (\*) Se encontraron 2 crías nacidas muertas cuyo genotipo fue  $Alx3^{-/-}$ .

Estos resultados sugieren que las alteraciones en el desarrollo que observamos en los embriones  $Alx3^{-/-}$  en el día E9.5, probablemente los casos de retraso más severo en el desarrollo (véase Tabla I), no son corregidos en su totalidad durante el resto de la gestación. Como consecuencia de ello algunos de estos individuos mueren antes de nacer, hecho que se refleja en una disminución de la proporción de individuos  $Alx3^{-/-}$  nacidos vivos en la descendencia de cruces ( $Alx3^{+/-}$  x  $Alx3^{+/-}$ ).

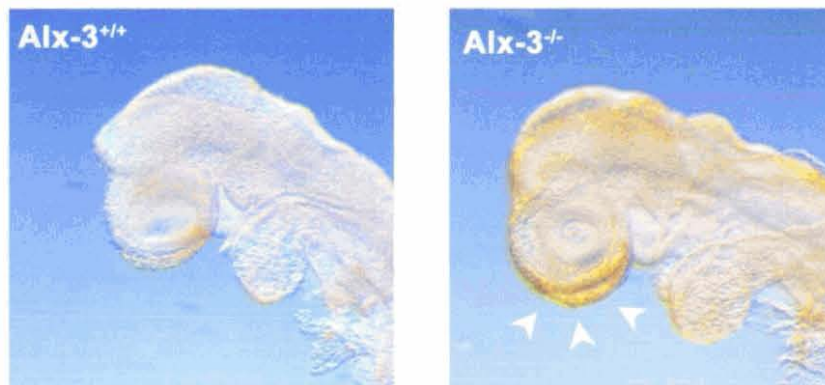
## 9. EL DÉFICIT DE $Alx3$ INCREMENTA EL NÚMERO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS EN LA REGIÓN CEFÁLICA EMBRIONARIA

Se ha descrito que los embriones de ratón deficientes en los genes *Cart1* o *Twist* presentan defectos del cierre del tubo neural craneal que se asocian a alteraciones en el mesénquima craneofacial (Chen y Behringer, 1995) (Zhao et al., 1996), donde puede aparecer un excesivo nivel de apoptosis que compromete el proceso de cierre (Zhao et al., 1996).



Dado que *Alx3* se expresa mayoritariamente en el mesénquima de la región anterior de la cabeza en un estadio crítico para el cierre del tubo neural que además coincide con la expresión de *Cart1* y *Twist*, nos planteamos analizar si el defecto del cierre del tubo neural craneal observado en animales *Alx3*<sup>-/-</sup> se acompaña de un incremento en la población de células apoptóticas en este tejido.

Con este objetivo realizamos ensayos TUNEL *in situ* sobre embriones *Alx3*<sup>+/+</sup> y *Alx3*<sup>-/-</sup> con un grado de desarrollo equivalente, evidenciado por presentar el mismo número de somitas. Así, utilizamos embriones de 10-11 somitas, ya que este estadio corresponde a un momento crítico del desarrollo que coincide con el inicio del cierre del tubo neural craneal.



**FIGURA 26.** Detección de células apoptóticas en el mesénquima craneofacial mediante ensayo TUNEL *in situ*. **Izquierda:** Embrión *Alx3*<sup>+/+</sup>. **Derecha:** Embrión *Alx3*<sup>-/-</sup>. Se observa una mayor proporción de células apoptóticas en la región anterior del mesénquima craneofacial de los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup>. El experimento se realizó de forma independiente sobre 4 embriones de cada uno de los genotipos y obtuvimos un patrón de inmunotinción similar en los diferentes ensayos.

Como se aprecia en la figura 26, en los embriones silvestres únicamente se observa una pequeña población de células apoptóticas localizadas en la región anterior del mesénquima de la cabeza a ambos lados de la línea media (Figura 26, izquierda). Sin embargo, cuando observamos los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup>, evidenciamos la presencia de un número notablemente mayor de células apoptóticas que se distribuyen en la región más anterior del mesénquima craneofacial (Figura 26, derecha). El incremento y la distribución de las células apoptóticas observadas en los embriones carentes de *Alx3* es similar a la observada por Zhao y cols. en ratones carentes de *Cart1* (Zhao et al., 1996) (véase Discusión) por lo cual estos resultados sugieren que los defectos en el cierre del tubo neural craneal que observamos en los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> se asocian a una alteración del mesénquima producida por una mayor proporción de células apoptóticas que puede comprometer el desarrollo del mismo.



## 10. IMPORTANCIA DE ALX3 EN LOS EFECTOS DEL ÁCIDO FÓLICO

En este punto de nuestro trabajo, tras haber comprobado que el ácido fólico regula la expresión de *Alx3 in vivo* y que una proporción de los embriones que carecen del gen que codifica esta homeoproteína presentan defectos específicos en el cierre del tubo neural a nivel craneal, nos planteamos analizar la implicación de *Alx3* en las acciones que ejerce el ácido fólico durante el desarrollo embrionario.

Con este fin, cultivamos embriones silvestres y embriones *Alx3<sup>-/-</sup>* durante el período en que tiene lugar el cierre del tubo neural (E8.5 → E9.5) en ausencia o en presencia de ácido fólico. Tras el cultivo analizamos y comparamos la morfología, el número de somitas y el grado de cierre del tubo neural en los embriones de ambos genotipos en las distintas condiciones de cultivo descritas, datos que vienen recogidos en la Tabla III.

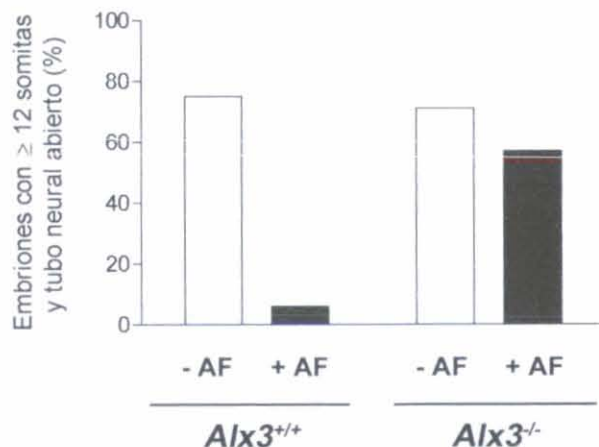
| Nº somitas | <i>Alx3<sup>+/+</sup></i> cultivo 24h (E8.5 → E9.5) |            |                |            | <i>Alx3<sup>-/-</sup></i> cultivo 24h (E8.5 → E9.5) |            |                |            |
|------------|---|------------|----------------|------------|---|------------|----------------|------------|
|            | - ácido fólico                                      |            | + ácido fólico |            | - ácido fólico                                      |            | + ácido fólico |            |
|            | TN abierto  | TN cerrado | TN abierto     | TN cerrado | TN abierto  | TN cerrado | TN abierto     | TN cerrado |
| 6          | 3   |            |                |            |   |            |                |            |
| 7          | 2   |            |                |            | 1   |            |                |            |
| 8          |   |            |                |            | 2   |            |                |            |
| 9          |   |            |                |            | 1   |            | 1              |            |
| 10         | 3   |            |                |            | 1   |            |                |            |
| 11         | 2   |            |                |            |   |            | 1              |            |
| 12         | 1   |            |                |            | 2   |            | 1              |            |
| 13         |   |            |                |            | 1   |            | 2              |            |
| 14         | 2   |            |                | 1          | 2   |            | 2              |            |
| 15         | 2   |            |                |            |   |            |                |            |
| 16         | 1   | 1          |                |            | 1   |            |                |            |
| 17         |   |            |                | 2          | 1   |            |                | 1          |
| 18         |   | 1          |                | 2          |   |            |                |            |
| 19         |   |            |                | 4          | 2   | 2          | 2              | 1          |
| 20         |   |            | 1              | 6          | 1   |            | 1              | 2          |
| 21         |   |            |                | 1          |   | 2          |                | 1          |
| 22         |   |            |                |            |   |            |                | 1          |

**TABLA III.** Número de somitas y grado de cierre del tubo neural craneal de los embriones *Alx3<sup>+/+</sup>* o *Alx3<sup>-/-</sup>* tras 24 horas en cultivo (E8.5 → E9.5) en ausencia de ácido fólico o en presencia de éste en una concentración 100  $\mu$ M. En la tabla se indica el número de embriones con el tubo neural abierto o cerrado que mostraron el número de somitas correspondiente.

Cuando los embriones silvestres se cultivaron en presencia de ácido fólico, de un total de 17, excepto uno que presentó un número de somitas relativamente bajo (14) y otro que con 20 somitas mostró el tubo neural abierto, todos se desarrollaron normalmente y presentaron un número de somitas entre 17 y 21 con el tubo neural cerrado. En cambio, en ausencia de ácido fólico, de un total de 18 embriones analizados, todos excepto uno

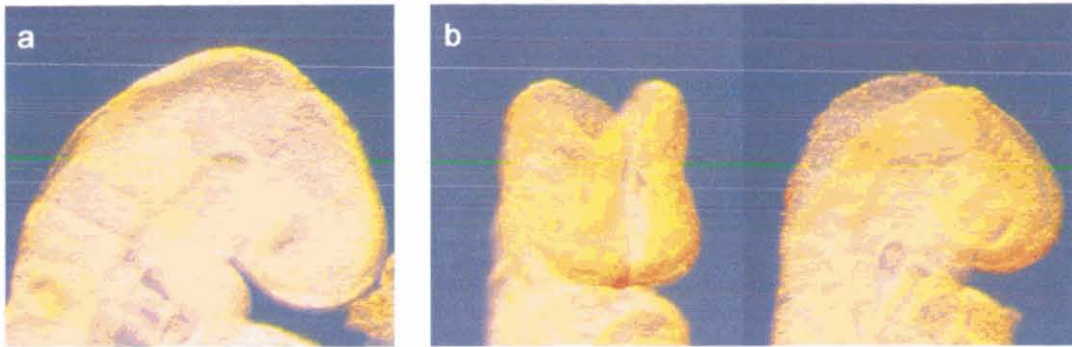
mostraron un número de somitas anormalmente bajo (Tabla III). En este grupo, el 75% de los embriones con más de 12 somitas presentaban el tubo neural abierto, evidenciando el conocido requerimiento de ácido fólico para que el proceso de cierre del tubo neural se complete (Tabla III).

Cuando analizamos los embriones  $Alx3^{-/-}$ , observamos que la falta de ácido fólico también afecta de manera global al desarrollo embrionario, ya que de 19 embriones, más de la mitad (58%) presentaron un número de somitas anormalmente bajo (<17). Además, de todos aquellos que presentaron un grado de desarrollo de 12 somitas o más, el tubo neural permanece abierto en el 71% de los casos. De manera contraria a lo observado en los animales control, la presencia de ácido fólico en el medio no impide el retraso del desarrollo de los embriones  $Alx3^{-/-}$  ni previene la aparición de defectos del cierre del tubo neural en un porcentaje elevado de los mismos, ya que, aun en presencia de ácido fólico, el 57% de los embriones  $Alx3^{-/-}$  con más de 12 somitas presentaron esta estructura abierta (Tabla III). Estos resultados, resumidos en la figura 27, indican que  $Alx3$  es necesario para la promoción del cierre del tubo neural ejercida por el ácido fólico.



**FIGURA 27.** Participación de  $Alx3$  en las acciones del ácido fólico durante el cierre del tubo neural. A partir de los datos mostrados en la tabla II, en la gráfica se representa, para sendos genotipos, el % de embriones con  $\geq 13$  somitas que aún no han cerrado el tubo neural en la región craneal.

Por otro lado, analizamos el nivel de apoptosis en el mesénquima craneofacial mediante ensayo TUNEL y comprobamos que en los embriones silvestres, cuando hay ácido fólico disponible en el medio de cultivo, la proporción de células apoptóticas en el mesénquima craneofacial es muy reducida. Sin embargo, en los embriones  $Alx3^{-/-}$ , además de las alteraciones en el cierre del tubo neural craneal, detectamos la presencia de una población anormalmente elevada de células apoptóticas en el mesénquima subyacente (Figura 28).



**FIGURA 28.** Comparación mediante ensayo TUNEL del nivel de apoptosis en el mesénquima craneofacial en embriones *Alx3*<sup>+/+</sup> (a) o en embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> (b) cultivados en presencia de ácido fólico. Obsérvese que los embriones silvestres apenas se detectan células apoptóticas en el mesénquima anterior de la cabeza, mientras que en los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> existe una apoptosis excesiva en esta región subyacente al tubo neural que también se encuentra alterado en estos embriones.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que *Alx3* participa en los mecanismos de cierre del tubo neural craneal y que la acción favorecedora del ácido fólico sobre este proceso se debe, al menos en parte, a la estimulación de la expresión de *Alx3* por esta vitamina.



## *Discusión*

---

## 1. EL ÁCIDO FÓLICO REGULA LA EXPRESIÓN DE *Alx3*

---

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan la primera evidencia de un mecanismo de acción del ácido fólico independiente de su acción metabólica que consiste en la regulación directa, probablemente a nivel transcripcional, de la expresión del gen que codifica el factor de transcripción de tipo homeodominio *Alx3*.

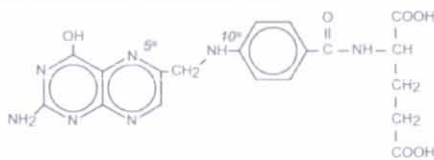
La regulación de la expresión de *Alx3* por ácido fólico constituye un nuevo mecanismo biológico que tiene especial importancia ya que, como también se pone de manifiesto en este trabajo, *Alx3* participa en el cierre del tubo neural craneal durante el desarrollo embrionario. En efecto, hemos comprobado que una proporción de los embriones de ratón deficientes en este gen presentan el tubo neural craneal abierto en un estadio del desarrollo embrionario en el que ya debe estar cerrado. Por lo tanto, *Alx3* constituye la primera diana biológica no metabólica conocida del ácido fólico y permite relacionar el demostrado papel preventivo de esta vitamina en la incidencia de determinadas enfermedades congénitas del tubo neural con los mecanismos que regulan el cierre del mismo durante el desarrollo embrionario.

Como vimos en la introducción, el aporte suplementario de ácido fólico en la dieta materna antes y durante las etapas iniciales de la gestación desempeña un importante papel en la prevención de los defectos congénitos del cierre del tubo neural en humanos, reduciendo su incidencia en más de un 70% (Wald, 1991). Debido a la magnitud de esta respuesta, desde hace unos años se vienen desarrollando numerosas investigaciones encaminadas a dilucidar los mecanismos responsables de este efecto preventivo del ácido fólico, que en la actualidad siguen siendo desconocidos. En este contexto, los resultados obtenidos en esta tesis constituyen un importante avance ya que revelan que *Alx3* es un efector directo del ácido fólico y proporcionan una posible explicación para uno de los mecanismos por los que esta vitamina desempeña su papel preventivo frente a los defectos del cierre del tubo neural.

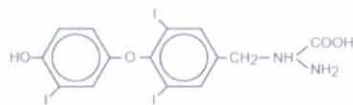
La identificación del gen que codifica *Alx3* como una diana directa del ácido fólico fue posible gracias a los experimentos llevados a cabo en la línea celular RC2.E10. En efecto, en presencia de concentraciones normales de ácido fólico en el medio *Alx3* se expresa constitutivamente. Sin embargo, cuando la concentración de ácido fólico disminuye, o en ausencia de éste, la expresión de *Alx3* decrece paralelamente hasta hacerse prácticamente indetectable. Mediante la realización de experimentos con embriones de ratón en cultivo comprobamos que esta regulación directa de la expresión de *Alx3* por ácido fólico tiene lugar tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con actinomicina D indican que la regulación de la expresión de *A/x3* por ácido fólico ocurre a nivel transcripcional. Desconocemos el mecanismo subyacente responsable de tal efecto, aunque una posibilidad es que el ácido fólico regule la transcripción génica a través de su unión a receptores nucleares. Esta idea se basa en que el ácido fólico es una molécula pequeña y relativamente sencilla que guarda cierta similitud estructural con otras moléculas de pequeño tamaño, como algunas hormonas, otras vitaminas y distintos compuestos xenobióticos que regulan la transcripción génica a través de su unión a receptores nucleares específicos que actúan como factores de transcripción (Figura 29). Los receptores nucleares constituyen un numeroso grupo de proteínas que operan a través de mecanismos complejos que regulan la transcripción en respuesta a la unión de ligandos específicos. En la actualidad se han descrito más de 40 de estos receptores en vertebrados, algunos de los cuales son "receptores huérfanos" para los que no se conoce ligando alguno (Aranda y Pascual, 2001). Por ello, no puede descartarse la posibilidad de que las acciones del ácido fólico a nivel transcripcional estén mediadas por su unión a receptores nucleares.

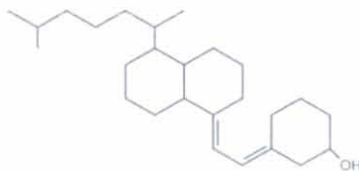
Ácido fólico



Triyodotironina T3

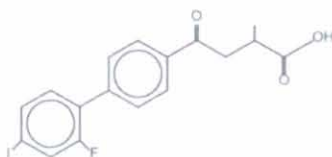


Vitamina D3

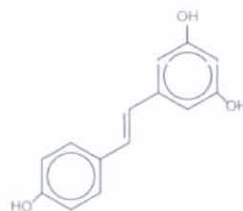


Otros compuestos xenobióticos

Flobufeno



Resveratrol



**FIGURA 29.** Estructura química del ácido fólico en relación a la de otras moléculas de pequeño tamaño que interaccionan con receptores nucleares específicos.



No obstante, hemos de señalar que en las etapas iniciales de este trabajo realizamos una serie de estudios preliminares encaminados a determinar la posible unión específica del ácido fólico a receptores nucleares utilizando ácido fólico tritiado en ensayos de unión a ligandos diseñados previamente (Harvey et al., 1999; Koenders y Thorpe, 1986; Leake, 2000). Dichos ensayos no generaron resultados positivos. Por ello, el estudio de los mecanismos transcripcionales por los que el ácido fólico regula la expresión de *Alx3* deberá abordarse en futuras investigaciones.

Diversos trabajos han puesto de manifiesto la participación de *Alx3* en diferentes procesos morfogénicos durante el desarrollo embrionario (Beverdam et al., 2001; Kuijper et al., 2005). Así, en una situación de déficit de ácido fólico cabe esperar que la expresión de *Alx3* se vea disminuida y, puesto que se trata de un factor de transcripción, la regulación de sus genes diana también resulte afectada, participando éstas en las alteraciones morfogénicas inducidas por el déficit de folatos.

Aunque hasta la fecha no se han identificado los genes diana regulados por *Alx3* o factores de transcripción relacionados, numerosos estudios han caracterizado la unión de las homeoproteínas de la clase Paired a elementos consenso constituidos por repeticiones palindrómicas de la secuencia 5'-TAAT-3' (elementos P) separadas por un número variable de nucleótidos. Las homeoproteínas de la clase Paired que se caracterizan por la presencia de un residuo de glutamina en la posición 50 del homeodominio (Q50), entre ellas *Alx3*, *Alx4* y *Cart1*, se unen preferentemente a los elementos P3, en los que la distancia entre ambos motivos TAAT es de tres nucleótidos (TAATNNNATTA) (Furukawa et al., 2002; Perez-Villamil et al., 2004; Qu et al., 1999; Tucker y Wisdom, 1999; Wilson et al., 1993). Se ha descrito que estas homeoproteínas dimerizan sobre sus elementos diana en el DNA de una manera cooperativa. De este modo, la unión de una molécula de homeodominio a uno de los motivos TAAT del palíndromo incrementa, hasta en 300 veces, la afinidad de unión de una segunda molécula de homeodominio al otro motivo TAAT (Wilson et al., 1993). En virtud de la cooperatividad de su dimerización sobre los elementos P3, la transactivación transcripcional ejercida por estas homeoproteínas resulta sinérgica, de tal modo que variaciones relativamente pequeñas en la cantidad de proteína disponible en la célula se traducen en efectos amplificados en su actividad transcripcional (Tucker y Wisdom, 1999; Wilson et al., 1993).

Así, a la hora de analizar las consecuencias funcionales de una disminución en los niveles de *Alx3*, es necesario tener en cuenta la naturaleza cooperativa de su unión a sus elementos diana en el DNA. En una situación de déficit de ácido fólico, cabe esperar que una disminución relativamente pequeña en los niveles de *Alx3* resulte

suficiente para que la expresión de los genes diana regulados por esta homeoproteína se vea seriamente alterada. El alcance funcional de estas alteraciones puede ser muy acusado ya que es probable que resulten afectados mecanismos que funcionan durante estadios críticos del desarrollo embrionario.

## 2. PARTICIPACIÓN DE *Alx3* EN LOS MECANISMOS QUE CONTROLAN EL CIERRE DEL TUBO NEURAL CRANEAL

Uno de los hallazgos más relevantes del presente trabajo de investigación es la participación de la homeoproteína *Alx3* en la regulación del cierre del tubo neural craneal durante el desarrollo embrionario. Comprobamos que una proporción de los embriones de ratón deficientes en el gen que codifica *Alx3* muestran defectos específicos en el cierre del tubo neural en la región craneal en un estadio del desarrollo embrionario ( $\geq 12$  somitas) en el cual el cierre en esta región ha de haberse completado.

Es importante señalar que sólo un porcentaje relativamente reducido de los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> muestran estas alteraciones. Éste no es un hallazgo inusual, ya que en los embriones de ratón sometidos a la inactivación de un gen mediante recombinación homóloga rara vez se observa penetrancia completa en un defecto fenotípico a nivel del tubo neural (Barbera et al., 2002). Esta variabilidad en la penetrancia puede deberse a factores genéticos que varían en función de la cepa de ratón utilizada, tal y como ocurre en los embriones de ratón *Cart1*<sup>-/-</sup>, que presentan un fenotipo de acrania/meroanencefalia cuya penetrancia varía entre el 65 y el 100% (Zhao et al., 1996). Por otro lado, el hecho de que los defectos que observamos en los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> no afecten a la totalidad de éstos puede indicar la existencia de otros genes o mecanismos compensadores que se ponen en marcha en ausencia de *Alx3*.

Inicialmente, al analizar el fenotipo de los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> observamos que un elevado porcentaje de ellos presenta un nivel de desarrollo significativamente menor al de los embriones silvestres en el mismo día de gestación (E9.5). Estas alteraciones generalizadas en el desarrollo pueden obedecer al hecho de que *Alx3* se expresa en múltiples regiones del embrión que incluyen el mesodermo lateral (ten Berge et al., 1998). No obstante, es importante destacar que, independientemente de estas alteraciones en el desarrollo, una proporción de los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> presentan defectos específicos a nivel del cierre del tubo neural craneal caracterizados, como ya hemos dicho, por la presencia del tubo neural abierto en la región craneal en un estadio del desarrollo embrionario ( $\geq 12$  somitas) en el que ya se ha completado la fusión de los



pliegues neurales a este nivel en los embriones normales. Un aspecto importante a tener en cuenta es que los defectos observados en los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> afectan de manera específica al cierre del tubo neural en la región craneal, ya que no hemos observado alteraciones a nivel caudal en estos embriones. Estos hallazgos indican, por tanto, que *Alx3* está implicado en la regulación del cierre del tubo neural en la región craneal, mientras que probablemente no participa en este proceso a nivel caudal.

### 3. *Alx3* ES UN EFECTOR DIRECTO DEL ÁCIDO FÓLICO

---

Además de su implicación en el cierre del tubo neural craneal, en este trabajo también se pone de manifiesto que *Alx3* es un factor necesario para las acciones que ejerce el ácido fólico durante el cierre del tubo neural. En efecto, nuestros experimentos de cultivo de embriones de ratón demuestran que la alteración del cierre del tubo neural producida como consecuencia del déficit de ácido fólico no puede ser compensada mediante la adición de este compuesto en los embriones deficientes en *Alx3*, al contrario de lo que ocurre en los embriones normales.

Dada la enorme importancia que tiene el aporte suplementario de ácido fólico en la prevención de los defectos congénitos del cierre del tubo neural, se han realizado numerosos estudios para identificar los mecanismos por los que esta vitamina ejerce dicho efecto preventivo. En la actualidad existen más de 80 modelos animales que muestran defectos del cierre del tubo neural. Algunos se producen como consecuencia de la acción directa de agentes teratógenos (Colas y Schoenwolf, 2001; Juriloff y Harris, 2000), mientras que otros se deben a la mutación o inactivación de determinados genes (Greene y Copp, 2005).

Entre ellos, en la Tabla IV se enumeran algunos modelos animales en los que se ha evaluado su sensibilidad al ácido fólico. En cinco de estos mutantes (*Cart1*<sup>-/-</sup>, *Cited2*<sup>-/-</sup>, *Crooked tail*, *Folbp1*<sup>-/-</sup> y *Spotch*<sup>2H</sup>) se ha descrito un efecto preventivo del ácido fólico frente a la aparición de defectos a nivel del tubo neural y ello ha permitido profundizar más en el análisis de las bases moleculares y celulares de dicha prevención (Barbera et al., 2002; Carter et al., 1999; Fleming y Copp, 1998; Piedrahita et al., 1999; Zhao et al., 1996).



| Modelo animal                     | Defecto del tubo neural | Mecanismo sugerido                         | Prevención por ácido fólico | Prevención por otros agentes                 |
|-----------------------------------|-------------------------|--|-----------------------------|--|
| <b>Genético</b>                   |                         |  |                             |  |
| <i>Axial defects</i>              | EB                      | ----                                       | No                          | Metionina                                    |
| <i>Cart1<sup>-/-</sup></i>        | EX                      | Apoptosis excesiva                         | Sí                          | ----   |
| <i>Cited2<sup>-/-</sup></i>       | EX                      | Apoptosis excesiva                         | Sí                          | ----   |
| <i>Crooked tail</i>               | EX                      | ----                                       | Sí                          | ----   |
| <i>Curly tail</i>                 | EB y EX                 | Defecto proliferativo en intestino distal  | No                          | Inositol y ácido retinoico                   |
| <i>Ephrin-A5<sup>-/-</sup></i>    | EX                      | Defecto de adhesión                        | No                          | ----   |
| <i>Folbp1<sup>-/-</sup></i>       | EX                      | Déficit de folatos                         | Sí                          | ----   |
| <i>Spotch<sup>2H</sup> (Pax3)</i> | EB y EX                 | Apoptosis excesiva                         | Sí                          | Timidina                                     |
| <b>Teratógeno</b>                 |                         |  |                             |  |
| Difenilhidantoína                 | EX                      | ----                                       | ----                        | Ácido araquidónico                           |
| Fumonisina                        | EX                      | Disrupción de proteínas ancladas a GPI     | Sí                          | ----   |
| Hiperglicemia                     | EX                      | Depleción de inositol o ácido araquidónico | ----                        | Ácido araquidónico<br>Inositol               |
| Hipertermia                       | EX                      | ----                                       | Sí                          | ----   |
| Déficit de inositol               | EX                      | ----                                       | ----                        | Inositol                                     |
| Ácido valproico                   | EB y EX                 | Alteración metabolismo de folatos          | Sí                          | Metionina<br>Ácido pantoténico<br>Vitamina E |

**TABLA III.** Efecto preventivo del aporte suplementario en la dieta materna de ácido fólico u otros nutrientes en la incidencia de defectos del cierre del tubo neural en distintos modelos animales.

El modelo genético *Crooked tail* (*Cd*) presenta una mutación espontánea que afecta al cromosoma 6 de ratón, aunque no se ha identificado aún el gen alterado. Los ratones heterocigotos para esta mutación presentan la cola torcida, en cambio, en homocigosis se observa una elevada incidencia de exencefalia, la cual es prevenida mediante el aporte de ácido fólico en la dieta materna (Carter et al., 1999).

Otro modelo animal con defectos del tubo neural que responde al ácido fólico es el ratón deficiente del gen que codifica la proteína de unión a folatos de alta afinidad FBP1. Los embriones *Fbp1<sup>-/-</sup>* muestran severas anomalías morfogénicas y mueren en el día de gestación E10. Se ha comprobado que el aporte suplementario de ácido fólico en la dieta materna contribuye a reducir la incidencia de los defectos observados en ausencia de *Fbp1* (Piedrahita et al., 1999).

Es importante señalar que en tres de los modelos animales de defectos sensibles a folatos que hemos enumerado, el gen mutado o inactivado codifica una proteína que participa en la regulación de la transcripción génica: *Cart1* codifica un factor de transcripción homeodominio de la familia *aristaless*, *Cited2* codifica un

miembro de la familia de proteínas CITED que actúan como reguladores transcripcionales, y los ratones *spotch* se caracterizan por la presencia de una mutación espontánea en el gen *Pax3* que codifica un factor de transcripción de la familia Paired (Epstein et al., 1991). Es posible, por tanto, que el ácido fólico active mecanismos de compensación que operen a nivel transcripcional, regulando la expresión de los genes diana afectados por las correspondientes mutaciones.

Los embriones de ratón deficientes en el gen que codifica *Cart1* desarrollan un fenotipo característico de acrania/meroanencefalia que se acompaña de una proporción anormalmente elevada de células apoptóticas en el mesénquima de la región anterior de la cabeza. Este fenotipo es suprimido en un elevado porcentaje de los embriones por el aporte suplementario de ácido fólico, observación que proporcionó la primera evidencia de que el tratamiento con ácido fólico puede compensar un déficit genético (Zhao et al., 1996). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo molecular o celular por el que el ácido fólico ejerce su efecto preventivo en estos animales. Es importante destacar que *Alx3* está estrechamente relacionado, tanto estructural como funcionalmente, con *Cart1*. Al igual que éste, *Alx3* presenta una elevada expresión en el tejido mesenquimático de la región anterior de la cabeza. En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible proponer que la supresión del fenotipo descrito en los embriones *Cart1*<sup>-/-</sup> por el ácido fólico responda a un mecanismo de compensación génica que incluya la estimulación de la expresión de *Alx3*. Esta propuesta se apoya en los siguientes argumentos:

- a) Ambos genes se expresan en el mesénquima craneofacial en estadios del desarrollo embrionario críticos para el cierre del tubo neural (E9.0-E9.5), por lo que es posible que participen conjuntamente en la regulación de otros genes que se expresan en este tejido y que son importantes en el cierre del tubo neural craneal (Meijlink et al., 1999; ten Berge et al., 1998; Zhao et al., 1994).
- b) Los dos factores de transcripción comparten homeodominios de secuencias prácticamente idénticas (Meijlink et al., 1999), por lo que no es descabellado pensar que si se coexpresan en las mismas células, regulen la transcripción de los mismos genes diana.
- c) Se ha descrito la capacidad de ambas proteínas de formar heterodímeros con la homeoproteína *Alx4* para transactivar de manera sinérgica la transcripción génica (Beverdam et al., 2001).

Estas circunstancias permiten proponer que ambos factores controlen la expresión de genes diana comunes. Con el fin de evaluar esta hipótesis, será necesario estudiar la regulación de la expresión de *Alx3* por ácido fólico en los ratones



*Cart1*<sup>-/-</sup>, y analizar el fenotipo de los ratones en los que ambos genes se encuentran inactivados con el objeto de determinar si la disminución en la incidencia del fenotipo de acrania/meroanencefalia producida por el ácido fólico en los embriones deficientes de *Cart1* se ve impedida por la falta de *Alx3*.

Otro modelo animal de defectos del cierre del tubo neural sensibles a ácido fólico es el ratón deficiente del gen que codifica la proteína *Cited2*. Aproximadamente el 80% de los embriones *Cited2*<sup>-/-</sup> desarrollan un fenotipo exencefálico cuya incidencia se ve reducida por el aporte de ácido fólico. El metabolismo de los folatos no está alterado en estos ratones, por lo que constituyen el primer modelo genético en el cual el ácido fólico previene un defecto del cierre del tubo neural por un mecanismo que no implica corregir un defecto metabólico intrínseco (Barbera et al., 2002). Es posible proponer, por tanto, que en este modelo el efecto preventivo del ácido fólico responda a un mecanismo compensatorio de la deficiencia génica de *Cited2*.

Finalmente, en los ratones *spotch* (*Sp*<sup>2H</sup>/*Sp*<sup>2H</sup>) la prevención los defectos del cierre del tubo neural (exencefalia y/o espina bífida) por el aporte de ácido fólico se acompaña de la normalización del metabolismo de los folatos, alterado en estos embriones (Fleming y Copp, 1998). No obstante, aún no se ha identificado el mecanismo molecular responsable de ello. Por otro lado, trabajos recientes indican que Pax3 inhibe la expresión del gen proapoptótico *p53* y se ha comprobado que la inactivación de *p53* en los embriones *Sp*<sup>2H</sup>/*Sp*<sup>2H</sup> rescata muchos de los defectos del tubo neural descritos (Pani et al., 2002). En base a estas observaciones, es posible proponer que la prevención de los defectos del cierre del tubo neural por el ácido fólico en los embriones *spotch* responda a la capacidad de esta vitamina de inducir la expresión de determinados factores de transcripción que suplan las funciones de Pax3, entre ellas la inhibición de la expresión de *p53*. En ensayos preliminares de transfección transitoria llevados a cabo en nuestro laboratorio para evaluar la actividad transcripcional de *Alx3* sobre el promotor de *p53*, hemos obtenido resultados que sugieren que *Alx3* es capaz de reprimir la transcripción de este gen (datos no mostrados). De confirmarse estos datos, es posible que *Alx3* u otros factores de transcripción relacionados con Pax3 puedan compensar funcionalmente la falta de éste en los embriones *spotch* y proporcionar así un mecanismo por el cual el ácido fólico ejerce su acción preventiva en estos embriones.

Por tanto, a la luz de los resultados obtenidos en este trabajo, es posible que la regulación directa de la expresión génica por el ácido fólico constituya un posible mecanismo por el que el aporte suplementario de esta vitamina durante el período



periconcepcional contribuya a reducir la incidencia de los defectos del cierre del tubo neural a través de una vía independiente de sus acciones a nivel metabólico.

#### 4. *Alx3* PARTICIPA EN EL CIERRE DEL TUBO NEURAL CRANEAL A TRAVÉS DE UN MECANISMO EXTRÍNSECO A NIVEL DEL MESÉNQUIMA DE LA REGIÓN ANTERIOR DE LA CABEZA

---

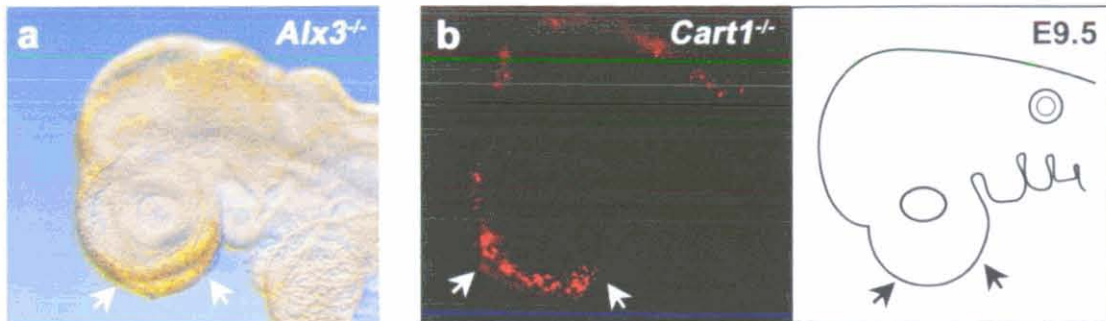
Como vimos en la introducción, durante la neurulación se generan una serie de fuerzas intrínsecas en el propio neuroepitelio que son necesarias para el plegamiento de la placa neural durante el cierre del tubo neural (Sadler, 1998; Smith y Schoenwolf, 1997).

A su vez, en la región craneal también es necesaria la participación de fuerzas extrínsecas, generadas fundamentalmente por la expansión del mesénquima subyacente que conlleva un aumento en la tasa proliferativa y una mayor producción de matriz extracelular. Estos dos fenómenos proporcionan, así, una importante fuerza mecánica que contribuye a la elevación y aposición de los pliegues neurales de manera específica en la región craneal (Solursh y Morriss, 1977).

La importancia del mesénquima craneofacial en el cierre del tubo neural a nivel craneal resulta evidente en los embriones deficientes del gen que codifica la homeoproteína *Cart1*. Los defectos del cierre del tubo neural craneal observados en estos embriones se asocian a una apoptosis excesiva en el mesénquima de la región anterior de la cabeza. Esto provoca una seria disminución en el número de células mesenquimales en esta región en el día de desarrollo embrionario E9.0, afectando a la elevación de los pliegues neurales a nivel craneal (Zhao et al., 1996). Aunque se ha descrito que el aporte suplementario de ácido fólico previene la aparición de estos defectos en un elevado porcentaje de los embriones *Cart1*<sup>-/-</sup>, se desconoce si esta vitamina ejerce su efecto protector a través de la prevención de la apoptosis en el mesénquima craneofacial.

Como vimos anteriormente, *Alx3* se expresa en el mesénquima de la región anterior de la cabeza y su expresión coincide con la de otros genes *aristaless*, entre ellos *Cart1* (Beverdam y Meijlink, 2001; Meijlink et al., 1999; ten Berge et al., 1998). Llama la atención que el patrón de apoptosis que muestran los embriones *Alx3*<sup>-/-</sup> es muy similar al observado en los embriones *Cart1*<sup>-/-</sup> (Zhao et al., 1996). Como se observa en la figura 30), ambos modelos animales presentan una apoptosis excesiva en la porción anterior del mesénquima craneofacial que indica que la alteración de las

células mesenquimales de esta región parece ser la causa de los defectos del cierre del tubo neural que presentan los embriones *Cart1*<sup>-/-</sup> o *Alx3*<sup>-/-</sup>.



**FIGURA 25.** Comparación del patrón de apoptosis que observamos en los embriones E9.5 *Alx3*<sup>-/-</sup> (a) (véase figura 22) con el que previamente se había descrito en los embriones *Cart1*<sup>-/-</sup> en el mismo día embrionario (Zhao et al., 1996) (b). Para facilitar la localización de la inmunofluorescencia detectada en el embrión *Cart1*<sup>-/-</sup>, en el panel derecho de la figura b se muestra una representación esquemática de la morfología de la cabeza de un embrión de ratón E9.5. Obsérvese que ambos modelos animales muestran una apoptosis excesiva en la zona más frontal del mesénquima de la región anterior de la cabeza (flechas blancas).

Estas observaciones indican que ambas proteínas desempeñan funciones a nivel del mesénquima craneofacial que son importantes para la integridad de este tejido y proporcionan un posible sustrato celular para el mecanismo propuesto anteriormente, por el cual *Alx3*, al ser inducido por ácido fólico, sea capaz de contrarrestar las alteraciones debidas a la falta de *Cart1*. Así, cabe la posibilidad de que, en esta situación, la estimulación de la expresión de *Alx3* por el ácido fólico rescate las células que entrarían en apoptosis al carecer de *Cart1*. Sería interesante, por tanto, analizar si la suplementación con ácido fólico incrementa la expresión de *Alx3* en el mesénquima craneofacial en los embriones *Cart1*<sup>-/-</sup>, y si ello se acompaña de una disminución en el número de células apoptóticas en este tejido.

Es interesante destacar que *Twist*, otro de los genes cuya disrupción provoca importantes defectos en el cierre del tubo neural a nivel craneal, presenta una marcada expresión en el mesénquima de la cabeza (Wolf et al., 1991). Los embriones *twist*<sup>-/-</sup> mueren en el día embrionario E11.5. El rasgo fenotípico más llamativo de estos embriones es la incapacidad de los pliegues neurales craneales de fusionarse debidamente, lo que provoca defectos severos en el cierre del tubo neural específicamente en la región craneal que se acompañan de alteraciones en el mesénquima cefálico subyacente (Chen y Behringer, 1995). *Twist* pertenece a la familia de factores de transcripción bHLH y es posible que se coexpresen con *Alx3*. De ser así, cabría la posibilidad de que *Twist* y *Alx3* estén relacionados funcionalmente, quizás a través de interacciones directas proteína-proteína. De hecho, la capacidad de



Alx3 de interactuar con proteínas bHLH ha sido demostrada recientemente en nuestro laboratorio en estudios realizados en células  $\beta$  pancreáticas, en las que Alx3 interactúa directamente con la proteína bHLH E47 para regular sinérgicamente la transcripción del gen de insulina.

## 5. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LA PARTICIPACIÓN DE Alx3 EN LA REGULACIÓN DEL CIERRE DEL TUBO NEURAL CRANEAL

---

Como vimos en la introducción, la etiología de los defectos del cierre del tubo neural es heterogénea y multifactorial, ya que tanto factores genéticos como ambientales contribuyen a la aparición de este tipo de anomalías durante el desarrollo embrionario temprano. Resulta fundamental, por tanto, la identificación de las posibles mutaciones o polimorfismos presentes en los genes implicados en la etiopatogenia de estas alteraciones para poder establecer factores genéticos de riesgo en la población y desarrollar terapias adecuadas en el futuro.

El estudio de modelos animales con defectos del tubo neural ha permitido la identificación y localización de los genes responsables de la aparición de algunas de estas malformaciones (Greene y Copp, 2005; Juriloff y Harris, 2000).

Así, la existencia de modelos animales con alteraciones genéticas no inducidas experimentalmente, como *circletail* (Murdoch et al., 2003), *looptail* (Murdoch et al., 2001) o *spotch* (Epstein et al., 1991) ha permitido la identificación de genes cuyo defecto produce alteraciones en el cierre del tubo neural. En los modelos mencionados, estos genes codifican, respectivamente, la proteína citosólica Scrb1, la de membrana Vangl2 y el factor de transcripción Pax3. Estos hallazgos no se han seguido de la identificación de los correspondientes genes homólogos como causantes de defectos del cierre del tubo neural en humanos, si bien se conoce que mutaciones en el gen Pax3 dan lugar al síndrome de Waardenburg (Tassabehji et al., 1993) que cursa con distopia cantorum, alteración del desarrollo de la línea media craneofacial caracterizada por el desplazamiento lateral de la separación de los ojos.

Por otro lado, como ha quedado expuesto anteriormente en este trabajo, la generación experimental de deleciones génicas en el laboratorio ha posibilitado la identificación de genes adicionales cuya función es necesaria para el cierre del tubo neural. Un número significativo de estos genes codifica proteínas implicadas en la regulación de la transcripción génica como Cart1, Twist, AP2 o Cited2. Esta circunstancia ha promovido la búsqueda de mutaciones en genes que codifican



reguladores transcripcionales, como *Cited2* y las homeoproteínas *Hox* y *Pax*, en pacientes con alteraciones congénitas del cierre del tubo neural, que hasta la fecha ha sido infructuosa (Trembath et al., 1999; Volcik et al., 2002a; Volcik et al., 2002b).

Otro gen cuya mutación ha sido relacionada con anomalías craneofaciales en el ratón es el gen bHLH *Twist*. El estudio de los ratones deficientes en este gen ha permitido conocer la etiología de algunas anomalías morfológicas observadas en humanos (Darling, 1996). En concreto, mutaciones en heterocigosis en el gen *TWIST* se han asociado al síndrome de Saethre-Chotzen, que cursa, entre otras alteraciones, con defectos craneofaciales y en la digitación (el Ghouzzi et al., 1997; Howard et al., 1997). Ya que *Alx3* participa en la morfogénesis de las estructuras esqueléticas craneofaciales y de las extremidades durante el desarrollo embrionario y, además, un porcentaje de los embriones de ratón *Alx3*<sup>-/-</sup> presentan polidactilia en las extremidades posteriores (Beverdam, comunicación personal; observaciones propias) es posible que *ALX3* esté relacionado con los defectos causados por la mutación del gen *TWIST*.

Existen aún modelos animales con alteraciones cromosómicas asociadas a defectos del cierre del tubo neural a nivel craneal para los cuales no se han identificado los genes responsables. Algunas de ellas parecen ser poligénicas, ya que se acompañan de alteraciones en más de una región cromosómica (Juriloff et al., 2001), mientras que otras afectan a un solo cromosoma (véase (Copp et al., 2003)).

El gen *Alx3* se encuentra en el ratón en el cromosoma 3. De los modelos referidos anteriormente, sólo uno, *Blebs (my)*, se asocia a una alteración en este cromosoma (Carter, 1959), por lo que queda determinar si *Alx3* está relacionado con dicha alteración.

Por último, cabe destacar que existen numerosos síndromes congénitos que cursan con defectos craneofaciales y de las extremidades, y para los cuales aún no se ha identificado el gen afectado. Uno de estos síndromes cursa principalmente con encefalocele anterior, labio y paladar hendido y ausencia de los miembros superiores, alteraciones todas ellas compatibles con una posible implicación de *ALX3* en la etiología de este trastorno. Sería interesante, por tanto, analizar la presencia de posibles mutaciones o polimorfismos en la región cromosómica donde se localiza el gen *ALX3* humano (cromosoma 1p21-p13). La identificación de alteraciones cromosómicas a este nivel en individuos afectados con defectos del cierre del tubo neural permitiría proponer a *ALX3* como posible candidato en la etiología multifactorial de estos procesos.

# *Conclusiones*

---

## CONCLUSIONES

---

Las conclusiones de la presente tesis doctoral son las siguientes:

1. El ácido fólico estimula específicamente la expresión del gen homeodominio *Alx3* en la línea celular RC2.E10 a través de un mecanismo transcripcional.
2. La disminución de los niveles de *Alx3* en ausencia de ácido fólico se traduce en una alteración de la transcripción de los genes regulados por *Alx3* debido a la desocupación de sus elementos diana.
3. El ácido fólico estimula la expresión del gen homeodominio *Alx3* durante el desarrollo embrionario *in vivo* en el mesénquima cefálico durante un período crítico para el cierre del tubo neural craneal.
4. *Alx3* está implicado en los mecanismos que regulan el cierre del tubo neural craneal durante el desarrollo embrionario.
5. La estimulación de la expresión de *Alx3* participa en el mecanismo de acción por el cual el ácido fólico promueve el cierre del tubo neural durante el desarrollo embrionario.
6. Los defectos en el cierre del tubo neural craneal observados en los embriones carentes de *Alx3* o en aquellos cultivados en ausencia de ácido fólico se asocian a una alteración del mesénquima subyacente producida por una mayor proporción de células apoptóticas.



# *Bibliografía*

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

Antony, A. C., Utley, C. S., Marcell, P. D., Kolhouse, J. F. (1982). Isolation, characterization, and comparison of the solubilized particulate and soluble folate binding proteins from human milk. *J Biol Chem* 257, 10081-10089.

Aranda, A., Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-1304.

Barbera, J. P., Rodriguez, T. A., Greene, N. D., Weninger, W. J., Simeone, A., Copp, A. J., Beddington, R. S., Dunwoodie, S. (2002). Folic acid prevents exencephaly in *Cited2* deficient mice. *Hum Mol Genet* 11, 283-293.

Beverdam, A., Brouwer, A., Reijnen, M., Korving, J., Meijlink, F. (2001). Severe nasal clefting and abnormal embryonic apoptosis in *Alx3/Alx4* double mutant mice. *Development* 128, 3975-3986.

Beverdam, A., Meijlink, F. (2001). Expression patterns of group-I aristaless-related genes during craniofacial and limb development. *Mech Dev* 107, 163-167.

Boncinelli, E., Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M. (1993). Homeobox genes in the developing central nervous system. *Ann Genet* 36, 30-37.

Carter, M., Ulrich, S., Oofuji, Y., Williams, D. A., Ross, M. E. (1999). Crooked tail (*Cd*) models human folate-responsive neural tube defects. *Hum Mol Genet* 8, 2199-2204.

Carter, T. C. (1959). Embryology of the Little an Bagg X-rayed mouse stock. *J Genetics* 56, 401-435.

Cecchi, C., Boncinelli, E. (2000). *Emx* homeogenes and mouse brain development. *Trends Neurosci* 23, 347-352.

Cecchi, C., Mallamaci, A., Boncinelli, E. (2000). *Otx* and *Emx* homeobox genes in brain development. *Int J Dev Biol* 44, 663-668.

Colas, J. F., Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* 221, 117-145.

Copp, A. J., Greene, N. D., Murdoch, J. N. (2003). The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet* 4, 784-793.

Copp, A. J. a. C., D.L. (1990). *Postimplantation Mammalian Embryos: A Practical Approach.*, IRL Press, Oxford edition).

Czeizel, A. E., Dudas, I. (1992). Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327, 1832-1835.

Chang, C., Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Cell fate determination in embryonic ectoderm. *J Neurobiol* 36, 128-151.

Chen, Z. F., Behringer, R. R. (1995). *twist* is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev* 9, 686-699.

Darling, S. (1996). Mice as models of human developmental disorders: natural and artificial mutants. *Curr Opin Genet Dev* 6, 289-294.

el Ghouzzi, V., Le Merrer, M., Perrin-Schmitt, F., Lajeunie, E., Benit, P., Renier, D., Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A. L., Munnich, A., Bonaventure, J. (1997). Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15, 42-46.

Epstein, D. J., Vekemans, M., Gros, P. (1991). *Splotch* (*Sp2H*), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of *Pax-3*. *Cell* 67, 767-774.

Erickson, C. A., Weston, J. A. (1983). An SEM analysis of neural crest migration in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 74, 97-118.

Fleming, A., Copp, A. J. (1998). Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science* 280, 2107-2109.



Fleming, A., Gerrelli, D., Greene, N. D., Copp, A. J. (1997). Mechanisms of normal and abnormal neurulation: evidence from embryo culture studies. *Int J Dev Biol* 41, 199-212.

Furukawa, K., Iioka, T., Morishita, M., Yamaguchi, A., Shindo, H., Namba, H., Yamashita, S., Tsukazaki, T. (2002). Functional domains of paired-like homeoprotein *Cart1* and the relationship between dimerization and transcription activity. *Genes Cells* 7, 1135-1147.

Garcia-Castro, M., Bronner-Fraser, M. (1999). Induction and differentiation of the neural crest. *Curr Opin Cell Biol* 11, 695-698.

Goulding, M. D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J. R., Gruss, P. (1991). Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *Embo J* 10, 1135-1147.

Greene, N. D., Copp, A. J. (2005). Mouse models of neural tube defects: investigating preventive mechanisms. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135, 31-41.

Groenen, P. M., van Rooij, I. A., Peer, P. G., Gooskens, R. H., Zielhuis, G. A., Steegers-Theunissen, R. P. (2004). Marginal maternal vitamin B12 status increases the risk of offspring with spina bifida. *Am J Obstet Gynecol* 191, 11-17.

Grunz, H., Tacke, L. (1989). Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer. *Cell Differ Dev* 28, 211-217.

Harvey, J. M., Clark, G. M., Osborne, C. K., Allred, D. C. (1999). Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17, 1474-1481.

Hemmati-Brivanlou, A., Melton, D. (1997). Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise. *Cell* 88, 13-17.

Hibbard, B. M. (1964). The Role Of Folic Acid In Pregnancy; With Particular Reference To Anaemia, Abruption And Abortion. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 71, 529-542.

Howard, T. D., Paznekas, W. A., Green, E. D., Chiang, L. C., Ma, N., Ortiz de Luna, R. I., Garcia Delgado, C., Gonzalez-Ramos, M., Kline, A. D., Jabs, E. W. (1997). Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15, 36-41.

Ikeda, A., Ikeda, S., Gridley, T., Nishina, P. M., Naggert, J. K. (2001). Neural tube defects and neuroepithelial cell death in Tulp3 knockout mice. *Hum Mol Genet* 10, 1325-1334.

Juriloff, D. M., Gunn, T. M., Harris, M. J., Mah, D. G., Wu, M. K., Dewell, S. L. (2001). Multifactorial genetics of exencephaly in SELH/Bc mice. *Teratology* 64, 189-200.

Juriloff, D. M., Harris, M. J. (2000). Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet* 9, 993-1000.

Juriloff, D. M., Harris, M. J., Tom, C., MacDonald, K. B. (1991). Normal mouse strains differ in the site of initiation of closure of the cranial neural tube. *Teratology* 44, 225-233.

Kirke, P. N., Daly, L. E., Elwood, J. H. (1992). A randomised trial of low dose folic acid to prevent neural tube defects. The Irish Vitamin Study Group. *Arch Dis Child* 67, 1442-1446.

Kirke, P. N., Molloy, A. M., Daly, L. E., Burke, H., Weir, D. G., Scott, J. M. (1993). Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 86, 703-708.

Koenders, A., Thorpe, S. M. (1986). Standardization of steroid receptor assays in human breast cancer--IV. Long-term within- and between-laboratory variation of estrogen and progesterone receptor assays. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22, 945-952.

Kuijper, S., Beverdam, A., Kroon, C., Brouwer, A., Candille, S., Barsh, G., Meijlink, F. (2005). Genetics of shoulder girdle formation: roles of Tbx15 and aristaless-like genes. *Development* 132, 1601-1610.

Leake, R. (2000). Detection of the oestrogen receptor (ER). immunohistochemical versus cytosol measurements. *Eur J Cancer* 36 Suppl 4, S18-19.

Lu, M. F., Cheng, H. T., Kern, M. J., Potter, S. S., Tran, B., Diekwisch, T. G., Martin, J. F. (1999). *prx-1* functions cooperatively with another paired-related homeobox gene, *prx-2*, to maintain cell fates within the craniofacial mesenchyme. *Development* 126, 495-504.

Lucock, M. (2000). Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab* 71, 121-138.

Medveczky, E., Puho, E., Czeizel, E. A. (2004). The use of drugs in mothers of offspring with neural-tube defects. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 13, 443-455.

Meijlink, F., Beverdam, A., Brouwer, A., Oosterveen, T. C., Berge, D. T. (1999). Vertebrate *aristaless*-related genes. *Int J Dev Biol* 43, 651-663.

Milunsky, A., Jick, H., Jick, S. S., Bruell, C. L., MacLaughlin, D. S., Rothman, K. J., Willett, W. (1989). Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *Jama* 262, 2847-2852.

Mills, J. L., Tuomilehto, J., Yu, K. F., Colman, N., Blaner, W. S., Koskela, P., Rundle, W. E., Forman, M., Toivanen, L., Rhoads, G. G. (1992). Maternal vitamin levels during pregnancies producing infants with neural tube defects. *J Pediatr* 120, 863-871.

Mitchell, H. (1941). The concentration of "folic acid". *J Amer Chem Soc* 63, 2284.

Mitchell, L. E., Adzick, N. S., Melchionne, J., Pasquariello, P. S., Sutton, L. N., Whitehead, A. S. (2004). Spina bifida. *Lancet* 364, 1885-1895.

Molloy, A. M., Kirke, P., Hillary, I., Weir, D. G., Scott, J. M. (1985). Maternal serum folate and vitamin B12 concentrations in pregnancies associated with neural tube defects. *Arch Dis Child* 60, 660-665.

Morriss-Kay, G. M. (1981). Growth and development of pattern in the cranial neural epithelium of rat embryos during neurulation. *J Embryol Exp Morphol* 65 Suppl, 225-241.



Morriss-Kay, G. M. T., S. (1987). Mapping cranial neural crest cell migration pathways in mammalian embryos. *Trends Genetics* 3, 257-261.

Morriss, G. M., Solursh, M. (1978). Regional differences in mesenchymal cell morphology and glycosaminoglycans in early neural-fold stage rat embryos. *J Embryol Exp Morphol* 46, 37-52.

Murdoch, J. N., Doudney, K., Paternotte, C., Copp, A. J., Stanier, P. (2001). Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of *Lpp1*, a novel gene involved in floor plate specification. *Hum Mol Genet* 10, 2593-2601.

Murdoch, J. N., Henderson, D. J., Doudney, K., Gaston-Massuet, C., Phillips, H. M., Paternotte, C., Arkell, R., Stanier, P., Copp, A. J. (2003). Disruption of *scribble* (*Scrb1*) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Hum Mol Genet* 12, 87-98.

Nieto, M. A., Patel, K., Wilkinson, D. G. (1996). In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Methods Cell Biol* 51, 219-235.

Pani, L., Horal, M., Loeken, M. R. (2002). Rescue of neural tube defects in Pax-3-deficient embryos by p53 loss of function: implications for Pax-3-dependent development and tumorigenesis. *Genes Dev* 16, 676-680.

Perez-Villamil, B., Mirasierra, M., Vallejo, M. (2004). The homeoprotein *Alx3* contains discrete functional domains and exhibits cell-specific and selective monomeric binding and transactivation. *J Biol Chem* 279, 38062-38071.

Pérez-Villamil, B. V., M (1996). Novel homeodomain transcription factors coexpressed in embryonic forebrain-derived neuronal cell lines. (10th International Congress of Endocrinology. San Francisco, CA.).

Piedrahita, J. A., Oetama, B., Bennett, G. D., van Waes, J., Kamen, B. A., Richardson, J., Lacey, S. W., Anderson, R. G., Finnell, R. H. (1999). Mice lacking the folic acid-binding protein *Folbp1* are defective in early embryonic development. *Nat Genet* 23, 228-232.

Qu, S., Li, L., Wisdom, R. (1997). Alx-4: cDNA cloning and characterization of a novel paired-type homeodomain protein. *Gene* 203, 217-223.

Qu, S., Tucker, S. C., Ehrlich, J. S., Levorse, J. M., Flaherty, L. A., Wisdom, R., Vogt, T. F. (1998). Mutations in mouse *Aristaless-like4* cause Strong's luxoid polydactyly. *Development* 125, 2711-2721.

Qu, S., Tucker, S. C., Zhao, Q., deCrombrughe, B., Wisdom, R. (1999). Physical and genetic interactions between *Alx4* and *Cart1*. *Development* 126, 359-369.

Ray, J. G., Blom, H. J. (2003). Vitamin B12 insufficiency and the risk of fetal neural tube defects. *Qjm* 96, 289-295.

Robel, L., Ding, M., James, A. J., Lin, X., Simeone, A., Leckman, J. F., Vaccarino, F. M. (1995). Fibroblast growth factor 2 increases *Otx2* expression in precursor cells from mammalian telencephalon. *J Neurosci* 15, 7879-7891.

Robinson, G. W., Mahon, K. A. (1994). Differential and overlapping expression domains of *Dlx-2* and *Dlx-3* suggest distinct roles for Distal-less homeobox genes in craniofacial development. *Mech Dev* 48, 199-215.

Robledo, R. F., Rajan, L., Li, X., Lufkin, T. (2002). The *Dlx5* and *Dlx6* homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev* 16, 1089-1101.

Ron, D., Habener, J. F. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* 6, 439-453.

Rudnick, A., Ling, T. Y., Odagiri, H., Rutter, W. J., German, M. S. (1994). Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12203-12207.

Sabharanjak, S., Mayor, S. (2004). Folate receptor endocytosis and trafficking. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1099-1109.

Sadler, T. W. (1998). Mechanisms of neural tube closure and defects. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 4, 247-253.

Saitsu, H., Ishibashi, M., Nakano, H., Shiota, K. (2003). Spatial and temporal expression of folate-binding protein 1 (Fbp1) is closely associated with anterior neural tube closure in mice. *Dev Dyn* 226, 112-117.

Sato, S. M., Sargent, T. D. (1989). Development of neural inducing capacity in dissociated *Xenopus* embryos. *Dev Biol* 134, 263-266.

Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17, 6419.

Schwartz, P. T., Perez-Villamil, B., Rivera, A., Moratalla, R., Vallejo, M. (2000). Pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 expressed in developing brain regulates somatostatin gene transcription in embryonic neural cells. *J Biol Chem* 275, 19106-19114.

Schwartz, P. T., Vallejo, M. (1998). Differential regulation of basal and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced somatostatin gene transcription in neural cells by DNA control elements that bind homeodomain proteins. *Mol Endocrinol* 12, 1280-1293.

Smith, J. L., Schoenwolf, G. C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci* 20, 510-517.

Solursh, M., Morriss, G. M. (1977). Glycosaminoglycan synthesis in rat embryos during the formation of the primary mesenchyme and neural folds. *Dev Biol* 57, 75-86.

Spemann, H. a. M., H (1924). Uber induktion von embryonanlagen durch implantation artfremder organisatoren. *Arch Mikr Anat EntwMech* 100, 599-638.