

# Inmunolocalización de Sonic Hedgehog en el Desarrollo Embrio-Fetal de Ratones (*Mus musculus*)

Immunolocalization of Sonic Hedgehog in Embryo-Fetal Mouse (*Mus musculus*) Development

Daniel Conei<sup>1,2,3</sup>; Gustavo Saint-Pierre<sup>1</sup>; Roberto Fierro<sup>3</sup>; Mariano del Sol<sup>2,4</sup> & Mariana Rojas Rauco<sup>1</sup>

**CONEI, D.; SAINT-PIERRE, G.; FIERRO, R.; DEL SOL, M. & ROJAS, R. M.** Inmunolocalización de Sonic hedgehog en el desarrollo embrio-fetal de ratones (*Mus musculus*). *Int. J. Morphol.*, 36(2):693-698, 2018.

**RESUMEN:** Sonic hedgehog (Shh) es un morfógeno esencial para el desarrollo de diversas estructuras, tales como notocorda, placa del piso del tubo neural, miembros, entre otros. Se buscó determinar la inmunolocalización de Shh en embriones y fetos de ratón. Para ello, se eutanasiaron 10 ratones gestantes (*Mus musculus*) BALB/c, un grupo de 5 animales a los 12,5 días post-coito (dpc), y otro grupo a los 17,5 dpc. Los embriones y fetos obtenidos fueron fijados en formalina al 10 % tamponada en PBS e incluidos en paraplast. Se realizaron cortes transversales seriados. Se utilizó anticuerpo policlonal Shh (Santa Cruz Biotechnology, H-160, conejo), dilución 1:100. Se identificó y describió la inmunolocalización de las muestras marcadas positivamente. La expresión de Shh en los embriones de 12,5 dpc fue inmunopositiva en notocorda, placa del piso del tubo neural, precartílago de radio y ulna, y prácticamente todos los epitelios: bronquial, intestinal, vejiga y uretra. En la etapa fetal, a los 17,5 dpc la inmunopositividad desaparece en el cartílago a excepción de zonas de osificación, disminuye en la epidermis pero aparece en folículos pilosos. La mucosa intestinal se ha diferenciado en segmentos, mostrando una inmunotinción mayor a nivel de las vellosidades intestinales. Shh actúa en distintos estadios del periodo gestacional, siendo clave en la diferenciación de distintas estructuras. En etapas embrionaria, es vital en la formación del sistema nervioso, organogénesis y formación de miembros, por lo que su expresión se encuentra en estas zonas. Sin embargo, en la etapa fetal la expresión cambia a estructuras de mayor especialización como folículo piloso y vellosidades intestinales.

**PALABRAS CLAVE:** Sonic hedgehog; Morfógeno; Organogénesis; Inmunohistoquímica.

## INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo embrionario ocurren una serie de procesos fundamentales para la formación de estructuras ordenadas, reguladas por morfógenos. Estas son moléculas orgánicas producidas y secretadas por un grupo de células embrionarias, las cuales son capaces de difundir y actuar sobre otras células o tejidos a distancia al unirse a receptores de membrana, gatillando respuestas celulares dependientes de la concentración del morfógeno (Rojas *et al.*, 2014). Con ello, diferentes células que se ubican a distintas distancias del centro morfogenético inductor responderán heterogéneamente, con lo cual las células adquieren la información posicional precisa (Briscoe & Small, 2015).

Se describen dos procesos para la formación del gradiente de concentración morfogenético. Por un lado, el

morfógeno es producido por una fuente localizada y es capaz de difundir célula a célula por medio de difusión simple, endocitosis o proteoglicanos, disminuyendo su concentración a medida que se aleja de su centro inductor (Rojas *et al.*). Otra opción es que el morfógeno presente una concentración uniforme, la cual es contrarrestada por un inhibidor producido en otro centro inductor capaz de inhibir la unión del morfógeno a su receptor celular de forma proporcional a su concentración (Zagorski *et al.*, 2017).

Dentro de las familias de proteínas que pueden actuar como morfógenos, se encuentra la familia Hedgehog (Hh), compuesta de tres proteínas: Indian Hedgehog (Ihh), Desert hedgehog (Dhh) y Sonic hedgehog (Shh) (hadden, 2014). Esta última es una proteína con una región N-terminal

<sup>1</sup> Laboratorio de Embriología Comparada, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>2</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias Morfológicas, Facultad de Ciencia, Universidad San Sebastián, Puerto Montt, Chile.

<sup>4</sup> Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

altamente conservada y una C-terminal más variable. En la superficie de la célula blanco se une al receptor Patched (Ptch), el cual corresponde a una proteína de 12 dominios transmembrana. Este tiene una directa relación con la proteína transmembrana Smoothed (Smo), receptor de 7 dominios transmembrana. Ptch es capaz de inhibir la actividad de señalización de Smo. Sin embargo, cuando Shh se une a Ptch, se interrumpe esta inhibición, permitiendo que la vía de señalización intracelular active proteínas Gli capaces de actuar como factores de transcripción, translocar al núcleo celular y estimular la transcripción de genes diana a Shh (Ngan *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017).

Como morfógeno, Shh tiene un rol central en el desarrollo de diversas estructuras y órganos durante el periodo embrionario, fetal y post-natal. Se ha demostrado que actúa como molécula señalizadora en múltiples estructuras embrionarias, como en la notocorda y placa del piso del tubo neural, regulando la formación del sistema nervioso central y formación de ejes corporales (Meyers & Martin, 1999; Cohen *et al.*, 2013); diferenciación del mesodermo paraxial (Murashima *et al.*, 2014; Kremnyov *et al.*, 2018); diferenciación del epitelio de revestimiento respiratorio e intestinal (van den Brink, 2007; Kugler *et al.*, 2015); crecimiento de los procesos palatinos en el desarrollo de la cavidad oral y zona de actividad polarizante durante el desarrollo de miembros (Cobourne & Green, 2012; Tickle & Barker, 2013); esbozos de folículos pilosos (Athar *et al.*, 2006); crecimiento del tubérculo genital (Miyagawa *et al.*, 2011); desarrollo del patrón arquitectónico celular de la retina (Furimsky & Wallace, 2006); entre otros.

Para el normal desarrollo de estas estructuras, es necesario que se exprese en diferentes etapas de la ontogenia, como también en distintos grupos celulares. Es por ello que el objetivo del estudio fue determinar la inmunolocalización de Shh en las etapas embrionarias y fetales en ratones *Mus musculus* BALB/c.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 10 ratones hembras jóvenes (*Mus musculus*) BALB/c, las que se dividieron en 2 grupos de 5 gestantes cada uno (grupos 1 y 2). Éstas se colocaron en jaulas con machos reproductivamente sanos y jóvenes. A las 12 h se verificó la presencia de tapón mucoso a nivel vaginal, lo que significa que hubo cópula, considerándose como el día post-coital (dpc) 0,5.

A los 12,5 dpc, 5 ratones gestantes se anestesiaron

y eutanasiaron con solución de eutanasia xilacina en dosis 1,1 a 2,2 mg/kg y ketamina en dosis de 10 a 20 mg/kg, extrayéndose los embriones, conformando el grupo donde se evidencia el término del desarrollo embrionario (grupo embrionario). Posteriormente, con la misma metodología se eutanasiaron a los 17,5 dpc a las restantes, donde se obtuvieron los fetos correspondientes al grupo de desarrollo fetal (grupo fetal).

Se realizó técnica inmunohistoquímica con anticuerpo policlonal anti-Shh (Santa Cruz Biotechnology, H-160, conejo). Los embriones y fetos fueron fijados en solución formalina tamponada en PBS e incluidos en paraplast. Se obtuvieron cortes transversales de 5 µm en micrótomos Leica (RM2255) en dirección céfalo-caudal, los cuales se adherieron a portaobjetos con carga positiva (Citoglas). Fueron adheridos 4 cortes por portaobjeto. La recuperación antigénica fue realizada en vaporera por 40 min, con los cortes sumergidos en solución desmascarante de antígenos (Vector Labs, H-3301). Se realizó bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno en metanol y bloqueo inespecífico de proteínas con PBS+BSA al 3 %. Para la incubación con el anticuerpo primario anti-Shh se usó una dilución 1:100 en PBS. Para la detección del anticuerpo primario se incubó con polímero conjugado con anticuerpo anti conejo y HRP durante 15 min (SuperPicture™, Thermo Fisher, 878963). Como sustrato para la HRP se usó diaminobencidina (DAB, Vector Labs, SK-4100) durante 1-2 min.

El control negativo estuvo dado por el desarrollo de la técnica inmunohistoquímica completa, pero sin considerar la incubación con el anticuerpo primario. Como control positivo se consideró la notocorda.

Los cortes transversales seriados fueron fotografiados en un microscopio Leica (DM750) con cámara digital HD Leica (ICC50 HD), analizados si resultaron marcados positivamente y fueron descritos morfológicamente.

## RESULTADOS

A los 12,5 dpc, en muestras más cefálicas se evidenció inmunotinción positiva a Shh en la formación de la retina neural y en el desarrollo del nervio óptico. A nivel de sistema nervioso central, la inmunoexpresión se observó en placa del piso del tubo neural y en notocorda. En cortes transversales a nivel torácico, este morfógeno se inmunolocalizó en epitelio de revestimiento esofágico, bronquios grandes y bronquios segmentarios. En el desa-

rollo de miembros superiores, la inmunotinción se observó en los primordios precartilaginosos de radio y ulna, no así en húmero. A nivel abdominal, se localizó en epitelios de revestimiento en estómago e intestino delgado. En muestras más caudales, la positividad a Shh se observó en epitelio uretral y vejiga, como también en la condensación precartilaginosa previo al desarrollo de fémur (Fig. 1).

En el grupo de fetos de 17,5 dpc, fue posible observar la inmunotinción en las capas marginal y ganglionar de la retina. En cortes transversales a nivel torácico, se evidenció en epidermis como también en el desarrollo en los esbozos de los bulbos capilares. A nivel abdominal se observó en glándulas fúndicas en el cuerpo estomacal y en el desarrollo de vellosidades intestinales a nivel duodenal (Fig. 2).

## DISCUSIÓN

Shh actúa en diferentes periodos del desarrollo gestacional, siendo clave en la diferenciación de diversas estructuras. Nuestros resultados indican que en la etapa embrionaria se inmunolocaliza en la formación del sistema nervioso, desarrollo de las vías visuales, en la organogénesis relacionada con los epitelios de revestimiento a nivel respiratorio, esofágico, estomacal, intestinal y urinario, como también en el desarrollo de miembros, encontrándose la expresión de este morfógeno en estas áreas. Sin embargo, en el periodo fetal su inmunoexpresión cambia a zonas de mayor especialización y diferenciación como en capas internas de la retina, desarrollo de folículos pilosos, glándulas estomacales y vellosidades intestinales.

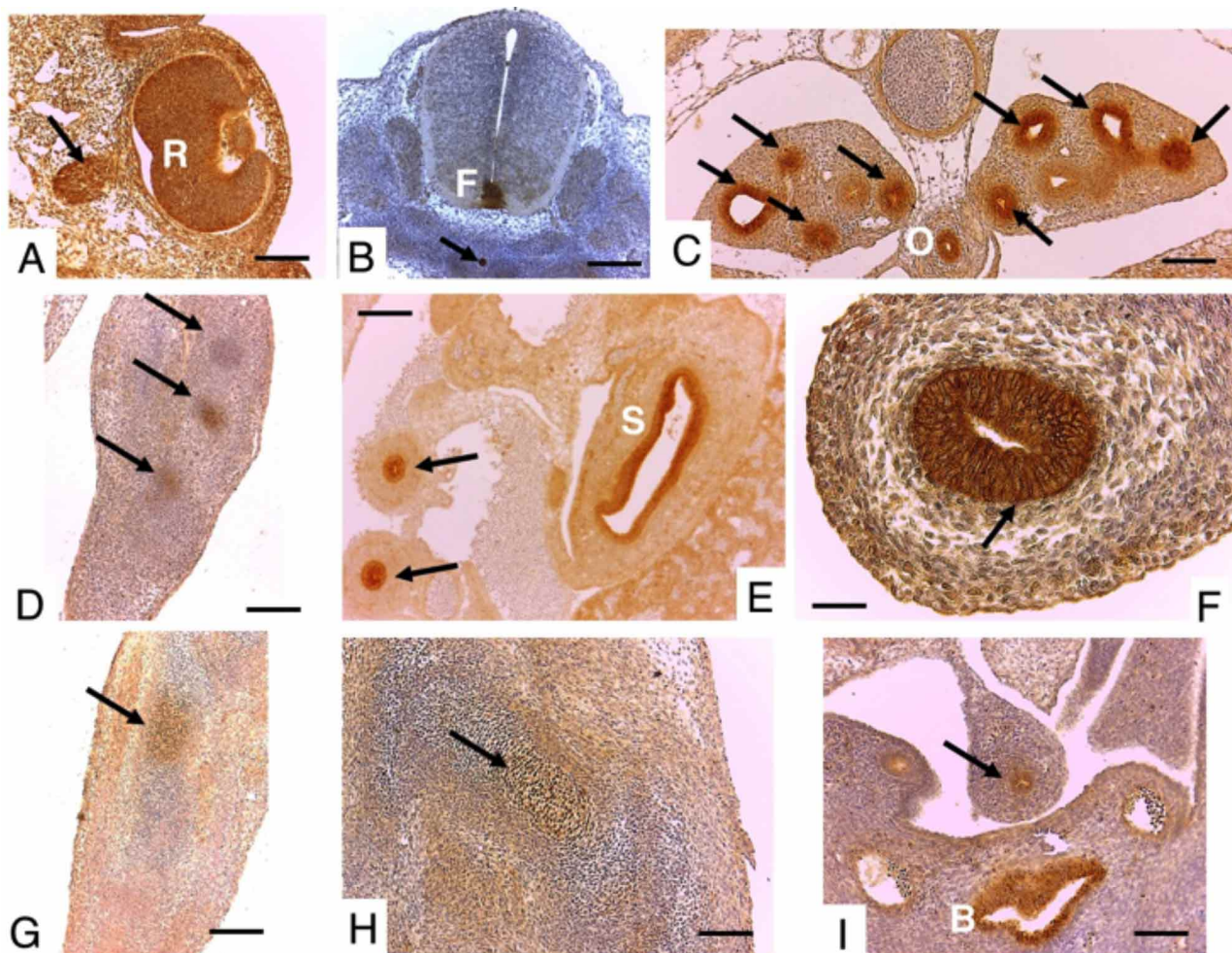


Fig. 1. Grupo Embrionario de 12,5 dpc. En A, capa neural de la retina (R) y tallo óptico del nervio óptico (flecha). En B, placa del piso del tubo neural (F) y notocorda (flecha). En C, esófago (O), bronquios principal y segmentarios (flechas). En D, flechas indica condensación precartilaginosa de húmero, radio y ulna. En E, estómago (S) y epitelio intestinal (flechas). Barra 200  $\mu$ m. En F, epitelio duodenal (flecha). Barra 100  $\mu$ m. En G y H, condensación precartilaginosa de fémur. Barra 200 y 100  $\mu$ m. En I, epitelio vesical (B) y uretra (flecha). Barra 200  $\mu$ m.



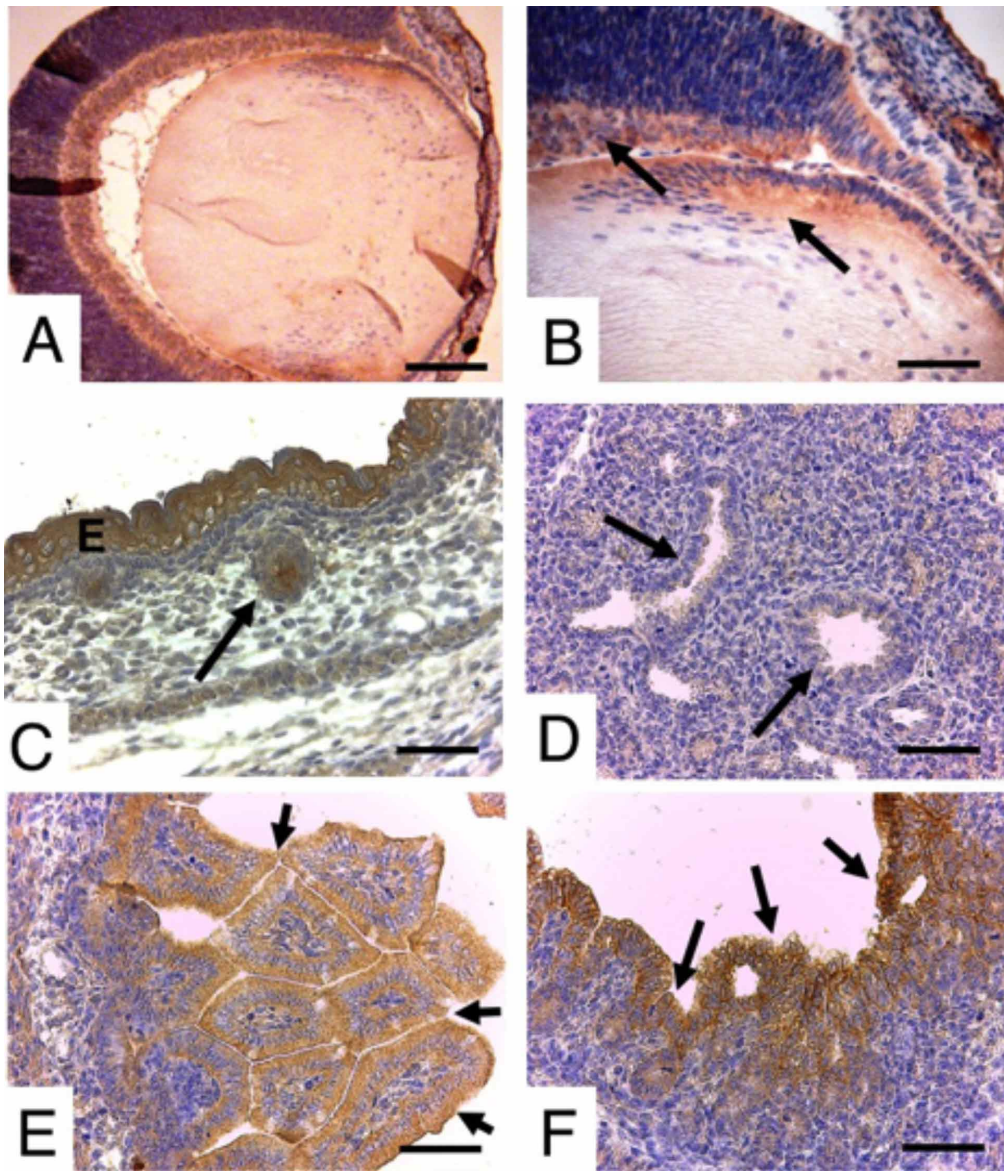


Fig. 2. Grupo fetal de 17,5 dpc. En A, globo ocular. Barra 200  $\mu\text{m}$ . En B, capas ganglionar y marginal de la retina. En C, epidermis (E) y folículo piloso en desarrollo (flecha). En D, epitelio bronquiolar (flechas). En E, vellosidades duodenales (flechas). En F, mucosa gástrica en cuerpo del estómago, región de glándulas fúndicas (flechas). Barra 100  $\mu\text{m}$ .

Durante el proceso de neurulación, es necesaria la expresión de Shh. El mecanismo planteado es que la notocorda libera Shh, siendo capaz de estimular a las células de la placa neural a formar la placa del piso del tubo neural. Luego, estas células de la placa del piso elaborarán Shh, el cual potenciado por el elaborado en la notocorda, inducirá a las células de la porción ventral del tubo neural a diferenciarse en el linaje neuronal motor y glial, determinando seis dominios de patrones de expresión génica (Yu *et al.*, 2013; Conei *et al.*, 2016). A su vez, también posee un papel fundamental en el cierre del tubo neural (Patterson *et al.*, 2009).

La inmunomarcación de Shh en nervio óptico y retina neural se debe a que esta proteína contribuye a la separación del campo ocular y formar las vesículas ópticas de forma bilateral y simétricas, el cual es secretado por células de la placa neural (Furimsky & Wallace). Posteriormente, se encarga de controlar la proliferación, diferenciación y organización celular a nivel de retina y en el desarrollo axonal de las células nerviosas hasta el tectum óptico, siendo su señalización contrastada por Wnt (Avilés *et al.*, 2013).

En el caso del desarrollo de miembros y huesos, Shh es capaz de regular los patrones de diferenciación y crecimiento en el proceso de osificación endocondral, en el cual las células mesenquimales se condensan y se diferencian en condrocitos, los cuales forman centros de osificación en donde éstos son reemplazados por osteoblastos (Yang *et al.*, 2015). En los inicios del desarrollo de los miembros, Shh se expresa en la zona de actividad polarizante, actuando como morfógeno estableciendo el eje anteroposterior (Tickle & Barker).

La inmunolocalización en el desarrollo del epitelio respiratorio, Shh comienza su expresión en los extremos de la yema respiratoria, teniendo un patrón graduado a lo largo de las etapas pseudoglandular y canalicular, siendo más bajo a lo largo de la yema respiratoria y más elevado en extremos distales. En el periodo sacular, su expresión global va disminuyendo gradualmente hasta el nacimiento (Miller *et al.*, 2001; Kugler *et al.*).

Durante el desarrollo del sistema digestivo, en etapas iniciales Shh se expresa en el endodermo del intestino anterior, para posteriormente expandirse hacia el endodermo ubicado a nivel de intestino posterior, también teniendo funciones en paralelo importantes para el establecimiento del eje derecha-izquierda. En el desarrollo esofágico, Shh se expresa a todo su largo y es vital en la formación del tabique traqueoesofágico, el cual separa las vías respiratorias de la digestiva, induciendo a la capa mesodérmica a su formación (Ioannides *et al.*, 2003). En el desarrollo del estómago, Shh se expresa en el epitelio gástrico en formación hasta su porción posterior, donde disminuye y predomina Ihh (van den Brink). En el desarrollo glandular se ha visto que juega un rol fundamental, ya que el crecimiento glandular se incrementa en ratones Shh *-/-*, lo que produce hiperplasia de la mucosa del estómago glandular, siendo inhibida por la expresión de FGF-10 secretado por el mesénquima adyacente, restringiendo su formación y ramificación (Spencer-Dene *et al.*, 2006).

En la formación de intestino es necesario Shh e Ihh. En el caso de Shh, su expresión aumenta en la formación de duodeno. Se ha evidenciado que en el duodeno de ratones Shh *-/-*, las vellosidades aparecen obstruyen el lumen duodenal, lo que indica que Shh restringe el crecimiento de vellosidades en el duodeno (Madison *et al.*, 2005).

En la expresión de Shh en el epitelio urinario, esta proteína es clave en la interacción epitelio-mesenquimática que involucra el desarrollo de la porción muscular, ya que se requiere urotelio vesical para inducir la diferenciación del mesénquima vesical a músculo liso, como también se expresa a lo largo de uréteres y uretra (Jenkins *et al.*, 2007;

DeSouza *et al.*, 2013). En la formación de otros epitelios, como la piel y folículos pilosos, Shh es fundamental en el desarrollo y proliferación de las células precursoras de queratinocitos (Athar *et al.*). También su señalización en la piel controla el crecimiento y la morfogénesis del folículo piloso, siendo fundamental en la coordinación de la transición epitelio-mesénquima (Ellis *et al.*, 2003).

Todo lo anterior se relaciona con la acción morfogénica de Shh, debido a que distintos grupos celulares que se encuentran a diferentes distancias del centro morfogénico, responden de manera diferente, dependiendo del estadio del desarrollo ontogénico (Cohen *et al.*, 2014). Así, no todas las células responderán de la misma manera frente al estímulo, siendo la concentración del morfógeno la encargada de entregar a las células la información posicional en relación a la fuente de la señal, gatillando respuestas celulares diferentes y correctamente interrelacionadas en el espacio y el estadio de desarrollo (Rojas *et al.*).

Para que esto se produzca, este morfógeno debe ser expresado en el lugar y momentos del desarrollo precisos, generando una respuesta dosis-dependiente a través de su gradiente de concentración (Zagorski *et al.*).

## CONCLUSIONES

Para que las células originen estructuras ordenadas y coherentes, es fundamental la formación de patrones, así como la adquisición de información posicional. Esto se relaciona con la expresión de morfógenos en etapas críticas. Todo esto nos permitirá obtener una mayor comprensión de los mecanismos biológicos del desarrollo que están alterados en los defectos de nacimiento.

---

CONEI, D.; SAINT-PIERRE, G.; FIERRO, R.; DEL SOL, M. & ROJAS, R. M. Immunolocalization of Sonic hedgehog in embryo-fetal mouse (*Mus musculus*) development. *Int. J. Morphol.*, 36(2):693-698, 2018.

**SUMMARY:** Sonic hedgehog (Shh) is an essential morphogen for the development of various structures, such as notochord, neural tube floor plate, limbs, among others. We sought to determine the immunolocalization of Shh in embryos and mouse fetuses. To do this, 10 pregnant mice (*Mus musculus*) BALB/c were euthanized, a group of 5 animals at 12.5 days post-coitus (dpc), and another group at 17.5 dpc. Embryos and fetuses obtained were fixed in 10 % formalin buffered in PBS and embedded in paraplast. Serial cross sections were made. Polyclonal antibody Shh (Santa Cruz Biotechnology, H-160, rabbit), dilution 1:100 was used. The immunolocalization of the positively labeled samples was identified and described. Shh expression in 12.5 dpc embryos was immunopositive in notochord, neural tube floor plate, radius precartilagae and ulna, and practically all epithelia: bronchial, intestinal, bladder and urethra. In the fetal stage, at

17.5 dpc the immunopositivity disappears in the cartilage except for areas of ossification, decreases in the epidermis but appears in hair follicles. The intestinal mucosa has differentiated into segments, showing greater immunostaining at the level of the intestinal villi. Shh acts in different stages of the gestational period, being key in the differentiation of different structures. In embryonic stages, it is vital in the formation of the nervous system, organogenesis and formation of limbs, so its expression is found in these areas. However, in the fetal stage the expression changes to more specialized structures such as hair follicles and intestinal villi.

**KEY WORDS: Sonic hedgehog; Morphogen; Organogenesis; Immunohistochemistry.**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Athar, M.; Tang, X.; Lee, J. L.; Kopelovich, L. & Kim, A. L. Hedgehog signalling in skin development and cancer. *Exp. Dermatol.*, 15(9):667-77, 2006.
- Avilés, E. C.; Wilson, N. H. & Stoeckli, E. T. Sonic hedgehog and Wnt: antagonists in morphogenesis but collaborators in axon guidance. *Front. Cell. Neurosci.*, 7:86, 2013.
- Briscoe, J. & Small, S. Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development*, 142(23):3996-4009, 2015.
- Cobourne, M. T. & Green, J. B. Hedgehog signalling in development of the secondary palate. *Front. Oral Biol.*, 16:52-9, 2012.
- Cohen, M.; Briscoe, J. & Blassberg, R. Morphogen interpretation: the transcriptional logic of neural tube patterning. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 23(4):423-8, 2013.
- Cohen, M.; Page, K. M.; Perez-Carrasco, R.; Barnes, C. P. & Briscoe, J. A theoretical framework for the regulation of Shh morphogen-controlled gene expression. *Development*, 141(20):3868-78, 2014.
- Conei, V. D.; Soler, G. B.; Saint-Pierre, C. G. & Rojas, R. M. Role of vitamin E in neural tube of mouse (*Mus musculus*) embryos and fetuses treated with valproic acid: Immunohistochemical study of Sonic Hedgehog. *Int. J. Morphol.*, 34(3):1044-50, 2016.
- DeSouza, K. R.; Saha, M.; Carpenter, A. R.; Scott, M. & McHugh, K. M. Analysis of the Sonic Hedgehog signaling pathway in normal and abnormal bladder development. *PLoS One*, 8(1):e53675, 2013.
- Ellis, T.; Smyth, I.; Riley, E.; Bowles, J.; Adolphe, C.; Rothnagel, J. A.; Wicking, C. & Wainwright, B. J. Overexpression of Sonic Hedgehog suppresses embryonic hair follicle morphogenesis. *Dev. Biol.*, 263(2):203-15, 2003.
- Furimsky, M. & Wallace, V. A. Complementary Gli activity mediates early patterning of the mouse visual system. *Dev. Dyn.*, 235(3):594-605, 2006.
- Hadden, M. K. Hedgehog pathway agonism: therapeutic potential and small-molecule development. *ChemMedChem*, 9(1):27-37, 2014.
- Ioannides, A. S.; Henderson, D. J.; Spitz, L. & Copp, A. J. Role of Sonic hedgehog in the development of the trachea and oesophagus. *J. Pediatr. Surg.*, 38(1):29-36, 2003.
- Jenkins, D.; Winyard, P. J. & Woolf, A. S. Immunohistochemical analysis of Sonic hedgehog signalling in normal human urinary tract development. *J. Anat.*, 211(5):620-9, 2007.
- Kremnyov, S.; Henningfeld, K.; Viebahn, C. & Tsikolia, N. Divergent axial morphogenesis and early Shh expression in vertebrate prospective floor plate. *Evodevo*, 9:4, 2018.
- Kugler, M. C.; Joyner, A. L.; Loomis, C. A. & Munger, J. S. Sonic hedgehog signaling in the lung. From development to disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 52(1):1-13, 2015.
- Madison, B. B.; Braunstein, K.; Kuizon, E.; Portman, K.; Qiao, X. T. & Gumucio, D. L. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development*, 132(2):279-89, 2005.
- Meyers, E. N. & Martin, G. R. Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH. *Science*, 285(5426):403-6, 1999.
- Miller, L. A.; Wert, S. E. & Whitsett, J. A. Immunolocalization of sonic hedgehog (Shh) in developing mouse lung. *J. Histochem. Cytochem.*, 49(12):1593-604, 2001.
- Miyagawa, S.; Matsumaru, D.; Murashima, A.; Omori, A.; Satoh, Y.; Haraguchi, R.; Motoyama, J.; Iguchi, T.; Nakagata, N.; Hui, C. C. & Yamada, G. The role of sonic hedgehog-Gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. *Endocrinology*, 152(7):2894-903, 2011.
- Murashima, A.; Akita, H.; Okazawa, M.; Kishigami, S.; Nakagata, N.; Nishinakamura, R. & Yamada, G. Midline-derived Shh regulates mesonephric tubule formation through the paraxial mesoderm. *Dev. Biol.*, 386(1):216-26, 2014.
- Ngan, E. S.; Kim, K. H. & Hui, C. C. Sonic Hedgehog signaling and VACTERL association. *Mol. Syndromol.*, 4(1-2):32-45, 2013.
- Patterson, V. L.; Damrau, C.; Paudyal, A.; Reeve, B.; Grimes, D. T.; Stewart, M. E.; Williams, D. J.; Siggers, P.; Greenfield, A. & Murdoch, J. N. Mouse hitchhiker mutants have spina bifida, dorso-ventral patterning defects and polydactyly: identification of Tulp3 as a novel negative regulator of the Sonic hedgehog pathway. *Hum. Mol. Genet.*, 18(10):1719-39, 2009.
- Rojas, M.; Signore, I. A. & Mejías, R. Morphogens during embryonic development of vertebrates. *Int. J. Morphol.*, 32(1):319-26, 2014.
- Spencer-Dene, B.; Sala, F. G.; Bellusci, S.; Gschmeissner, S.; Stamp, G. & Dickson, C. Stomach development is dependent on fibroblast growth factor 10/fibroblast growth factor receptor 2b-mediated signaling. *Gastroenterology*, 130(4):1233-44, 2006.
- Tickle, C. & Barker, H. The Sonic hedgehog gradient in the developing limb. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, 2(2):275-90, 2013.
- van den Brinck, G. R. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol. Rev.*, 87(4):1343-75, 2007.
- Wu, F.; Zhang, Y.; Sun, B.; McMahon, A. P. & Wang, Y. Hedgehog signaling: From basic biology to cancer therapy. *Cell Chem. Biol.*, 24(3):252-80, 2017.
- Yang, J.; Andre, P.; Ye, L. & Yang, Y. Z. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *Int. J. Oral Sci.*, 7(2):73-9, 2015.
- Yu, K.; McGlynn, S. & Matise, M. P. Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord. *Development*, 140(7):1594-604, 2013.
- Zagorski, M.; Tabata, Y.; Brandenberg, N.; Lutolf, M. P.; Tkacik, G.; Bollenbach, T.; Briscoe, J. & Kicheva, A. Decoding of position in the developing neural tube from antiparallel morphogen gradients. *Science*, 356(6345):1379-83, 2017.

Dirección de Correspondencia  
Daniel Conei  
Doctorado en Ciencias Morfológicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de La Frontera  
Avenida Francisco Salazar # 01145  
Temuco  
CHILE

E-mail: d.conei01@ufromail.cl

Recibido : 11-01-2018  
Aceptado: 24-03-2018