



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEGENERACIÓN DE NEURONAS DERIVADAS
DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

SANDRA GÓMEZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES



2005

245379



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Sandra Gómez López
FECHA: 23 JUNIO 2005
FIRMA: [Signature]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

“Degeneración de neuronas derivadas de células troncales embrionarias”

realizado por: GÓMEZ LÓPEZ SANDRA

con número de cuenta: 9804322-0, quien cubrió los créditos de la carrera de: BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Propietario Dr. Julio Morán Andrade

Propietario Dr. Iván Velasco Velázquez

Suplente Dra. Susana Castro Obregón

Suplente Dr. Jean Louis Charli Casalonga

[Handwritten signatures: Luis Fernando Covarrubias Robles, Julio Morán Andrade, Iván Velasco Velázquez, Susana Castro Obregón, Jean Louis Charli Casalonga]

Consejo Departamental de Biología

[Signature]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

A mamá, papá,
Lorna, Edith, Mariela y Ximena.

Agradezco a:

La Universidad Nacional Autónoma de México, por crear un espacio donde converge la cultura y la ciencia y permitirme ser parte de él.

Luis Covarrubias, por su apoyo y por darme la oportunidad de involucrarme en la investigación.

Susana Castro, por todos los consejos y sugerencias que me ayudaron a mejorar este trabajo.

David, Rodrigo y Manuel, porque su apoyo y asesoría hicieron posible una parte importante de este trabajo.

Miriam, Arcadio, Eugenio y Etienne, por todas las noches de salsa y dominó, y por haber hecho mi estancia en Cuernavaca más agradable.

La familia: Jimena, Fernando, Jonathan y Sergio. Por haberme adoptado en este lado del mundo, y por todos los talleres de manualidades y las modificaciones conjuntas.

Las niñas trabajadoras: Gala, Vianey y Gaby. Por todas las risas y buenos momentos, y porque en un mundo como este es difícil encontrar personas como ellas.

Mis hermanas, por sus consejos y cariño, y por encontrar la manera de hacerme reír hasta en los peores momentos.

Mamá y papá, por su amor, paciencia, confianza y apoyo incondicional, y por haberme enseñado a ser feliz.

Todos los que forman parte de mi vida o han dejando una marca en ella, porque de todas las experiencias he aprendido algo bueno.

ÍNDICE

	Pág.
1. Abreviaturas	1
2. Introducción	2
2.1. Formación de los linajes neurales <i>in vivo</i>	2
2.1.1. Desarrollo de la médula espinal y neuronas motoras	4
2.2. Establecimiento de linajes neurales <i>in vitro</i> a partir de células troncales embrionarias (ES)	6
2.2.1. Diferenciación de células ES	7
2.2.2. Formación espontánea de linajes celulares neurales	8
2.2.3. Inducción de linajes neurales por ácido retinóico	9
2.3. Esclerosis amiotrófica lateral	10
2.3.1. Mutaciones de la SOD1 asociadas a la fALS	10
2.3.2. Toxicidad de la mSOD1: un proceso celular no-autónomo	14
2.3.3. Características de las neuronas motoras en degeneración	15
3. Antecedentes	18
3.1. Modelos de estudio de la degeneración motoneuronal	18
3.1.1. Modelos <i>in vivo</i>	18
3.1.2. Modelos <i>in vitro</i>	23
3.2. Sistemas de estudio de degeneración neuronal basados en células ES	27
4. Justificación	29
5. Hipótesis	31
6. Objetivos	31
7. Materiales y métodos	32
7.1. Plásmidos	32
7.1.1. Subclonación de fragmentos de DNA	32
7.2. Líneas y cultivos celulares	34
7.2.1. Cultivo y transfección de células COS-7	34
7.2.2. Preparación de células alimentadoras	36
7.2.3. Cultivo de células ES	37
7.2.4. Electroporación de células ES	38
7.2.5. Mantenimiento y almacenaje de líneas celulares	40

7.3. Diferenciación de células ES	42
7.3.1. Formación de cuerpos embrionarios (EBs)	42
7.3.2. Diferenciación al fenotipo motoneuronal	42
7.4. Western blots y geles de actividad	43
7.4.1. Extractos de proteína	44
7.4.2. SDS-PAGE	44
7.4.3. Western blot	45
7.4.4. Geles de activad de superóxido dismutasa	46
7.5. Inmunocitoquímica	46
7.6. Análisis estadísticos	48
8. Resultados	49
8.1. Generación de plásmidos de expresión SOD1	49
8.2. Establecimiento de líneas de células ES que expresen SOD1	52
8.3. Diferenciación de células ES al fenotipo motoneuronal	55
8.4. Susceptibilidad de motoneuronas derivadas de células ES a la toxicidad inducida por fALS-SOD1	56
9. Discusión	59
9.1. Propiedades de la SOD1 ^{A4V}	59
9.2. Expresión constitutiva de SOD1 en células ES	60
9.3. Generación y mantenimiento de motoneuronas	61
9.4. Susceptibilidad de motoneuronas derivadas de células ES a la toxicidad inducida por fALS-SOD1	62
9.5. Las células ES como modelo de estudio de enfermedades neurodegenerativas .	63
10. Conclusiones	65
11. Referencias	66
12. Anexo: Medios y soluciones	72

1. ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
ALS	Esclerosis amiotrónica lateral
ATP	Adenosin trifosfato
BMMA	β -metilamino-L-alanina
BMP	Proteína morfogénica de hueso
BOAA	β -oxilamino-L-alanina
CNS	Sistema nervioso central
ChAT	Acetilcolina transferasa
D.E.	Desviación Estándar
DNA	Ácido ácido
dpc	Días <i>post coitum</i>
dpi	Días post-inducción
EB	Cuerpo embrionario
EC	Carcinoma embrionario
ER	Retículo endoplásmico
ES	Troncal embrionario
fALS	Esclerosis amiotrónica lateral familiar
FGF	Factor de crecimiento de fibroblasto
GFAP	Proteína acidica fibrilar glial
GDNF	Factor neurotrófico derivado de glía
HCSMA	Atrofia muscular espinal canina hereditaria
HD	Homeodominio
HSP	Proteína de choque térmico
ICM	Masa celular interna
IFs	Filamentos intermedios
Isl	Islet
kDa	Kilodaltones
LIF	Factor inhibidor de leucemia
MN	Motoneurona
MND	Enfermedad motoneuronal
N-CAM	Molécula de adhesión celular neural
NF	Neurofilamento
NGF	Factor de crecimiento de nervio
NMDA	N-metil-D-aspartato
pMN	Progenitor motoneuronal
PNS	Sistema nervioso periférico
RA	Ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucléico
Shh	Sonic hedgehog
SOD1	Superóxido dismutasa 1
SOX	SRY-box
YP	Yoduro de propidio

2. INTRODUCCIÓN

2.1. FORMACIÓN DE LOS LINAJES NEURALES *IN VIVO*

La embriogénesis de los mamíferos placentados (Fig. 1) ocurre en tres fases: preimplantación, implantación y postimplantación. La fase de preimplantación tiene lugar en el oviducto y el lumen uterino, es independiente de la madre, y culmina con la formación del blastocisto. La implantación es el resultado de interacciones adhesivas entre el blastocisto y el útero, y marca el inicio de un periodo de dependencia materna. El desarrollo postimplantación incluye la gastrulación, elaboración de la placenta, organogénesis y crecimiento (revisado en Downs, 2001).

La formación del blastocisto representa el primer evento de diferenciación durante el desarrollo embrionario. El blastocisto es una estructura esférica compuesta por el (1) trofocotodermo, una monocapa externa de células epiteliales polarizadas; (2) la masa celular interna (ICM, “*inner cell mass*”), un conjunto de células no polarizadas; y (3) la cavidad del blastocelo adyacente a la ICM. Estos tipos celulares no sólo difieren en su localización y morfología, también en su patrón de expresión proteica, su función y destino: el trofocotodermo dará lugar a las estructuras extraembrionarias, mientras que la ICM originará los linajes embrionarios (revisado en Wild y Fleming, 2001).

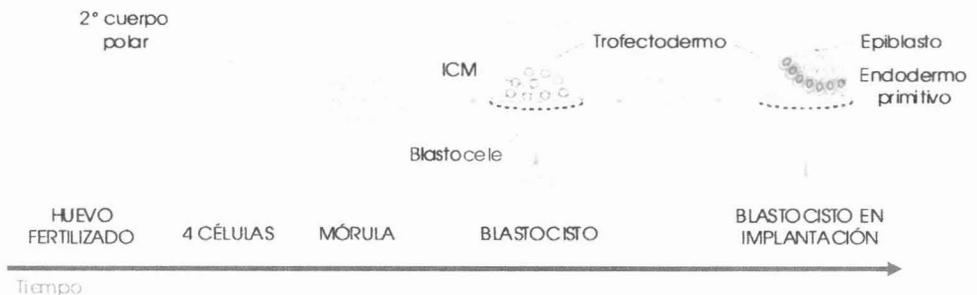


Figura 1. Embriogénesis temprana en mamíferos (Modificado de Beddington, 2001).

Alrededor del tiempo de implantación al útero, un grupo de células de la ICM adyacentes a la cavidad del blastocelo originan el hipoblasto (endodermo primitivo), tejido precursor de linajes extraembrionarios, incluidos el endodermo visceral y el parietal. En esta etapa al resto de las células de la ICM se les denomina epiblasto o ectodermo primitivo, a partir de esta población pluripotente surgirá el linaje neural (revisado en Wild y Fleming, 2001).

Durante la transición entre la ICM y el ectodermo primitivo se delinear temporalmente distintas poblaciones de células pluripotentes, todas ellas caracterizadas por la expresión de *Oct4*. En el ratón, entre los 3.5 y 4.5 días *post coitum* (dpc) las células pluripotentes del blastocisto expresan *Oct4*, *CRTR-1*, *Rex1* y *Psc1*. Una disminución en la expresión de *CRTR-1* y *Rex1* y el inicio de la expresión de *PRCE* a los ~4.75 dpc indican una transición de la población pluripotente. Entre los 4.75 dpc y el inicio de la cavitación proamniótica, se identifica otra población celular caracterizada por la expresión de *Psc1* en ausencia de *CRTR-1* y *Rex1*. Entre los 5.0 y 5.25 dpc cesa la expresión de *Psc1* y comienza a expresarse *Fgf5*, lo que resulta en una población de células que expresan *Oct4*, *PRCE* y *Fgf5*. Entre los 5.25 y 5.5 dpc ocurre un decremento en la expresión de *PRCE*, manteniéndose la expresión de *Oct4* y *Fgf5*. Este patrón de expresión se mantiene hasta la gastrulación (Pelton *et al.*, 2002).

Durante la gastrulación el ectodermo primitivo da lugar al surco primitivo justo en la línea que separa las regiones embrionaria y extraembrionaria. Conforme el surco primitivo se expande distalmente, las células del epiblasto se internan en él y emergen como mesodermo. Al alcanzar el extremo distal del embrión el surco primitivo se condensa en una estructura especializada, el nodo, desde donde emana el mesodermo axial. Entonces, el mesodermo axial se mueve hacia la región anterior del embrión y origina el neuroectodermo (revisado en Downs, 2001).

El proceso de formación del neuroectodermo como una región distinta del resto de las células ectodermales, se conoce como inducción neural, y ocurre como resultado de la inhibición de la señalización por la proteína morfogénica de hueso (BMP, “bone morphogenic protein”) en el ectodermo embrionario (revisado en Muñoz-Sanjuán y Brivanlou, 2002).

Inicialmente, el neuroectodermo consiste en una lámina de células a lo largo de la línea media anterior del embrión (placa neural), la cual se pliega para formar el tubo neural (Fig. 2). La formación de la placa neural a partir de ectodermo coincide con un aumento en la expresión *Sox1* (“SRY-box containing gene 1”) y con la expresión del factor transcripcional *Gbx2* (“Gastrulation brain homeobox 2”). Con el cierre del tubo neural la expresión de *Gbx2* se regula negativamente en el interior del epitelio neural (revisado en Lang *et al.*, 2004).

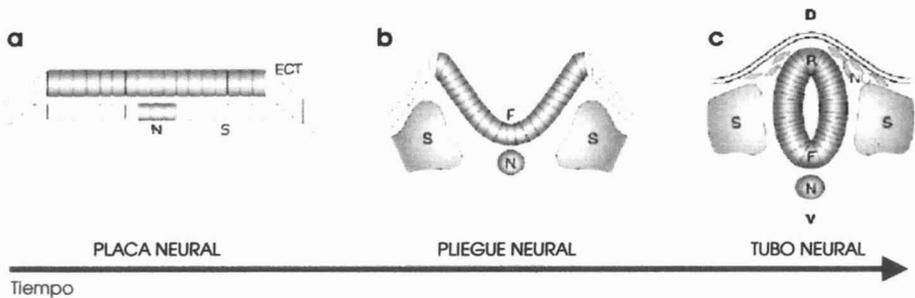


Figura 2. Desarrollo del sistema nervioso en mamíferos. **(a)** En la etapa de placa neural, las células neurales recién formadas están flanqueadas lateralmente por el ectodermo epidérmico (ECT). Las células de la notocorda (N) descansan por debajo de la línea media de la placa neural, y el mesodermo segmental (S) está debajo de la región lateral de la placa neural. **(b)** En la etapa de pliegue neural, las células de la placa del piso (F) se hacen evidentes en la línea media ventral y el mesodermo somítico comienza a desarrollarse. **(c)** En la etapa de tubo neural, en la línea media dorsal comienzan a diferenciarse las células de la placa del techo (R), y las células de la cresta neural (NC) comienzan a delaminarse desde la región dorsal del tubo neural. Se indican las regiones ventral (V) y dorsal (D) (Jessell, 2000).

Las células multipotentes de la placa/tubo neural, también denominadas precursores neurales, se caracterizan por la expresión de varios marcadores, incluyendo los factores transcripcionales *Sox1* y *Sox2*, *nestina* (un tipo de filamento intermedio), *musashi1* (proteína de unión a RNA que funciona como regulador traduccional) y N-CAM (molécula de adhesión celular neural), y diferencian a los principales tipos celulares del sistema nervioso central (CNS, “central nervous system”) —neuronas y glía— y sistema nervioso periférico (PNS, “peripheral nervous system”) (Lang *et al.*, 2004).

A la par de la inducción, el neuroectodermo se subdivide respecto a los ejes dorso-ventral y antero-posterior, en respuesta a señales provenientes de tejidos vecinos. Esto resulta en un patrón de expresión génica restringido regionalmente y en la alteración del potencial de desarrollo (revisado en Lang *et al.*, 2004).

2.1.1. Desarrollo de la médula espinal y surgimiento de las neuronas motoras

La médula espinal es una estructura caudal, pero las células neurales de las que deriva expresan transitoriamente marcadores moleculares de tipo rostral. La adquisición del carácter caudal de la médula ocurre justo después de la inducción neural, a través de la reprogramación del destino de un grupo de células neurales por una serie de señales extrínsecas: factores de crecimiento de fibroblasto (FGFs, “fibroblast growth factors”),

retinoides, BMPs y una actividad caudalizante del mesodermo paraxial. Estas señales derivan del surco primitivo en la etapa de gástrula o del mesodermo paraxial del embrión (revisado en Jessell, 2000).

Los principales tipos celulares de la médula espinal —las células de la placa del piso (una clase especializada de células gliales), las motoneuronas (MNs) y las interneuronas— se generan durante las primeras etapas del desarrollo de la región ventral del tubo neural. Las células de la placa del piso diferencian en la línea media ventral justo después de la formación de la placa neural (Figs. 2a, b), mientras que las MNs e interneuronas se generan en posiciones más dorsales. La diferenciación de estos tres tipos celulares depende de señales provenientes de un grupo celular del mesodermo axial, la notocorda, y posteriormente, de las propias células de la placa del piso (revisado en Jessell, 2000).

Las principales actividades señalizadoras de la notocorda y la placa del piso están mediadas por el gradiente de concentración de una proteína secretada, Sonic hedgehog (Shh). Un grupo de proteínas de homeodominio (HD) expresadas por las células progenitoras ventrales actúan como factores intermediarios en la interpretación de la señal de Shh (revisado en Jessell, 2000). Shh promueve la expresión de algunas de estas proteínas (Clase II) y reprime la expresión de otras (Clase I). La represión mutua entre las proteínas de la Clase I y Clase II establece cinco dominios discretos de células progenitoras en la región ventral de la médula espinal, los cuales generan posteriormente tipos específicos de neuronas (revisado en Appel y Eisen, 2003).

Las neuronas motoras derivan de células progenitoras que expresan la proteína HD Pax6 (“Paired box gene 6”) (Fig. 3). Dentro de esta población las acciones combinadas de las proteínas HD Clase II Nkx6.1, Nkx2.2 e Irx3 restringen la generación de MNs a un solo dominio progenitor (pMN). Dentro de este dominio la actividad de Nkx6.1 dirige la expresión dominio-restringida de otros factores, como la proteína de homeodominio MNR2. La expresión de MNR2 se inicia durante el ciclo de división final de los progenitores motoneuronales y coincide con el momento en que estas células se vuelven independientes de la señal de Shh (revisado en Jessell, 2000).

MNR2 induce la expresión de las proteínas HD Lim3 y Isl1. La inducción de Isl1 podría ser un paso clave en el proceso de diferenciación de MNs somáticas, ya que la aparición de Isl2 y HB9 —factores transcripcionales específicos de las MNs somáticas— parece requerir de la expresión de Isl1. HB9 posee una actividad similar a la de MNR2, pero aparece sólo en neuronas postmitóticas, por lo que su función podría ser la de mantener las propiedades de las MNs somáticas después de que la expresión de MNR2 se ha extinguido (Tanabe *et al.*, 1998).

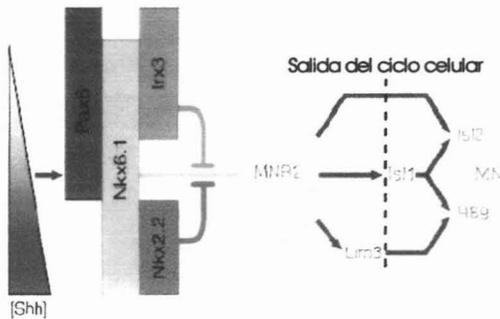


Figura 3. Vía molecular para la generación de motoneuronas (MNs). El gradiente de Shh establece un dominio progenitor inicial en el que la expresión de Nkx6.1, en ausencia de Nkx2.2 e Irx3, delinea el dominio a partir del cual se generan las MNs. La actividad de Nkx6.1 es suficiente para inducir la expresión de la proteína homeodominio MNR2. MNR2 induce la expresión de otros factores de transcripción, incluyendo Lim3, Isl1, Isl2 y HB9. MNR2 también autoactiva su propia expresión, consolidando el destino de las células progenitoras hacia una identidad motoneuronal (Jessell, 2000).

2.2. ESTABLECIMIENTO DE LINAJES NEURALES *IN VITRO* A PARTIR DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS

Las células troncales embrionarias (ES, “*embryonic stem*”) son líneas celulares derivadas de la ICM de blastocistos en etapa de preimplantación. Cuando se cultivan *in vitro*, las células ES mantienen un cariotipo diploide estable y retienen la capacidad de desarrollar todos los tipos celulares, incluyendo las células germinales. Aparentemente, estas líneas celulares exhiben un potencial replicativo ilimitado, lo cual podría estar relacionado al nivel de metilación extremadamente bajo del DNA genómico en el blastocisto. En términos de su patrón de expresión génica, las células ES se asemejan a la ICM tardía (revisado en O’Shea, 1999).

El mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células ES de ratón no es un proceso autónomo. Originalmente, se consideró que el co-cultivo con una capa de células alimentadoras era esencial para suprimir la diferenciación; sin embargo, posteriormente se descubrió que las células alimentadoras podían sustituirse por una citocina, el factor inhibidor de leucemia (LIF, “*leukaemia inhibitory factor*”). El LIF es producido por las células alimentadoras y su expresión se estimula por la presencia de células ES. Si se retira el LIF (o las células alimentadoras), la proliferación continúa, pero al mismo tiempo se induce la diferenciación celular, de modo que las células troncales no persisten más allá de unos días. Este efecto sobre la auto-renovación de las células ES se observa en cultivos suplementados con suero y es exclusivo del LIF y de un pequeño grupo de citocinas relacionadas que actúan vía el receptor gp130, activando el factor transcripcional STAT3 (revisado en Smith, 2001).

En condiciones de cultivo sin suero, el LIF no es suficiente para mantener la auto-renovación de las células ES, pues se observa que los cultivos comienzan a diferenciar, predominantemente a fenotipos neurales. Sin embargo, si a los cultivos se les añade LIF y BMP se preservan las propiedades de auto-renovación y diferenciación multilínea de las células troncales. De hecho, las células ES se pueden derivar *de novo* y propagar sin suero y sin células alimentadoras usando LIF y BMP. La principal contribución de las BMPs es inducir la expresión de los genes Id (“Inhibitor of differentiation”) mediante la ruta de Smad. La expresión forzada de los genes Id en células ES las libera de su dependencia de BMP o suero y permite su auto-renovación adicionando únicamente LIF. Si se retira el LIF del medio, las células ES con expresión forzada de Id diferencian, pero no dan lugar a los linajes neurales. Con base en lo anterior, se cree que el bloqueo de factores de transcripción linaje-específicos por las proteínas Id permite la auto-renovación en respuesta a LIF/STAT3 (Ying *et al.*, 2003).

2.2.1. Diferenciación de células ES

Las células ES diferencian fácilmente en cultivo en monocapa cuando se les priva de LIF o células alimentadoras. Bajo estas condiciones, emergen varias morfologías diferenciadas y se expresan marcadores de mesodermo y endodermo. No obstante, la identidad de la mayoría de los tipos celulares producidos no se ha definido detalladamente. Es posible que muchas de estas células no representen fenotipos embrionarios o fetales, sino productos aberrantes resultado de un programa de diferenciación confuso y mal regulado (revisado en Smith, 2001).

Habitualmente, los métodos empleados para diferenciar células ES a tipos celulares definidos (Fig. 4) consisten en remover el LIF del medio e inducir la formación de agregados celulares. Para ello, existen varios protocolos: (i) sobrecrecer el cultivo, provocando la formación de agregados que se desprenden del sustrato y continúan desarrollándose en suspensión; (ii) desprender las células, disociarlas y platarlas sobre sustratos no adherentes (por ejemplo, platos de cultivo de grado bacteriológico); (iii) realizar cultivos en gota colgante, para controlar el número celular y forzar el contacto célula-célula; o (iv) platear las células sobre un sustrato de baja adhesión, como metilcelulosa.

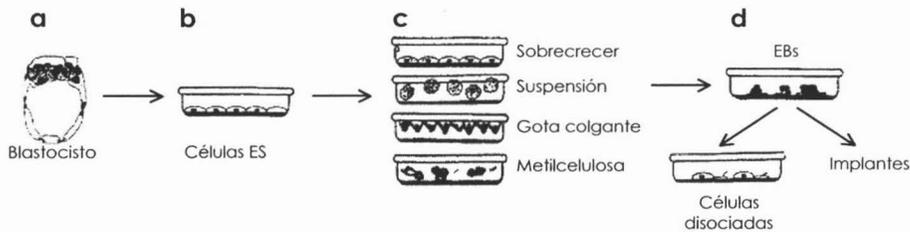


Figura 4. Derivación y diferenciación de células ES. **(a)** Las células ES pueden derivarse de ratones silvestres, con algún marcador genético, con alguna mutación espontánea o transgénicos. Para ello, los blastocistos se cultivan *in vitro* en presencia de LIF y los grupos de células de proliferación rápida (de la ICM) se remueven, disocian y re-siembran. **(b)** Durante la expansión de las células ES se pueden llevar a cabo experimentos genéticos de pérdida o ganancia de función. **(c)** La diferenciación de células ES requiere la remoción de LIF del medio y el cultivo de las células en agregado por 2-4 días para dar lugar a la formación de cuerpos embrionarios (EBs). Durante el tiempo de cultivo, los EBs se exponen a algún agente químico inductor. **(d)** Después de algunos días de cultivo los EBs se siembran en condiciones de adhesión, o bien, se disocian y las células se platican y cultivan con un medio definido o se implantan en un animal (Modificado de O'Shea, 1999).

Después de 4-8 días *in vitro* las células se agrupan en grupos irregulares, los cuales, debido a que asemejan burdamente embriones tempranos —endodermo exterior, mesodermo y ectodermo interior rodeando una gran cavidad similar al saco vitelino— se han denominado cuerpos embrionarios (EBs, “embryoid bodies”). Posteriormente, para promover la diferenciación terminal, los EBs resultantes frecuentemente: (a) se platican directamente bajo condiciones de adhesión, o se disgregan y después se siembran; (b) se transplantan subcutáneamente, a la cápsula del riñón o al corioalantoides de pollo (revisado en O'Shea, 1999).

2.2.2. Formación espontánea de linajes celulares neurales

A pesar de que en los EBs ocurre la diferenciación de poblaciones que representan las tres capas germinales embrionarias, los EBs carecen de la organización antero-posterior y dorso-ventral inherentes del embrión en desarrollo. Debido a esto, del total de células de un EB en diferenciación las neuronas comprenden sólo una pequeña fracción, observándose que la diferenciación de tipos celulares neurales no es temporalmente sincrónica ni está organizada espacialmente. La presencia de tejidos señalizadores endógenos, como el endodermo visceral y otras poblaciones no-neurales, genera algunas complicaciones adicionales, pues se cree que las células en diferenciación están expuestas a señales de diferenciación apropiadas e inapropiadas (revisado en Lang *et al.*, 2004).

2.2.3. Inducción de linajes neurales por ácido retinóico

Diversos experimentos han demostrado que el ácido retinóico (RA, “*retinoic acid*”) juega un papel importante durante el desarrollo embrionario, particularmente en el proceso de diferenciación neuronal, pues este factor es capaz de establecer o cambiar el patrón de actividad génica en las células, induciendo su diferenciación (revisado en McCaffery y Dräger, 2000).

La formación de linajes neurales a partir de células pluripotentes en respuesta a RA se demostró inicialmente usando células embrionarias de carcinoma (EC, “*embryonal carcinoma*”) (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982) y subsecuentemente a partir de células ES cultivadas como EBs (Bain *et al.*, 1995; Fraichard *et al.*, 1995). En este último caso, se ha observado que después de tres días de cultivo los EBs expuestos a RA contienen 40-60% de células precursoras neurales, las cuales comparten características con las poblaciones de precursores neurales encontradas *in vivo*, incluyendo la expresión de marcadores neuroepiteliales (*Sox1*, *Sox2* y *nestina*), y un potencial de diferenciación *in vitro* e *in vivo* tanto a neuronas como a glía. Para el día 5-7 de desarrollo del EB, la gran mayoría de las células que sobreviven (50-70%) exhiben características de células neuronales, incluyendo la expresión de NeuN (proteína nuclear neurona-específica) y tubulina β -III (isoforma de la tubulina neurona-específica) (Wichterle *et al.*, 2002). Aunque la presencia de astrocitos y oligodendrocitos —reconocidos por la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y O4, respectivamente— se detecta desde el día 5 de cultivo, estos tipos celulares representan una proporción muy baja de la población total. Sin embargo, entre el día 6 y 9 de cultivo el número de células positivas para GFAP incrementa, fundamentalmente en el interior de los agregados, hasta constituir aproximadamente un 75% de la población neural total (Fraichard *et al.*, 1995).

Adicionalmente, la especificación del destino neuronal post-mitótico se puede modificar añadiendo otras moléculas señalizadoras a los EBs tratados con RA. Por ejemplo, la diferenciación de EBs tratados únicamente con RA resulta en una formación ineficiente de MNs, identificadas por la expresión de HB9 que, como se mencionó anteriormente, es una proteína específica de este tipo neuronal. La adición de Shh a los EBs da lugar a un marcado incremento en el número de MNs producidas —20-30% del total de células del EB en ratón, y >50% de las células diferenciadas a partir de células ES humanas—, indicando que tanto la señal de posteriorización por RA como la de ventralización por Shh, son esenciales para la generación de neuronas motoras a partir de progenitores neurales (Wichterle *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005).

2.3. ESCLEROSIS AMIOTRÓFICA LATERAL

Descrita inicialmente en 1869 por Jean-Martin Charcot, la esclerosis amiotrófica lateral (ALS, “*amyotrophic lateral sclerosis*”) es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la pérdida progresiva de motoneuronas en la corteza, tallo del cerebro y médula espinal (revisado en Cleveland y Rothstein, 2001; Julien, 2001).

Las características clínicas más comunes de la enfermedad incluyen contracciones musculares, calambres o rigidez en los músculos, debilidad muscular, habla deteriorada (disartria) y dificultad para deglutir (disfagia). En particular, la degeneración de las MNs superiores ocasiona músculos tiesos o rígidos (espasticidad) y reflejos exagerados (hiperreflexia); mientras que la pérdida de MNs inferiores provoca debilidad y atrofia de los músculos, calambres y contracciones musculares rápidas (fasciculaciones). El decline progresivo de la función muscular resulta, ultimadamente, en una falla respiratoria que provoca la muerte de la gran mayoría de los pacientes con ALS en un lapso de tiempo de 2 a 5 años después del inicio de la enfermedad (revisado en Wong *et al.*, 1998; Julien, 2001; Guégan y Przedborski, 2003).

La ALS tiene una prevalencia de tres a cinco por cada 100,000 individuos, lo que la hace la enfermedad paralítica más frecuente en adultos. Aunque puede presentarse a cualquier edad, generalmente los síntomas aparecen entre los cuarenta y cincuenta años (revisado en Guégan y Przedborski, 2003), incrementándose el riesgo en un orden de magnitud después de los sesenta (Cleveland y Rothstein, 2001).

El ~90% de los pacientes con ALS presenta una forma de la enfermedad conocida como ALS esporádica, la cual no tiene ningún elemento genético asociado. El ~10% restante, hereda la enfermedad de manera dominante, una forma conocida como ALS familiar (fALS). En ambos casos, las características patológicas y clínicas de la enfermedad son muy similares (revisado en Bruijn *et al.*, 2004).

2.3.1. Mutaciones de la SOD1 asociadas a la fALS

Alrededor del 20% de los casos de fALS se deben a mutaciones en el gen que codifica para la superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Rosen *et al.*, 1993), una de las principales enzimas antioxidantes en las células, localizada primordialmente en el citosol. La SOD1 es un homodímero de 153 aminoácidos (32 kDa) con una secuencia altamente conservada. Contiene un sitio de unión a cobre y uno de unión a zinc, así como un enlace disulfuro en cada una de sus subunidades (revisado en Valentine y Hart, 2003). En condiciones normales, la función mejor conocida de esta enzima de expresión ubicua es catalizar la

dismutación (una reacción en la que dos moléculas de sustrato idénticas tienen destinos diferentes) de dos moléculas de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. (Fig. 5) (Mathews y Van Holde, 2000). El superóxido es un radical libre que se genera como resultado de la reacción de moléculas auto-oxidables con oxígeno molecular, escape de electrones de la cadena mitocondrial de transporte de electrones y por ciertas enzimas, como la xantina oxidasa (revisado en Halliwell, 2001).

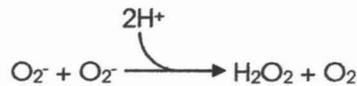


Figura 5. Química normal de la superóxido dismutasa 1 (SOD1). La SOD1 media la dismutación de dos moléculas de superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2), de modo que una molécula de superóxido se oxida y otra se reduce.

Hasta ahora, se han identificado aproximadamente 100 mutaciones puntuales diferentes en la SOD1 en pacientes con ALS, las cuales se distribuyen a lo largo de toda la estructura primaria de la enzima (Fig. 6). Con sólo dos excepciones ($SOD1^{D96A}$ y $SOD1^{N86S}$), todas las mutaciones se heredan de manera dominante y ninguna de ellas elimina la síntesis del polipéptido, aunque al menos siete mutaciones de marco de lectura o de “splicing”, truncan los 20-30 aminoácidos finales (revisado en Cleveland y Rothstein, 2001; Bendotti y Carri, 2004).

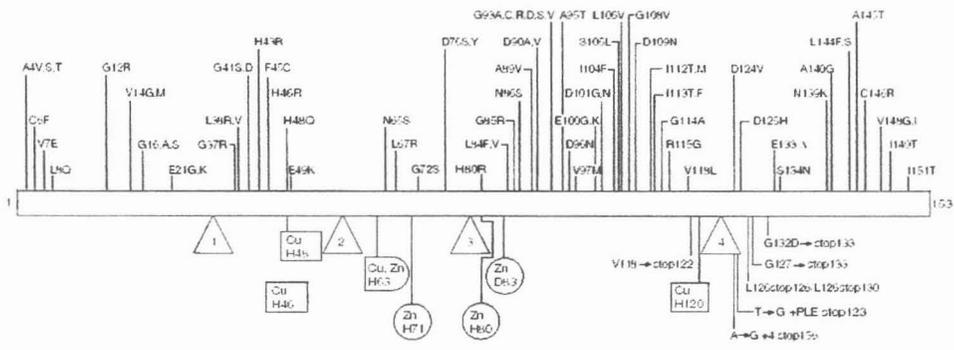


Figura 6. Mutaciones en el polipéptido de 153 aminoácidos de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) asociadas con la esclerosis amiotrófica lateral (ALS) (Cleveland y Rothstein, 2001).

De todas las mutaciones asociadas a la fALS que se han estudiado, la A4V es la más común en Norteamérica (~41% de los casos) y una de las que evoluciona con mayor rapidez, provocando la muerte del paciente un año después de los primeros síntomas (Andersen *et al.*, 2003).

Inicialmente, se había pensado que la toxicidad de las formas mutantes de la SOD1 asociadas a la fALS (fALS-SOD1) podría ser el resultado de una pérdida parcial o total de su actividad. Sin embargo, las diferentes fALS-SOD1 muestran un importante grado de variación con respecto a su actividad enzimática, vida media del polipéptido y resistencia a proteólisis, sin que alguna de estas variables correlacione con la edad en la que aparecen los primeros síntomas de la enfermedad, ni con la velocidad con que ésta progresa (Ratovitski *et al.*, 1999). Además, se ha observado que los animales deficientes en SOD1 no desarrollan ninguna enfermedad asociada a las motoneuronas (Reaume *et al.*, 1996), mientras que la expresión transgénica de distintas fALS-SOD1 humanas o murinas provoca un síndrome similar a la ALS, independientemente de si la actividad catalítica de la enzima silvestre se mantiene normal, se aumenta o se reduce (Gurney *et al.*, 1994; Ripps *et al.*, 1995; Bruijn *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2001; Dunlop *et al.*, 2003). Estas observaciones han proporcionado evidencia suficiente para concluir que la citotoxicidad de la fALS-SOD1 no está mediada por una pérdida de función, sino por un mecanismo de ganancia de función no asociada a su actividad catalítica.

La discusión sobre la toxicidad de las formas mutantes de la SOD1 asociadas a la ALS ha estado dominada por dos teorías: la hipótesis de agregación y la hipótesis de daño oxidativo (Fig. 7). La primera sostiene que las proteínas fALS-SOD1 tienen fallas en su plegamiento y, a consecuencia de esto, tienden a oligomerizar en especies de alto peso molecular hasta formar grandes agregados, los cuales, en algún momento de su formación resultan selectivamente tóxicos para las neuronas motoras (Bruijn *et al.*, 1998; Stathopoulos *et al.*, 2003). En apoyo a esta hipótesis, se ha observado que la presencia de agregados proteicos intracelulares es una característica patológica prominente de varias líneas murinas transgénicas y varios tipos celulares cultivados que expresan fALS-SOD1. Se especula que la presencia de estos agregados en el citosol de las motoneuronas podría ser deletérea al dañar el transporte axonal de nutrimentos vitales dependiente de microtúbulos, o al perturbar el recambio normal de proteínas intracelulares (Johnston *et al.*, 2000).

Una variación de esta hipótesis señala que los agregados de fALS-SOD1 podrían unirse a otras proteínas esenciales, como las proteínas de choque térmico (HSP, “heat shock protein”) u otras chaperonas, proteínas mitocondriales transportadoras de electrones, proteínas involucradas en la supervivencia celular o proteínas de la maquinaria de degradación proteica, impidiéndoles que lleven a cabo sus funciones normales en la célula

(revisado en Cleveland y Rothstein, 2001; Julien, 2001). En este contexto, se ha observado que en humano y en ratón la proteína anti-apoptótica Bcl-2 se une a los agregados de fALS-SOD1 presentes en las mitocondrias de muestras provenientes de médula espinal pero no aquellas provenientes de hígado. Una posible consecuencia de la interacción Bcl-2-fALS-SOD1 podría ser que Bcl-2 pierda su funcionalidad al quedar “atrapado” en estos agregados. Otra posibilidad es que la interacción Bcl-2-fALS-SOD1 induzca un cambio conformacional que convierta a Bcl-2 en una molécula pro-apoptótica (Pasinelli *et al.*, 2004).

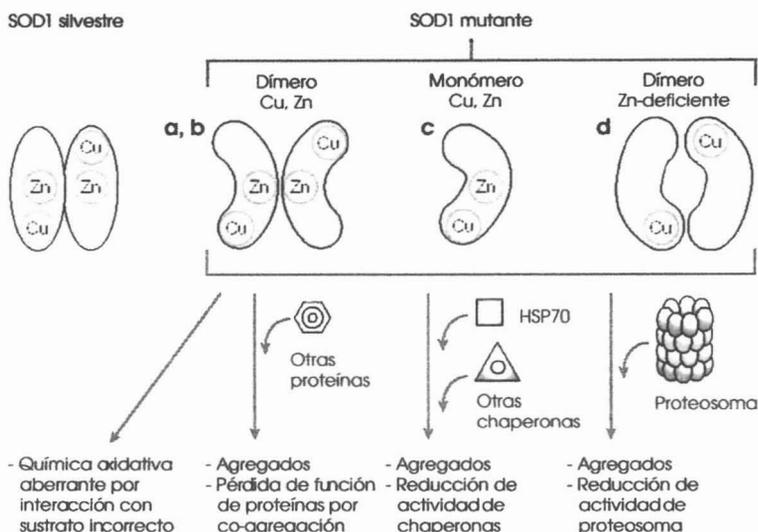


Figura 7. Hipótesis para la toxicidad mediada por fALS-SOD1. La toxicidad de la fALS-SOD1 podría ser el resultado de (a) una química oxidativa aberrante de subunidades de fALS-SOD1 mal plegadas o agregadas que permiten el acceso de sustratos inapropiados al átomo de cobre catalítico; (b) pérdida de proteínas celulares esenciales, como la proteína anti-apoptótica Bcl-2, mediante su co-agregación con oligómeros de fALS-SOD1; (c) fallas en el plegamiento de componentes celulares esenciales debido a la saturación de proteínas chaperonas, como la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), con fALS-SOD1; o (d) inhibición de la degradación por proteosomas debido a su saturación con fALS-SOD1 mal plegadas (Modificado de Cleveland y Rothstein, 2001).

Por otra parte, la hipótesis de daño oxidativo postula que las proteínas fALS-SOD1 podrían ser capaces de generar estrés oxidativo por dos mecanismos diferentes, los cuales no son mutuamente excluyentes. En el primer mecanismo, las mutaciones de la SOD1 resultarían en una conformación más relajada de la enzima, permitiendo que tipos o cantidades anormales de sustrato ingresen en el canal activo y reaccionen con el átomo de cobre que se encuentra en el sitio catalítico. Entre los sustratos aberrantes se ha propuesto el

peroxinitrito y el peróxido de hidrógeno (Wiedau-Pazos *et al.*, 1996; Yim *et al.*, 1996), los cuales pueden causar daño celular directa o indirectamente. La interacción peroxinitrito-SOD generaría como intermediario el ión nitronio, el cual puede nitrar residuos de tirosina de diferentes proteínas celulares; mientras que el uso de peróxido de hidrógeno como sustrato de la SOD resultaría en la generación de radicales hidroxilo que pueden dañar blancos celulares incluyendo DNA, proteínas y membranas lipídicas. Una ligera modificación de esta idea es que las mutantes podrían manejar el cobre torpemente, liberándolo frecuentemente y permitiendo que, al estar libre, catalice reacciones oxidativas no deseadas (revisado en Cleveland y Rothstein, 2001). En el segundo mecanismo se especula que las mutaciones en la SOD1 están asociadas con una unión más lábil del átomo de zinc a la proteína, y que al perder el zinc, el átomo de cobre de la fALS-SOD1 se reduciría rápidamente. Esta forma reducida de la enzima podría catalizar la conversión de oxígeno en superóxido, el cual al combinarse con óxido nítrico produciría peroxinitrito, que podría ocasionar daño oxidativo serio a virtualmente todos los elementos celulares (Estévez *et al.*, 1999). Sin embargo, el hecho de que la toxicidad de la fALS-SOD1 no se reduce al incrementar la expresión, y con ello la actividad, de la enzima silvestre, es inconsistente con que el daño se deba al superóxido o a cualquier producto de una reacción espontánea de éste, como el peroxinitrito (revisado en Cleveland y Rothstein, 2001; Liochev y Fridovich, 2003).

Una hipótesis más reciente sugiere que existe un vínculo causal entre la fALS-SOD1, un daño al aparato y vía de secreción neuronal y la degeneración motoneuronal. La idea se basa en la evidencia de que la SOD1 silvestre es secretada al medio extracelular, pero las formas mutantes no, o sólo deficientemente, provocando la formación de inclusiones intracelulares. Así, esta hipótesis sustenta que (i) la SOD1 extracelular podría tener una función protectora sobre las motoneuronas al funcionar como antioxidante; y (ii) la fALS-SOD1 podría inducir daño estructural a los organelos del aparato de secreción —aparato de Golgi y retículo endoplásmico (ER, “endoplasmic reticulum”)— contribuyendo a la acumulación intracelular de proteínas, agregación y toxicidad (Turner *et al.*, 2005).

2.3.2. Toxicidad de la fALS-SOD1: un proceso celular no-autónomo

Independientemente del mecanismo de toxicidad, aún no está totalmente claro si la degeneración y muerte motoneuronal son resultado de un proceso que se origina directamente en las células que expresan la fALS-SOD1, es decir, si la toxicidad es un proceso celular autónomo. En este contexto, una de las primeras observaciones que llamó la atención fue que a pesar de que la fALS-SOD1 tiene una expresión ubicua, en los pacientes

con fALS-SOD1 las únicas células afectadas son las MNs. De manera similar, en los roedores transgénicos que expresan fALS-SOD1 en todas las células, se observa degeneración severa de las MNs (revisado en Bruijn *et al.*, 2004); sin embargo, si la expresión de la SOD1 mutante se restringe a las motoneuronas de los transgénicos, los animales no desarrollan la enfermedad (Pramatarova *et al.*, 2001; Lino *et al.*, 2001). Lo anterior sugirió que el efecto neurotóxico de la SOD1 mutante no es sólo consecuencia directa de su expresión en el interior de las neuronas, sino que requiere la alteración de la función de células no neuronales.

La importancia de la función de las células gliales en la provisión de factores tróficos a las neuronas motoras y en el mantenimiento de la homeostasis de glutamato, hace plausible un papel de las células gliales en la toxicidad mediada por fALS-SOD1. Tomando esto en consideración, Gong *et al.* (2000) generaron un ratón transgénico con expresión selectiva de SOD1^{G85R} en glía, observando que la expresión astrocito-específica de la enzima mutante provoca cierta patología en este tipo celular, pero no es suficiente para generar muerte motoneuronal.

Una de las evidencias más fuertes de que la toxicidad de la fALS-SOD1 a las MNs no es un proceso celular autónomo, se derivó a partir de análisis realizados en ratones quiméricos (Clement *et al.*, 2003), los cuales son una mezcla de células que expresan la enzima silvestre y células que expresan una forma mutante. En estos ratones, las MNs que expresaban de forma crónica las mutantes SOD1^{G37R} o SOD1^{G93A} a niveles que provocan un desarrollo temprano de la enfermedad cuando las enzimas se expresan ubicuamente, lograban escapar de la degeneración y muerte si se encontraban rodeadas por un número suficiente de células no neuronales silvestres. En algunos casos, incluso una minoría relativamente pequeña (5-20%) de células silvestres retardaba la degeneración y extendía la supervivencia de las neuronas mutantes. Además, las MNs silvestres que se encontraban rodeadas por células no neuronales que expresaban la enzima mutante mostraban algunos depósitos intracelulares ubiquitinados, indicando que las células que expresaban la forma mutante de la enzima les habían transferido el daño.

Los datos anteriores apuntan a que la muerte motoneuronal en la fALS depende, al menos en parte, de una interacción de las MNs con las células gliales u otros tipos celulares no-neuronales que las rodean.

2.3.3. Características de las neuronas motoras en degeneración

Los estudios microscópicos y ultraestructurales realizados en ratones transgénicos que expresan fALS-SOD1 han revelado que en estos animales la mayoría de las neuronas

enfermas están atrofiadas y su citoplasma está ocupado por vacuolas, que resultan de la dilatación del ER rugoso y de mitocondrias en degeneración (Dal Canto y Gurney, 1994). Además, muchas neuronas tienen el citoplasma y el núcleo condensados difusamente y presentan formas irregulares (Guégan y Przedborski, 2003).

De acuerdo con Dal Canto y Gurney (1994), las lesiones observadas se pueden clasificar en dos patrones principales, los cuales parecen guardar una relación temporal secuencial. El primero se caracteriza principalmente por cambios vacuolares extensivos en las astas ventrales —región de la médula donde se ubican las MNs— de la región anterior médula espinal y en algunos núcleos del tallo del cerebro, siendo característico de los animales más jóvenes. El segundo patrón se observa en animales más viejos, en la etapa final de la enfermedad, y se caracteriza por la pérdida severa de neuronas en las astas anteriores de la médula espinal y la presencia de inclusiones citoplásmicas —acumulaciones esféricas de filamentos densamente empaquetados— en algunas de las neuronas sobrevivientes. De este modo, la primera fase patológica se caracteriza principalmente por degeneración vacuolar, lo cual eventualmente produce neuronas atroficas y finalmente provoca la pérdida neuronal.

Si bien aún no se ha determinado el tipo de muerte que ocurre en la enfermedad, las características de las neuronas en degeneración que se mencionaron anteriormente, corresponden a una morfología no apoptótica con algunas características de autofagia y muerte citoplásmica (muerte tipo III). Sin embargo, aunque con muy poca frecuencia, también se observan algunas células apoptóticas en la médula espinal de los ratones afectados. Si bien la mayoría de estas células ya no exhiben características morfológicas definitivas o expresan marcadores fenotípicos que permitan su identificación como neuronas o glía, algunas de ellas (menos del 15%) aún son inmunoreactivas para proteínas específicas como neurofilamentos y GFAP, sugiriendo que en los modelos murinos transgénicos tanto células gliales como neuronales mueren por apoptosis (revisado en Guégan y Przedborski, 2003).

En lo que respecta a los casos de ALS humana, Martin (1999) ha clasificado las MNs residuales de muestras *post mortem* de médula espinal en tres categorías, las cuales considera, reflejan diferentes etapas de degeneración. En la etapa de cromatolisis, las neuronas motoras aún se asemejan a las células no enfermas, excepto que el cuerpo celular se observa inflamado y redondo, la tinción de Nissl difusa y el núcleo ubicado excéntricamente. Algunas de las neuronas cromatolíticas tienen inclusiones citoplásmicas hialinas prominentes (Tabla 1). En la etapa de desgaste somatodendrítico, el citoplasma y el núcleo se observan homogéneos y condensados, y el cuerpo celular parece contraído y con forma irregular. En la etapa denominada “apoptótica” las MNs afectadas tienen

aproximadamente un quinto de su diámetro normal, el citoplasma y el núcleo están extremadamente condensados y el cuerpo celular adopta una forma fusiforme o redondeada. Sin embargo, cabe mencionar que la condensación nuclear de las MNs afectadas difiere de la observada clásicamente en la apoptosis, ya que la cromatina no se encuentra organizada discretamente en cúmulos densos y redondos.

Tabla 1. Inclusiones encontradas en neuronas provenientes de pacientes con esclerosis amiotrófica lateral (Festoff, 2000).

Tipo de inclusión	Localización	Tinción	Contenido
Esferoide	α -motoneurona	Plata	Neurofilamento
Conglomerado	Célula piramidal de Betz	Plata	Neurofilamento
Cuerpo Bunina	α -motoneurona	Hematoxilina y eosina	Incierto
Eosinofílica	α -motoneurona	Hematoxilina y eosina	Neurofilamento
Madeja	Neurona subcortical	Anticuerpo anti-ubiquitina	Ubiquitina positiva

3. ANTECEDENTES

3.1. MODELOS DE ESTUDIO DE DEGENERACIÓN MOTONEURONAL

3.1.1. Modelos *in vivo*

Un modelo animal ideal de una enfermedad humana debe cumplir ciertos criterios, incluyendo la recapitulación del proceso patogénico, la presentación de los signos clínicos y síntomas patológicos de la enfermedad humana y responsividad a eventos que modifiquen la enfermedad, como los tratamientos terapéuticos. Se han empleado diferentes enfoques para la creación de modelos animales de enfermedades humanas, los cuales, esencialmente, se pueden dividir en (i) aquellos que intentan reproducir la patogénesis de la enfermedad y (ii) los que tratan de reproducir los síntomas. Además, la serendipia ha provisto a la comunidad científica de modelos animales naturales, generalmente líneas murinas mutantes, que muestran espontáneamente los síntomas de alguna enfermedad humana (revisado en Doble y Kennel, 2000).

En el contexto de la ALS, se han propuesto varios modelos animales, los cuales se pueden clasificar en tres categorías principales: (a) modelos farmacológicos, (b) modelos espontáneos y (c) modelos transgénicos (revisado en Kaal *et al.*, 1999; Doble y Kennel, 2000). Adicionalmente, se han empleado modelos de lesión, en los cuales se seccionan los nervios motores (axotomía), induciendo la degeneración neuronal. Sin embargo, el daño que estas lesiones generan, representa un solo evento “masivo” que podría generar una cascada de eventos diferente de la generada por una enfermedad crónica como la ALS (revisado en Elliott, 1999).

a. Modelos farmacológicos

Aunque varias toxinas producen neurodegeneración, pocas producen daño específicamente a las MNs (Kaal *et al.*, 1999).

β -metilamino-L-alanina (BMAA). La BMAA se deriva de la palma de sagú (*Cycas circinalis*) y se ha implicado como un factor patogénico potencial en una forma de ALS del Pacífico Occidental asociada con parkinsonismo y demencia. La BMAA es un agonista de los receptores a aminoácidos excitatorios de tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), produciendo neurotoxicidad dependiente del receptor a NMDA en cultivos celulares. Administrada oralmente a monos en grandes dosis, produce degeneración de las células de

Betz en la corteza motora y, en menor grado, de las células del asta anterior, esto, acompañado por signos de disfunción motora y un síndrome parkinsoniano. Las ratas alimentadas con BMAA desarrollan un síndrome cerebelar, mientras que los ratones parecen ser resistentes a la toxina (revisado en Doble y Kennel, 2000).

Cabe mencionar que la hipótesis de la BMMA para el origen de la ALS del Pacífico Occidental ha estado en disputa debido a que las concentraciones de BMAA en los alimentos preparados son muy bajas para que ésta actúe como una neurotoxina (revisado en Doble y Kennel, 2000).

β -oxilamino-L-alanina (BOAA). La BOAA es un aminoácido excitatorio que se encuentra en el garbanzo (*Lathyrus sativus*) y se ha implicado en la patogénesis del neurolatirismo, un desorden motoneuronal caracterizado por la degeneración del tracto motoneuronal superior. Esta excitotoxina actúa activando los receptores a aminoácidos de tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato)/kainato, provocando muerte por excitotoxicidad a células en cultivo. Su administración oral a monos les produce lesiones en el tracto corticoespinal y su inyección intratecal (dentro del espacio que contiene el líquido cefalorraquídeo) a roedores les provoca parálisis (revisado en Doble y Kennel, 2000).

Ácido kaínico. El ácido kainico, una piroldina ácida aislada del alga *Digneia simplex* y análoga al ácido glutámico, es la excitotoxina exógena más empleada (Coyle, 1987). Su inyección intratecal genera daño neuronal en la médula espinal. Por alguna razón, aún no establecida, las células de la región anterior de la médula parecen ser más sensibles al ácido kaínico en comparación con el resto de las neuronas espinales. Histopatológicamente, las lesiones se caracterizan por inflamación axonal y anomalías en la arquitectura del citoesqueleto similares a las observadas en la ALS (revisado en Doble y Kennel, 2000).

b. Modelos espontáneos

Existen varios modelos animales que desarrollan degeneración motoneuronal de manera natural, la mayoría de ellos son líneas de ratones con alguna mutación espontánea. Además, se ha descrito una forma canina de atrofia muscular espinal hereditaria y una enfermedad motoneuronal espontánea en caballos (revisado en Doble y Kennel, 2000). Debido al desarrollo reciente de modelos transgénicos, la atención a los modelos espontáneos ha disminuido (Kaal *et al.*, 1999).

Ratón Mnd. La enfermedad motoneuronal (Mnd, “motor neuron disease”) de ratón es un síndrome que evoluciona lentamente y no se restringe al sistema motoneuronal. La mutación Mnd se hereda de manera dominante y se localiza en el cromosoma 8 (revisado en Doble y Kennel, 2000). Los síntomas neuropatológicos y signos clínicos aparecen en la etapa adulta e incluyen inflamación neuronal con inclusiones citoplásmicas y degeneración motoneuronal en la médula espinal, núcleo hipoglosal y corteza motora; también se observa degeneración retinal severa. La supervivencia de los ratones raras veces se extiende más allá de los 14 meses (revisado en Elliott, 1999).

Ratón wobbler. El ratón wobbler porta una mutación recesiva (*wr*) localizada en el cromosoma 11. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen a las tres semanas de edad y la muerte ocurre alrededor de los 6 meses. Las motoneuronas que inervan las extremidades anteriores parecen afectarse de manera predominante y la pérdida de MNs es evidente en la región cervical de la médula espinal. Los principales cambios neuropatológicos son degeneración axonal proximal, vacuolización pronunciada de las células del asta anterior, cambios en los astrocitos y cierta degeneración de las MNs del tallo cerebral (revisado en Elliott, 1999). Se han descrito algunos cambios en los niveles de ácido glutámico del fluido cerebro-espinal y en los receptores espinales de glutamato, pero éstos no se asemejan a los observados en la ALS (revisado en Doble y Kennel, 2000).

Aunque este ratón exhibe un curso clínico y patología que asemeja más a la enfermedad motoneuronal humana, las contradicciones observadas en los resultados con diferentes tratamientos farmacológicos en este modelo murino y en humanos, ponen en duda su utilidad para predecir la eficacia terapéutica de distintos agentes en la ALS (revisado en Doble y Kennel, 2000).

Ratón wasted. Los ratones homocigos para la mutación autosómica wasted (*wst*) sufren deterioro progresivo comenzando a las 3 semanas de edad. Estos animales no viven más de 30 días, presentan parálisis de las extremidades posteriores, desarrollan respuestas inmunes secretorias reducidas y tienen mecanismos de reparación de DNA anormales. El principal cuadro neuropatológico se caracteriza por una prominente degeneración vacuolar de las neuronas dentro de las astas anteriores de la médula espinal y núcleo motor del tallo del cerebro (revisado en Kaal *et al.*, 1999).

Ratón pmn. El ratón pmn porta una mutación autosómica recesiva en el cromosoma 13. La principal característica patológica es axonopatía distal; los cuerpos celulares de las neuronas y los axones proximales se preservan relativamente, lo cual difiere de lo

observado en los pacientes con ALS (Elliott, 1999). Los animales presentan atrofia muscular neurogénica y, subsecuentemente, parálisis. También se observa patología testicular. Los signos clínicos aparecen tempranamente (2 semanas), los síntomas neuropatológicos comienzan a las 3 semanas de edad y progresan de manera rápida, presentándose la muerte alrededor de los 40 días (revisado en Doble y Kennel, 2000).

Ratón nmd. El defecto genético del ratón nmd se ha identificado como una delección de un aminoácido y una mutación de “splicing” en el gen que codifica para una ATPasa/DNA helicasa de expresión ubicua, conocida como SMbp2. Estos ratones presentan debilidad progresiva en las extremidades posteriores desde las 2 semanas y generalmente no sobreviven más de 4 semanas. El cuadro patológico revela cuerpos motoneuronales en degeneración en la médula lumbar (revisado en Elliott, 1999).

En general, en los modelos espontáneos descritos en roedores anteriormente, el curso temporal (nmd, wasted), el patrón espacial (Mnd) o la patología (pmn) son bastante distintos de lo observado en la ALS.

Perros Brittany spaniel. La atrofia muscular espinal canina hereditaria (HCSMA, “hereditary canine spinal muscular atrophy”) es una enfermedad motoneuronal progresiva de etiología desconocida que se observa en perros Brittany spaniel. Existen diferentes variantes de la enfermedad con un curso más o menos agresivo. Aunque el volumen del cuerpo neuronal y el diámetro axonal están reducidos, sugiriendo un retraso o anomalía en su desarrollo, las células del asta anterior no se pierden. La neuropatología incluye agregación intensa de neurofilamentos. Debido a que las MNs superiores no sufren ningún daño, la HCSMA se asemeja más a la atrofia muscular espinal humana que a la ALS (revisado en Doble y Kennel, 2000).

Enfermedad motoneuronal equina (MND). Las características clínicas, neuropatológicas y electromiográficas de la MND (“motor neuron disease”) asemejan a aquellas de una forma moderada de la ALS humana. La etiología de esta enfermedad equina es desconocida, pero se sospecha de una factor ambiental. Como en los humanos, los caballos afectados muestran atrofia y fasciculaciones de los músculos de las extremidades, debilidad y, ocasionalmente, contracciones musculares involuntarias (revisado en Doble y Kennel, 2000).

c. Modelos transgénicos

El advenimiento de las técnicas de transgénesis ha permitido el diseño y generación de nuevos modelos animales de enfermedad motoneuronal (revisado en Elliott, 1999). Se han creado varias líneas de roedores que expresan el gen de la SOD1 humana con mutaciones encontradas en ciertas formas de fALS (Gurney *et al.*, 1994; Ripps *et al.*, 1995; Bruijn *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2001; Dunlop *et al.*, 2003). Además, debido a que se ha postulado que diversas anomalías en el citoesqueleto podrían jugar un papel significativo en la patogénesis de la ALS, se han generado ratones transgénicos que expresan genes de proteínas del citoesqueleto, incluyendo neurofilamentos y periferina (Robertson *et al.*, 2002).

fALS-SOD1. Los ratones nulos con deleciones en ambos alelos de la SOD1 y virtualmente sin actividad de SOD1 no desarrollan pérdida motoneuronal espontánea (Reaume *et al.*, 1996; Bruijn *et al.*, 1998). En contraste, las líneas de ratones que expresan el gen de la SOD1 humana con alguna de las mutaciones asociadas a la fALS exhiben degeneración espontánea de MNs y debilidad clínica progresiva. En todas estas líneas la expresión del transgén está dirigida por el promotor endógeno de la SOD1 humana, y de ellas, la primera que se desarrolló y la más ampliamente estudiada es la que porta la mutación G93A (Gurney *et al.*, 1994). Fenotípicamente, los ratones mutantes para la SOD1 presentan una función motora normal, pero después desarrollan debilidad progresiva, la cual generalmente comienza por los miembros posteriores y, eventualmente, lleva a la muerte del animal. La supervivencia de estos ratones varía de línea a línea (4-14 meses) y parece no depender de la mutación en particular, sino del nivel de expresión de la enzima mutante. Las médulas espinales de las líneas con más altos niveles de expresión se encuentran prácticamente sin MNs, y las neuronas motoras que aún permanecen presentan cambios vacuolares significativos y mitocondrias dilatadas. Sin embargo, las líneas con niveles más bajos de expresión del transgén, carecen de estos cambios mitocondriales, lo que sugiere que estas vacuolas están relacionadas con el curso más fulminante de la enfermedad que presentan las líneas con los niveles de expresión más altos. Las MNs de los ratones transgénicos también contienen inclusiones positivas para neurofilamentos, ubiquitina y SOD1, similares a aquellas encontradas en pacientes con ALS familiar y esporádica (revisado en Elliot, 1999).

Proteínas del citoesqueleto. El citoesqueleto neuronal está compuesto de tres tipos de filamentos: actina, microtúbulos y filamentos intermedios (IFs). Se ha reportado el principal

tipo de IFs, los neurofilamentos (NF), forman acumulaciones en las motoneuronas de pacientes con ALS familiar y esporádica; no obstante, las causas de estas acumulaciones y la manera en que contribuyen a la enfermedad aún se desconocen (revisado en Julien y Beaulieu, 2000).

En ratones transgénicos, la sobreexpresión de cualquiera de las subunidades silvestres de los NF puede inducir la formación de acumulaciones de NF tanto en el soma como en los axones neuronales. Aunque estos ratones desarrollan debilidad, ésta no es suficientemente severa para causarles la muerte (revisado en Elliot, 1999). En contraste, los ratones que expresan el transgén de la cadena ligera de los NF (NF-L; “*neurofilament light chain*”) con una sustitución de Leucina a Prolina (L394P), muestran, dentro de las primeras cuatro semanas después de nacidos, una pérdida masiva de neuronas motoras. Sin embargo, cabe mencionar que esta mutación no está descrita para ningún caso de ALS (revisado en Robertson *et al.*, 2002).

La periferina es un filamento intermedio de tipo III que interacciona con los neurofilamentos durante el ensamblaje del citoesqueleto y se detecta en la mayoría de las inclusiones de IFs (89%) en las MNs de pacientes con ALS (revisado en Julien y Beaulieu, 2000). La sobreexpresión de periferina en ratones transgénicos da lugar a una pérdida selectiva de las MNs espinales conforme los animales envejecen. Los síntomas clínicos van precedidos por la formación de cuerpos de inclusión que contienen proteínas de los filamentos intermedios. El desarrollo tardío de la enfermedad se puede acelerar cuando la periferina se sobreexpresa en ratones en los que se ha suprimido la expresión de NF-L (revisado en Doble y Kennel, 2000).

3.1.2. Modelos *in vitro*

A pesar de la existencia de modelos *in vivo* para el estudio de la degeneración motoneuronal asociada a la ALS, existen algunas ventajas de los sistemas *in vitro* (Fig. 7) que han motivado su desarrollo. En general, estos sistemas permiten un estudio más detallado de tipos celulares específicos y ofrecen una manipulación sencilla, ya sea por administración farmacológica directa o mediante transfecciones génicas (revisado en Elliott, 1999).

Aunque se ha utilizado tejido humano como material de partida para realizar cultivos de MNs, es más frecuente que el material se obtenga de roedores debido, principalmente, a su mayor disponibilidad. En el pasado, el mayor tamaño de las ratas en relación con el de los ratones, favoreció el uso de éstas; sin embargo, actualmente, dado que

existe una mayor disponibilidad de modelos murinos para la ALS, estas preferencias están cambiando (revisado en Kaal *et al.*, 1999).

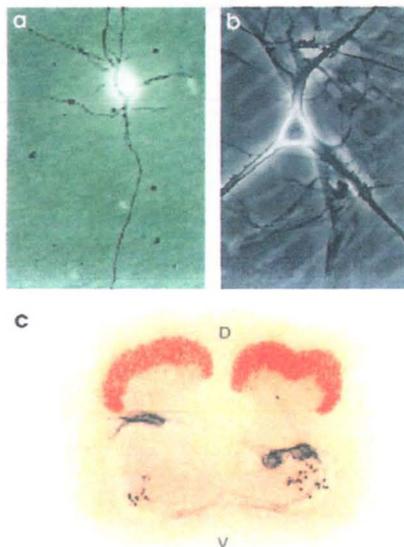


Figura 7. Modelos *in vitro* para el estudio de la degeneración motoneuronal. **(a)** Monocultivo de motoneuronas derivadas de médula espinal de embriones de rata de 15 días de desarrollo (Kaal *et al.*, 1998). **(b)** Motoneurona de rata en cocultivo con astrocitos de rata (Herpers *et al.*, 1999). **(c)** Rebanada organotípica de médula espinal después de tres semanas de cultivo. La médula se derivó de una rata postnatal de 8 días; en negro se observan las motoneuronas positivas para acetilcolina transferasa (ChAT), localizadas en el asta ventral (V), y en rojo, las neuronas positivas para calretinina, ubicadas en dos bandas del asta dorsal (D) (Kaal *et al.*, 2000).

a. Monocultivos

Cultivos primarios. El cultivo primario de MNs superiores (corticoespinales) se ha limitado debido a la dificultad de identificar y aislar esta pequeña subpoblación del resto de las neuronas corticales (revisado en Elliott, 1999; Kaal *et al.*, 1999). Esto no ha sido igual para el caso de las MNs inferiores, cuya técnica de cultivo se describió originalmente por Schnaar y Schaffner en 1981, y se ha mantenido hasta la actualidad con algunas modificaciones. En este método, las MNs se purifican con base en las diferencias que existen entre su densidad de flotación y la de astrocitos y neuronas más pequeñas. Una vez aisladas, las MNs se cultivan sobre un sustrato adecuado (Fig. 7a), el cual generalmente contiene laminina y un polímero de un aminoácido básico. Dado que en la médula espinal en desarrollo se produce un exceso de MNs —la mayor parte de las cuales (~50%) muere durante la inervación (revisado en Houenou y Oppenheim, 1994)—, para obtener un mayor número de MNs estas preparaciones se derivan de animales en estadios embrionarios o neonatales, lo cual tiene la desventaja de que las neuronas generalmente son bastante inmaduras (Elliott, 1999). Además, la mayoría de las neuronas (hasta el 90%) muere en las

primeras horas después de haber sido disociadas, y las que sobreviven permanecen con vida sólo por una semana (Bär, 2000), por lo que estos cultivos resultan más adecuados para el estudio de daños agudos y no de enfermedades crónicas, como la ALS (revisado en Elliott, 1999).

Líneas celulares. Con la finalidad de lograr monocultivos más prolongados y tomando como base el concepto de inmortalización, se han generado varias líneas celulares neuronales, siendo las más comunes la NSC-34 y la VSC 4.1. En ambos casos, las líneas se obtuvieron mediante la hibridación de MNs con células de neuroblastoma, dando como resultado células que asemejan neuronas motoras inmaduras (revisado en Kaal *et al.*, 1999).

Dado que los monocultivos no permiten que exista una interacción realista entre las motoneuronas, otros tipos neuronales y células gliales, las aplicaciones que tienen en el estudio de la degeneración neuronal relacionada con la ALS son muy limitadas.

b. Cocultivos

Motoneuronas-Glía. Para obtener cultivos más estables, varios investigadores cultivan las MNs sobre una capa de astrocitos confluentes, que debe prepararse con una o dos semanas de anticipación (Fig. 7b). Estas células gliales rodean a las MNs en la médula espinal y se cree que interactúan con ellas y les proveen factores tróficos. Los cultivos de neuronas motoras recién aisladas plateadas sobre astrocitos sobreviven más tiempo (más de 2 semanas) que los monocultivos y se desarrollan en mejores condiciones, permitiendo el crecimiento de neuritas, observándose árboles dendríticos densamente ramificados y exhibiendo características de MNs adultas, como la presencia de receptores AMPA permeables a calcio (revisado en Kaal, 1999; Bär, 2000).

Motoneuronas-Fibroblastos. Se ha desarrollado un sistema de cocultivo en el que las MNs se siembran sobre una capa de fibroblastos. Bajo estas condiciones, las MNs viven más tiempo que en los monocultivos, pero no tanto como aquellas que crecen sobre astrocitos, lo que indica que no sólo es importante la presencia de otras células como sustrato, sino también el tipo celular (Bär, 2000).

Cultivos mixtos. Otro tipo de cocultivo consiste en el cultivo de células disociadas de médula espinal de embriones murinos sin ninguna purificación. Aunque este tipo de cultivo supone una mayor supervivencia de las MNs (al menos 4 semanas), pues están presentes todas las células que las rodean *in vivo* (revisado en Kaal *et al.*, 1999), tiene la desventaja

de que la concentración real de MNs en el cultivo es muy baja (<1%), por lo que no resulta adecuado para estudiar las respuestas de estas células (revisado en Bär, 2000).

c. Cultivos organotípicos

La rebanada organotípica de médula espinal (Fig. 7c) provee ciertas ventajas de manipulación *in vitro*, mientras se preservan algunas de las interacciones célula-célula que ocurren *in vivo*. Generalmente, estas rebanadas se preparan a partir de ratones postnatales de 8-9 días y se pueden preservar en cultivo hasta por tres meses, con la ventaja de que la identificación y cuantificación de MNs se realiza fácilmente (revisado en Elliott, 1999). Además, las MNs de la rebanada muestran características de neuronas adultas, como crecimiento axonal y expresión de acetilcolina transferasa (ChAT, “Choline-acetyltransferase”) (revisado en Kaal, 1999).

La rebanada conserva, *grosso modo*, la arquitectura normal de la médula espinal, pudiéndose reconocer fácilmente las astas dorsales, el canal central y las zonas ventrales; además, teóricamente, algunas asociaciones neuronales deberían mantenerse (revisado en Elliott, 1999). Con el desarrollo de la técnica de interfase, un sistema en el que la rebanada crece sobre una membrana en la interfase aire-fluido, se obtiene una mejor organización tridimensional y menor proliferación glial (revisado en Kaal, 1999).

Aunque la administración de agentes terapéuticos potenciales a la rebanada se hace de manera directa, su manipulación genética resulta más complicada en comparación con los cultivos celulares, pues la transferencia de genes a la rebanada requiere la utilización de vectores adenovirales o biobalística. Además, la rebanada tiene algunas dificultades intrínsecas. Dado que debe ser removida del animal, se realizan múltiples axotomías que dejan a las MNs sin aferencias. El grado de muerte inducido por la axotomía se reduce debido a que las rebanadas se preparan a partir de animales maduros —el corte de los axones motores de ratón durante la primera semana de desarrollo postnatal resulta en una pérdida masiva de MNs (revisado en Houenou y Oppenheim, 1994)—, sin embargo, las neuronas motoras siguen sujetas al estrés inducido por la axotomía y las condiciones de cultivo. A pesar de esto, muchas de las MNs sobreviven en la preparación, pero es posible que el procedimiento esté seleccionando la supervivencia de neuronas particulares, lo cual debe considerarse al momento de interpretar los datos derivados de este tipo de cultivos (revisado en Elliott, 1999).

3.2. SISTEMAS DE ESTUDIO DE DEGENERACIÓN NEURONAL BASADOS EN CÉLULAS ES

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que por medio de protocolos de inducción, como aquellos que involucran el uso de RA, es posible obtener cultivos mixtos de neuronas y células gliales a partir de células ES. Las neuronas así derivadas asemejan a las neuronas de cultivos primarios por su morfología y por la expresión de marcadores moleculares particulares (Bain *et al.*, 1995; Fraichard *et al.*, 1995; Renoncourt *et al.*, 1998; Wichterle, 2002); más aún, despliegan varias características funcionales de las neuronas desarrolladas *in vivo*, incluyendo la expresión de receptores a neurotransmisores, las propiedades electrofisiológicas de membrana necesarias para generar patrones de disparo de potenciales de acción apropiados y la capacidad de formar sinapsis (Miles *et al.*, 2004). Tomando esto en consideración, recientemente se han diseñado paradigmas basados en células ES para estudiar algunos procesos de degeneración neuronal.

Qu *et al.* (2003) indujeron, mediante el tratamiento de EBs con RA, la diferenciación neuronal de células ES de ratón y evaluaron si estas células podían proveer un sistema para examinar la muerte neuronal mediada por receptores de glutamato. Los autores encontraron que las neuronas derivadas de células ES son vulnerables a la muerte inducida por los agonistas prototípicos de los receptores a glutamato: NMDA, kainato y AMPA. Además, observaron que esta vulnerabilidad a la muerte inducida por los agonistas aumentaba conforme se incrementaba la edad *in vitro* y correlacionaba con la expresión de las subunidades de los receptores, tal como sucede en los cultivos primarios de neuronas. Dado lo anterior, se concluyó que las células neuronales diferenciadas de células ES exhiben una respuesta excitotóxica que asemeja a la que muestran las neuronas del CNS.

Por otra parte, en el contexto de los desórdenes neurodegenerativos, Martinat y colaboradores (2004) desarrollaron un modelo de estudio para una forma de la enfermedad de Parkinson que se hereda de manera recesiva y está relacionada con una delección en el gen DJ-1, el cual se sabía está involucrado en respuestas celulares a estrés oxidativo. Martinat *et al.* generaron clones de células ES de ratón deficientes de DJ-1 (mutantes nulas). Mediante el co-cultivo de las células ES con una línea celular estromal murina, se indujo la diferenciación *in vitro* a neuronas dopaminérgicas (DA) —células selectivamente afectadas en la enfermedad de Parkinson—. Se observó que las neuronas DA derivadas de células ES deficientes de DJ-1 mostraban una menor supervivencia y un incremento en la sensibilidad al estrés oxidativo en relación con neuronas derivadas de células ES heterocigas. Con esto, los autores concluyeron que DJ-1 es un componente esencial de la respuesta a estrés oxidativo en neuronas DA y demostraron la utilidad de las neuronas

derivadas de células ES genéticamente modificadas en el estudio de desórdenes neurodegenerativos.

4. JUSTIFICACIÓN

La esclerosis amiotrófica lateral es la enfermedad paralítica más frecuente en adultos y uno de los desórdenes neurodegenerativos más devastadores. Hasta ahora, no existe ningún tratamiento terapéutico eficaz, en gran parte debido a que aún no están totalmente claras las causas de la muerte neuronal. Lo anterior, resalta la necesidad de crear un sistema de estudio que reproduzca el proceso de degeneración neuronal asociado a la ALS.

Dada la complejidad de los organismos vivos, la utilización de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas puede resultar poco práctica, complicada y consumir periodos de tiempo muy prolongados. Por ello, resulta esencial el desarrollo de sistemas *in vitro*, pues estos modelos además de ofrecer una manipulación sencilla, pueden proveer información a nivel celular y molecular sobre el proceso patogénico, así como paradigmas para la evaluación de tratamientos potenciales.

Una de las principales limitantes de los modelos *in vitro* que se han utilizado hasta ahora para estudiar la degeneración motoneuronal, es la disponibilidad del material de partida. Resulta difícil aislar poblaciones grandes de neuronas motoras y lograr cultivos primarios poco variables (Silani *et al.*, 2001). Además, la manipulación genética de neuronas postmitóticas tampoco es sencilla, pues aún no se ha encontrado algún sistema que proporcione una alta eficiencia de transfección independientemente del tamaño de la construcción, que tenga baja toxicidad celular y sea fácil y seguro de emplear (Washbourne y McAllister, 2002). En principio, estas limitaciones podrían resolverse utilizando líneas celulares, las cuales proveen un sustrato inmortal y uniforme. Sin embargo, estas células no presentan las características de una neurona madura, por lo que su comportamiento podría diferir del de las neuronas desarrolladas *in vivo*.

Las células ES proveen un sistema fácilmente manipulable a nivel genético y capaz de originar *in vitro* células neuronales funcionalmente maduras, en periodos de tiempo cortos. Esto abre la posibilidad de generar líneas de células ES que expresen alguna forma mutante de la SOD1 asociada a la ALS. A partir de esas líneas, se puede obtener un gran número de motoneuronas, seguir su desarrollo y comparar su comportamiento con el de motoneuronas derivadas de células ES silvestres.

Además, este sistema podría ayudar a dilucidar algunos de los aspectos fundamentales de la patología neuronal que hasta ahora ninguno de los modelos de estudio de la ALS ha logrado explicar: el tipo celular responsable de la degeneración neuronal y la especificidad de la muerte motoneuronal. En el primer caso, considerando la evidencia de que la degeneración neuronal puede ser el resultado de una interacción entre neuronas y astrocitos disfuncionales, y la capacidad de las células ES para diferenciar en neuronas o

glía en función de las condiciones de cultivo, sería posible estudiar los efectos de la fALS-SOD1 en ambos tipos celulares, ya sea de manera independiente o en condiciones de cocultivo. En cuanto a la especificidad, podría inducirse la diferenciación de células ES que expresen fALS-SOD1 a diferentes tipos neuronales, y estudiar qué factores hacen a las motoneuronas particularmente susceptibles a la toxicidad inducida por la enzima mutante.

En síntesis, las células ES representan una estrategia para obtener un modelo de estudio de manejo sencillo y, quizá aún más importante, reproducible, pues al poder partir siempre de células con el mismo fondo genético se reduce la variabilidad entre los experimentos, lo que aumenta la confiabilidad de los resultados.

5. HIPÓTESIS

Dado que las motoneuronas derivadas *in vitro* a partir de células ES exhiben diversas características morfológicas, moleculares y funcionales propias de las motoneuronas desarrolladas *in vivo*, se espera que sean susceptibles a la toxicidad inducida por una forma mutante de SOD1 asociada a la fALS.

6. OBJETIVOS

GENERAL:

Generar un modelo experimental a partir de células ES que reproduzca *in vitro* el proceso de degeneración motoneuronal asociado a la esclerosis amiotrófica lateral.

PARTICULARES:

- Construir diferentes vectores de expresión de la enzima humana SOD1^{WT} y SOD1^{A4V} bajo el control del promotor CMV/CBA (citomegalovirus “enhancer”/promotor “chicken- β -actin”).
- Generar diferentes líneas de células troncales embrionarias (ES) que expresen de manera constitutiva la enzima humana SOD1 silvestre o su forma mutante A4V.
- Llevar a cabo la diferenciación de células ES al fenotipo motoneuronal.
- Comparar la viabilidad de las motoneuronas derivadas de células ES silvestres con la de aquellas derivadas de células ES que expresan SOD1 humana silvestre o la forma mutante A4V.

7. MÉTODOS

7.1. PLÁSMIDOS

El plásmido de expresión que codifica para la SOD1^{A4V} se derivó de un plásmido basado en el vector pcDNA3 (Invitrogen) (Fig. 8). Los plásmidos de expresión que codifican para las enzimas SOD1^{WT} y SOD1^{A4V} fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP, “green fluorescent protein”) se derivaron de plásmidos basados en el vector pEGFP-C2 (Clontech) (Fig. 9). Este vector codifica para una variante de la GFP^{WT}, la EGFP (“enhanced” GFP), la cual contiene dos sustituciones de aminoácidos cerca del cromóforo y 190 cambios de base silenciosos que la hacen más brillante y adecuada para su expresión en células de mamífero.

En todos los casos, con el fin de lograr la expresión constitutiva de la SOD1 en células ES, se reemplazó la secuencia promotora de los plásmidos originales (CMV) por el promotor CMV/CBA (Citomegalovirus “enhancer”/promotor “chicken- β -actin”) que se encontraba clonado en el vector pBluescript IKS (pKS) (Stratagene) (Figs. 8 y 9). Las construcciones generadas se verificaron estructuralmente mediante su patrón de restricción con diversas endonucleasas y, en algunos casos, por secuenciación, y funcionalmente por transfección transitoria en células COS-7.

7.1.1. Subclonación de fragmentos de DNA

El vector CMV/CBA-SOD1^{A4V} se generó digiriendo los plásmidos pcDNA3-SOD1^{A4V} y pKS-CMV/CBA con *NdeI* y *EcoRI*. En el primer caso, se purificó un fragmento de 5661 pb que contenía la secuencia de la SOD1 y el esqueleto del vector sin promotor, y en el segundo, un fragmento de 1467 pb correspondiente al promotor CMV/CBA (Fig. 8). Posteriormente, se ligaron ambos fragmentos.

Para reemplazar las secuencias promotoras de los plásmidos pEGFP-C2-SOD1^{WT} y pEGFP-C2-SOD1^{A4V}, éstos se digirieron con *NdeI* y *NheI*, generándose, en cada caso, un fragmento de 5075 pb correspondiente a la secuencia de la enzima y al esqueleto del vector sin promotor. El plásmido pKS-CMV/CBA se digirió con *NdeI* y *SpeI*, para generar un fragmento de 1491 pb que contenía la secuencia del promotor CMV/CBA (Fig. 9). Una vez purificados los fragmentos, se efectuó la reacción de ligación.

Procedimiento

1. Digerir las moléculas parentales de DNA con las enzimas de restricción adecuadas, incubando 1 hora a 37°C.

Para una reacción de 20 µl:

x µl de DNA (0.5 a 4 µg en buffer TE)

2 µl de buffer de restricción 10X

Endonucleasa de restricción (1 a 5 U/µg de DNA)

H₂O cuanto baste para 20 µl

2. Separar los fragmentos de DNA digeridos mediante electroforesis en gel de agarosa SeaPlaque de bajo punto de fusión (BioWhittaker Molecular Applications #50100).
3. Usando una lámpara de luz UV de longitud de onda larga o una lámpara Dark Reader para visualizar el DNA, cortar la banda de interés y extraer el DNA del gel:
 - a. Pesar la banda cortada y completar a 250 mg con H₂O libre de RNAsa.
 - b. Fundir a 65°C durante 10 minutos.
 - c. Extraer dos veces con 250 µl de fenol, recuperando la fase acuosa, y una vez con cloroformo.
 - d. Añadir 25 µl de acetato de potasio 3M pH 5.5 y 1 ml de etanol absoluto para precipitar el DNA. Dejar reposar 1 minuto.
 - e. Centrifugar a 17500 × *g* a 4°C por 20 minutos.
 - f. Lavar el pellet dos veces con etanol al 70%, secarlo al vacío y resuspenderlo en H₂O.
4. Cuantificar el DNA purificado en un gel de agarosa.
5. Mezclar el vector con el inserto, de modo que el número de moléculas quede en una proporción 1:3. Si el volumen final es muy grande precipitar el DNA:
 - a. Añadir 1 µl de glucógeno (20 µg/µl) y 300 µl de etanol absoluto.
 - b. Congelar a -70°C por 15 minutos.
 - c. Centrifugar 5 minutos a 15700 × *g*.
 - d. Eliminar el sobrenadante y secar el pellet al vacío.
 - e. Resuspender el DNA en 5 µl de H₂O.
6. Poner la reacción de ligación. Incubar toda la noche a 15°C si la proporción de GC en los extremos cohesivos es mayor a la de AT, o a 4°C si la de AT es mayor.

Para una reacción de 5 µl:

3.5 µl de DNA

1 µl de buffer de ligación con ATP 5X

0.5 µl de DNA ligasa T4 (Boehringer #716359)

7. Una vez concluida la reacción de ligación, añadir 500 μ l de butanol para precipitar el DNA. Mezclar en vórtex y centrifugar a $15700 \times g$ durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante.
8. Lavar el pellet con 100 μ l de etanol al 70% frío. Centrifugar a $15700 \times g$ durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante, secar el pellet al vacío (2 a 5 minutos) y resuspenderlo en 10 μ l de H₂O.
9. Transformar células *E. coli* competentes con los productos de la ligación y seleccionar los transformantes en función del cassette de resistencia a antibiótico incluido en el vector.
10. Para cada transformante, purificar el DNA plasmídico mediante una minipreparación de DNA (“miniprep”) y determinar su secuencia mediante enzimas de restricción. Una vez identificada la clona de interés, amplificar el plásmido por medio de una maxipreparación de DNA (“maxiprep”).

7.2. LÍNEAS Y CULTIVOS CELULARES

La verificación funcional de los vectores de expresión construidos se realizó en células COS-7. Esta línea celular proviene de riñón de mono africano verde (*Cercopithecus aethiops*) adulto y se encuentra transformada con un mutante de SV40 deficiente de replicación que codifica para el antígeno T silvestre.

Para los cultivos de células ES, se utilizó la línea celular de ratón (*Mus musculus*) AB2.2, de la cual posteriormente se derivaron por transfección estable las líneas WTF1 y WTF10 (CMV/CBA-SOD1^{WT}-EGFP), A4V2 (CMV/CBA-SOD1^{A4V}), y A4VF3 (CMV/CBA-SOD1^{A4V}-EGFP). Las células alimentadoras utilizadas para el mantenimiento de estos cultivos consistieron de la línea de fibroblastos murinos STO. La composición de los medios utilizados para el cultivo de estas líneas celulares se describe en el anexo.

7.2.1. Cultivo y transfección de células COS-7

a. Subcultivo de células COS-7

1. Aspirar el medio usando la bomba de vacío.
2. Lavar 2 veces con PBS.
3. Añadir 2 ml de tripsina 0.25% a cada plato de 10 cm ó 1 ml a cada plato de 6 cm e incubar a 37 °C por 5 minutos.

4. Agregar al menos un volumen de medio COS-7 para inactivar la tripsina y dispersar las células pipeteando suavemente.
5. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml (Corning #430790) y centrifugar 5 minutos a $220 \times g$.
6. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
7. Resuspender el pellet en 5 ml de medio STO. Tomar una alícuota de 10 μ l y contar el número de células en la cámara de Neubauer.
8. Sembrar 1×10^6 células en cada plato de 10 cm (Corning #430167) para mantener la línea, ó 4×10^5 células en cada plato de 35 mm (Corning #430165) o en cajas de 6 pozos (Costar #3506) para transfectar. En este último caso, utilizar medio sin antibiótico para evitar que las células se intoxiquen durante la transfección.

b. Transfección transitoria de células COS-7

La transfección transitoria de células COS-7 se llevó a cabo en cajas de 6 pozos o platos de 35 mm, por lipofección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen #11668-027), de acuerdo con las instrucciones del proveedor, las cuales se describen a continuación:

1. Un día antes de la transfección, sembrar 4×10^5 células en 2 ml de medio de crecimiento (DMEM + SFB 10%) sin antibióticos (penicilina, estreptomycin).
2. Para cada muestra preparar el complejo de transfección de la siguiente manera:
 - a. Diluir 4 μ g de DNA en 250 μ l de DMEM sin suero. Mezclar gentilmente.
 - b. Agitar suavemente la Lipofectamina antes de usarla. Después, diluir 8 μ l en 250 μ l de DMEM sin suero. Incubar por 4 minutos a temperatura ambiente.
 - c. Después de la incubación, mezclar suavemente el DNA y la Lipofectamina. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir los 500 μ l de mezcla a cada pozo. Dispersar la solución, moviendo la caja gentilmente en todas direcciones.
4. Incubar las células a 37°C y 5% de CO₂.
5. Cuatro horas después de la transfección, reemplazar el medio por medio de crecimiento sin antibióticos.
6. 24 horas después de la transfección, cambiar el medio por 2 ml de medio COS-7. Incubar a 37°C y 5% de CO₂. Se obtiene una eficiencia de transfección de ~70%.

7.2.2. Preparación de células alimentadoras

Las células ES empleadas se cultivaron sobre una capa de células alimentadoras que consistió en fibroblastos STO mitóticamente inactivados. Las células STO se mantuvieron y propagaron en platos de cultivo previamente gelatinizados. Para ello, los platos se cubrieron con una solución de gelatina al 0.1%, se incubaron a temperatura ambiente con la solución al menos 2 horas y, posteriormente, se aspiró la solución de gelatina.

a. Subcultivo de células STO

1. Aspirar el medio usando la bomba de vacío.
2. Lavar 2 veces con PBS.
3. Añadir 2 ml de tripsina 0.25% a cada plato de 10 cm ó 0.5 ml a cada plato de 6 cm (Corning #430166; NUNC #150288) e incubar a 37 °C por 3 minutos.
4. Agregar al menos un volumen de medio STO para inactivar la tripsina y dispersar las células pipeteando suavemente.
5. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml y centrifugar 5 minutos a 220 × g.
6. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
7. Resuspender el pellet en 5 ml de medio STO. Tomar una alícuota de 10 µl y contar el número de células en la cámara de Neubauer.
8. Sembrar 1 x 10⁶ células por cada plato de 10 cm previamente gelatinizado.

b. Inactivación mitótica de células STO

Las células alimentadoras se prepararon a partir de cultivos confluentes de células STO en platos de 10 cm. Para inactivarlas mitóticamente se utilizó mitomicina C (Roche #107409), una droga altamente tóxica, cuyo manejo requirió el uso de guantes de látex y cubrebocas.

Procedimiento

1. Añadir 200 µl de mitomicina C 50X (0.5 mg/ml en PBS) a cada plato de 10 cm. Mover el plato gentilmente para distribuir la droga lo mejor posible.
2. Incubar a 37°C por dos horas. Gelatinizar los platos suficientes para distribuir las células alimentadoras.
3. Después de la incubación, lavar 2 veces con PBS para eliminar la mitomicina.
4. Añadir 2 ml de tripsina 0.25% a cada plato e incubar a 37°C por 3 minutos.

5. Agregar al menos un volumen de medio STO para inactivar la tripsina y dispersar las células pipeteando suavemente.
6. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml y centrifugar 5 minutos a $220 \times g$.
7. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
8. Resuspender el pellet en 5 ml de medio STO. Tomar una alícuota de $10 \mu\text{l}$ y contar el número de células en la cámara de Neubauer.
9. Sembrar 1×10^6 células por cada plato de 6 cm ó 3×10^6 por cada plato de 10 cm, previamente gelatinizados. Bajo estas condiciones, las células alimentadoras pueden mantenerse hasta por una semana a 37°C y con 5% de CO_2 . Para ello, es necesario cambiar el medio periódicamente para evitar que se acidifique (se torna color amarillo) y revisarlas bajo el microscopio para asegurarse que la monocapa se encuentre en buenas condiciones.

7.2.3. Cultivo de células ES

Previo a cualquier manipulación (electroporación, inducción de diferenciación, etc.) las células ES empleadas se subcultivaron al menos una vez después de haberlas descongelado. Durante el tiempo de cultivo, las células se mantuvieron subconfluentes y se registraron diariamente bajo el microscopio para detectar cualquier diferenciación espontánea.

a. Subcultivo de células ES

1. Cambiar el medio 2-3 horas antes de subcultivar las células.
2. Aspirar el medio viejo usando la bomba de vacío.
3. Lavar 2 veces con PBS.
4. Añadir 0.5 ml de tripsina 0.25% a cada plato de 6 cm a 37°C por 10 minutos.
5. Agregar al menos un volumen de medio M15 para inactivar la tripsina y dispersar las células pipeteando suavemente.
6. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml y centrifugar 5 minutos a $220 \times g$.
7. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
8. Resuspender el pellet en 5 ml de medio M15. Tomar una alícuota de $10 \mu\text{l}$ y contar el número de células en la cámara de Neubauer.
9. Sembrar 5×10^5 células por cada plato de células alimentadoras de 6 cm.
10. Cambiar el medio diariamente para evitar que se acidifique (se torna color amarillo).

7.2.4. Electroporación de células ES

La transfección estable de las células AB2.2 se llevó a cabo mediante electroporación. En cada evento de electroporación se utilizaron 1×10^7 células (1 o 2 platos de 6 cm a densidad óptima) y 10 μg de DNA previamente linearizado. El plásmido CMV/CBA-SOD1^{A4V} se linearizó con *SspI* y los plásmidos CMV/CBA-SOD1^{WT}-EGFP y CMV/CBA-SOD1^{A4V}-EGFP con *Alw441*. Dado que el DNA debe estar limpio de compuestos orgánicos y sales, una vez linearizado, se extrajo una vez con un volumen de fenol/cloroformo y una vez con un volumen de cloroformo, se precipitó y se lavó 2 veces con etanol al 70%. Finalmente el pellet se secó al vacío y se resuspendió a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en buffer TE 0.1X estéril.

Procedimiento

1. Cambiar el medio a las células 2-3 horas antes de realizar la electroporación.
2. Tripsinizar la células en la forma habitual.
3. Resuspender el pellet de células en un volumen conocido de PBS. Tomar una alícuota de 10 μl y contar el número de células en la cámara de Neubauer.
4. Centrifugar 5 minutos a $220 \times g$.
5. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
6. Resuspender el pellet de células en el volumen de PBS requerido para obtener una densidad de 1.1×10^7 células/ml.
7. Colocar 10 μg del DNA linearizado sobre la pared interna de la celda de electroporación (Bio-Rad #165-2088)
8. Transferir 900 μl de la suspensión celular a la celda de electroporación y homogenizar con la solución de DNA pipeteando suavemente, sin hacer burbujas.
9. Colocar la celda en el electroporador (Bio-Rad) con el extensor de capacitancia y dar un pulso de 230V y 500 mF, presionando los dos botones simultáneamente. Este procedimiento se realiza rápidamente y a temperatura ambiente. La máquina muestra "Ch9", hace un tono cuando la electroporación está completa y despliega la constante de tiempo, cuya lectura debe ser entre 5.6 y 7.0.
10. Transferir el contenido de la celda a un tubo de 50 ml estéril (Corning #430828) con 20 ml de medio M15, resuspender y repartir la solución en 2 platos de 10 cm con células alimentadoras.
11. Incubar a 37°C con 5% de CO₂.

a. Selección

Después de crecer 24 horas las células electroporadas en medio M15, se inició la selección de las células que habían adquirido el vector. Para ello, se adicionó antibiótico en dosis letales para todas las células ES, excepto para aquellas que estuvieran expresando un gen que les proporcionara resistencia al agente de selección. Dado que los vectores utilizados proveían resistencia a neomicina, se utilizaron 300 µg/ml de G-418 (Gibco #10131-035). La selección tomó de 12 a 15 días.

Un día antes de que el proceso de selección se completara se prepararon platos de 96 pozos con fondo plano (Corning #3524) con células alimentadoras.

b. Aislamiento de colonias

Concluida la selección, se aislaron las colonias que se utilizarían para manipulaciones futuras. Se eligieron aquellas colonias que fueran ligeramente más pequeñas que la punta de un tip para pipeta de 20 µl y que tuvieran los bordes claramente definidos. En el caso de las células electroporadas con los plásmidos CMV/CBA-SOD1^{WT}-EGFP y CMV/CBA-SOD1^{A4V}-EGFP, se consideró, además, que las colonias fueran positivas a la fluorescencia.

Procedimiento

1. Inspeccionar las células bajo el microscopio y señalar con un marcador sobre la base de la caja las colonias ideales.
2. Ya en campana, lavar las células con PBS y añadir 7 ml de PBS al plato de 10 cm.
3. Con el tip de la pipeta de 20 µl colocada en 10 µl, trazar un pequeño círculo alrededor de la colonia y raspar cuidadosamente desde la periferia hacia el centro para desprender la colonia del plato.
4. Aspirar la colonia en un solo movimiento y colocarla en un pozo de una caja de 96 pozos con fondo de U (Costar #3799).
5. Realizar el mismo procedimiento (pasos 3-5) con el resto de las colonias.
6. Tripsinizar las colonias con 50 µl de tripsina 0.25%, incubando 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂.
7. Durante la incubación, reemplazar el medio de cultivo de una caja de 96 pozos con células alimentadoras por medio M15 (50 µl por pozo).
8. Detener la tripsinización añadiendo 100 µl de medio M15 a cada pozo del plato con tripsina. Dispersar las colonias mecánicamente pipeteando suavemente.

9. Transferir los 150 μl de suspensión celular a la caja de 96 pozos con células alimentadoras. Incubar a 37°C y 5% de CO_2 .
10. Cambiar el medio diariamente.

c. Expansión de colonias

Una vez que las células ES en los platos de 96 pozos alcanzaron 70% de confluencia se subcultivaron a platos de 24 pozos (Corning #3524) con células alimentadoras y de éstos, a cajas de 6 cm.

Procedimiento

1. Cambiar el medio 2-3 horas antes de subcultivar las células.
2. Lavar las células con 100 μl de PBS.
3. Añadir 50 μl de tripsina al 25% e incubar 5 minutos a 37°C y 5% de CO_2 .
4. Durante la incubación, reemplazar el medio de cultivo de una caja de 24 pozos con células alimentadoras por medio M15.
5. Detener la tripsinización añadiendo 50 μl de medio M15 y pipetear para obtener una suspensión homogénea. Transferir los 100 μl de suspensión a la caja de 24 pozos.
6. Incubar a 37°C y 5% de CO_2 . Cambiar el medio diariamente.
7. Cuando las células hayan alcanzado 70% de confluencia, subcultivarlas a platos de 6 cm con células alimentadoras. Para ello, seguir los pasos 1-5, aumentando la cantidad de PBS de los lavados a 500 μl y el volumen de tripsina y de medio M15 utilizado para detener la tripsinización a 200 μl .

Una vez que las células en las cajas de 6 cm alcanzaron una densidad adecuada, cada caja se tripsinizó y las células se resuspendieron en 1 ml de medio M15. Posteriormente, la mitad de la suspensión celular se congeló, añadiendo previamente 500 μl de medio de congelación 2X, y el resto se utilizó para hacer extractos de proteína (ver más adelante).

7.2.5. Mantenimiento y almacenaje de líneas celulares

a. Congelación de células

1. Tripsinizar las células en la forma habitual. Para el caso de las células ES, cambiar el medio 2-3 horas antes.

2. Resuspender el pellet de células en una cantidad conocida del medio correspondiente. Tomar una alícuota de 10 μ l y contar el número de células en la cámara de Neubauer.
3. Centrifugar 5 minutos a 220 \times g.
4. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
5. Resuspender el pellet de células en la mitad del volumen de medio requerido para obtener una densidad de (5-10) \times 10⁶ células/ml.
6. Agregar gradualmente por la pared del tubo o por goteo un volumen de medio de congelación 2X, mezclando constantemente la suspensión celular.
7. Alicuotar rápidamente en viales de congelación (Corning #2028), colocando 1 ml de la suspensión celular por vial.
8. Marcar cada vial con el nombre de la línea celular, número de pase, cantidad de células y fecha.
9. Congelar a -70°C . Transferir al tanque de nitrógeno líquido para su almacenaje.

b. Descongelación de células

1. Sacar el vial de células congeladas del tanque de nitrógeno líquido y transferirlo a un baño de agua a 37°C . La descongelación toma 1-2 minutos.
2. Transferir la suspensión celular a un tubo estéril de 15 ml. Añadir gradualmente por la pared del tubo o por goteo 5 ml del medio correspondiente, agitando constantemente el tubo durante la adición.
3. Centrifugar 5 minutos a 220 \times g.
4. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
5. Resuspender el pellet de células en 5 ml del medio correspondiente. Tomar una alícuota de 10 μ l y registrar la viabilidad celular en la cámara de Neubauer utilizando azul de tripano (GIBCO #15250-061) como colorante vital.
6. Sembrar las células en las condiciones apropiadas según el tipo celular:
 - >1 \times 10⁶ células COS-7 en una caja de 6 cm
 - >0.5 \times 10⁶ células STO en una caja de 6 cm previamente gelatinizada
 - >1 \times 10⁶ células ES en una caja con de 6 cm con células alimentadoras
7. Cambiar el medio al día siguiente para eliminar células muertas.

7.3. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS ES

El protocolo empleado para inducir la diferenciación de células ES hacia el fenotipo motoneuronal está basado en el trabajo de Wichterle *et al.* (2002). Este protocolo involucra la formación de cuerpos embrionarios y, subsecuentemente, el tratamiento de estos agregados con factores inductores.

7.3.1. Formación de cuerpos embrionarios (EBs)

Antes de iniciar la formación de cuerpos embrionarios es recomendable disminuir la proporción de células alimentadoras en los cultivos de células ES. Para este fin, las células ES se subcultivaron de la manera habitual y se sembraron 1×10^6 células en un plato de 6 cm previamente gelatinizado, sin células alimentadoras y con medio M15 suplementado con 1000 U/ml de LIF (Chemicon #LIF2010) para evitar la diferenciación celular. El cultivo se mantuvo en estas condiciones por 3 o 4 días, cambiando el medio diariamente.

Posteriormente, para promover la formación de los agregados, las células ES se cultivaron en suspensión. Para ello, se desprendieron el sustrato mediante un tratamiento con tripsina 0.25% y se sembraron $(1-1.5) \times 10^4$ células/cm² en platos bacteriológicos o en los pozos de una caja de adherencia ultra baja (Costar #3471) con medio DFK5.

7.3.2. Diferenciación al fenotipo motoneuronal

1. Iniciar la formación de cuerpos embrionarios, sembrando las células ES en suspensión con medio DFK5.
2. Después de dos días de cultivo, cambiar el medio de los EBs por medio DFK5 suplementado con ácido retinóico 2 μ M (Sigma #R2625) y agonista de Sonic hedgehog (Hh-Ag1.3) (Curis Inc.) 1 μ M. Para ello:
 - a. Transferir el cultivo a un tubo estéril de 15 ml.
 - b. Dejar reposar verticalmente, hasta que los EBs precipiten en el fondo del tubo (5 minutos aprox.)
 - c. Aspirar el medio usando la bomba de vacío.
 - d. Añadir el medio de cultivo fresco y resuspender moviendo el tubo gentilmente.
 - e. Vaciar los EBs al plato en el que estaban originalmente.
3. Mantener los EBs en tratamiento con RA y Hh-Ag1.3 durante cinco días, cambiando el medio el tercer día del tratamiento.

Una vez concluidos los 5 días de tratamiento, los EBs se cultivaron sobre una monocapa de células alimentadoras en cajas de 4 pozos (2cm²) (NUNC #177437) con medio DFK5 suplementado con 10% de SFB (DFK5 + 10). Se emplearon dos paradigmas de cocultivo, en uno los EBs se sembraron íntegros, y en el otro, se disociaron previamente para platear una suspensión celular. En este último caso se empleó el siguiente protocolo:

1. Transferir los EBs con la micropipeta de 1 ml a un tubo de 15 ml con 5 ml de PBS.
2. Dejar reposar verticalmente, hasta que los EBs precipiten en el fondo del tubo.
3. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
4. Lavar una vez con PBS para eliminar los restos de medio.
5. Añadir 500 µl de tripsina 0.25% e incubar 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂.
6. Disociar los agregados pipeteando suavemente (5-10 veces).
7. Dejar reposar verticalmente, hasta que los agregados restantes sedimenten.
8. Transferir 400 µl del sobrenadante (que contiene las células disociadas) a un tubo estéril de 15 ml con 2 ml de medio DFK5 + 10.
9. Añadir 400 µl de tripsina 0.25% al pellet de EBs, incubar 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂ y repetir la disociación.
10. Recuperar las células disociadas y transferirlas al tubo con medio. De ser necesario, la disociación se puede repetir una vez más, pero el tiempo total de tripsinización no debe exceder 20 minutos.
11. Centrifugar la suspensión celular recuperada 5 minutos a 220 × g.
12. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
13. Resuspender el pellet en 1 ml de medio DFK5 + 10. Tomar una alícuota de 10 µl y contar el número de células en la cámara de Neubauer.
14. Sembrar 1.5 x 10⁵ células en cada pozo de 2 cm² con células alimentadoras. Incubar a 37°C y 5% de CO₂.

Transcurridos dos días después de haber sembrando las células, se les añadió Ara-C (Sigma #C1768) a una concentración final de 10µM para detener la división celular. Dos días más tarde y, posteriormente, cada 5 días, se reemplazó la mitad del medio por medio DFK5 + 10 fresco.

7.4. WESTERN BLOTS Y GELES DE ACTIVIDAD

Los niveles de expresión de SOD1 en las células COS-7 transfectadas y en las clonas de células AB2.2 seleccionadas después de la electroporación, se evaluaron mediante análisis

tipo western blot a partir de extractos de proteína citosólica derivados de estas células. Para ello, se utilizó un anticuerpo policlonal anti-SOD1 (1:1000) (The Binding Site, Birmingham) y posteriormente un anticuerpo anti-oveja IgG acoplado a fosfatasa alcalina (1:1000) (Zymed, San Francisco, CA). Además, a partir de los extractos derivados de las células COS-7 se realizaron ensayos de actividad de SOD en geles de acrilamida (Beauchamp y Fridovich, 1971).

7.4.1. Extractos de proteína

1. Tripsinizar las células en la forma habitual.
2. Lavar el pellet de células con PBS.
3. Agregar un volumen de buffer de lisis igual al volumen del pellet de células.
4. Colocar las células en hielo y lisarlas por sonicación (tres ciclos de 10 segundos a 30% de amplitud) (Ultrasonic Processor, Sonios & Materials, Inc).
5. Centrifugar a $17500 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Recuperar el sobrenadante.
6. Determinar la concentración de proteínas en el espectrofotómetro mediante una curva Bradford.

7.4.2. SDS-PAGE (electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes)

1. Preparar un gel desnaturizante de poliacrilamida:

	Resolving gel (11%)	Resolving gel (15%)	Stacking gel (4%)
H ₂ O	1.85 ml	2.4 ml	1.22 ml
Acilamida/Bis (30% T, 2.67% C)	1.85 ml	5 ml	260 μl
Buffer*	1.25 ml	2.5 ml	500 μl
SDS 10%	50 μl	100 μl	20 μl
Persulfato de amonio 10%	50 μl	40 μl	10 μl
TEMED	5 μl	5 μl	2 μl
Total	5.0 ml	10 ml	2.0 ml

* Resolving gel: Tris-HCl 1.5M, pH 8.8. Staking gel: Tris-HCl 0.5M, pH 6.8

2. Agregar buffer de carga a 50 μg de cada muestra (el volumen final no debe exceder 20 μl), calentar a 95°C por 4 minutos y cargar en el gel.
3. Correr el gel a 100-200 V hasta que el colorante llegue al final.
4. Sacar el gel de los cristales con ayuda de una espátula.

7.4.3. Western blots para SOD1

1. Correr el gel de proteína.
2. Transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en la cámara Mini Trans-Blot (Bio-Rad) 1 hora a 100 V, 350 mA, o 12 horas a 30 V, 90 mA.
 - a. Preparar el buffer de transferencia y enfriarlo a 4°C.
 - b. Cortar la membrana de nitrocelulosa de acuerdo con las dimensiones del gel. Utilizar guantes al manipular la membrana.
 - c. Equilibrar el gel y sumergir la membrana, el papel filtro y las fibras en buffer de transferencia por 15 minutos.
 - d. Preparar el “sándwich” de transferencia:
 - Poner el cassette, con la superficie gris hacia abajo, sobre una superficie limpia.
 - Colocar sobre la superficie gris del cassette una fibra, enseguida una hoja de papel filtro, el gel previamente equilibrado y sobre éste la membrana pre-humedecida. Encima, colocar otra hoja de papel filtro y otra fibra.
 - Eliminar cualquier burbuja de aire que se haya formado.
 - e. Cerrar el cassette firmemente y colocarlo dentro del módulo.
 - f. Colocar la unidad de enfriamiento previamente congelada y el módulo con los cassettes en la cámara. Llenar completamente el tanque con buffer de transferencia.
 - g. Colocar una mosca magnética en el interior del tanque y ponerlo sobre un agitador para mantener la temperatura y distribución iónica del buffer.
 - h. Conectar los electrodos a la fuente de poder y transferir, preferentemente a 4°C.
3. Terminada la transferencia, lavar la membrana con agua 2 veces.
4. Lavar con TBST.
5. Bloquear con una solución de leche al 5% en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente, o 12 horas a 4°C.
6. Incubar con el anticuerpo primario (anti-SOD1 1:1000 en leche al 5% en TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente, o 12 horas a 4 °C.
7. Lavar con TBST 10 minutos 3 veces.
8. Incubar con el anticuerpo secundario (anti-oveja acoplado a fosfatasa alcalina 1:1000 en leche al 5% en TBST) durante 2 horas a 4 °C.
9. Lavar con TBST durante 5 minutos dos veces.
10. Lavar con DIG3.

11. Revelar con DIG3 + NBT (3.37 μ l/ml) + BCIP (3.5 μ l/ml). Detener la reacción en cuanto aparezcan las bandas.
12. Lavar con agua y dejar secar sobre papel filtro.

7.4.4. Geles de actividad de superóxido dismutasa

1. Preparar un gel nativo de poliacrilamida:

	Resolving gel (8%)	Stacking gel (5%)
H ₂ O	2.7 ml	1.26 ml
Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C)	1.3 ml	260 μ l
Tris 2M pH 8.9	1 ml	400 μ l
Persulfato de amonio 10%	25 μ l	12 μ l
TEMED	10 μ l	4 μ l
Total	5.0 ml	2.0 ml

2. Cargar 150 μ g de proteína de cada muestra, previamente mezclados con buffer de carga. Como control positivo pueden utilizarse 100 μ g de extracto proteico de hígado de ratón.
3. Correr el gel a 120V hasta que el colorante salga por el extremo inferior.
4. Sacar el gel de los cristales con ayuda de agua del grifo y una espátula. Mantenerlo en agua.
5. En el cuarto oscuro, preparar las soluciones 1 y 2 (ver anexo) por separado.
6. Desechar el agua en la que se encuentra el gel y adicionar las dos soluciones simultáneamente en la obscuridad. Incubar con agitación suave durante 40 minutos.
7. Revelar exponiendo el gel al transiluminador hasta ver las bandas (30 minutos aproximadamente).
8. Una vez expuesto, lavar el gel con agua y fijarlo con metanol 5% y formaldehído 5% en H₂O.

7.5. INMUNOCITOQUÍMICA

Sobre los cultivos obtenidos después de haber aplicado el protocolo de diferenciación motoneuronal en células ES, se realizaron técnicas de inmunocitoquímica para detectar la presencia de neuronas (Tubulina β III y NeuN) y motoneuronas (Islet1/2).

Para facilitar el análisis cuantitativo de las motoneuronas presentes en los cultivos, se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal, o utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE300) y una cámara digital (CoolSNAP RS, Photometrics).

Tabla 2. Anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Especie hospedera	Dilución	Fuente
Anti-Tub β III	Conejo	1:2000	Covance (Berkley, CA)
Anti-Isl1/2	Ratón	1:1	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, IA)
Anti-NeuN	Ratón	1:100	Chemicon (Temecula, CA)

Tabla 3. Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Dilución	Fuente
Alexa Fluor 488 Cabra anti-conejo IgG	1:1000	Molecular Probes (Eugene, OR)
Alexa Fluor 488 Cabra anti-ratón IgG	1:1000	Molecular Probes (Eugene, OR)
Alexa Fluor 594 Cabra anti-ratón IgG	1:500	Molecular Probes (Eugene, OR)

Procedimiento

1. Retirar el medio de cultivo utilizando la bomba de vacío.
2. Lavar 2 veces con PBS.
3. Fijar las células con 200 μ l de PFA 4% por 10 minutos.
4. Lavar 3 veces con PBS.
5. Permeabilizar con 200 μ l Tritón X-100 1% en PBS durante 5 minutos.
6. Lavar 2 veces con PBS.
7. Incubar con solución de bloqueo (SS 10% y Tritón X-100 0.2% en PBS) durante 30 minutos.
8. Incubar con el anticuerpo primario:
 - a) Anti-Tubulina β III o anti-NeuN. Realizar la dilución correspondiente en 200 μ l de solución de bloqueo e incubar 1 hora.
 - b) Anti-Isl1/2. Añadir 10 μ l de una mezcla de los dos anticuerpos (39.4D5 y 40.2D6, en una relación 1:1), cubrir el pozo con un círculo de parafilm para distribuir homogéneamente la solución sobre toda la muestra e incubar 1 hora 30 minutos en cámara húmeda.
9. Lavar 3 veces con PBS.

10. Incubar con el anticuerpo secundario durante 30 minutos en agitación. Realizar la dilución correspondiente en 200 μ l de una solución de SS 10% y Tritón X-100 1% en PBS.
11. Lavar 3 veces con PBS.
12. Teñir los núcleos con DAPI (Molecular Probes #D-1306) o yoduro de propidio (YP) (0.2 μ g/ml) por 2 minutos.
13. Lavar una vez con PBS y agregar unas gotas de solución de montaje.

7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El número total de células en los cultivos a los 4 y 20 días post-inducción (dpi) se calculó a través del conteo de células viables (con azul de tripano) en la cámara de Neubauer. Para obtener el porcentaje de células Isl1/2⁺ se analizaron 6 campos por pozo de 2 cm² (aproximadamente 850 células).

Para evaluar si había diferencias significativas en el número total de células y el porcentaje de células Isl1/2⁺ entre los cultivos derivados de las diferentes líneas de células ES (AB2.2, WTF1, WTF10, A4V2 y A4VF3) se realizaron análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la prueba *post hoc* de Tukey. El número total de células para cada línea a los 4 y 20 dpi se comparó mediante una prueba de *t*. Para ello, se utilizó el programa GraphPad Prism versión 4.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, www.graphpad.com). Todos los datos cuantitativos representan la media \pm desviación estándar (D.E.) de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

8. RESULTADOS

8.1. GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE SOD1

Con la finalidad de lograr la expresión constitutiva de SOD1 humana en células ES y en neuronas derivadas de estas células, se generaron vectores de expresión de esta enzima bajo el control del promotor CMV/CBA. Para ello, se reemplazaron las secuencias promotoras de los plásmidos pcDNA3-SOD1^{A4V}, pEGFP-C2-SOD1^{WT} y pEGFP-C2-SOD1^{A4V} por el promotor CMV/CBA, dando lugar a los vectores CMV/CBA-SOD1^{A4V} (Fig. 8), CMV/CBA-SOD1^{WT}-EGFP y CMV/CBA-SOD1^{A4V}-EGFP (Fig. 9), respectivamente.

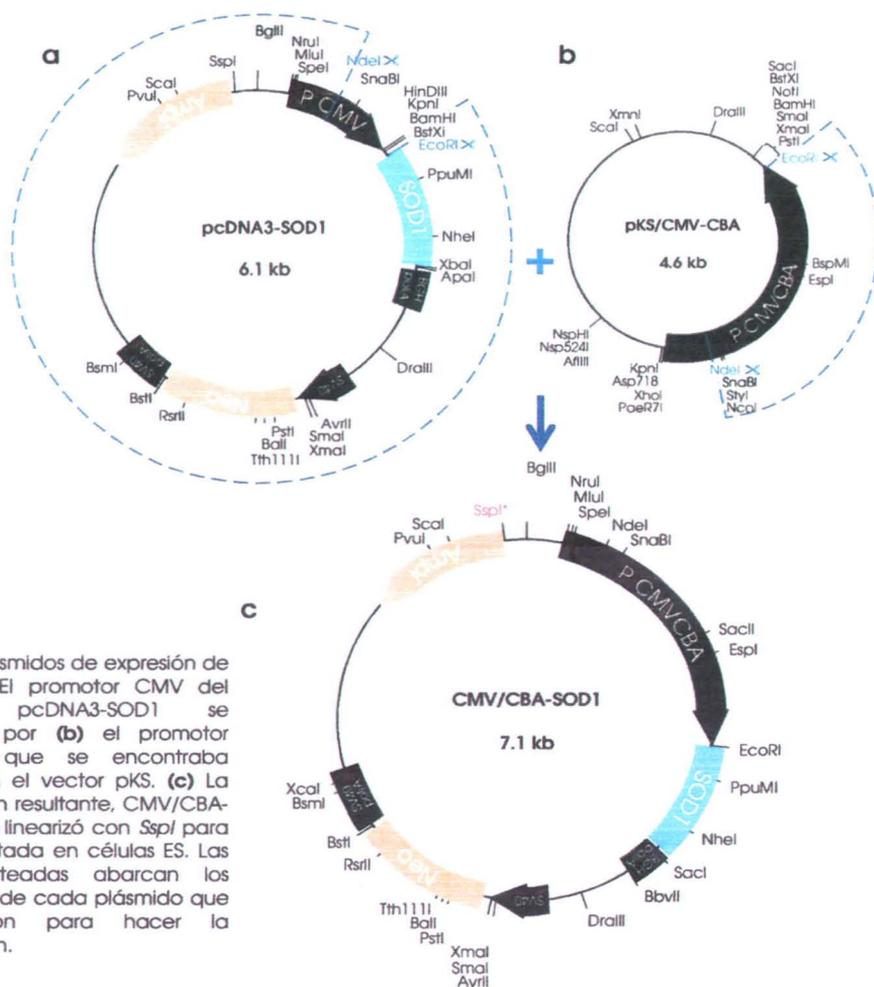


Figura 8. Plásmidos de expresión de SOD1. **(a)** El promotor CMV del plásmido pcDNA3-SOD1 se reemplazó por **(b)** el promotor CMV/CBA que se encontraba clonado en el vector pKS. **(c)** La construcción resultante, CMV/CBA-SOD1^{A4V}, se linealizó con *SspI* para ser transfectada en células ES. Las líneas punteadas abarcan los fragmentos de cada plásmido que se tomaron para hacer la construcción.

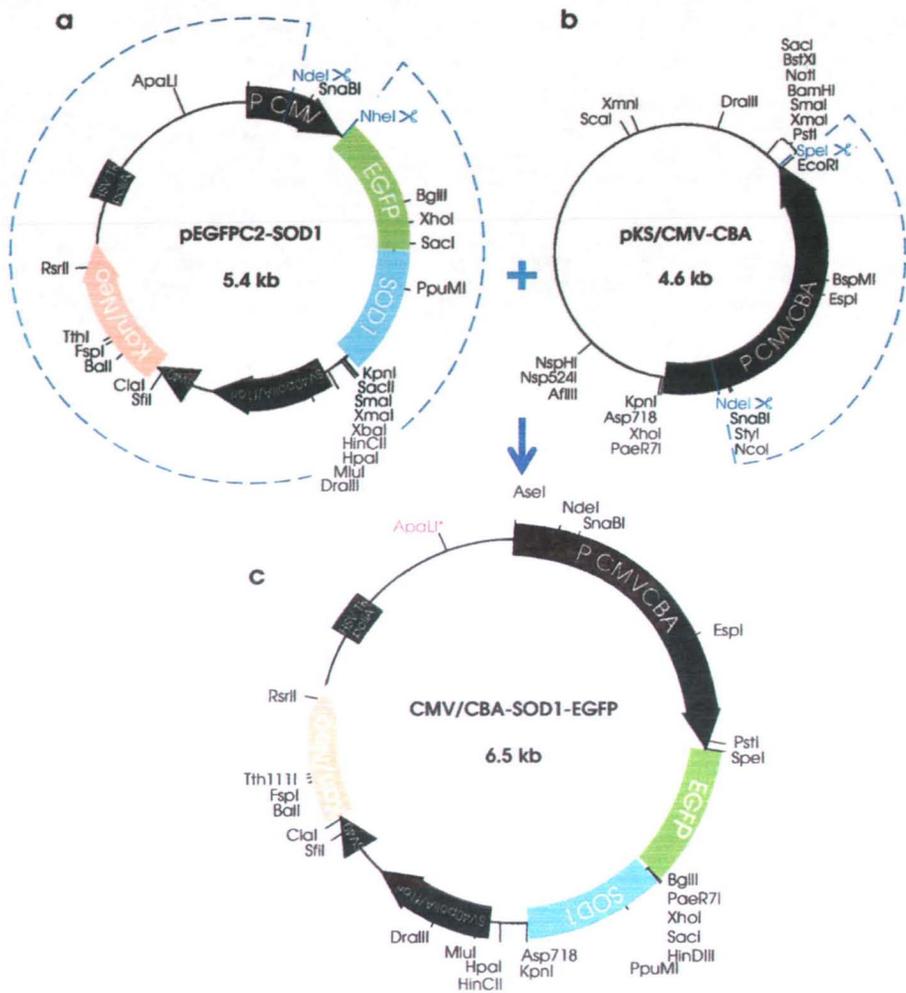


Figura 9. Plásmidos de expresión de SOD1-EGFP. **(a)** El promotor CMV del plásmido pEGFPC2-SOD1 se reemplazó por **(b)** el promotor CMV/CBA que se encontraba clonado en el vector pKS. **(c)** La construcción resultante, CMV/CBA-SOD1^{ΔV}, se linealizó con *Alw441* (=ApaI) para su transfección estable en células ES. Las líneas punteadas abarcan los fragmentos de cada plásmido que se tomaron para hacer la construcción.

La funcionalidad de las construcciones generadas se verificó mediante su transfección transitoria en células de mono COS-7. Transcurridas 48 horas después de la transfección, se examinaron los cultivos con un microscopio invertido de fluorescencia. Se observó que aproximadamente el 70% de las células lipofectadas con los vectores que codifican para SOD1-EGFP eran EGFP⁺.

La expresión transitoria de SOD1^{WT}-EGFP en células COS-7 produjo una señal fluorescente distribuida homogéneamente en todo el citoplasma; en contraste, la expresión de SOD1^{A4V}-EGFP indujo un señal heterogénea y más localizada, indicando que la enzima mutante había formado agregados (Fig. 10).

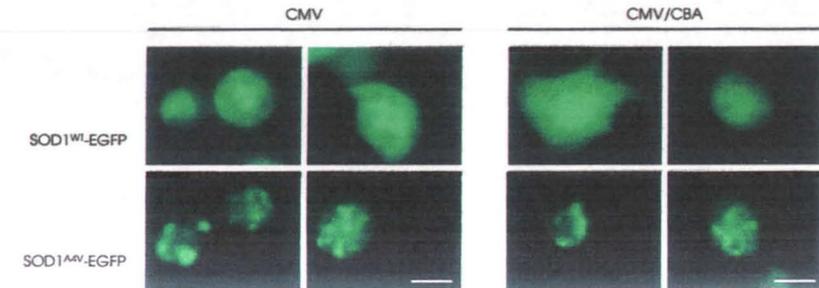


Figura 10. Expresión transitoria de SOD1-EGFP en células COS-7. La expresión de SOD1^{WT}-EGFP genera una señal fluorescente distribuida homogéneamente en el citoplasma celular, mientras que la expresión de SOD1^{A4V}-EGFP induce la formación de agregados. Barra de escala 20 μ m.

Análisis de western blot realizados a partir de extractos de proteína de las células COS-7 transfectadas, confirmaron la expresión de SOD1 humana (hSOD1) sobre una banda de fondo de \sim 12 kDa correspondiente a la enzima endógena (mSOD1) (Fig. 11a).

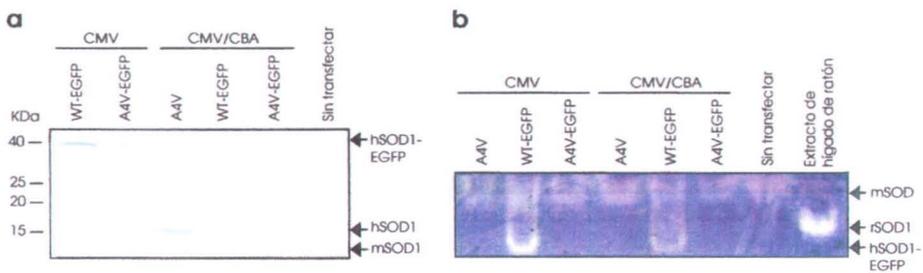


Figura 11. Niveles de expresión y de actividad de SOD1 en células COS-7. Cultivos confluentes de células COS-7 se transfectaron transitoriamente con vectores de expresión de SOD1 bajo el control de los promotores CMV o CMV/CBA; después de 48 horas las células se lisaron y se obtuvo un extracto de proteína. **(a)** 50 μ g de cada extracto de proteína se fraccionaron por SDS/PAGE en gels al 11% y se analizaron mediante western blot con un anticuerpo policlonal anti-SOD1. **(b)** 150 μ g de cada extracto de proteína se utilizaron para analizar la actividad de SOD1 en gels nativos al 8%. hSOD1=SOD1 humana; mSOD1=SOD1 de mono; rSOD1=SOD1 de ratón.

En el caso de las células transfectadas con el vector CMV/CBA-SOD1^{A4V} se detectó, además de la enzima endógena, una única banda de ~15 kDa, correspondiente a la forma monomérica de SOD1^{A4V}. Mientras que en las células lipofectadas con los vectores que codifican para SOD1^{WT}-EGFP y SOD1^{A4V}-EGFP se observó una banda principal de ~40 kDa que correspondía al monómero de la proteína de fusión SOD1-EGFP, así como otras bandas más débiles y de menor peso (~15, ~20, ~25 y ~35 kDa), que indicaban la presencia de posibles productos de degradación.

Finalmente, con los extractos de proteína derivados de las células transfectadas, se realizó un ensayo de actividad de SOD en geles de acrilamida. Una de las finalidades de este ensayo era determinar si en la fusión de SOD1 a EGFP la actividad enzimática de la SOD1 se mantiene. Se observó que la proteína de fusión SOD1^{WT}-EGFP mantiene actividad significativa de superóxido dismutasa. En ningún caso se detectó actividad para la enzima SOD1^{A4V} (Fig. 11b).

8.2. ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS DE CÉLULAS ES QUE EXPRESEN SOD1

Una vez verificada la funcionalidad de los vectores de expresión generados, se procedió con el segundo objetivo de este trabajo, la obtención de líneas de células ES murinas que expresen de forma estable y constitutiva la enzima SOD1 humana silvestre o su forma mutante A4V.

Los plásmidos de expresión CMV/CBA-SOD1^{A4V}, CMV/CBA-SOD1^{WT}-EGFP y CMV/CBA-SOD1^{A4V}-EGFP previamente linearizados se introdujeron en células AB2.2 por electroporación, obteniendo varias clonas (233±2.64 D.E. en tres experimentos de electroporación) de células ES resistentes a G418. Para cada construcción, se aislaron 24 clonas resistentes a G418 y se expandieron para analizar los niveles de expresión de SOD1. En el caso de las clonas obtenidas de la transfección de los plásmidos CMV/CBA-SOD1^{WT}-EGFP y CMV/CBA-SOD1^{A4V}-EGFP se eligieron clonas que mostraran expresión de EGFP. En lo que se refiere al vector CMV/CBA-SOD1^{A4V}, la selección fue al azar.

Después de un primer análisis por western blot, se eligieron varias clonas de células ES con niveles similares de expresión de SOD1. Las clonas que expresaban SOD1^{WT}-EGFP y SOD1^{A4V}-EGFP se expandieron y se analizaron bajo el microscopio de fluorescencia para seleccionar aquellas en las que las colonias presentaran una expresión homogénea de EGFP. Posteriormente, con el fin de verificar que la expresión de la hSOD1 en las clonas seleccionadas fuera constitutiva, se indujo la formación de EBs. Los EBs se mantuvieron en cultivo por 5 días y al final de ese periodo se escogieron las clonas a partir

de las cuales se desarrollaron EBs que conservaron durante todo su desarrollo un patrón de expresión homogéneo de EGFP. Con base en lo anterior, se eligieron las clonas WTF1, WTF10 (CMV/CBA-SOD1^{WT}-EGFP) y A4VF3 (CMV/CBA-SOD1^{A4V}-EGFP) para realizar los experimentos subsecuentes (Figs.12 y 13).

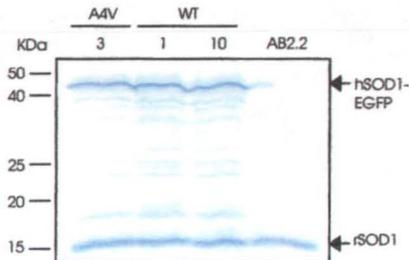


Figura 12. Clonas seleccionadas de células ES con expresión estable de hSOD1. Después de dos días de cultivo sobre células alimentadoras, las clonas seleccionadas se expandieron en cajas de cultivo cubiertas con gelatina, sin células alimentadoras y con medio suplementado con LIF. Los niveles de expresión de SOD1 se verificaron mediante análisis western blot de extractos de proteína derivados de estos cultivos. hSOD1=SOD1 humana; rSOD1=SOD1 murina.

En el caso de las clonas seleccionadas después de la electroporación con el vector CMV/CBA-SOD1^{A4V}, no fue posible detectar la expresión de la enzima mutante mediante western blot, debido a que su peso molecular es igual al de la enzima endógena y el anticuerpo empleado reconoce a ambas. No obstante, dado que presentaba un fenotipo similar a la A4VF3 (ver más adelante), lo que sugería que expresaba cantidades suficientes de SOD1^{A4V} (dato a confirmar mediante RT-PCR), se seleccionó también la clona A4V2.

Durante la expansión de la línea AB2.2 y las clonas seleccionadas, se observó que mientras que las células AB2.2 y las que expresan hSOD1^{WT} forman colonias compactas, con los límites redondeados y bien definidos, las células que expresan hSOD1^{A4V} se desarrollan en colonias extendidas con bordes irregulares. Estas diferencias se perciben más fácil cuando las células crecen sobre cajas de cultivo sin células alimentadoras y con medio M15 suplementado con LIF, se acentúan conforme transcurre el tiempo de cultivo y son más marcadas cuando el cultivo casi ha llegado a confluencia (Fig. 14).

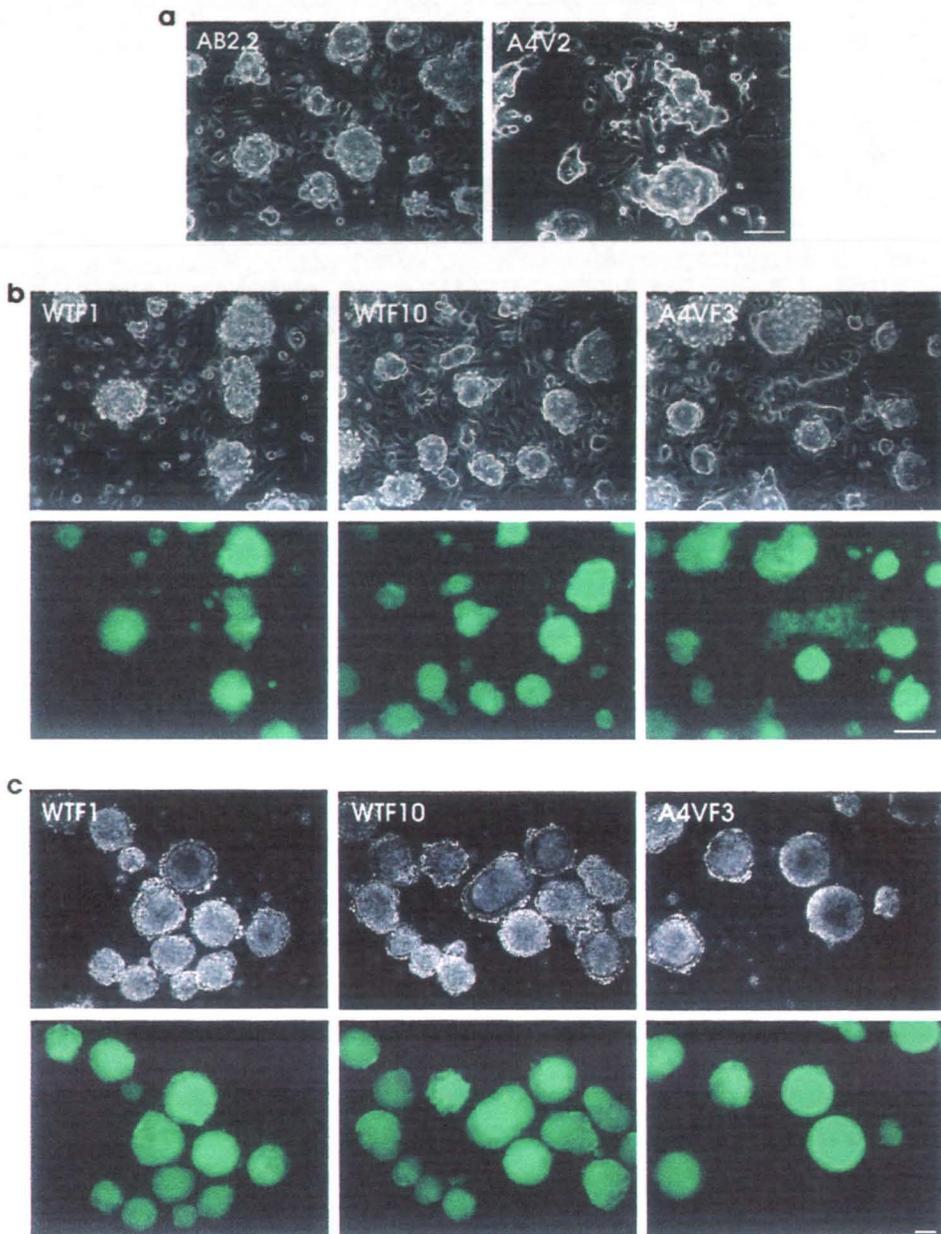


Figura 13. Células ES silvestres (AB2.2) y clones seleccionadas con expresión estable de hSOD1. **(a)** y **(b)** Células indiferenciadas a los 2 días de cultivo. **(c)** Cuerpos embrionarios de 3 días de desarrollo. Las imágenes de fluorescencia muestran la expresión constitutiva de EGFP-SOD1. Barras de escala 100 μm .

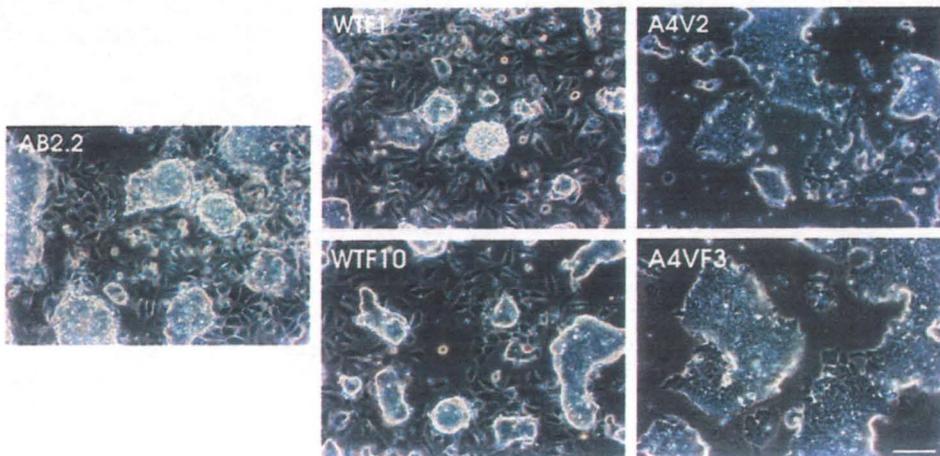


Figura 14. Morfología de colonias de clonas seleccionadas de células ES con expresión estable de hSOD1. Transcurridos cuatro días de cultivo en cajas con gelatina, sin células alimentadoras y con medio suplementado con LIF, se observan diferencias en la morfología de las colonias de células que expresan SOD1^{A4V} con respecto a las de células silvestres. Barra de escala 100 μm .

8.3. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS ES AL FENOTIPO MOTONEURONAL

El tercer objetivo de este trabajo fue llevar a cabo la diferenciación de células ES al fenotipo motoneuronal. Para ello, se recurrió al protocolo establecido por Wichterle *et al.* (2002), el cual involucra el cultivo de células ES en suspensión por 2 días para inducir la formación de EBs, y posteriormente, el tratamiento de estos agregados con RA y Shh durante 5 días (ver detalles en la sección de Métodos).

Concluido el protocolo de diferenciación, las células se cultivaron nuevamente en condiciones de adhesión. Inicialmente, se emplearon dos paradigmas de cultivo: en uno, los EBs se sembraron íntegros, y en el otro, se disociaron previamente. En ambos casos, se observó que después de un día de cultivo, gran parte de las células tratadas habían extendido neuritas largas y expresaban el marcador neuronal Tub β III. Una subpoblación de las células Tub β III⁺, expresaba también el marcador motoneuronal Islet1/2 (Fig. 15).

Tomando en cuenta los objetivos de este trabajo, se encontró que la disociación de los EBs previa al plating, tenía algunas ventajas sobre la siembra de los EBs íntegros. Las neuronas quedaban más extendidas y separadas entre sí, lo que facilitaba los conteos y resultaba más adecuado para analizar deterioro y muerte neuronal, incluso a nivel de células individuales. Dado lo anterior, se optó por incluir la disociación de EBs para los estudios siguientes.

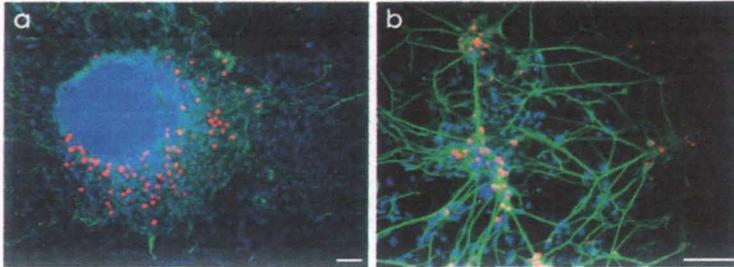
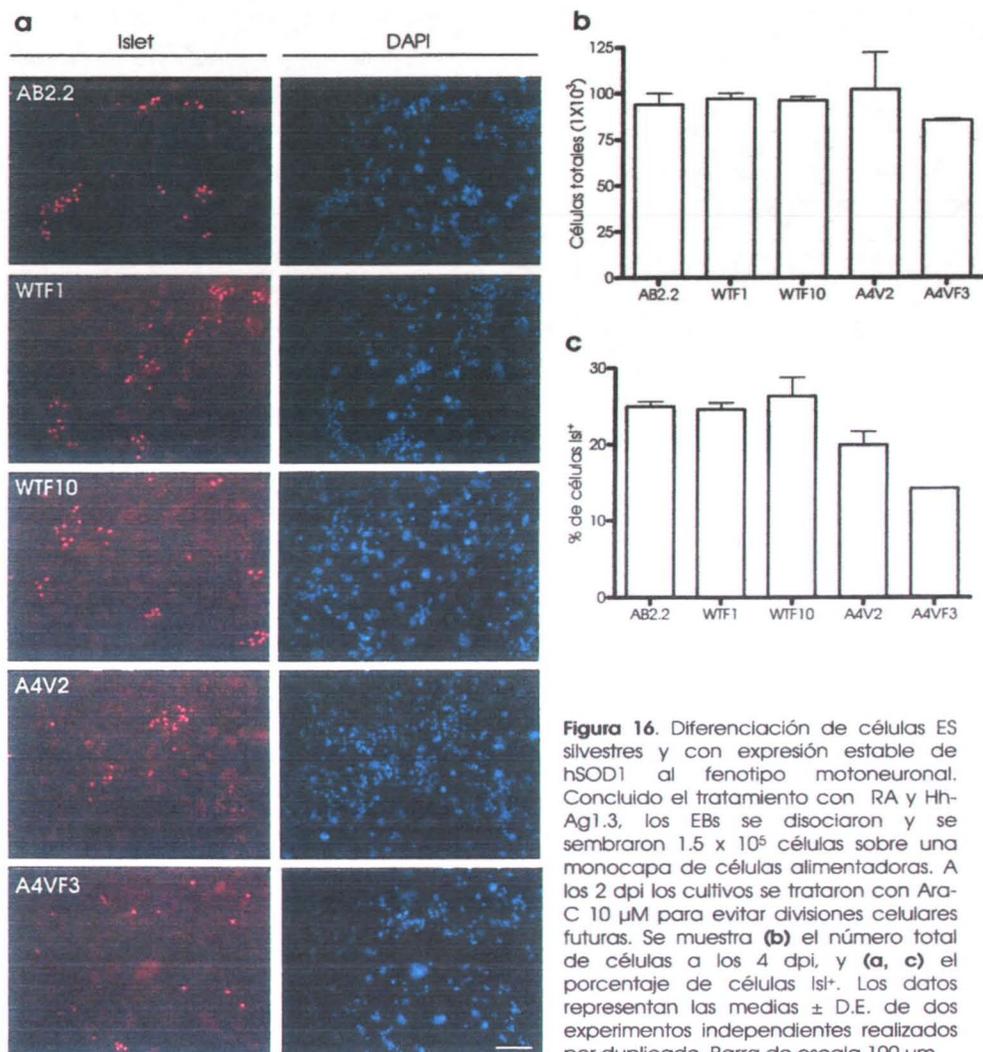


Figura 15. Las células AB2.2 tratadas con RA y Hh-Ag1.3 expresan el marcador neuronal Tub β III (verde) y el marcador motoneuronal Isl1/2 (rojo). Después de 5 días de tratamiento, los cuerpos embrionarios, íntegros (**a**) o disociados (**b**), se platearon sobre una monocapa de células alimentadoras. Transcurrido 1 día de cocultivo se observa que las células tratadas han extendido extensas neuritas. Barra de escala 100 μ m.

8.4. SUSCEPTIBILIDAD DE MOTONEURONAS DERIVADAS DE CÉLULAS ES A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR FALS-SOD1

Para analizar el efecto de la expresión de la enzima SOD1^{A4V} en neuronas motoras, se aplicó el protocolo de diferenciación de células ES al fenotipo motoneuronal en las líneas WTF1, WTF10, A4V2 y A4VF3, así como en células AB2.2 silvestres. Concluido el tratamiento con RA y Hh-Ag1.3, se sembraron 1.5×10^5 células por pozo de 2 cm² sobre una monocapa de células alimentadoras (fibroblastos STO mitóticamente inactivados). Posteriormente, se realizaron conteos del número total de células y del porcentaje de motoneuronas. Esto último, mediante la identificación por inmunocitoquímica de células positivas para el marcador Isl1/2.

Se encontró que a los 4 días post-inducción, sin haber diferencias en el número total de células ($p = 0.8$), el porcentaje de motoneuronas en los cultivos derivados de las líneas de células ES que expresan SOD1^{A4V} era significativamente menor en relación al de los cultivos derivados de células silvestres y de aquellas que expresan SOD1^{WT} ($p = 0.02$) (Fig. 16).



Adicionalmente, se evaluó la estabilidad general de los cultivos. Se observó que bajo las condiciones empleadas, los cultivos de motoneuronas derivados de las células AB2.2 y de las que expresan SOD1^{WT} se mantienen en buenas condiciones hasta por tres semanas, sin haber cambios significativos en el número total de células ($p > 0.05$) (Fig. 17).

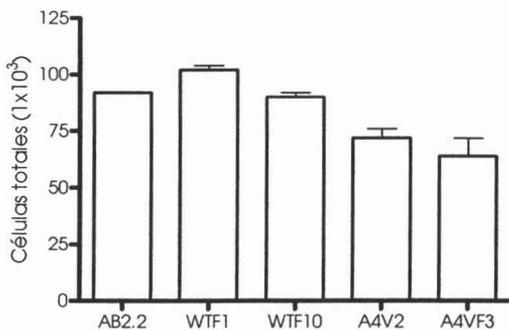


Figura 17. Número total de células por pozo de 2 cm² a los 20 dpi. Los datos representan las medias \pm D.E. de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Al analizar en conjunto el número total de células a los 20 dpi en todas las líneas empleadas, se encontró que la población celular total es significativamente menor en las líneas A4V2 y A4VF3, en comparación con las líneas AB2.2 y WTF1 ($p = 0.0148$) (Fig.17).

9. DISCUSIÓN

9.1. PROPIEDADES DE LA SOD1^{A4V}

Diversos autores han reportado que una característica prominente de varias líneas de ratones transgénicos y líneas celulares que expresan fALS-SOD1 es que presentan agregados citoplasmáticos (Bruijn *et al.*, 1998; Tobisawa *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2005). Consistente con esos reportes, durante la verificación funcional de los vectores de expresión en células COS-7 nosotros observamos que, a diferencia de la SOD1 silvestre que se distribuye difusamente en todo el citoplasma celular, la mutante A4V forma agregados.

Se ha sugerido que la propiedad de la fALS-SOD1 de precipitar fácilmente y formar agregados, está asociada con cambios conformacionales que disminuyen su solubilidad. De hecho, estudios *in vitro* realizados con distintas mutantes de la SOD1 asociadas a la fALS (A4V, G93A, G93R y E100G) han demostrado que, en relación con la enzima silvestre, las formas mutantes tienen menor estabilidad y mayor velocidad de desnaturalización. Lo anterior provoca que, del total de la población de enzima, la mayor parte se encuentre desnaturalizada o sólo parcialmente plegada, lo que incrementa su propensión a agregarse (Stathopoulos *et al.*, 2003).

Aparte de la solubilidad, otra de las propiedades de la SOD1 que se ve afectada en la fALS-SOD1 es su actividad enzimática. Aunque ciertas formas mutantes son totalmente inactivas, la mayoría retienen entre el 30 y 60% de actividad en relación con la enzima silvestre, y algunas incluso el 100%. En el caso de la SOD1^{A4V}, se sabe que la enzima mantiene actividad, pero los datos reportados son muy heterogéneos: 12%, 45% y 75% respecto a la enzima silvestre (Ratovitski *et al.*, 1999; Borchelt *et al.*, 1994; Ray *et al.*, 2004). La variabilidad tan alta de estos datos y el hecho de que en el ensayo que nosotros realizamos no detectáramos actividad alguna, podría ser resultado de diferencias en la sensibilidad de las técnicas empleadas y en las condiciones particulares del ensayo, pues se ha demostrado que la actividad específica de la mutante A4V está en función de su concentración, siendo menor a concentraciones más bajas (Ray *et al.*, 2004). Además, en nuestro caso particular, podría deberse a que el método que empleamos para preparar los extractos de proteína quizá no logre deshacer los agregados de la enzima mutante, por lo que estaríamos perdiendo una parte importante de la muestra.

9.2. EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE SOD1 EN CÉLULAS ES

El principal atributo de las células troncales embrionarias es que, aún después de haber sido expandidas y manipuladas *in vitro*, mantienen la capacidad de diferenciar a todos los tipos celulares del embrión y del adulto. Dicho potencial ha llevado a que estas líneas celulares constituyan una importante herramienta para introducir alteraciones genéticas específicas en la línea germinal, permitiendo la generación de animales transgénicos, y para analizar *in vitro* el papel de distintos genes durante la diferenciación celular (Smith, 2001).

Dado que las aplicaciones anteriores dependen de que las células ES puedan manipularse a nivel genético de manera eficiente, diversos grupos han evaluado la eficiencia de varios promotores celulares y virales en células ES en diferentes estados de diferenciación (Chung *et al.*, 2002; Ward y Stern, 2002; Zeng *et al.*, 2003). Se ha reportado que el “enhancer” del citomegalovirus (CMV) fusionado al promotor de β -actina de pollo (CBA) es capaz de dirigir la expresión constitutiva de transgenes tanto en células ES indiferenciadas (Chung *et al.*, 2002), como en los distintos tipos celulares del embrión y del adulto, incluyendo las células del sistema nervioso (Pratt *et al.*, 2000).

Tomando como base esas observaciones, en este trabajo decidimos utilizar el promotor CMV/CBA para lograr la expresión constitutiva de SOD1 humana en la línea de células ES AB2.2. La fusión de la enzima a la proteína verde fluorescente nos permitió verificar que la actividad del promotor se mantuviera estable en diferentes etapas del proceso de diferenciación neuronal: células indiferenciadas, cuerpos embrionarios y neuronas maduras.

Comprobar continuidad y ubicuidad de la expresión de la SOD1 era esencial para que el modelo de estudio que se plantea en este proyecto reprodujera de la manera más fiel posible el proceso degenerativo que ocurre *in vivo*, dado que, a pesar de que la ALS es una enfermedad que se manifiesta hasta la etapa adulta y afecta únicamente a las neuronas motoras, la fALS-SOD1 se expresa en todos los tipos celulares y durante toda la vida del individuo. Además, el hecho de que la evidencia actual apunta a que la degeneración motoneuronal inducida por la fALS-SOD1 no es un proceso celular autónomo, sino que requiere que la enzima mutante se exprese tanto en las MNs, como en las células no neuronales que las rodean, recalca la importancia de que la expresión de la SOD1 sea constitutiva. Pues de esta manera se garantiza que todos los tipos celulares que se deriven de las células ES transfectadas y que podrían estar interaccionando con las MNs en el cultivo, estarán expresando la enzima mutante.

Algo que llamó nuestra atención durante la expansión de las células ES indiferenciadas, fue la morfología de las colonias de las células que expresan SOD1^{A4V}. En

contraste con la línea AB2.2 silvestre que forma colonias redondas y con los límites bien definidos, las células ES que expresan SOD1^{A4V} generan colonias más extendidas y con forma irregular. Este cambio en la morfología no parece ser consecuencia simplemente del evento de transfección o de la expresión de SOD1, ya que las células ES que expresan SOD1^{WT} no presentan dicho fenotipo. Hasta ahora, no existe ningún reporte en la literatura que asocie la expresión de fALS-SOD1 con un fenómeno de este tipo, por lo que podría ser interesante analizarlo con detalle. Una estrategia que nos ayudaría a visualizar mejor lo que está ocurriendo sería la realización de ensayos clonales, pues estos permiten monitorear temporalmente el desarrollo colonial a partir de una sola célula. Con ello, se podría obtener información detallada sobre diferencias en el patrón y la tasa de proliferación, factores que quizá pudieran estar contribuyendo a este fenotipo.

9.3. GENERACIÓN Y MANTENIMIENTO DE MOTONEURONAS

En el 2002 Wichterle y colaboradores demostraron que es posible generar neuronas motoras *in vitro* a partir de células ES de ratón, en un proceso que recapitula las diferentes etapas de la diferenciación motoneuronal que ocurren *in vivo*. En dicho reporte se señala que después de cinco días de tratamiento con ácido retinoico y Sonic hedgehog, el 20-30% de las células del EB adquieren identidad motoneuronal. Bajo nuestras condiciones de cultivo con la línea celular AB2.2 esta proporción se conserva, ya que aproximadamente el 25% de las células tratadas son positivas para el marcador motoneuronal Isl1.

Dados los objetivos de nuestro trabajo, nos interesaba encontrar un sistema de siembra que nos permitiera obtener cultivos motoneuronales estables, es decir, que eliminara al máximo la muerte celular espontánea, y además, era deseable que las neuronas quedaran extendidas de modo que se pudieran analizar y contar fácilmente. En la mayoría de los protocolos publicados para inducir la diferenciación neuronal de células ES, las células generadas se platan sobre cajas de cultivo cubiertas con algún sustrato que permita la adhesión y desarrollo neuronal, como poli-D-lisina/laminina (Li *et al.*, 1998) o poliornitina/laminina (Renoncourt *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000). Sin embargo, la viabilidad de estos cultivos es limitada y las células tienden a crecer en agregados débilmente adheridos a la superficie, lo que dificulta su conteo y las hace muy susceptibles a desprenderse durante los cambios de medio y lavados (Qu *et al.*, 2003 y nuestras propias observaciones).

Se ha observado que al platear neuronas motoras recién aisladas de un animal sobre una monocapa preexistente de astrocitos o fibroblastos, la viabilidad de los cultivos

aumenta notablemente en comparación con la de un monocultivo (Bär, 2000). Aunque el tipo celular es importante, pues las neuronas plateadas sobre astrocitos tienen una mayor supervivencia que las plateadas sobre fibroblastos, el simple hecho de sembrar las células sobre un sustrato celular mejora la calidad del cultivo. Tomando esto en consideración, decidimos evaluar la estabilidad de un sistema de co-cultivo de motoneuronas derivadas de células ES y células alimentadoras (fibroblastos mitóticamente inactivados). Encontramos que en estas condiciones las neuronas generadas pueden mantenerse en cultivo hasta por tres semanas. Adicionalmente, observamos que las neuronas extienden neuritas más largas que las cultivadas directamente sobre la caja cubierta con poli-D-lisina y que su distribución espacial mejora.

En un futuro, quizá sería conveniente evaluar la utilización de células gliales como sustrato, pues como se mencionó anteriormente, se ha reportado que bajo estas condiciones los cultivos se desarrollan mejor. Esto es de esperarse puesto que este tipo celular es el que rodea a las células neuronales *in vivo*, y se sabe que no sólo funciona como una fuente importante de factores de crecimiento, sino también que los contactos neurona-astrocito promueven la supervivencia neuronal a largo plazo. Cabe mencionar que, aunque los cultivos de astrocitos normalmente se derivan de ratones post-natales (Qu *et al.*, 2003), también se pueden obtener a partir de células ES, con lo que tendríamos la posibilidad de (a) reducir la variabilidad experimental que pueda surgir al derivar células de distintos animales, y de (b) implementar condiciones de cocultivo combinando astrocitos silvestres con MNs que expresen fALS-SOD1, o viceversa, y evaluar el efecto que tienen las células gliales sobre la supervivencia de la población motoneuronal en la ALS.

9.4. SUSCEPTIBILIDAD DE MOTONEURONAS DERIVADAS DE CÉLULAS ES A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR FALS-SOD1

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si las motoneuronas derivadas de células ES son susceptibles a la toxicidad inducida por una de las formas mutantes de la SOD1 asociada a la ALS. Dado que la ALS es una enfermedad que provoca la degeneración específica de neuronas motoras en personas adultas (revisado en Cleveland y Rothstein, 2001), el que las motoneuronas derivadas de células ES sean sensibles al efecto tóxico de la SOD1, depende de que posean propiedades funcionales y/o moleculares características de una motoneurona madura que se ha desarrollado *in vivo*.

En estudios previos se había demostrado que las motoneuronas derivadas de células ES expresan distintos marcadores moleculares característicos de las poblaciones

desarrolladas *in vivo*, como HB9, Isl1/2, Lhx3 y Lim1 (Wichterle *et al.*, 2002), y que poseen las mismas propiedades electrofisiológicas que las neuronas derivadas de embrión (Miles *et al.*, 2004). Además se había visto que si estas células se implantan en la médula espinal de embriones de pollo, logran sobrevivir y proyectar axones a las fibras musculares (Wichterle *et al.*, 2002).

En este trabajo, nosotros observamos que después de 4 días de concluido el protocolo de diferenciación de células ES al fenotipo motoneuronal, la proporción de motoneuronas presentes en los cultivos derivados de células que expresan SOD1^{A4V} era menor con respecto a la de los cultivos derivados de células silvestres o que expresan la SOD1^{WT}. Lo que sugiere que las motoneuronas derivadas de células ES son vulnerables al efecto tóxico de la fALS-SOD1. Esto, aunado a los reportes mencionados anteriormente, confirma que las neuronas derivadas de células ES pueden ser motoneuronas maduras.

Cabe recalcar que, aunque se detectan diferencias en el número de motoneuronas, para asegurarse de que se trata de un efecto específico de la SOD1 sobre este tipo neuronal —como sucede en la enfermedad—, será necesario verificar que la producción general de neuronas no se vea afectada, evaluando por ejemplo el número de células NeuN⁺ o TubβIII⁺, y examinar si cualquier otro tipo neuronal presente en el cultivo presenta algún cambio.

Por otra parte, también será importante investigar si el menor número de motoneuronas en los cultivos que expresan fALS-SOD1 es resultado de que hay una menor producción de ellas, o de que las células generadas tienen una menor supervivencia. Para ello, habrá que realizar un análisis temporal del número de motoneuronas, empezando quizá desde un punto más temprano a los 4 dpi y tomando en cuenta tiempos más tardíos. Dado que a los 20 dpi se observa un decremento en la población total de células en los cultivos que expresan SOD1^{A4V} con respecto a los silvestres, esperamos que conforme transcurra el tiempo de cultivo la población motoneuronal siga disminuyendo, y que esta diferencia que logramos detectar en la población total sea un reflejo de ello.

9.5. LAS CÉLULAS ES COMO MODELO DE ESTUDIO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

En este trabajo se ha implementado un sistema de estudio *in vitro* para una enfermedad neurodegenerativa a partir de células troncales embrionarias. Este sistema tiene varias ventajas sobre los modelos que existen actualmente, principalmente el factor temporal y la facilidad de manejo.

En muchos de los estudios que se han realizado para analizar el proceso de muerte que ocurre en diversos desórdenes neurodegenerativos se recurre al uso de animales transgénicos. Sin embargo, la dilucidación molecular de los mecanismos que originan una enfermedad puede resultar mucho más sencilla utilizando modelos celulares, en vez de animales completos.

Habitualmente, los estudios de degeneración motoneuronal que emplean modelos celulares utilizan cultivos primarios, los cuales son difíciles de obtener, presentan mucha muerte celular espontánea e implican aislar continuamente las células de un animal. En otros casos, se emplean líneas de neuroblastoma, las cuales tienen la limitante de que no presentan todas las características de una neurona madura. En contraste, las células ES indiferenciadas, son células que se dividen rápidamente, lo que facilita su modificación genética y la generación de cultivos, y dado que los protocolos de diferenciación neuronal son relativamente cortos, permiten la obtención de neuronas totalmente funcionales en poco tiempo.

Tomando en cuenta estas propiedades de las células ES y la disponibilidad de diversos protocolos de diferenciación neuronal, la estrategia que aquí se empleó para generar un modelo de estudio de la ALS podría extenderse al estudio de otras enfermedades neurodegenerativas.

10. CONCLUSIONES

- El promotor CMV/CBA es capaz de dirigir la expresión de SOD1 en la línea de células ES AB2.2 en diferentes estados de diferenciación.
- En cocultivo con fibroblastos inactivados mitóticamente, las motoneuronas derivadas de células ES silvestres se mantienen viables hasta por 3 semanas.
- La SOD1^{A4V} tiene un efecto negativo sobre el número de motoneuronas derivadas de células ES.

11. REFERENCIAS

- Andersen, P. M., K. B. Sims, W. W. Xin, R. Kiely, G. O'Neill, J. Ravits, E. Pioro, Y. Harati, R. D. Brower, J. S. Levine, H. U. Heinicke, W. Seltzer, M. Boss y R. H. Brown. (2003) Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 4:62-73.
- Appel, B. y J. S. Eisen. (2003) Retinoids run rampant: múltiple roles during spinal cord and motor neuron development. *Neuron.* 40:461-464.
- Borchelt, D. R., M. K. Lee, H. S. Slunt, M. Guarnieri, Z.-S. Xu, P. C. Wong, R. H. Brown, D. L. Price, S. S. Sisodia y D. W. Cleveland. (1994) Superoxide dismutase 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:8292-8296.
- Bain, G., D. Kitchens, M. Yao, J. E. Huettner y D. I. Gottlieb. (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev Biol.* 168:342-357.
- Bär, P. R. (2000) Motor neuron disease *in vitro*: the use of cultured motor neurons to study amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Pharmacol.* 405:285-295.
- Beddington, R. S. (2001) Mammalian embryo: establishment of embryonic axes. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Londres, Nature Publishing Group. <http://www.els.net/>
- Bendotti, C. y M. T. Carri. (2004) Lessons from models of SOD1-linked familial ALS. *TRENDS Mol Med.* 10:393-400.
- Beauchamp, C. e I. Fridovich. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to arylamide gels. *Anal Biochem.* 44:276-287.
- Brujin L. I., M. K. Houseweart, S. Kato, K. L. Anderson, S. D. Anderson, E. Ohama, A. G. Reaume, R. W. Scott y D. W. Cleveland. (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science.* 281:1851-1853.
- Brujin L. I., T. M. Miller y D. W. Cleveland. (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci.* 27:723-749.
- Clement, A. M., M. D. Nguyen, E. A. Roberts, M. L. Garcia, S. Boillée, M. Rule, A. P. McMahon, W. Doucette, D. Siwek, R. J. Ferrante, R. H. Brown Jr., J.-P. Julien, L. S. B. Golstein y D. W. Cleveland. (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science.* 302:113-117.
- Cleveland, D. W. y J. D. Rothstein. (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature Rev Neurosci.* 2:806-819.
- Coyle, J. T. (1987) Kainic acid: insights into excitatory mechanisms causing selective neuronal degeneration. *Ciba Found Symp.* 126:186-203.

- Chung, S., T. Andersson, K.-C. Sonntag, L. Björklund, O. Isacson y K.-S. Kim. (2002) Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 20:139-145.
- Dal Canto, M. C. y M. E. Gurney. (1994) Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol*. 145:1271-1279.
- Doble, A. y P. Kennel. (2000) Animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 1:301-312.
- Downs, K. M. (2001) Mouse early development: Molecular basis. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Londres, Nature Publishing Group. <http://www.els.net/>
- Dunlop, J., H. B. McIlvain, Y. She y D. S. Howland. (2003) Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis. 23:1688-1696.
- Elliott, J. L. (1999) Experimental models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 6:310-320.
- Estévez, A. G., J. P. Crow, J. B. Sampson, C. Reiter, Y. Zhuang, G. J. Richardson, M. M. Tarpey, L. Barbeito y J. S. Beckman. (1999) Induction of nitric oxide-dependent apoptosis en motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* 286:2498-2500.
- Festoff, B. W. (2000) Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Londres, Nature Publishing Group. <http://www.els.net/>
- Fraichard, A., O. Chassande, G. Bibaut, C. Dehay, P. Savatier y J. Samarut. (1995). *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci*. 108:3181-3188.
- Gong, Y. H., A. S. Parsadianian, A. Andreeva, W. D. Snider y J. L. Elliott. (2000) Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes result in astrocytosis but not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci*. 20:660-665.
- Guégan, C. y S. Przedborski. (2003) Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest*. 111:153-161.
- Gurney, M. E., H. Pu, A. Y. Chiu, M. C. Dal Canto, C. Y. Polchow, D. D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y. W. Kwon, H.-X. Deng, W. Chen, P. Zhai, R. L. Sufit y T. Siddique. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 264:1772-1775.
- Halliwell, B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Anging*. 18:685-716.
- Herpers, B. L., L. H. Schrama, E. C. A. Kaal, E. A. J. Joosten y P. R. Bär. (1999) Microinjection of catalase cDNA prevents hydrogen peroxide-induced motoneuron death. *NeuroReport*. 10:1-4.

- Houenou, L. J., y L. W. Oppenheim. (1994) Motor neuron death during development, following injury and in neurological disease. *Semin Neurosci.* 6:283-289.
- Jessell, T. M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nature Rev Gen.* 1:20-29.
- Johnston, J. A., M. J. Dalton, M. E. Gurney y R. R. Kopito. (2000) Formation of high weight complexes of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familia amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:12571-12576.
- Jones-Villeneuve, E. M. V., M. W. McBurney, K. A. Rogers y V. I. Kalnins. (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol.* 94:253-262.
- Julien, J.-P. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell.* 104:581-591.
- Julien, J.-P., y J.-M. Beaulieu. (2000) Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: beneficial or detrimental effects? *J Neurol Sci.* 180:7-4.
- Kaal, E. C. A., H. Veldman, P. Soodaar, E. A. J. Joosten, P. R. Bär. (1998) Oxidant treatment causes a dose-dependent phenotype of apoptosis in cultured motoneurons. *J Neurosci Res.* 54:778-786.
- Kaal, E. C. A., S. Dijkstra, M. G. H. van Westerlaak, E. A. J. Joosten y P. R. Bär. (1999) Experimental models for ALS – a short review. *Neurosci Res Commun.* 25:1-11.
- Kaal, E. C. A., A. S. Vlug, M. W. J. Versleijen, M. Kuilman, E. A. J. Joosten y P. R. Bär. (2000) Chronic mitochondrial inhibition induces selective motoneuron death *in vitro*: a new model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 74:1158-1165.
- Lang, K. J. D., J. Rathjen, S. Vassilieva y P. D. Rathjen. (2004) Differentiation of embryonic stem cells to a neural fate: a route to re-building the nervous system? *J Neurosci Res.* 76:184-192.
- Lee, S.-H., N. Lumelsky, L. Studer, J. M. Auerbach y R. D. McKay. (2000) Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Biotech.* 18:675-679.
- Li, M., L. Pevny, R. Lvell-Badge y A. Smith. (1998) Generation of purified neuronal precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol.* 8:971-974.
- Li, X.-J., Z.-W. Du, E. D. Zarnowska, M. Pankratz, L. O. Hasen, L. A. Pearce y S.-C. Zhang. (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nature Biotech.* 23:215-221.
- Lino, M. M., C. Schneider y P. Caroni. (2002) Accumulation of SOD1 in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci.* 22:4825-4832.
- Liochev, S. I. e I. Fridovich. (2003) Mutant Cu,Zn superoxide dismutases and familial amyotrophic lateral sclerosis: evaluation of oxidative hypotheses. *Free Rad Biol Med.* 34:1382-1389.

- Martin, L. J. (1999) Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58: 459-471.
- Martinat, C., S. Shendelman, A. Jonason, T. Leete, M. F. Beal, L. Yang, T. Floss y A. Abeliovich. (2004) Sensitivity to oxidative stress in DJ-1-deficient dopamine neurons: An ES-derived cell model of primary parkinsonism. *PLOS Biol.* 2:e327.
- Mathews, C. K., y K. E. Van Holde. (2000) Bioquímica. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid.
- McCaffery, P. y U. C. Dräger. (2000) Regulation of retinoic signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11:23-249.
- Miles, G. B., D. C. Yohn, H. Wichterle, T. M. Jessell, V. F. Rafuse y R. M. Brownstone. (2004) Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. *J Neurosci.* 24:7848-7858.
- Muñoz-Sanjuán, I. y A. H. Brivanlou. (2002) Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nature Rev Neurosci.* 3:271-280.
- Nagai, M., M. Aoki, I. Miyoshi, M. Kato, P. Pasinelli, N. Kasai, R. H. Brown y Y. Itoyama. (2001) Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci.* 21:9246-9254.
- O'Shea, K. S. (1999) Embryonic stem cell models of development. *Anat Rec (New Anat).* 257:32-41.
- Pasinelli, P., M. E. Belford, N. Lennon, B. J. Bacskai, B. T. Hyman, D. Trotti y R. H. Brown. (2004) Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron.* 43:19-30.
- Pelton, T. A., S. Sharma, T. C. Schulz, J. Rathjen y P. D. Rathjen. (2002) Transient pluripotent cell populations during primitive ectoderm formation: correlation of *in vivo* and *in vitro* pluripotent cell development. *J Cell Sci.* 115:329-339.
- Pramatarova, A., J. Laganière, J. Roussel, K. Brisebois y G. A. Rouleau. (2001) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci.* 21:3369-3374.
- Pratt, T., L. Sharp, J. Nichols, D. J. Price y J. O. Mason (2000) Embryonic stem cells and transgenic mice ubiquitously expressing a tau-tagged green fluorescent protein. *Dev Biol.* 228:19-28.
- Qu, Y., S. Vadivelu, L. Choi, S. Liu, A. Lu, B. Lewis, R. Girgis, C. S. Lee, B. J. Snider, D. I. Gottlieb y J. W. McDonald. (2003) Neurons derived from embryonic stem (ES) cells resemble normal neurons in their vulnerability to excitotoxic death. *Exp Neurol.* 184:326-336.

- Ratovitski, T., L. B. Corson, J. Strain, P. Wong, D. W. Cleveland, V. C. Culotta y D. R. Borchelt. (1999) Variation in the biochemical/biophysical properties of mutant superoxide dismutase 1 enzymes and the rate of disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis kindreds. *Hum Mol Gen.* 8:1451-1460.
- Ray, S. S., R. J. Nowak, K. Strokovich, R. H. Bown, T. Waltz y P. T. Lansbury. (2004) An intersubunit disulfide bond prevents *in vitro* aggregation of a superoxide dismutase-1 mutant linked to familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem.* 43:4899-4905.
- Reaume, A. G., J. L. Elliott, E. K. Hoffman, N. W. Kowall, R. J. Ferrante, D. F. Siwek, H. M. Wilcox, D. G. Flodd, M. F. Beal, R. H. Brown, *et al.* (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet.* 13:43-47.
- Renoncourt, Y., P. Carroll, P. Filippi, V. Arce y S. Alonso. (1998) Neurons derived *in vitro* from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons. *Mech Dev.* 79:185-197.
- Ripps, M. E., G. W. Huntley, P. R. Hof, J. H. Morrison y J. W. Gordon. (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:689-693.
- Robertson, J., J. Kriz, M. D. Nguyen y J.-P. Julien. (2002) Pathways to motor neuron degeneration in transgenic mouse models. *Biochimie.* 84:1151-1160.
- Rosen, D. R., T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O'Reagan, H.-X. Deng, *et al.* (1993) Mutations in Zn/Cu superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362:59-62.
- Schnaar, R. L., y A. E. Schaffner. (1981) Separation of cell types from embryonic chicken and rat spinal cords: characterization of motoneuron-enriched fraction. *J Neurosci.* 1:204-217.
- Smith, A. G. (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Biol.* 17:435-462.
- Stathopoulos, P. B., J. A. O. Rumfeldt, G. A. Scholz, R. A. Irani, H. E. Frey, R. A. Hallewell, J. R. Lepock y E. M. Meiering. (2003) Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:7021-2026.
- Tanabe, Y., C. William y T. M. Jessell. (1998) Specification of motor neuron identity by MNR2 homeodomain protein. *Cell.* 95:67-80.
- Tobisawa, S., Y. Hozumi, S. Arakawa, S. Koyama, M. Wada, M. Nagai, M. Aoki, Y. Itoyama, K. Goto y T. Kato. (2003) Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 303:496-503.
- Turner, B. J., J. D. Atkin, M. A. Farg, D. W. Zang, A. Rembach, E. C. Lopes, J. D. Patch, A. F. Hill y S. S. Cheema. (2005) Impaired extracellular secretion of mutant

- superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 25:108-117.
- Valentine, J. S. y P. J. Hart. (2003) Misfolded CuZn SOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:3617-3622.
- Ward, C. M. y P. L. Stern. (2002) The human cytomegalovirus immediate-early promoter is transcriptionally active in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 20:472-475.
- Wasbourne, P., y A. K. McAllister. (2002) Techniques for gene transfer into neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 12:566-573.
- Wichterle, H., I. Lieberman, J. A. Porter, T. M. Jessell. (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell.* 110:385-397.
- Wiedau-Pazos, M., J. J. Goto, S. Rabizadeh, E. B. Gralla, J. A. Roe, M. K. Lee, J. S. Valentine y D. E. Bredesen. (1996) Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 271:515-517.
- Wild, A. E. y T. P. Fleming. (2001) Cleavage and gastrulation in mouse embryos. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Londres, Nature Publishing Group. <http://www.els.net/>
- Wong, P. C., J. D. Rothstein y D. L. Price. (1998) The genetic and molecular mechanisms of motor neuron disease. *Curr Opin Neurobiol.* 8:791-799.
- Yim, M. B., J.-H. Kang, H.-S. Yim, H.-S. Kwak, P. B. Chock y E. R. Stadtman. (1996) A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: an enhancement of free radical formation due to a decrease in K_m for hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:5709-5714.
- Ying, Q.-L., J. Nichols, I. Chambers y A. Smith. (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 115:281-292.
- Zeng, X., J. Chen, J. F. Sanchez, M. Coggiano, O. Dillon-Carter, J. Petersen y W. J. Freed. (2003) Stable expression of hrGFP by mouse embryonic stem cells: promoter activity in the undifferentiated state and during dopaminergic neural differentiation. *Stem Cells.* 21:647-653.

12. ANEXO: MEDIOS Y SOLUCIONES

1. CULTIVO DE CÉLULAS

D-MEM (“Dubelco’s modified Eagle Medium”) (GIBCO #12100-046)

Para 1 litro: 1 sobre de medio en polvo
3.7 g de NaHCO₃
H₂O grado cultivo

- Disolver el medio en polvo en 800 ml de H₂O grado cultivo mediante agitación suave.
- Añadir 3.7 g de NaHCO₃ y agitar hasta disolver.
- Ajustar el pH a 6.9 con HCl 1N. Este pH está 0.2-0.3 unidades por debajo de lo requerido durante las condiciones de trabajo, ya que suele incrementar 0.1-0.3 con la filtración.
- En campana, aforar a 1 litro y esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm.
- Almacenar a 4°C y utilizar en un período máximo de 2 meses.

D-MEM/F12 sin HEPES (GIBCO #12500-039).

Para 1 litro: 1 sobre de medio en polvo
2.438 g de NaHCO₃
H₂O

- A excepción de la cantidad de NaHCO₃, se prepara igual que el D-MEM.

Suero bovino fetal (FBS, “fetal bovine serum”) (GIBCO #16000-044)

- Inactivar las proteínas del complemento, calentado el suero a 56°C por 30 minutos.
- Alicuotar y almacenar a -20°C.
- Para utilizar, descongelar una alícuota y mantener a 4°C hasta por 1 mes.

GPS 100X. Glutamina + Penicilina + Estreptomicina

Para 100 ml: 100 ml de Gluta-Max 200mM (GIBCO #35050-061)
300 mg de penicilina
500 mg de estreptomicina

- Transferir 10 ml de Gluta-Max a un tubo de 15 ml.
- Agregar la penicilina y la estreptomicina. Disolver.
- Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm y agregar la solución al restante de Gluta-Max. Mezclar homogéneamente.
- Alicuotar y almacenar a -20°C.
- Para utilizar, descongelar y mantener a 4°C hasta por 1 mes.

β-mercaptoetanol (BME) 100X

Para 25 ml: 4.5 ml de BME 55mM (GIBCO #21985-023)
20.5 ml de PBS 1X

- Almacenar a 4°C hasta por 2 meses.

PBS 1X (Buffer salino de fosfatos)

Para 1 litro: 8 g de NaCl
0.2 g de KCl
1.44 g de Na₂HPO₄
0.24 g de KH₂PO₄
H₂O

- Disolver y esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm.

Tripsina 0.25% (GIBCO #15090-046)

Para 20 ml: 2 ml de tripsina 2.5% en H₂O grado cultivo (se almacena a -20°C)
18 ml de Verseno (GIBCO #15040-066)

- Almacenar a 4°C hasta por 1 mes.

Medio COS-7

Para 250 ml: 222.5 ml de D-MEM
25 ml de FBS (final 10%)
2.5 ml de GPS 100X (final 1X)

Medio STO

Para 250 ml: 230 ml de D-MEM
17.5 ml de FBS (final 7%)
2.5 ml de GPS 100X (final 1X)

Medio M15

Para 250 ml: 204.75 ml de D-MEM
37.5 ml de FBS (final 15%)
2.5 ml de piruvato de sodio 100X (final 1X) (GIBCO #11360-070)
2.5 ml de aminoácidos no esenciales 100X (final 1X) (GIBCO #11140-050)
250 µl de BME (final 1X)
2.5 ml de GPS 100X (final 1X)

Medio de congelación 2X

Para 10 ml: 6 ml de D-MEM
2 ml de FBS (final 20%)
2 ml de DMSO (final 20%) (Sigma #D2650)

Medio DF

Para 50 ml: 48.4 ml de D-MEM/F12 sin HEPES
500 µl de glucosa 450 mg/ml (final 4500 mg/l)
125 µl de insulina 4 mg/ml (final 10 mg/l) (GIBCO #13007-018)
69 µl de transferrina 4 mg/ml (final 5.5 mg/l) (GIBCO #13008-016)
187.5 µl de selenita de sodio 10µM (final 37.5nM)
10 µl de progesterona 100µM (final 20nM) (Sigma #8783)
30 µl de putrescina 0.1M (final 60µM)
91 µl de BME 55mM (final 0.1mM)
500 µl de GPS 100X (final 1X)

Medio ESK10

Para 50 ml: 43.9 ml de D-MEM
5 ml de reemplazo de suero knockout (final 10%) (GIBCO #10828)
500 μ l de aminoácidos no esenciales 100X (final 1X)
91 μ l de BME 55mM (final 0.1mM)
500 μ l de GPS 100X (final 1X)

Medio DFK5. Medio DF + Medio ESK10 (1:1)

Lipofectamina 2000 (Invitrogen #11668-027)

Gelatina 1%

Para 300 ml: 3 g de gelatina
300 ml de H₂O grado cultivo

- Calentar en horno de microondas hasta disolver.
- Esterilizar en autoclave.
- Almacenar a temperatura ambiente hasta 2 meses.
- Antes de usar llevar la solución al 0.1% en H₂O grado cultivo.

Mitomicina C 50X (Roche #107409)

Para 4 ml: 2 mg de mitomicina C
4 ml de PBS 1X

- Utilizar guantes y cubrebocas.
- Con una jeringa de 1 ml tomar 1 ml de PBS, clavar la jeringa en la tapa del frasco de mitomicina para despresurizar e inyectar el PBS.
- Una vez disuelto, destapar el frasco, tomar el contenido con la jeringa y adicionarlo a 3 ml de PBS en un tubo de 15 ml. La solución debe verse azul-violeta.
- Almacenar a 4°C en la obscuridad, hasta por 1 mes.

Ara-C (Citosina-1- β -arabinofuranósido) (Sigma #C1768)

Stock: 1 mM en PBS

- Almacenar a 4°C en la obscuridad.

LIF (Factor inhibidor de leucemia) (Chemicon #LIF2010)

Stock: 1 x 10⁵ U/ml en PBS + BSA 10% (Sigma #A3059)

- Almacenar a 4°C.

Ácido Retinóico (AR) (Sigma #R2625)

Stock: 1mM en DMSO

- Almacenar a -20°C en la obscuridad.

Agonista de Sonic Hedgehog (Hh-Ag1.3) (Curis Inc.)

Stock: 1mM en DMSO

- Almacenar a -20°C.

2. WESTERN BLOTS Y GELES DE ACTIVIDAD

2.1. Extractos de proteína

Buffer de lisis. HEPES 20mM + DTT 1mM + Mesilato de deferoxamina 0.1mM + PMSF 1 mM

Para 10 ml: 200 µl de HEPES 1M
 100 µl de DTT 100mM
 10 µl de desferal 100mM
 9.59 ml de H₂O

- Antes de usar adicionar 100 µl de PMSF 100mM.

HEPES 1M (4-(2-hidroxi-etil)-1-ácido piperazin-etansulfónico) (Sigma #H-6147)

Para 10 ml: 2.383 g de HEPES
 10 ml de H₂O

- Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.

1,4-Ditiotreitol (DTT) 100mM (Merck #12013)

Para 10 ml: 154.5 mg de DTT
 10 ml de acetato de sodio 0.01M pH 5.2

- Esterilizar por filtración, y almacenar en alícuotas de 1 ml a -20°C.

Mesilato de deferoxamina 100mM (Sigma #D-9533)

Para 10 ml: 956.8 mg de mesilato de deferoxamina
 10 ml de H₂O

- Almacenar en alícuotas de 500 µl a -20°C.

PMSF 100mM

Para 10 ml: 174 mg de PMSF
 10 ml de isopropanol

- Almacenar en alícuotas de 1 ml a -20°C.

2.2. SDS-PAGE (electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes)

Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C)

Para 100 ml: 29.2 g de acrilamida
 0.8 g de N'N'-bis-metileno-acrilamida
 H₂O desionizada

- Utilizar guantes y cubrebocas.
- Disolver, filtrar y almacenar a 4°C en la oscuridad.

Tris-HCl 1.5M, pH 8.8

Para 150 ml: 27.23 g de Tris base
 80 ml de H₂O

- Ajustar pH 8.8 con HCl 6N.
- Aforar con H₂O y almacenar a 4°C.

Tris-HCl 0.5M, pH 6.8

- Para 100 ml: 6 g de Tris base
60 ml de H₂O
- Ajustar pH 6.8 con HCl 6N.
 - Aforar con H₂O y almacenar a 4°C.

TEMED (Bio-Rad #161-0801)

Persulfato de amonio (APS) 10% (Bio-Rad #161-0700)

- Para 1 ml: 100 mg de APS
1 ml H₂O

HCl 6N

- Para 100 ml: 81.6 ml H₂O
18.4 ml de HCl

Buffer de corrida. Tris 25mM, pH 8.3 + glicina 192mM + SDS 0.1%

- Para 1 litro: 3.03 g de Tris base
14.4 g de glicina
1 g de SDS
H₂O

Buffer de carga 5X

- Para 9.5 ml: 3.55 ml de H₂O desionizada
1.25 ml de Tris-HCl 0.5M, pH 6.8
2.5 ml de glicerol
2 ml de SDS 10%
200 µl de azul de bromofenol 0.5%
- Almacenar a temperatura ambiente.
 - Antes de usar, añadir 50 µl de β-mercaptoetanol (Bio-Rad #161-0710) a cada 950 µl de buffer. En estas condiciones, almacenar a -20°C.

2.3. Western blot

Buffer de transferencia. Tris 25mM, pH 8.3 + glicina 192mM + metanol 20% + SDS 0.1%

- Para 1 litro: 3.03 g de Tris base
14.4 g de glicina
1 g de SDS
- Disolver en H₂O, aforando a 800 ml
 - Añadir 200 ml de metanol

TBST. Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 + NaCl 0.9% + Tween 20 0.1%

- Para 1 litro: 100 ml de Tris-HCl 1M, pH 7.5
9 g de NaCl
1 ml de Tween 20
H₂O

DIG3. Tris-HCl 100mM, pH 9.5 + NaCl 100mM + MgCl₂ 50mM

Para 10 ml: 1 ml de Tris-HCl 1M, pH 9.5
0.2 ml de NaCl 5M
0.5 ml de MgCl₂ 1M
8.3 ml de H₂O

NBT (Cloruro 4-nitro azul tetrazolio) (Roche #1383213)

BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (Roche #1383221)

2.4. Geles de actividad de superóxido dismutasa

Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C)

Tris-HCl 2M, pH 8.9

Para 100 ml: 24 g de Tris base
60 ml de H₂O

- Ajustar pH 8.9 con HCl 6N.
- Aforar con H₂O y almacenar a 4°C.

TEMED

Persulfato de amonio (APS) 10%

Buffer de corrida. Tris 25mM, pH 8.3 + glicina 192mM

Para 1 litro: 3.03 g de Tris base
14.4 g de glicina
H₂O

Buffer de carga

Para 1.5 ml: 1 ml de glicerol
500 µl de Tris-HCl 2M, pH 8.9
3 mg de azul de bromofenol

Solución 1

Para 7.5 ml: 7.455 ml de H₂O
7.5 µl de riboflavina 10% en H₂O
37.5 µl de NBT

- Preparar en la obscuridad.
- Disolver y filtrar a través de membrana de 0.22 µm.

Solución 2

Para 7.5 ml: 7.5 ml de H₂O
45 µl de TEMED

3. INMUNOCITOQUÍMICA

Paraformaldehído (PFA) 4%. Preparar fresco

Para 10 ml: 0.4 g de paraformaldehído
 H₂O bidestilada

- Utilizar guantes y cubrebocas y trabajar en campana.
- Calentar 8 ml de H₂O 10-15 segundos en horno de microondas, cuidando de que no hierva.
- Adicionar 0.4 g de PFA.
- Añadir 2 µl de NaOH 2.5 M. Agitar hasta que la solución se vea clara.
- Añadir 1 ml de PBS 10X.
- Aforar con H₂O y dejar enfriar 10 minutos en hielo.
- Filtrar a través de membrana de 0.22 µm.

PBS 10X

Para 50 ml: 4 g de NaCl
 0.1 g de KCl
 0.72 g de Na₂HPO₄
 0.12 g de KH₂PO₄
 H₂O

- Disolver y ajustar pH a 7.4 con HCl.
- Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm.

PBS 1X

Tritón X-100 (Bio-Rad 161-0407)

Suero de oveja (SS, "sheep serum")

DAPI (Molecular Probes #D-1306)

Solución de montaje

Para 10 ml: 5 ml de glicerol
 5 ml de NaHCO₃ 0.1M, pH 9.0