



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE  
TRANSCRIPCIÓN KRÜPPEL 4 DURANTE EL  
DESARROLLO EN EL HIPOTÁLAMO DE ROEDOR”**

**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 :  
**MIRIAM MARTÍNEZ ARMENTA**

**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ**

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Hoja de Datos del Jurado

## 1. Datos del alumno

Martínez  
Armenta  
Miriam  
56 44 59 43  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
097106625

## 2. Datos del tutor

Dra.  
Leonor  
Pérez  
Martínez

## 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Julio  
Morán  
Andrade

## 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Jaime Iván  
Velasco  
Velásquez

## 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Jean-Louis  
Charli  
Casalonga

## 6. Datos del sinodal 4

Dr.  
Martín Gustavo  
Pedraza  
Alva

## 7. Datos del trabajo escrito

Análisis de la expresión del factor de transcripción krüppel 4 durante el desarrollo en el hipotálamo de roedor  
87 p  
2006

*A mi madre y mis hermanos  
porque a pesar del caos individual y  
colectivo siempre están a mi lado*

## **AGRADECIMIENTOS**

---

*A la Máxima casa de estudios,  
por ser el espacio donde convergen la ciencia y la cultura  
y darme la oportunidad de ser miembro de ella*

*Patricia Joseph y Jean-Louis Charli,  
por acercar a la Facultad de Ciencias con el Instituto de Biotecnología y  
permitirme ser parte de su grupo*

*A Leonor, la mujer excepcional  
Madre, esposa, hija, amiga y además apasionada por la Ciencia.  
Gracias por todas tus enseñanzas y dedicación*

*A mis compañeros y amigos de laboratorio,  
Carlos, Vicenta y Alejandra, que tuvieron la paciencia de enseñarme y me  
acompañaron durante este tiempo*

*Fidelia Romero, Manuel Villa, Elena Martel y Miguel Angel Olvera, cuyo  
trabajo diario es indispensable para el funcionamiento  
del laboratorio, y porque siempre tienen palabras  
y actos de apoyo para aligerar la carga*

*Homero por tu apoyo y cariño incondicional durante estos años  
Por no permitir que las adversidades me derrotaran  
e impulsarme en todas las locuras que he emprendido*

*A los niños de Ciencias: Tere, Angel, Paulina y Martha,  
por todo el tiempo y conocimiento compartido  
pero sobre todo por su amistad en los mejores años de mi vida*

*Angélica Meneses y Juan Manuel Viveros  
porque su ejemplo ha sido una inspiración*

*Para las chicas de Amarain  
(Lidia, Paty, Rocío, Mónica, Andrea, Silvia, Ana y Ale)  
por todas las noches y días de shimies compartidas  
que hicieron más agradable mi estancia en Cuernavaca*

*Cristobal, porque lo iniciaste todo . . .*

# INDICE

---

	<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>ABREVIATURAS</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
2.1	ESPECIFICACIÓN DEL NEUROBLASTO	8
2.1.1	Genes proneurales	11
	Inhibición lateral	12
	Inhibición del destino glial	13
2.2	DIFERENCIACIÓN NEURONAL	14
2.2.1	Salida del ciclo celular	14
	Cascada de genes	16
2.2.2	Migración	17
2.2.3	Desarrollo de procesos celulares	19
2.2.4	Establecimiento de sinápsis	20
2.2.5	Regulación extrínseca de la neurogénesis.	21
2.3	EL HIPOTÁLAMO COMO MODELO DE ESTUDIO	22
2.3.1	La Hormona Liberadora de Tirotrópina	25
	Regulación de la biosíntesis de TRH	28
	Análisis del transcriptoma TRHérgico	28
<b>3</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>32</b>
3.1	EL FACTOR-4 SIMILAR A KRÜPPEL	32
<b>4</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>41</b>
7.1	CITOLOGÍA VAGINAL	41
7.2	MUESTREO DE HIPOTÁLAMOS	41
7.3	EXTRACCIÓN DE ARN	43
7.4	CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL	43
7.5	TRANSCRIPCIÓN REVERSA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	44
7.6	MATERIAL	46
7.7	NORTHERN BLOT	47
	Gel desnaturalizante	47

	Marcado de la sonda	48
	Purificación de la sonda.	49
	Prehibridación, hibridación y lavados	49
7.8	HIBRIDACIÓN IN SITU	50
	Transcripción in vitro para el cARN de Klf4 utilizando UTP [ <sup>35</sup> S]	50
	Preparación de los tejidos	52
	Hibridación y revelado	53
	Análisis estadístico	54
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
8.1	OPTIMIZACIÓN DE RT-PCR SEMICUANTITATIVA PARA EL ARNm DE KLF-4	55
8.2	ANÁLISIS DEL ARNm DE KLF-4 DURANTE EL DESARROLLO HIPOTALÁMICO DE RATA POR RT-PCR	62
8.3	ANÁLISIS DEL ARNm DE KLF-4 DURANTE EL DESARROLLO POR NORTHERN BLOT	64
8.4	EXPRESIÓN DEL ARNm DE KLF-4 A NIVEL CELULAR POR HIBRIDACIÓN IN SITU	66
<b>9</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>72</b>
9.1	EXPRESIÓN DEL ARNm DE KLF4 EN ESTADOS EMBRIONARIOS	73
9.2	EXPRESIÓN DEL ARNm DE KLF4 POST-PARTO	74
9.3	¿CÓMO PODRÍA KLF4 PARTICIPAR EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL?	76
	Ciclo celular	76
	Diferenciación neuronal	77
<b>10</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>11</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>8</b>
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>81</b>

## RESUMEN

---

La neurogénesis es un proceso sumamente regulado que involucra la interacción dinámica entre señales intracelulares y extracelulares, con el fin de restringir el potencial de los progenitores neurales al expresar de manera espacio-temporal genes que controlan el nacimiento, morfología, trayectoria, localización final y sinapsis establecidas por las neuronas. Los factores de transcripción juegan un papel crucial en este proceso, al regular la activación de genes a través de la unión específica a secuencias del ADN, ya sea de manera individual o formando dímero con ellos mismos u otros factores de transcripción.

En los últimos años se han caracterizado numerosas proteínas proneurales pertenecientes a la familia bHLH que promueven la diferenciación de neuronas a partir de progenitores neurales regulando etapas tanto de determinación como de diferenciación. Sin embargo, para el caso de los fenotipos neuroendócrinos, hasta el momento se han descritos pocos factores involucrados en la regulación de la neurogénesis.

En este estudio demostramos que el ARNm del factor de transcripción KLF4 es detectable en el hipotálamo de rata y que su expresión es regulada a lo largo del desarrollo alcanzando niveles máximos de expresión a los días embrionarios (E) 15, postnatal (P) 0 y P7.

Asimismo, el análisis por hibridación *in situ* en cortes coronales de cerebro, permitió localizar el ARNm de KLF4 alrededor de los ventrículos laterales al día E18, en especial en la placa basal telencefálica, en neuroepitelio cortical y el neuroepitelio de la formación hipocámpal, así como en las células endocelulares del ventrículo lateral al día P7. Además de un grupo reducido de células en la capa I de la neocorteza en los estadios P0 y P7.

Estos datos aunados a la evidencia de otros grupos de que KLF4 participa en eventos de diferenciación terminal, nos llevan a proponer que KLF4 pudiese estar participando en el proceso de neurogénesis ya sea al promover la salida del ciclo celular de progenitores neurales o bien, al activar genes involucrados en la etapa de diferenciación terminal.

## **2 INTRODUCCIÓN**

---

El proceso a través del cual las células neuronales primitivas en el embrión temprano proliferan y se diferencian en el Sistema Nervioso Central (SNC) es uno de los procesos más interesantes dentro de la biología del desarrollo. Esto se debe no sólo a la importancia del sistema nervioso en los organismos, sino a la complejidad de redes neuronales que se establecen para el correcto funcionamiento del mismo.

Durante la embriogénesis de los vertebrados, las células neurales primitivas comienzan a generarse durante la gastrulación y continúan conforme avanza la formación de los ejes dorso-ventral y antero-posterior. Gradualmente las células adquieren identidad posicional la cual conduce a la diferenciación de compartimentos funcionales<sup>1</sup>.

La neurogénesis es el mecanismo básico en el cual las células adquieren propiedades neuronales comunes que son independientes de la región del sistema nervioso en la que son generadas y de las funciones específicas que desempeñan. De manera general el proceso se puede dividir a su vez en dos subprocesos: la especificación del neuroblasto y la diferenciación terminal<sup>2</sup>.

### **2.1 ESPECIFICACIÓN DEL NEUROBLASTO**

Una vez que se han formado las capas germinales primordiales durante la gastrulación (ectodermo, mesodermo y endodermo), el primer paso hacia la diferenciación del tejido neural lo constituye la inducción neural del ectodermo, donde la zona ventral se diferenciará a epidermis, mientras que la zona dorsal dará lugar al sistema nervioso completo.

A partir de estudios realizados en diferentes organismos, se ha observado que un grupo de células especializadas del mesodermo, conocidas como organizador de Spemann en anfibios, capa embrionaria en pez cebra, nódulo de Hensen en pollo y nodo en ratón, secretan factores solubles como la noggina, cordina y folistatina, los cuales se unen en forma directa e inhiben a los inductores epidermales, principalmente proteínas morfogénicas de hueso BMP2, BMP4 y BMP7, lo cual resulta en la formación del neuroectodermo<sup>3</sup> (Figura 1)

**Figura 1.** Modelo de diferenciación ectodermal en anfibios . (a) Vista dorsal de *Xenopus laevis* durante la gastrulación, donde el organizador secreta factores como la noggina, cordina y folistatina, que se unen e inhiben a los inductores epidermales (BMP2, BMP4 y BMP7). El borde entre el ectodermo dorsal y ventral se amplifica en (b). (b) En el ectodermo dorsal los factores secretados por el organizador inhiben la diferenciación epidermal por unión con los inductores epidermales. En el ectodermo ventral, los antagonistas de BMP están ausentes y los inductores epidermales pueden unirse a sus receptores sin interferencia. (c) El mecanismo de señalización que desencadena la inducción de genes epidermales involucra TGF y la vía Smad. (Tomado de Eggen, B: BMP antagonists and neural induction<sup>3</sup>)

La generación de neuronas a partir del neuroectodermo involucra como paso intermedio la generación del neuroblasto, una célula destinada a diferenciarse a neurona.

En la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* este proceso inicia en una zona específica del neuroepitelio conocida como “cluster” proneural, en donde a partir de un grupo de 4-6 células (con el potencial de convertirse en neuroblasto) una sola de ellas se delamina, alarga y comienza a moverse dentro del embrión. El resto de las células adquieren el destino epidermal, es decir, son inhibidas para diferenciarse a neuroblasto a través del proceso de inhibición lateral<sup>4</sup> (Figura 2).

**Figura 2.** Formación del neuroblasto . (A) El neuroectodermo en la superficie de un embrión de *Drosophila* se encuentra marcado en rosa. Un corte transversal muestra la monocapa celular en la etapa de blastomero y la posición del neuroectodermo ventral. D: dorsal; V: ventral; P: posterior y A: anterior. (B) En el neuroectodermo ventral, existe un grupo de células conocidas como cluster proneural (rosa). Conforme el desarrollo avanza una de las células se alarga originando el neuroblasto (NB) al tiempo que suprime la diferenciación en las células vecinas a través de la inhibición lateral. El neuroblasto se delamina del epitelio, se divide asimétricamente formando las células madre del ganglio (GMC) (verde), el cual tras dividirse origina neuronas o glia (Amarillo) (Tomado de Torroja, H: *Drosophila neural development*<sup>4</sup>)

El grupo de genes involucrados en esta importante elección del desarrollo comprende a los genes proneurales así como aquellos que participan en el proceso de inhibición lateral, como Notch y Delta

### 2.1.1 Genes proneurales

A finales de los años 70s estudios realizados en *D. melanogaster* permitieron identificar algunos genes involucrados en la diferenciación neuronal temprana: el complejo achaete-scute (asc) que incluye a los genes achaete (ac), scute (sc), lethal of scute (lsc) y asense (as), los cuatro miembros codifican para factores de transcripción pertenecientes a la familia bHLH (hélice-asa-hélice básico), dominio estructural que permite su interacción con el ADN. Posteriormente se aisló el gen atonal (ato), el cual pertenece a una familia diferente al complejo asc y que incluye a otros genes como amos (absent MD neurons and olfactory sensilla) y cato (cousin of atonal). Las características que definen a ambas familias como genes proneurales son: a) la expresión en el ectodermo, principalmente en el cluster proneural, antes que cualquier señal de diferenciación; b) el ser necesarios y suficientes para promover la generación de progenitores neurales del ectodermo; c) la pertenencia a la misma clase de factores de transcripción, lo cual indica que comparten propiedades bioquímicas<sup>5</sup>.

El análisis en vertebrados, ha permitido encontrar numerosos genes relacionados al complejo asc, denominándolos como ash (homólogo de achaete-scute) presentes en todas las especies analizadas (Mash1 en ratón, Cash1 en pollo, Zash1 en el pez cebra y Xash1 en *Xenopus*), así como otros tres genes que se encuentran sólo en una especie (Mash2 en ratón, Xash3 en *Xenopus* y Cash4 en pollo). Respecto a los homólogos de ato la lista es mucho

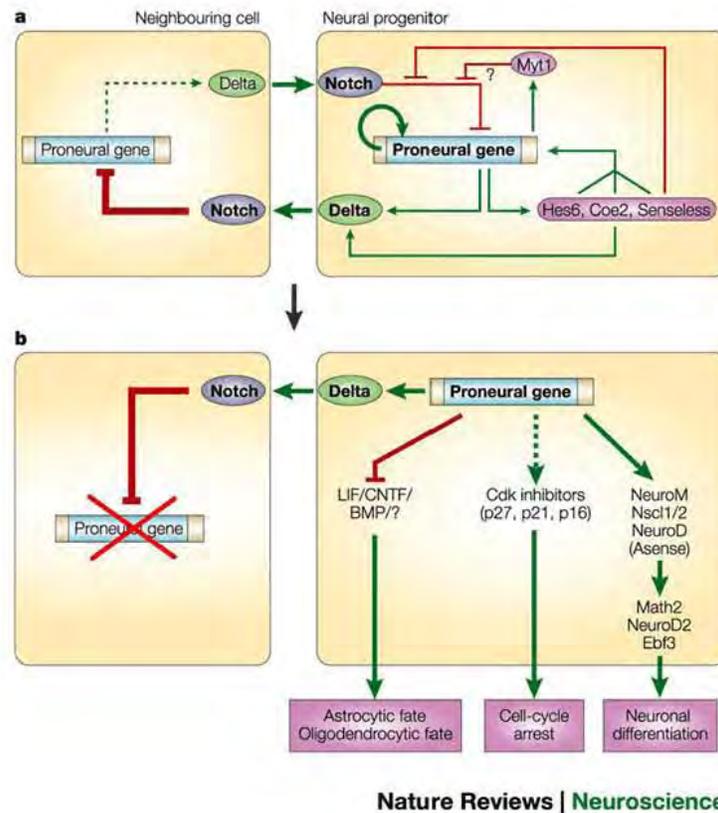
mayor, pero sólo los genes Math1 y Math2 de ratón pueden ser considerados como ortólogos. Otros genes relacionados con ato pueden ser incluidos en familias diferentes (como Neurogenina (Ngn), NeuroD y Olig) ya que poseen residuos específicos en el dominio bHLH<sup>5</sup>.

Los factores de transcripción proneurales activan la transcripción al unirse a zonas específicas del ADN conocidas como cajas E (CANNTG), para lo cual forman heterodímeros con proteínas E de expresión ubicua codificadas por los genes daughterless (da) en Drosophila y E2A, HEB o E2-2 en mamíferos. Los productos de los genes extra macrochaetae (emc) en Drosophila y el inhibidor de diferenciación (Id) en vertebrados actúan como inhibidores de la actividad de los factores proneurales al competir directamente por la unión a proteínas E. Por otro lado las proteínas Hes/Her/Esr en vertebrados constituyen junto con su contraparte hairy y Esp1 en Drosophila otra familia de inhibidores proneurales, ya que actúan directamente como represores en la transcripción de los genes proneurales<sup>6</sup>.

### Inhibición lateral

Una de las primeras funciones realizadas por las proteínas proneurales es restringir su actividad al neuroblasto, inhibiendo su expresión en las células adyacentes y previniendo así su diferenciación. En D. melanogaster, este proceso, denominado inhibición lateral, se inicia con la activación de la vía de señalización Notch/Delta. La expresión del ligando Delta en la célula progenitora, activa una cascada de señalización por Notch (su receptor) en las células vecinas, la cual culmina con la inhibición de los genes proneurales a través de los inhibidores Esp1 en Drosophila y Hes/Her/Esr en vertebrados. Aunque inicialmente los genes proneurales tienen una distribución homogénea

dentro del cluster, a través de la inhibición lateral este patrón de expresión se reduce sólo al neuroblasto<sup>7,8</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Vías reguladoras controladas por los genes proneurales . (a) El proceso de inhibición lateral dentro de las células del cluster neural involucra la vía de señalización Notch/Delta que inhibe la diferenciación neural en las células vecinas. (b) El aumento en la expresión de los genes proneurales en el neuroblasto inicia el programa de diferenciación neuronal, en paralelo a la inhibición del destino glial y la salida irreversible del ciclo celular. (Tomado de Bertrand, N. (2002): Proneural genes and the specification of neural cell types<sup>5</sup>)

### Inhibición del destino glial

En paralelo a los programas de inhibición lateral y diferenciación neuronal, que se abordaran más adelante, los genes proneurales inhiben la diferenciación glial a través de mecanismos independientes. Por ejemplo, en ratones que son dobles mutantes para Mash1 y Math3 o Mash1 y Ngn2 existe un bloqueo de la diferenciación neuronal, el cual es compensado con la expresión prematura de astrocitos en diferentes zonas del cerebro<sup>9,10</sup>.

Asimismo, la sobreexpresión de Ngn2 parece reprimir la diferenciación de oligodendrocitos en la médula espinal<sup>11</sup>.

Un estudio reciente propone un mecanismo para la inhibición de la diferenciación astrocítica por medio de la Ngn1 en la corteza cerebral<sup>12</sup>. La neurogenina puede inhibir la diferenciación glial de dos maneras: a) al asociarse directamente con el complejo p300/CBP-Smad1 e interferir con la formación del complejo que incluye STAT1/3; o bien, b) al prevenir la fosforilación de STAT3<sup>13</sup>. Aquí los factores gliogénicos BMP y CNTF (factor neurotrófico ciliar) actúan de manera sinérgica estimulando la transcripción del marcador glial GFAP (proteína fibrilar ácida glial) al inducir la formación de un complejo que incluye STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), STAT3 y SMAD1, (mothers against decapentaplegic, homologue 1) ambos factores de transcripción co-activadores de p300/CBP<sup>13</sup>.

## **2.2 DIFERENCIACIÓN NEURONAL**

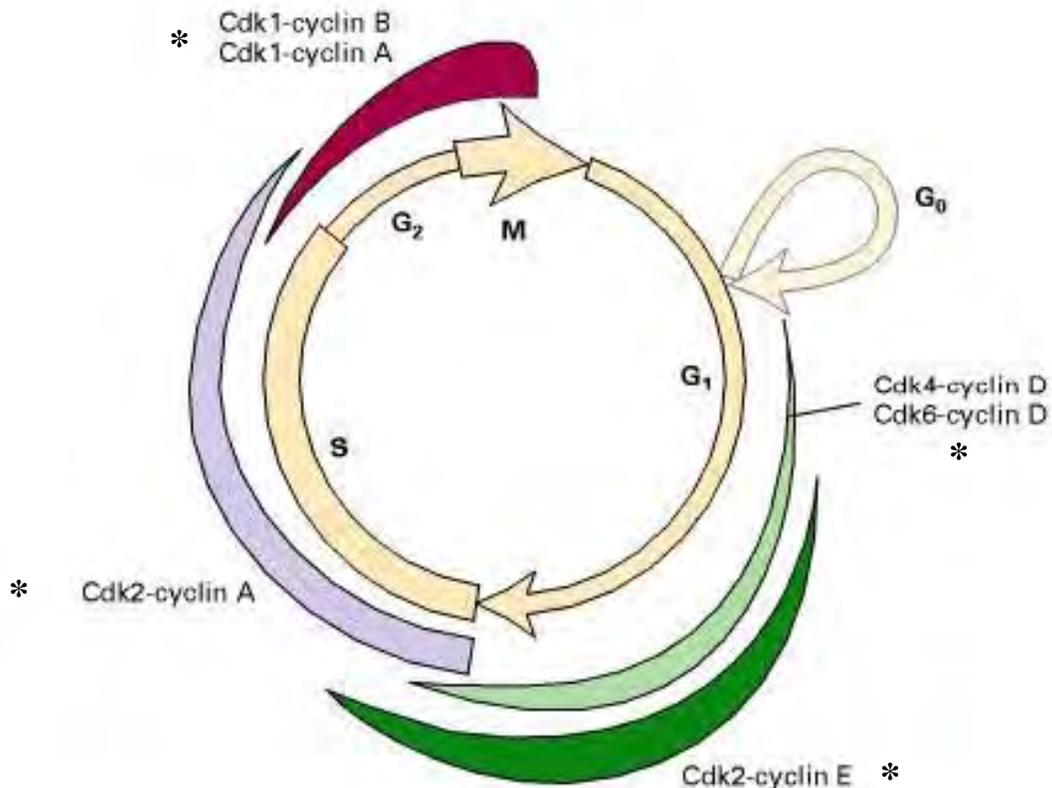
Como se mencionó anteriormente, los genes proneurales actúan como señales intrínsecas que participan en la neurogénesis al activar un complejo programa de diferenciación neuronal que incluye: salida del ciclo celular, migración, desarrollo de procesos celulares y establecimiento de las sinapsis.

### **2.2.1 Salida del ciclo celular**

En células eucariontes, el ciclo celular consta de cuatro etapas fundamentales: G1, S, G2 y M (Figura 4). La estimulación de una célula quiescente resulta en la activación de una cascada de eventos, que incluye la síntesis de ADN y la subsecuente división celular. Adicionalmente, las células poseen un grupo de genes (como p21, p27, p16 y p15) que inhiben la actividad

de las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas, proteínas que juegan un papel esencial en la regulación del ciclo<sup>14</sup>.

La salida del ciclo celular parece ser una condición obligatoria tanto para la miogénesis<sup>15</sup>, como para la neurogénesis<sup>16</sup>.



**Figura 4. Esquemización del ciclo celular en una célula eucarionte y su regulación.** El ciclo celular se divide en cuatro etapas GAP1 (G<sub>1</sub>), Síntesis (S), GAP2 (G<sub>2</sub>) y Mitosis (M), las cuales se realizan progresivamente. La interfase comprende las fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> en donde se sintetiza toda la maquinaria necesaria para la replicación de la célula. Durante la fase S se sintetiza el ADN. Tras la fase G<sub>2</sub> en que la célula se prepara para la replicación inicia la fase M en donde se da la división del ADN. La regulación positiva es ejercida por complejos Cdk-Ciclina, característicos para cada una de las etapas y que a su vez pueden ser regulados negativamente por inhibidores de la familia INK o Cip/Kip como p18 o p21 representados por un (\*) en el esquema superior. Las células que no se dividen salen del ciclo y entran a un estado quiescente conocido como G<sub>0</sub> (Tomado de Lodish, H.A. et al. 1999<sup>14</sup>).

Diversos estudios demuestran que uno de los principales eventos por los cuales las proteínas proneurales participan en la neurogénesis es al promover el arresto celular. Por ejemplo la sobreexpresión de Ngn2 en el tubo neural de pollo resulta en una salida prematura del ciclo y en la

diferenciación temprana de las células neuroepiteliales<sup>17</sup>. De manera similar la expresión de ciertos genes proneurales, como NeuroD, NeuroD2, MATH2 y MATH3 en la línea celular P19 promueve la salida del ciclo, así como la diferenciación neural<sup>16</sup>. El mecanismo por el cual estos genes pudiesen estar regulando la salida del ciclo involucra la activación de proteínas inhibitoras como la p16, p21 y p27 que actúan sobre las ciclinas dependientes de cinasas (CDKs), en puntos específicos del ciclo celular<sup>16</sup>. Por ejemplo NeuroD puede activar el promotor de p21 en células HeLa elevando la expresión de dicha proteína, lo cual resulta en la salida del ciclo celular<sup>18</sup>. Asimismo, el aumento en los niveles de expresión de la proteína p27<sup>kip1</sup> en células transfectadas P19, sugiere que las proteínas proneurales pueden dirigir la salida del ciclo al elevar los niveles de p27<sup>kip1</sup> o de otras proteínas CDKi<sup>16</sup>.

#### Cascada de genes

La habilidad de los genes proneurales (como NeuroD y MATH2<sup>16</sup>) para promover la diferenciación neuronal se basa principalmente en la inducción de otros genes que participan en el programa de diferenciación neuronal (como NeuroD2 y Ebf3<sup>19</sup>). Estos genes al ser administrados de manera ectópica conducen a la diferenciación neuronal, pero son expresados mucho después que los genes proneurales, estando bajo su control transcripcional<sup>19</sup>.

En vertebrados, por ejemplo, los genes de la familia de NeuroD, se expresan en las neuronas inmaduras más que en el neuroblasto. Su expresión ectópica y los ensayos de pérdida de función demuestran que son necesarios para la diferenciación y sobrevivencia de las células granulares en el cerebelo y el hipocampo<sup>20,21</sup>. Las mutaciones de Math2/Nex1 o NeuroD2 en el ratón también resultan en defectos en la diferenciación y sobrevivencia en estas mismas subpoblaciones<sup>22,23</sup> (Figura 3b).

### 2.2.2 Migración

Una vez que los progenitores neurales salen del ciclo celular, otra etapa importante durante la neurogénesis es la migración neuronal, ya que la ubicación topográfica de la neurona es importante para el funcionamiento correcto de los circuitos neuronales y es crucial para el procesamiento de la información dentro del sistema nervioso<sup>24</sup>.

Se han documentado dos modos de migración neuronal durante el desarrollo del CNS, la migración radial y la tangencial.

- a) La migración radial se considera el modo clásico y se ejemplifica muy bien durante el desarrollo de la neocorteza de mamíferos donde los precursores neuronales de la zona ventricular migran radialmente a lo largo de la glia radial hasta la superficie del cerebro para formar la placa cortical resultando en la corteza madura (Figura 5). Otro ejemplo de este tipo de migración lo constituyen las células de la capa granular externa (EGL) del cerebelo y las de la zona ventricular de la médula espinal<sup>24</sup>.
- b) La migración tangencial se caracteriza por el movimiento de las neuronas paralelo a la superficie del cerebro. En el telencéfalo de mamíferos las células que llevan a cabo migración tangencial originan generalmente interneuronas y oligodendrocitos así como la mayoría de los precursores que desarrollan neuronas gabaérgicas y algunas de las neuronas dopaminérgicas y colinérgicas. Este tipo de migración es independiente de la glia radial<sup>24</sup>.

**Figura 5.** Tipos de migración radial y tangencial en la neocorteza . En azul se muestran las neuronas que se mueven a través de las fibras gliales desde la zona ventricular. En rojo se muestran las neuronas que migran tangencialmente desde la eminencia ganglionar hasta la neocorteza. (Tomado de Wong, K et al. (2002): Neuronal migration<sup>24</sup>)

Estudios genéticos tanto en humanos como en modelos animales han permitido la identificación de moléculas involucradas en la migración neuronal, además de caracterizar pasos discretos en este proceso, como son: a) la presencia y detección de una señal ante la cual la célula comienza a migrar; b) la regulación de los componentes de adhesión celular con otras células y con la matriz extracelular; c) señales de atracción o repulsión que dirijan el movimiento neuronal; y d) una vez que la neurona llegó a la posición correcta una señal de paro<sup>24</sup>.

La mayoría de las moléculas identificadas son proteínas intracelulares asociadas al citoesqueleto importantes para la regulación y organización tanto de la actina como de los microtúbulos. Por ejemplo, mutaciones en la Filamina-1 (Fln1) (proteína asociada a actina) causan heterotopia periventricular, caracterizada por la formación de islas ectópicas de neuronas cerca a la zona ventricular como resultado de un defecto en la

migración radial, lo cual sugiere un papel importante de la filamina en la motilidad basada en actina y en el inicio de la migración neuronal<sup>25</sup>.

Otras proteínas como Lis1 y Doublecortina (Dcx) estabilizan microtúbulos y se asocian con la lisencefalia, enfermedad caracterizada por anomalías en el cerebro, incluyendo la ausencia o reducción de las circunvoluciones, así como una interrupción en la laminación de la corteza cerebral<sup>25</sup>.

Estudios realizados en ratón demuestran que el “knock-out” para Cdk5 exhibe defectos en la migración neuronal<sup>25</sup>. Recientemente se ha demostrado que p27<sup>kip1</sup> puede ser regulada por la Cdk5, a través de la fosforilación de la Ser 10, y que la inhibición en la expresión de p27<sup>kip1</sup> por shARN impide la localización de las neuronas en la placa cortical, por lo que se piensa que una vez que ha concluido su papel en el control del ciclo celular Cdk5, puede ser un regulador importante en la migración celular<sup>26</sup>.

### 2.2.3 Desarrollo de procesos celulares

Una vez que el neuroblasto ha sido especificado para un destino neuronal en particular y que ha migrado hasta su posición final, debe adquirir la morfología de una neurona madura y sobrevivir hasta que su axón alcance su blanco. Pocos componentes del programa genético que controla los últimos pasos de la diferenciación neuronal se conocen hasta el momento. En el caso de las interneuronas corticales se sabe que el GDNF (factor neurotrófico derivado de la glia) está involucrado en el crecimiento axonal y en la adquisición de la morfología neuronal<sup>27</sup>, mientras que Dlx1 que actúa sinérgicamente con Dlx2 para la migración tangencial de las interneuronas corticales, participa por sí solo en el desarrollo dendrítico en el mismo tipo de neuronas<sup>28</sup>.

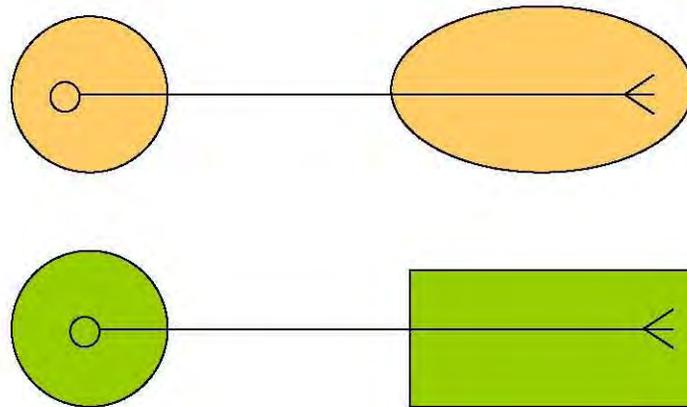
#### 2.2.4 Establecimiento de sinapsis

La formación de las sinapsis no es un evento aislado durante el desarrollo; la formación de las conexiones adecuadas entre la célula presináptica y la postsináptica se lleva a cabo sólo tras un proceso preciso de navegación del cono axonal hasta su blanco. Sin embargo, poco se sabe respecto a las señales que participan en este proceso. En principio factores repulsivos y atrayentes (como las semaforinas y las netrinas), además de un sustrato adecuado de navegación (como la laminina) pueden guiar el crecimiento axonal<sup>29</sup> (Figura 6a).

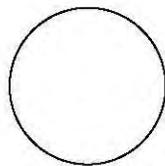
Una vez que el axón llega a su área blanco en la terminal nerviosa la expresión de receptores hacia moléculas quimioatrayentes juegan un papel determinante en la localización topográfica de la neuronas (Figura 6b). Aún después del establecimiento de la conexión sináptica se dan procesos de reajuste y reorganización en respuesta a ciertos estímulos, culminando con la eliminación de las conexiones inapropiadas<sup>29</sup>.

La neurogénesis no termina cuando una célula abandona el ciclo celular y adquiere la morfología característica de una neurona. Para que ésta funcione, tiene que expresar muchas propiedades sumamente especializadas, en particular, los transmisores que envían señales a otras neuronas y a los órganos blanco, así como los receptores que permiten la respuesta de la célula a aferencias sinápticas<sup>2</sup>. Incluso después de que se hayan establecido la identidad y las propiedades funcionales de la neurona, la muerte celular programada, o apoptosis, es un proceso biológico clave responsable de la eliminación selectiva de neuronas<sup>2</sup>.

A)



B)



**Figura 6. Principios de navegación axonal.** (a) Selección del área blanco. (b) Localización topográfica. (Tomado de Kidokoro, Y (2001): Synapse formation<sup>29</sup>)

### 2.2.5 Regulación extrínseca de la neurogénesis.

Aunque se ha demostrado que los factores de transcripción juegan un papel crítico durante la neurogénesis, poco se sabe acerca de las señales extracelulares responsables de la activación de dichos factores. La familia de las neurotrofinas, que incluye al factor de crecimiento neural (NGF), al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y las neurotrofinas 3, 4, 6 y 7 (NT-3, NT4/5, NT-6 y NT-7) constituyen uno de los grupos cuyas funciones durante el desarrollo del SNC se encuentran mejor caracterizadas<sup>30</sup>.

La expresión tanto de estas proteínas como de sus receptores TrkA, TrkB, TrkC o p75 durante el desarrollo se ha caracterizado en el neuroepitelio así como en células troncales en cultivo<sup>31</sup>. El NGF acelera la proliferación de progenitores neurales junto con el FGF2<sup>32</sup>, mientras que BDNF potencia la diferenciación neuronal de neuroesferas producidas a partir de células troncales<sup>33</sup>. Finalmente la NT-3 promueve la sobrevivencia de las neuronas corticales<sup>34</sup> así como de neuronas de la zona subependimal del cerebro anterior, además de inducir la diferenciación de oligodendroglia<sup>35</sup>.

En un estudio reciente se demostró que BDNF y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) de origen cerebelar tienen un efecto antiproliferativo y de diferenciación, cuando son aplicados a células granulares hipocampales<sup>36</sup>.

### **2.3 EL HIPOTÁLAMO COMO MODELO DE ESTUDIO**

El hipotálamo junto con la hipófisis constituyen el eje principal del sistema neuroendócrino al integrar señales tanto de la periferia como del cerebro, controlando así la síntesis y secreción de numerosas hormonas necesarias para la función autónoma, el crecimiento y desarrollo, la termorregulación, la actividad del sistema inmune, la ingesta de alimento, el sueño y las conductas reproductivas, entre otras<sup>37</sup>.

La adenohipófisis involucrada en este eje, consiste en cinco tipos diferentes de células definidas de acuerdo al tipo de hormona que producen: tirotropos, somatotropos, corticotropos, lactotropos y gonadotropos que sintetizan respectivamente: la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la hormona del crecimiento (GH), la hormona adrenocorticotropica (ACTH), la

prolactina (PRL), y las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH)<sup>37</sup>.

Por su parte, el hipotálamo neuroendócrino consiste fundamentalmente de dos poblaciones distintas de neuronas:

- ❖ Magnocelulares: agrupadas en los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) y que proyectan sus axones a la hipófisis posterior para liberar oxitocina (OT) y arginina vasopresina (AVP)<sup>37</sup>
- ❖ Parvocelulares: distribuidas en los núcleos preóptico (PON), periventricular (PV), arcuato (ARN), ventromedial (VMN) y PVN de donde proyectan sus terminales a la eminencia media para liberar la hormona estimulante de tirotrópina (TRH), hormona estimulante de corticotropina (CRH), somatostatina (SS), hormona estimulante de la hormona de crecimiento (GHRH) y dopamina (DA)<sup>37</sup>.

El trabajo de un gran número de laboratorios ha permitido caracterizar, no sólo el tipo de hormonas sintetizadas y liberadas por cada subpoblación de las neuronas hipofisiotrópicas, sino en algunos casos como para las neuronas TRHérgicas, la ubicación y el papel fisiológico que éstas juegan en el organismo, lo cual convierte al hipotálamo en un sistema sumamente ventajoso para estudiar los mecanismos involucrados en la generación de diferentes poblaciones celulares dentro del sistema nervioso central (SNC).

Estudios realizados recientemente, tanto a nivel genético como molecular, han identificado algunos factores de transcripción que participan en el desarrollo de ciertos núcleos hipotalámicos (Figura 7). En el caso del ratón “knock-out” para el gen de la familia homeobox *otp* el PVN, SON, PV anterior y ARN muestran una baja densidad celular, además de que la

expresión de TRH, CRH, AVP, OT y SS se encuentra totalmente abatida<sup>38,39</sup>. Otro factor involucrado en el desarrollo de las neuronas del PVN y SON es el factor Brn2, perteneciente a la familia POU; en este caso el ratón nulo para la expresión del gen exhibe defectos en la expresión de CRH, OT Y AVP, la proyección de axones y la sobrevivencia de las neuronas neurosecretoras de estos núcleos<sup>40,41</sup>. El factor Sim1<sup>42,43</sup> de la familia bHLH-PAS expresado principalmente en el PVN, aPV y SON y en cuyo mutante se ve afectada la función de las neuronas parvocelulares y magnocelulares, disminuyendo la expresión de OT, AVP, TRH CRH y SS y cuyo mecanismo parece ser la regulación directa de Brn2<sup>40,41</sup>. Finalmente Sim2<sup>101</sup>, paralogo de Sim1 y que contribuye a la expresión de TRH y SS actuando río abajo de Otp y Sim1. Estos estudios en conjunto demuestran que la expresión de un solo factor de transcripción es capaz de regular la diferenciación de ciertos fenotipos neurales en regiones específicas dentro del cerebro.

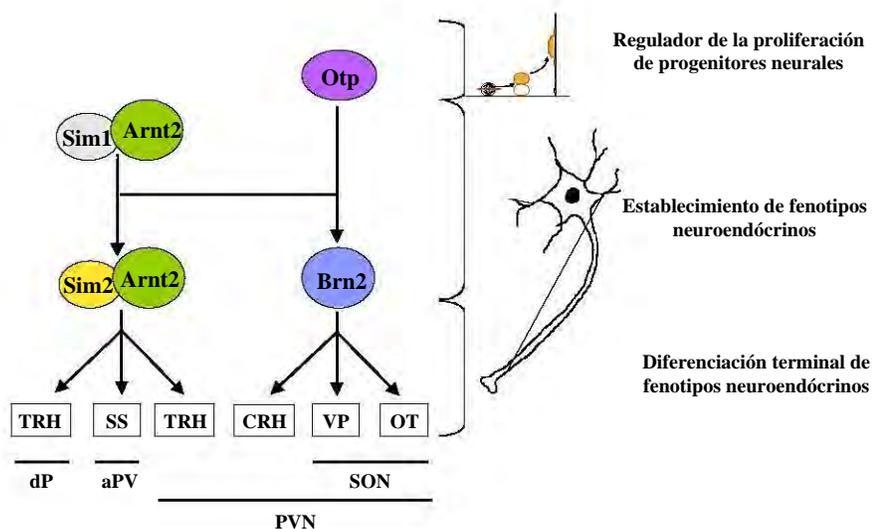


Figura 7. Factores de transcripción involucrados en el desarrollo de los fenotipos neuroendócrinos hipotalámicos. Modelo basado en el fenotipo de ratones carentes para la expresión de algunos factores de transcripción. dP área preóptica dorsal; aPV núcleo periventricular anterior; PVN: núcleo paraventricular; SON núcleo supraóptico. (Tomado de Perez-Martínez, L y JL Charli, en prensa<sup>44</sup>)

### 2.3.1 La Hormona Liberadora de Tirotropina

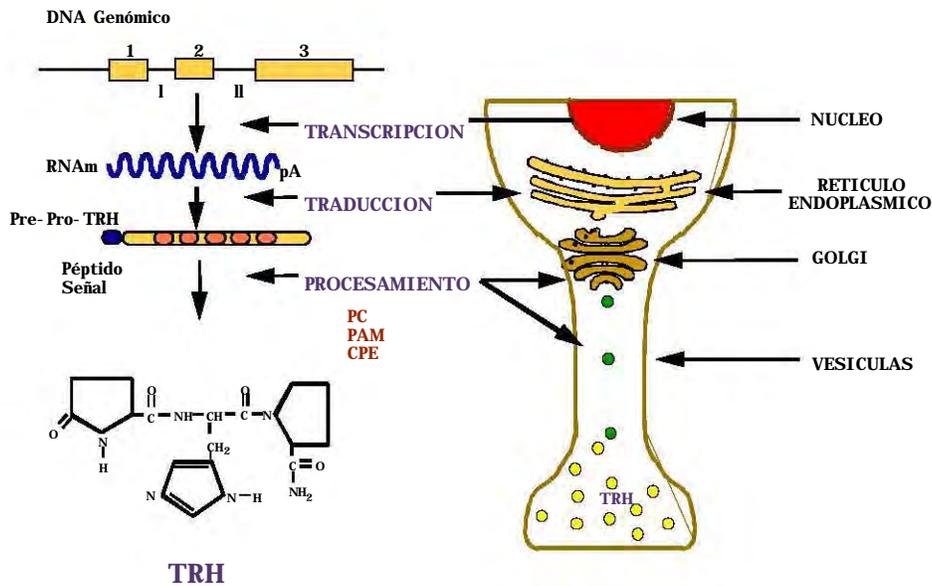
Para los fines de este trabajo nos centraremos en la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH por sus siglas en inglés) que juega un papel fundamental en el sistema endócrino al regular el eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides (HHT). Este tripéptido (L-piroglutamil L-histidil L-prolinamida) se sintetiza en diferentes núcleos del hipotálamo (como el preóptico, anterior, lateral, dorsomedial y supraóptico, periventricular y supraquiasmático, así como los núcleos dimórfico sexual, medial y lateral del área preóptica)<sup>45,46</sup>. Sin embargo, son las células parvocelulares del núcleo paraventricular las que proyectan sus axones a la eminencia media (EM) de donde, en respuesta a un estímulo neuronal, se libera al sistema portal, a través del cual llega a la hipófisis anterior, en donde al unirse a receptores específicos en lactótrofos y tirótrofos induce la síntesis de Prolactina (PRL), así como la síntesis y liberación de Tirotropina (TSH)<sup>47</sup>.

Sin embargo, más de dos terceras partes de la TRH cerebral se encuentran fuera de la zona hipofisiotrópica del hipotálamo en el sistema límbico (Corteza, Amígdala, Núcleo acumbens, Bulbo olfatorio), el Septum, el Tallo encefálico y la Médula espinal<sup>45</sup>. Además se encuentra en tejidos fuera del SNC, como son tracto gastrointestinal, páncreas, corazón, ovarios, testículos y placenta<sup>48-50</sup>. Además de su papel como neurohormona se ha propuesto que la TRH participa en la modulación de otras actividades biológicas como son: la termorregulación, la memoria, el control de la motilidad gastrointestinal, la secreción del ácido gástrico, la vasodilatación y la modulación del sistema inmune<sup>51</sup>.

Hasta el momento, en los genomas de humano y rata, se ha caracterizado un sólo gen que codifica para la TRH; la unidad transcripcional contiene tres exones interrumpidos por dos intrones. En rata, el exón 1 codifica la región 5' no traducida, que contiene la región promotora en la que podemos encontrar elementos consenso como: una caja TATA (-29/-25pb), dos cajas GC (-117/-197 y -687/-661), dos sitios que reconocen a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) (-101/-94 y -59/-52), uno de los cuales es también reconocido por AP1 y es capaz de unir a TR 1, así como cuatro posibles sitios de unión al receptor a glucocorticoides (-735/-729, -560/-559, -210/-204 y -284/-269). El exón 2 codifica el péptido señal y una pequeña porción del extremo amino terminal, mientras que el exón 3 codifica el resto del extremo amino terminal, cinco copias de la secuencia de TRH y la región 3' no traducida y siete péptidos crípticos cuya función se encuentra todavía en estudio, aunque uno de ellos (Ps4) actúa de manera sinérgica con TRH promoviendo la secreción hormonal a partir de la hipófisis<sup>52</sup>.

La biosíntesis de la TRH inicia a partir de un precursor de 26 kD (preproTRH) que contiene repetidas cinco veces la secuencia gln his pro gly, la cual se encuentra flanqueada por residuos básicos (Arg-Arg o Arg-Lys), los cuáles son cortados proteolíticamente generando TRH-gly (gln his pro gly). Posteriormente, la glutamina N-terminal es ciclada para formar ácido piroglutámico por la enzima glutamil ciclasa, mientras que la carboxipeptidasa peptidil-glicina- - amidante monooxigenasa (PAM) amida a la prolina, generando de esta manera 5 moléculas de TRH y 7 péptidos crípticos, uno de los cuales regula junto con TRH la secreción de TSH y PRL; del resto de los

péptidos su función se encuentra actualmente en estudio (revisado en 53) (Figura 8).



**Figura 8. Esquematación del proceso de síntesis de la TRH.** La biosíntesis de la TRH inicia en el núcleo celular, donde se sintetiza un ARNm, el cual es posteriormente traducido en los ribosomas del RER, generando un precursor peptídico de alto peso molecular que contiene la secuencia del triptéptido repetida cinco veces. Durante su transporte a la terminal nerviosa, el péptido sufre las últimas modificaciones para convertirse en el péptido activo, el cual se almacena en vesículas de secreción en la terminal nerviosa.

A pesar del amplio conocimiento que existe sobre la función de los fenotipos neuroendócrinos y en especial de la TRH, poco se sabe acerca de las vías que regulan su expresión durante el desarrollo. Gracias al uso de análogos de timidina, se ha podido establecer in vivo el "nacimiento" de poblaciones neuronales específicas. Para el caso de las células neuroendócrinas TRHérgicas del PVN sabemos que en rata, estas nacen entre los días E11 y E15<sup>54</sup>, con un pico máximo al día E12, mientras que el pico de las células no-neuroendócrinas se observa al día E11 (Figura 9).

Por otro lado, estudios realizados por hibridación in situ, han permitido detectar al ARNm de TRH en el hipotálamo lateral desde el día E14, aunque en el PVN comienza a ser detectable a partir del E16<sup>55</sup> y los niveles tienden a elevarse progresivamente hasta los 7 días de vida postnatal, edad a partir de la cual inicia la regulación negativa por las hormonas tiroideas<sup>56</sup>.

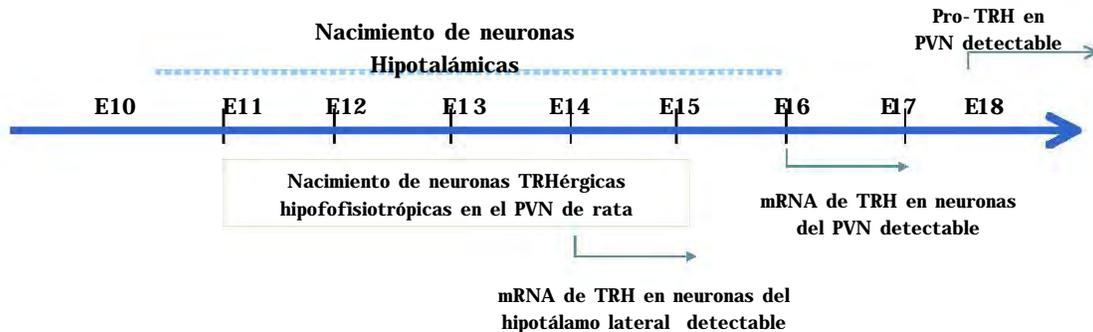


Figura 9. Cronología del desarrollo de neuronas TRHérgicas hipotalámicas en la rata. Los datos obtenidos a través del marcaje con timidina [<sup>3</sup>H] e hibridación in situ han permitido establecer el origen de las neuronas TRHérgicas tanto neuroendocrinas como no neuroendocrinas. (Tomado de Gonzalez-Sánchez, Tesis de maestría<sup>57</sup>).

### Regulación de la biosíntesis de TRH

Estudios previos en el laboratorio han mostrado que en cultivos primarios de hipotálamo fetal (E17) los niveles de ARNm de TRH se incrementan de manera específica en respuesta a la neurotrofina BDNF. Este efecto es independiente de la sobrevivencia celular y se observa exclusivamente en la población de células TRHérgicas que expresan el receptor para BDNF TrkB<sup>58</sup>.

Estos datos en conjunto indican que el BDNF participa en la etapa de diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual esta neurotrofina ejerce su efecto aún queda por elucidarse.

### Análisis del transcriptoma TRHérgico

Con el fin de identificar otras moléculas que pudiesen estar participando en la regulación de la biosíntesis de TRH, en el laboratorio se decidió analizar el transcriptoma de las células TRHérgicas a través de microarreglos de ADN.

Para esto, fue necesario optimizar una técnica para aislar neuronas TRHérgicas a partir de cultivos primarios de hipotálamo fetal de 17 días de gestación (Figura 10). La técnica consistió en transfectar los cultivos con un vector que expresa la proteína GFP bajo el promotor de TRH y purificar posteriormente las células por citometría de flujo (FACS)<sup>59</sup>. A partir de estas células se generó un cARN con el cual se hibridó el “GenChip” U34 (Affymetrix), que evalúa la expresión de 8,799 genes del genoma de rata.

**Figura 10. Protocolo para la purificación de neuronas expresando la TRH a partir de cultivos de hipotálamo fetal de rata.** Los hipotálamos de fetos de 17 días de gestación son extraídos, las células dispersadas y mantenidas en cultivo. Un día después de su siembra son transfectadas con el vector que dirige la expresión de la proteína GFP a partir el promotor de la TRH. Dos días después, las células que emiten fluorescencia son purificadas a través de un citómetro de flujo. (Tomado de Guerra-Crespo (2004), tesis de doctorado<sup>60</sup>)

Los datos obtenidos en dos microarreglos demuestran que 21 transcritos tienen niveles de expresión incrementados o disminuidos significativamente respecto al control de células no purificadas (Tabla 1).

<b>Transcrito</b>	<b>Nivel de cambio en la expresión (log<sub>2</sub>)</b>	<b>Función</b>
Secuencia transcrita	3.08	Desconocida
Secuencia transcrita con similaridad a pir:A42772	3.03	Desconocida
Neurofilamento H	2.88	Soporte estructural neuronal
Gen regulado positivamente por la 1,25-dihidroxitamina D3	2.58	Desconocida
Secuencia transcrita con similaridad a pir:I48404 (Histona 4)	2.43	Desconocida
Factor 4 similar a Kruppel	2.18	Factor transcripcional
Secuencia transcrita	2.05	Desconocida
EST197673 de ADNc del extremo 3' de Rattus norvegicus	1.98	Desconocida
Folistatina	1.75	Inhibidor de la FSH
Factor de activación de la transcripción 3	1.70	Factor transcripcional
Secuencia transcrita	1.70	Desconocida
c-fos	1.55	Factor transcripcional
Secuencia transcrita	1.55	Desconocida
Gen inducido tempranamente por TGF	1.50	Factor transcripcional
Región larga interespaseada de ADN repetitivo, LIN4 (L1Rn)	1.45	Desconocida
Región larga interespaseada de ADN repetitivo, LIN3 (L1Rn)	1.23	Desconocida
Proteína GRP78 regulada por glucosa	1.15	Respuesta a estrés
Región terminal repetida de 2.4 kb de ADN de rata	1.13	Desconocida
Internexina alpha	0.83	Soporte estructural neuronal
Colágena Tipo I alpha 1	- 1.68	Soporte estructural glial
Colágena Tipo III alpha 1	- 2.10	Soporte estructural glial

Tabla 1. Relación de transcritos con diferencias significativas en los microarreglos provenientes de células purificadas, comparada contra el control de células de cultivo primario sin purificar. El log<sub>2</sub> = 1 indica un incremento de 2 veces en la expresión (Tomado de Guerra-Crespo (2004), tesis de doctorado<sup>60</sup>).

Dentro de los transcritos con un nivel de cambio significativamente elevado se encuentran la internexina alfa y el neurofilamento H; este último componente del citoesqueleto involucrado en el mantenimiento de la arquitectura neuronal<sup>61a</sup>. Por otro lado, algunos marcadores gliales mostraron niveles significativamente disminuidos; tal es el caso de la colágena tipo I-alfa-1 y la colágena tipo III-alfa-1 ambas proteínas fibrilares expresadas en tejido conectivo dentro del SNC en células gliales pero no en neuronas<sup>61b,62</sup>.

Asimismo, destacan los incrementos detectados en transcritos de los que aún se desconoce la proteína para la cual codifican.

De especial interés para el laboratorio resultó el aumento observado en la expresión de tres factores de transcripción respecto a sus controles: el factor activador de la transcripción 3 (ATF3), el gen inducido tempranamente por TGF (TIEG) y el factor 4 similar a krüppel (KLF4), y cuyas funciones involucran la diferenciación terminal en diferentes tejidos<sup>60</sup>.

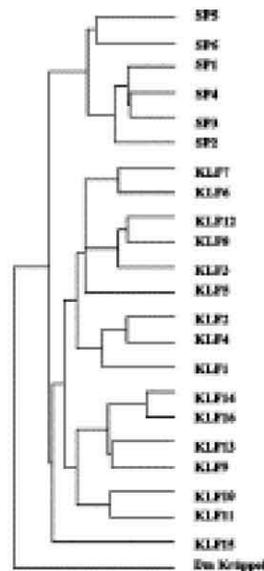
El presente trabajo se restringe al estudio de KLF4 ya que hasta el momento no se ha determinado el patrón de expresión y su función durante el desarrollo del SNC.

### 3 ANTECEDENTES

---

#### 3.1 EL FACTOR- 4 SIMILAR A KRÜPPEL

Los factores de transcripción se clasifican de acuerdo a los dominios estructurales a través de los cuales se unen al ADN, siendo uno de los más comunes los dedos de zinc (1% del genoma humano)<sup>14</sup>. La familia de los factores similares a krüppel (KLFs), filogenéticamente relacionada con la familia de los factores de transcripción SP1, se caracteriza por la presencia de tres dedos de zinc tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> altamente conservados en su extremo carboxilo terminal, además de poseer gran homología con el gen de segmentación krüppel de la mosca de la fruta *D. melanogaster* (Figura 11). En el humano, la familia incluye 16 miembros involucrados en procesos biológicos tan diferentes como proliferación celular, apoptosis, diferenciación y embriogénesis y desarrollo tumoral, ya sea a través de la activación o inhibición de un gran número de genes<sup>63</sup>.



**Figura 11.** Relación filogenética de la familia KLF-SP . Clasificación de las 21 proteínas relacionadas con KLF1 identificadas por medio de una búsqueda en BLAST. La proteína krüppel de la mosca de la fruta *D. melanogaster* (Dm) fue utilizada como grupo externo (Tomado de Zhang, 2005<sup>64</sup>).

El gen que codifica para KLF-4 en la rata contiene una región 5 no traducible de 311 pb, un único marco de lectura abierto (ORF) de 1,449 pb formado por cinco exones separados por cuatro intrones, además de una región 3 no traducible de 977 pb<sup>65</sup>.

El ORF posee tres posibles sitios de inicio de la traducción, aunque solamente el segundo cumple con la regla de Kosak, codificando para un polipéptido de 483 amino ácidos con una masa aproximada de 53 kDa<sup>65</sup>. La proteína, al igual que otros miembros de la familia, contiene tres dedos de zinc en la región C-terminal, una señal de localización nuclear; un dominio rico en prolina y serina, un dominio PEST característico de proteínas con una vida media corta (<2 hrs), así como un dominio SH3 de unión a otras proteínas con dominios ricos en prolina<sup>65</sup>. Respecto a su interacción con el ADN se sabe que al igual que otros miembros de la familia, KLF4 se une a la secuencia consenso CACCC así como a cajas ricas en GC, como aquellas reconocidas por otros miembros de la familia SP1<sup>66</sup> (Figura 12).

En cuanto a su distribución, ensayos por Northern blot han mostrado una expresión abundante en el tracto gastrointestinal<sup>65</sup> (por lo que también se le denomina "gut krüppel like factor" o GKLF), pulmón<sup>65</sup>, testículos<sup>65</sup>, timo<sup>67</sup> y endotelio vascular<sup>68</sup>. Estudios por hibridación in situ, indican que la expresión del ARNm de KLF4 ocurre principalmente en el epitelio intestinal<sup>65</sup> y en la piel<sup>69</sup>, exclusivamente en células postmitóticas (Figura 13); además se ha relacionado con la maduración de células epiteliales en el timo<sup>67</sup>. Estos datos en conjunto sugieren que la expresión de KLF4 está asociada con estados de diferenciación terminal en este tipo de epitelios, lo cual además se apoya en la observación de que KLF4 se expresa abundantemente

alrededor del día E17, etapa del desarrollo fetal en la que el intestino, la piel y el timo, sufren cambios dramáticos previos a la maduración<sup>67,69,70</sup>.

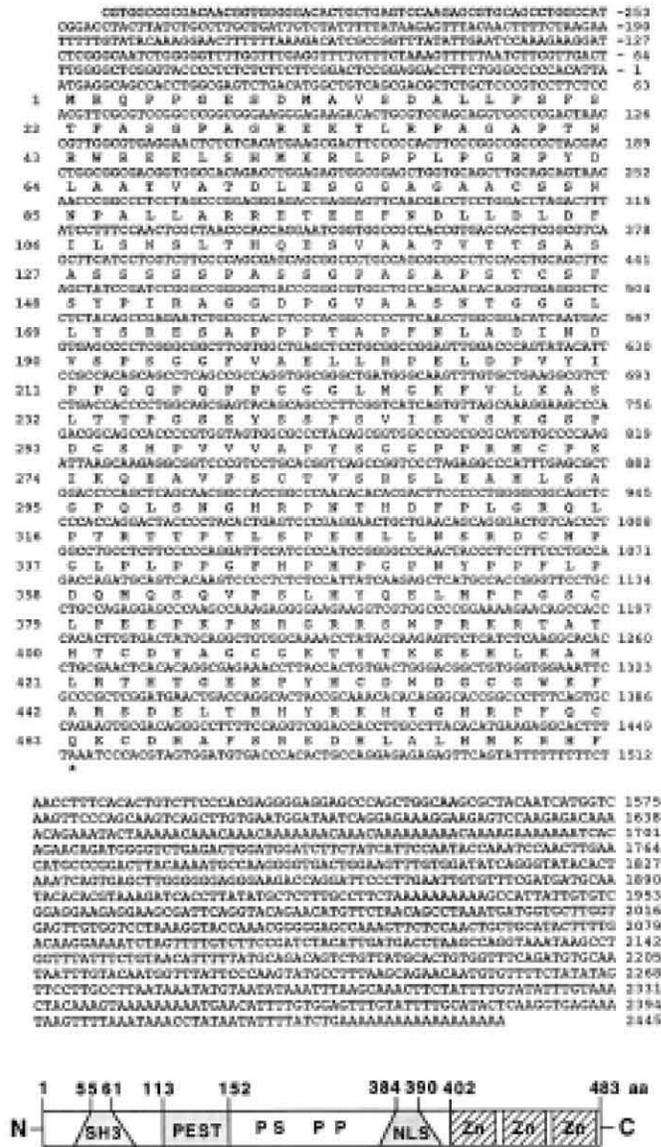


Figura 12. Secuencia nucleotídica completa y secuencia de aminoácidos deducida para KLF4. Los números de la izquierda corresponde a la secuencia de aminoácidos, mientras que los de la derecha corresponden a la secuencia nucleotídica. En el esquema inferior se muestra el marco de lectura abierto de KLF4: (N) amino terminal, (C) carboxilo terminal y las cajas de líneas diagonales representan los tres dedos de zinc. Los posibles sitios de reconocimiento para proteínas SH3, la secuencia PEST y una posible señal de localización nuclear corresponden a las cajas sombreadas. (Tomado de Shields, et al 1996<sup>65</sup>)

La función de KLF4 en eventos de diferenciación ha podido demostrarse a través del análisis de ratones *Klf4*<sup>-/-</sup>. Aunque al momento del nacimiento no existen diferencias morfológicas evidentes al compararlos con su contraparte silvestre, los ratones nulos para la expresión de KLF4 son incapaces de alimentarse al no poder succionar. Sin embargo, la muerte a las pocas horas de nacidos se debe a un defecto en la función de barrera de la piel, la cual se evidencia por la incorporación de colorantes y una elevada deshidratación. Estos defectos están directamente relacionados con drásticos cambios en la diferenciación terminal de la dermis, principalmente en el estrato córneo, donde las células no adquieren la morfología aplanada característica, además de que no excluyen sus organelos, favoreciendo además la disposición irregular de lípidos<sup>71</sup> (Figura 13A).

KLF4 también es necesario para la diferenciación terminal de células calciformes en el colon. El ratón *Klf4*<sup>-/-</sup> muestra una reducción del 90% en el número de células que se forman, así como una expresión anormal de los marcadores específicos para estas células<sup>72</sup>.

Por otro lado, la expresión ectópica de KLF4 en la lámina basal de la epidermis bajo el promotor de la queratina 5 acelera el proceso de formación de la piel hasta en un día, al regular conjuntos de genes involucrados en esa función como la queratina<sup>71</sup> (Figura 13D).

Estudios realizados *in vitro*, han permitido asociar a este factor de transcripción con estados de arresto celular. Por ejemplo, en cultivo de células NIH 3T3, los niveles del ARNm de KLF4 se encuentran disminuidos o son inexistentes en células mitóticamente activas, mientras que aquellas en que se induce la salida del ciclo celular por privación de suero o inhibición

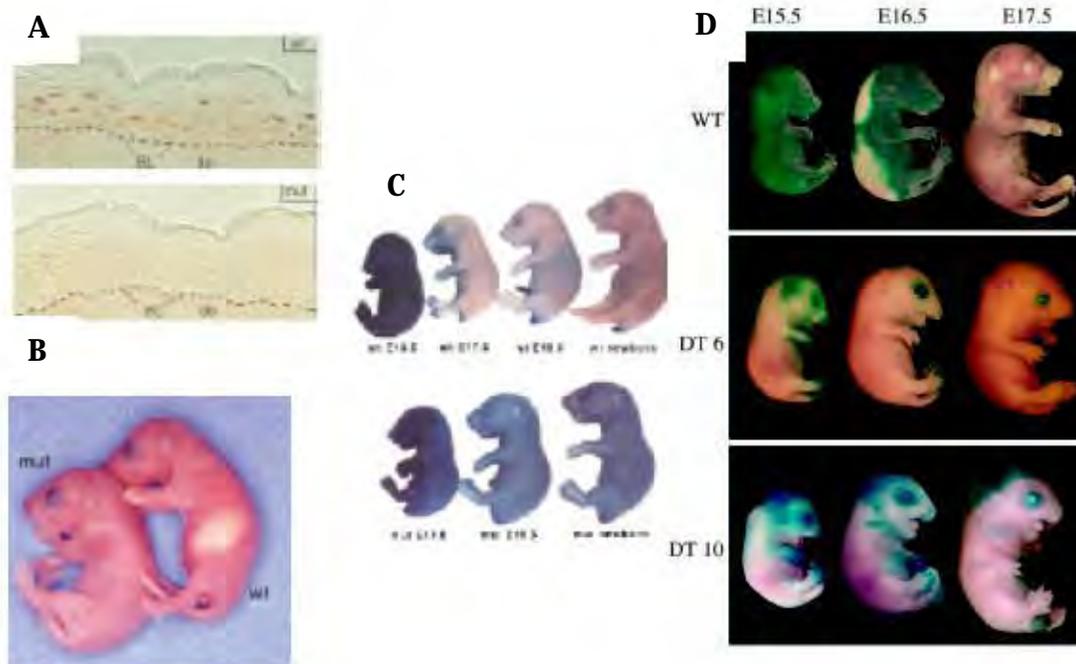
por contacto, muestran niveles significativamente elevados de este factor respecto a sus controles. Asimismo, la estimulación para reingresar al ciclo celular agregando suero fresco, ocasiona una disminución en la expresión del ARNm de KLF4, además de que la sobreexpresión de la proteína por transfección inhibe la síntesis de ADN. Estos resultados sugieren que KLF4 es un potente regulador negativo del ciclo celular<sup>65</sup>.

El mecanismo por el cual KLF4 regula la salida del ciclo celular se ha caracterizado por diferentes grupos. Shields y colaboradores, indujeron la expresión de KLF4 durante la salida del ciclo causada por daño en el ADN. Este aumento en KLF4 activa la proteína supresora de tumores p53 que como consecuencia induce al inhibidor de ciclinas p21<sup>WAF1/Cip1</sup> a través de la unión directa de KLF4 en su promotor<sup>73</sup>.

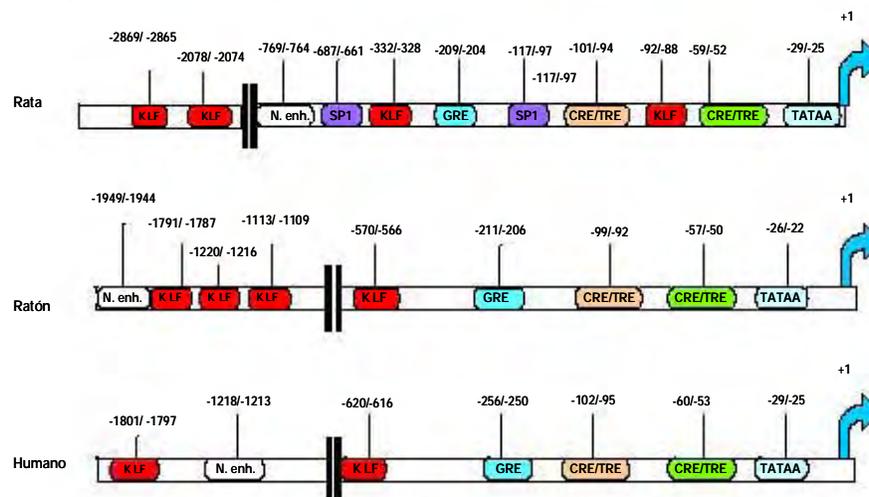
Asimismo, la sobreexpresión de KLF4 en células de carcinoma de colon HT29 también resulta en una reducción en la expresión de la ciclina D, debido a un efecto represor de KLF4 sobre el promotor de esta ciclina<sup>74</sup>.

Estos datos en conjunto demuestran que KLF4 juega un papel importante en la diferenciación de ciertos fenotipos, ya sea al regular genes involucrados en procesos de diferenciación terminal como las queratinas 4 y 19; o bien involucrados en la regulación del ciclo celular como p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, y la ciclina D1.

Finalmente, el análisis de la región promotora del gen de TRH de rata, en donde se encontraron cuatro probables sitios de unión tipo CACCC para los miembros de la familia KLFs, así como dos posibles sitios de unión tipo SP1, (Figura 14) nos lleva a pensar que el factor de transcripción KLF4 pudiese estar participando en la diferenciación del hipotálamo.



**Figura 13. Expresión de KLF4 y su papel en la permeabilidad de la piel.** A) La expresión de KLF4 en las células postmitóticas se muestra por inmunohistoquímica en secciones de epidermis de ratones neonatos silvestres en la parte superior y *Klf4*<sup>-/-</sup> en la parte inferior. B) Ejemplares de ratones de cuatro horas de nacidos *Klf4*<sup>-/-</sup> y su control. C) Ensayo de exclusión de colorante que demuestran defectos en la función de barrera de la piel. D) Adquisición acelerada de dicha función en dos líneas K5-*Klf4* (DT6 y DT10) a los estadios que se muestran en la parte superior del panel. (Tomado de Segre, 1999<sup>69</sup> y Jaubert, 2003<sup>71</sup>).



**Figura 14. Representación esquemática de la región promotora del gen de TRH.** El análisis de las secuencias promotoras de rata, ratón y humano en el que se muestran algunos de los elementos de respuesta a factores transcripcionales identificados con ayuda del programa MATINSPECTOR de GENOMATIX<sup>75</sup>. En rojo se indican las posiciones relativas de los elementos tipo CACCC para la posible unión de factores tipo KLF. En morado se muestran los sitios correspondientes a las cajas tipo GGGCGGG que reconocen el factor de transcripción SP1. CRE, elemento de respuesta a AMPc; TRE, elemento de respuesta a hormonas tiroideas; GRE, elemento de respuesta a glucocorticoides; N. enh., “enhancer” neuronal.

## 4 JUSTIFICACIÓN

---

El establecimiento de un fenotipo neuronal es el resultado de una serie de eventos coordinados que incluyen la salida irreversible del ciclo celular y la expresión ordenada de genes específicos, todo esto en respuesta a múltiples señales tanto extracelulares como intracelulares.

En el caso particular de los diferentes fenotipos neuroendócrinos hipotalámicos, el estudio del proceso de diferenciación resulta de gran interés por diversas razones. En primer lugar, la importancia que tiene el hipotálamo al regular numerosos procesos fisiológicas como el crecimiento y desarrollo, termorregulación, actividad del sistema inmune, ingesta de alimento, sueño y la conducta reproductiva, por mencionar sólo algunas.

Si bien se conocen algunas de las señales (BMP y Shh<sup>76</sup>) involucradas en el establecimiento de ciertos fenotipos hipotalámicos, no ha sido sino hasta la última década que han comenzado a esclarecerse los mecanismos a través de los cuales esto ocurre, en donde los factores de transcripción como Six-3<sup>76</sup> juegan un papel preponderante, por lo que este trabajo contribuirá incrementando el conocimiento existente en este campo.

Recientemente Nilaweera y colaboradores sugirieron que los factores de transcripción tipo bHLH como Nhlh-2 (factor neurológico básico HLH-2) pudiesen estar participando de manera importante en el balance energético, al regular la expresión de genes como POMC (pro-opiomelanocortina) y CART (transcrito regulado por cocaína y anfetamina), conocidos por su función anorexigénica<sup>77</sup>. Por esta razón, el conocer y manipular las diferentes señales que definen el destino de los diferentes fenotipos neuroendócrinos hipotalámicos a partir de progenitores neurales posibilitaría en un futuro la

optimización de protocolos de diferenciación y la definición de las características particulares de una población requerida para uso terapéutico (v.g. obesidad, anorexia), ya sea a través de la generación *in vitro* para posteriormente transplantarla o bien para la regeneración a partir de los precursores neurales presentes en el cerebro adulto.

## 5 HIPÓTESIS

---

En base a que el evento de diferenciación neuronal requiere la salida irreversible del ciclo celular, aunado a los datos obtenidos a partir del transcriptoma de las neuronas TRHérgicas en los que KLF4 se encuentra significativamente incrementado, proponemos que la expresión de KLF4 pudiera estar regulada durante el desarrollo del hipotálamo.

## 6 OBJETIVOS

---

### GENERAL

- Determinar el patrón de expresión del ARNm de KLF4 durante el desarrollo del hipotálamo de rata

### ESPECÍFICOS

- Analizar la expresión del ARNm de KLF4 por medio de RT-PCR y Northern blot durante la ontogenia en el hipotálamo de rata
- Analizar in situ la expresión de KLf4 a través de hidridación *in situ*.

## **7 MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **7.1 CITOLOGÍA VAGINAL**

Utilizamos ratas hembras de la cepa Wistar de aproximadamente 300 g mantenidas en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las muestras se tomaron con ayuda de una asa bacteriología estéril que se introdujo a través de la papila genital externa a una profundidad de aproximadamente 4 mm girándola suavemente y retirándola para colocar la muestra sobre un portaobjetos limpio, repitiendo el procedimiento para 40 ratas.

Posteriormente la muestra se tiñó con hematoxilina-eosina y se observó bajo el microscopio de luz con el objetivo 10X para determinar la etapa del ciclo estral en que se encontraba cada animal dependiendo de la morfología celular (Figura 15). Se seleccionaron las ratas que se encontraban en proestro o proestro-estro y se colocaron con ratas macho para aparearse. Después de aproximadamente 18 horas fueron separadas, considerando ese día como el primero de gestación, la cual se corroboraba por palpación abdominal el día de su utilización.

### **7.2 MUESTREO DE HIPOTÁLAMOS**

Realizamos un estudio ontogénico del ARNm de KLF4 durante el desarrollo del hipotálamo de rata, desde el día embrionario 14 (E14) hasta E21, los días postnatales (P) 0, 7, 14 y 21, así como en adulto (5 meses de edad); empleando intestino e hígado de adulto como controles positivo y negativo respectivamente.

Estro

Proestro

Proestro-estro

Diestro

**Figura 15. Etapas representativas del ciclo estral de rata.** Microfotografías representativas de la citología vaginal utilizadas para determinar los diferentes estadios: Proestro - células nucleadas; Estro - células en descamación (sin núcleo evidente); Diestro - leucocitos y Proestro-estro - combinación de células nucleadas y en descamación.

Las ratas gestantes así como las crías, se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12 hr/12 hr), temperatura (17°C) y alimentadas ad libitum hasta el momento de su decapitación alrededor de las 12:00 hrs. Para la colecta de los embriones (hipotálamos y/o cerebros completos) se anestesiaron las hembras gestantes con pentobarbital (40 µl/250 g peso: Sedalphorte) o bien se decapitaron las crías después de nacidas. Se realizó la extracción del hipotálamo cortando a través de la línea imaginaria que une el borde superior del ojo y el oído y disecando la región comprendida por detrás del quiasma óptico, entre los surcos mamilares y por delante de los cuerpos mamilares a una profundidad aproximada de 3 mm. Los

hipotálamos, cerebros y embriones completos fueron congelados en hielo seco y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización.

### **7.3 EXTRACCIÓN DE ARN**

El ARN total fue extraído a partir del tejido congelado por el método de isotiocianato de guanidina, el cual consistió en homogenizar los tejidos en  $400\ \mu\text{l}$  de solución D (4 M tiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sodio pH 7.0, 0.5% sarcosil, 0.1 M  $\beta$ -mercaptoetanol),  $40\ \mu\text{l}$  acetato de sodio (NaOAc) 2 M y mezclar en vortex vigorosamente. Posteriormente se añadieron  $400\ \mu\text{l}$  de fenol saturado con agua agitando de la misma forma. A la mezcla anterior se le agregaron  $100\ \mu\text{l}$  de cloroformo:isoamil-alcohol (49:1), centrifugando los tubos a  $4^{\circ}\text{C}$  y 13,000 rpm durante 17 minutos. El sobrenadante se mezcló con  $450\ \mu\text{l}$  de isopropanol, se mezcló e incubó durante 30 minutos en hielo seco, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm/ $4^{\circ}\text{C}$  durante 22 minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en  $300\ \mu\text{l}$  de solución D y  $300\ \mu\text{l}$  de isopropanol, incubando toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm/ $4^{\circ}\text{C}$  durante 22 minutos. Posteriormente la pastilla se lavó con  $400\ \mu\text{l}$  de etanol al 70% centrifugando bajo las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante se desechó dejando secar el botón a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos. El ARN se resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC)<sup>78</sup>.

### **7.4 CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL**

De las muestras totales se tomó una alícuota ( $2\ \mu\text{l}$  ARN +  $98\ \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ) para medir la densidad óptica con luz ultravioleta a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf). Sólo se utilizaron aquellas muestras cuya

relación 260/280 fuera mayor a 1.5. La concentración del ARN se calculó mediante la fórmula:

$$\frac{(\text{densidad óptica}) (\text{factor de dilución}) (40)}{1000} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

La calidad del ARN se verificó por electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio (EthBr). Las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S debían guardar una proporción 2:1 y no mostrar barridos que indicasen degradación.

## **7.5 TRANSCRIPCIÓN REVERSA- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT- PCR)**

Se utilizó 1  $\mu\text{g}$  del ARN total para la transcripción reversa llevándolo a 12  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC para transcribir en un volumen final de 32  $\mu\text{l}$  que contenían por cada tubo 8.9  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril tratada con DEPC, 6  $\mu\text{l}$  de buffer RT 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.4, 375 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 3  $\mu\text{l}$  de dithiothreitol (DTT) 0.1 M, 0.6  $\mu\text{l}$  de deoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM, 1  $\mu\text{l}$  de oligodeoxinucleótido de timidina (oligo dT) 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 0.5  $\mu\text{l}$  de transcriptasa reversa M-MLV (200 U/ $\mu\text{l}$ ; Invitrogen). El ARN fue preincubado durante 5 minutos a 65°C antes de la síntesis del cADN y transferido inmediatamente a hielo. La reacción de la transcripción reversa se realizó durante 2 hrs a 37°C. Las muestras fueron mantenidas a 4°C para realizar la PCR inmediatamente o almacenadas a -20°C hasta su uso.

Los cambios relativos en los niveles del ARNm de KLF4 se determinaron por PCR semicuantitativa, utilizando el ARNm de ciclofilina y G3PDH como controles internos. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  conteniendo: 6 o 4  $\mu\text{l}$  del producto de RT (para el caso de KLF4 o ciclofilina y G3PDH respectivamente), 5  $\mu\text{l}$  de buffer para Taq ADN

polimerasa 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, gelatina 10 µg/ml), 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 30 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de los oligonucleótidos correspondientes para KLF4 (25 pmol/µl), ciclofilina o G3PDH (50 pmol/µl), 0.5 µl de Taq ADN polimerasa (Amplificasa 5 U/µl; Biogénica) y agua para llevar al volumen final.

Un fragmento de 218 pb correspondiente a los nucleótidos 1057-1275 del cADN del gen de KLF4 de rata se amplificó con los oligonucleótidos: 5'-GTGTGGGTGGCTGTTCTTTT-3' (sentido) y 5'-CTGAACAGCAGGGACTGTCA-3' (antisentido). Mientras que los oligonucleótidos 5'-GGGGAGAAAGGATTTGGCTA-3' (sentido) y 5'-GGCTGGATGGCAAGCATGT-3' (antisentido) y 5'-TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGGC-3' (sentido) y 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3' (antisentido) permitieron la amplificación de un fragmento de 256 pb que corresponde a los nucleótidos 166-422 del cADN para ciclofilina y de uno de 983 pb correspondiente a los nucleótidos 35-1017 del cADN para G3PDH. Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa PRIMER 3 para verificar la ausencia de estructuras secundarias y la formación de dímeros entre los oligonucleótidos; la especificidad de cada par fue verificada mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search) del NCBI<sup>79</sup>.

La amplificación se realizó en un termociclador (Mastercycler de Eppendorf) durante 26 ciclos para KLF4 y 20 ciclos para ciclofilina y G3PDH de acuerdo a la siguiente tabla.

	Temperatura: tiempo	
	KLF4	Ciclofilina o G3PDH
Desnaturalización	94°C:1'15"	94°C:1'
Apareamiento	61°C:1'	57°C:1'
Polimerización	72°C:2'	72°C:1'15"
Extensión	72°C:10'	72°C:5'

Tabla 2. Condiciones estandarizadas para RT-PCR de los genes Klf4, Ciclofilina y G3PDH.

Se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ l de los productos de PCR para someterlos a electroforesis a través de geles de agarosa 2% durante 90 minutos a 110 volts, los cuales fueron posteriormente teñidos con bromuro de etidio. Los geles fueron iluminados con una lámpara de luz ultravioleta (UV), fotografiados y cuantificados por medio de un analizador de imágenes (Fluor-S Multimager) según el protocolo previamente descrito<sup>80</sup>. La migración de los productos de PCR fue comparada con la de marcadores de peso molecular en el rango de 100-1200 pb (NEBiolabs).

## **7.6 MATERIAL**

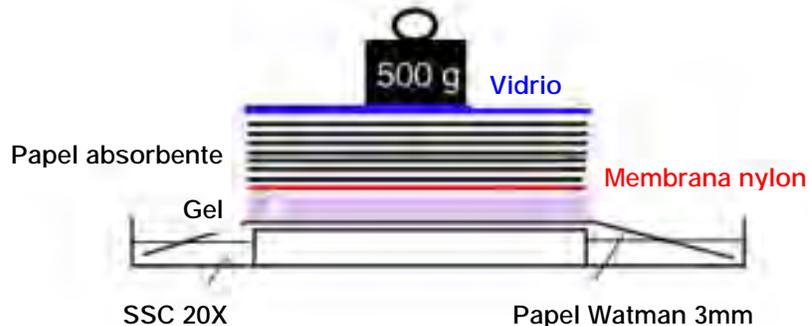
Todo el material de vidrio que se empleó para la preparación y almacenamiento de las soluciones, tanto para el Northern blot como para la hibridación in situ se horneó a 180°C durante 12 hrs. El material de vidrio sensible a las altas temperaturas y el de plástico se esterilizó en una autoclave a 120 lb de presión durante 30 minutos. El agua empleada se desionizó (milliQ Plus, calidad 18 M /cm) y colectó en frascos horneados; adicionalmente se esterilizó en una autoclave a 120 libras de presión durante 30 minutos.

## 7.7 NORTHERN BLOT

### Gel desnaturalizante y transferencia

Se preparó un gel de agarosa 1.2% con formaldehído 2.2 M y buffer MAE 1X (MAE 10X: 0.2 M MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA pH 7.0). Del ARN previamente extraído se tomaron 10-20  $\mu\text{g}$  los cuales se secaron durante 15 minutos en un liofilizador (Savant) para resuspenderlos en 4  $\mu\text{l}$  de agua con DEPC y añadir cuatro volúmenes de buffer de carga (44% formamida, 5.9% folmaldehido, 20 mM MOPS, 5 mM NaOAc, 1 mM EDTA, 6.4% glicerol, 0.4 mg/ml azul de bromofenol y 0.1% EthBr). La electroforesis se realizó a 120 V en buffer MOPS 1X durante 3-4 hrs.

Posteriormente se realizó la transferencia del ARN del gel a una membrana de nylon por capilaridad, para lo cual se montó un circuito en el que gel y membrana estaban en contacto directo y conectados de manera constante con buffer SSC 20X durante toda la noche, tal y como se muestra en la figura 16.



**Figura 16. Northern blot.** Esquematación del sistema para la transferencia de ARN a la membrana de nylon por capilaridad.

El ARN se fijó a la membrana por medio de radiación UV (120 mJoule: Stratagene) durante 1.5 min. El gel fue fotografiado antes y después de la transferencia, al igual que la membrana para comprobar la integridad del

ARN y la eficiencia de la transferencia para finalmente almacenar a 4°C hasta el momento de la hibridación.

### Marcado de la sonda

El producto de PCR de 218 pb purificado se empleo como templado para la generación de una sonda de cARN, la cual realizó empleando el kit de Perkin Elmer para marcaje por “random primer”. La mezcla de reacción consistía en: 50 ng del cADN de KLF4 desnaturalizado por ebullición durante 5 minutos (30 ng para el caso de ciclofilina), 4.6 µl de agua tratada con DEPC, 6 µl de mezcla de nucleósidos trifosfato, 6 µl de buffer de extensión 5X, 50 µCi de -dCTP [<sup>32</sup>P] [3000 Ci/nmol] y 2 µl de polimerasa de ADN de tipo Klenow (1.5-2.5 U/µl); esta mezcla fue incubada durante toda la noche a temperatura ambiente. Para calcular el porcentaje de eficiencia se tomaron 0.5 µl de la mezcla de reacción, adicionando 25 µl de solución acarreadora (EDTA 10 mM pH 8, SDS 0.1% y tARN 0.5 mg/ml), de aquí se colocaron 5µl sobre 1 cm<sup>2</sup> de papel DEAE 81 por cuadruplicado, dos de estos se lavaron 5 veces durante 5 minutos con una solución de fosfato de sodio dibásico (0.5 M), una vez durante un minuto con agua y una vez durante otro minuto con etanol al 70%. Cada cuadro de papel fue colocado en un vial agregándole líquido de centelleo para leer las radiaciones beta emitidas por el fósforo radiactivo en un contador de centello. El porcentaje de eficiencia de la reacción se calculó por la siguiente relación:

$$\% \text{ de incorporación} = \frac{\text{cpms proveniente de papeles lavados}}{\text{cpms provenientes de papeles no lavados}}$$

Para calcular la actividad específica de la sonda marcada fue necesario calcular la cantidad de ADN total sintetizado en la reacción con base la ecuación reportada por el fabricante, donde la cantidad de ADN en ng es igual a:

$$\frac{(\mu\text{Ci agregados}) (13.2) (\% \text{de incorporación})}{(\text{num. total de nucleótidos marcados}) (\text{actividad específica del nucleótido marcado})} + 50 \text{ ng}$$

La actividad específica equivale a las cuentas por minutos (cpms) totales obtenidas entre los  $\mu\text{g}$  totales de ADN que se tenían al final de la reacción.

#### Purificación de la sonda.

La sonda marcada fue purificada por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G50 equilibrada a temperatura ambiente con buffer TE (10 mM Tris-Cl pH 8 y 1 mM EDTA pH 8). Durante la cromatografía se colectaron fracciones de aproximadamente 100  $\mu\text{l}$ , las cuales fueron monitoreadas con un contador geiger (Radiation Alert). La muestra se separó en dos picos, el primero correspondiente a la sonda marcada y el segundo a los nucleótidos marcados no incorporados. Se recolectaron las fracciones del primer pico y se calculó la actividad específica.

#### Prehibridación, hibridación y lavados

La membrana a la que se fijó el ARN fue incubada durante 8 hrs en solución de prehibridación [SSC 5X, Denhardtts 5X, fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.5, formamida 45%, SDS 0.5% y ADN de esperma de salmón 0.15 mg/ml (desnaturalizado por ebullición durante 5 min)]. Esta solución fue posteriormente substituída por la solución de hibridación [SSC 5X, Denhardtts 1X, fosfato de sodio 0.06 M pH 6.5, Dextran sulfato 10%, formamida 50%, SDS 0.5%, ADNs desnaturalizado 0.1mg/ml] conteniendo  $8 \times 10^6$  cmp/ml (actividad específica  $9 \times 10^6$  cmp/ $\mu\text{g}$ ) del ADN de KLF4 o ciclofilina marcados con -dCTP [ $^{32}\text{P}$ ] (previamente desnaturalizados por ebullición durante 5 minutos). La membrana se hibridó a 42°C por 18 horas. Posteriormente se realizaron los siguientes lavados para eliminar la unión

inespecífica de la sonda: dos veces por 30 min en una solución SSC 5X, SDS 0.2% a TA, dos veces por 30 min en SSC 0.1X, SDS 0.2% a TA y dos veces por 15 min en una solución SSC 0.1X, SDS 0.2% a 45°C<sup>81</sup>.

Finalmente, para el revelado de la señal la membrana se expuso durante 24 horas a una pantalla para phosphorimager (Molecular Dynamics). Al día siguiente la señal fue cuantificada mediante el programa Image Quant a través del cual se calculó el área bajo la curva para cada una de las muestras, la cual corresponde a la intensidad de la señal por muestra.

El valor reportado corresponde al cociente del valor obtenido para la señal de hibridación de KLF4 entre el valor obtenido para la señal de hibridación de ciclofilina o bien de la subunidad ribosomal 28S del gel antes de su transferencia.

## **7.8 HIBRIDACIÓN IN SITU**

Con el fin de obtener un patrón de expresión del ARN mensajero de KLF4 a nivel celular se realizó hibridación in situ. Para ello se emplearon los puntos de la ontogenia que por RT-PCR mostraron los niveles máximos de expresión del ARNm de KLF4 (E15, P0 y P7). En los ensayos se incluyó el adulto de 5 meses y al embrión de 18 días.

### Transcripción in vitro para el cARN de Klf4 utilizando UTP [<sup>35</sup>S]

El plásmido (pCR4-Klf4) se generó insertando el producto purificado de RT-PCR de 218 pb del gen de Klf4 (1057-1275)<sup>82</sup> (Figura 17). Este fue digerido durante 1 hr a 37°C empleando PstI para generar la cadena sentido y con NotI para la cadena anti-sentido, en una mezcla que en 20 µl contenía 6 µl de H<sub>2</sub>O, 2 µl de buffer 10X [90 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl] para PstI y [50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM

DTT] para NotI, 2 µl de enzima PstI [18 U/µl; Promega] o de NotI [10 U/µl; NEB] y 10 µg del plásmido circular. Posteriormente se purificó con un kit de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante, cuantificando por espectrofotometría y corriendo un gel con 200 ng del producto linearizado.

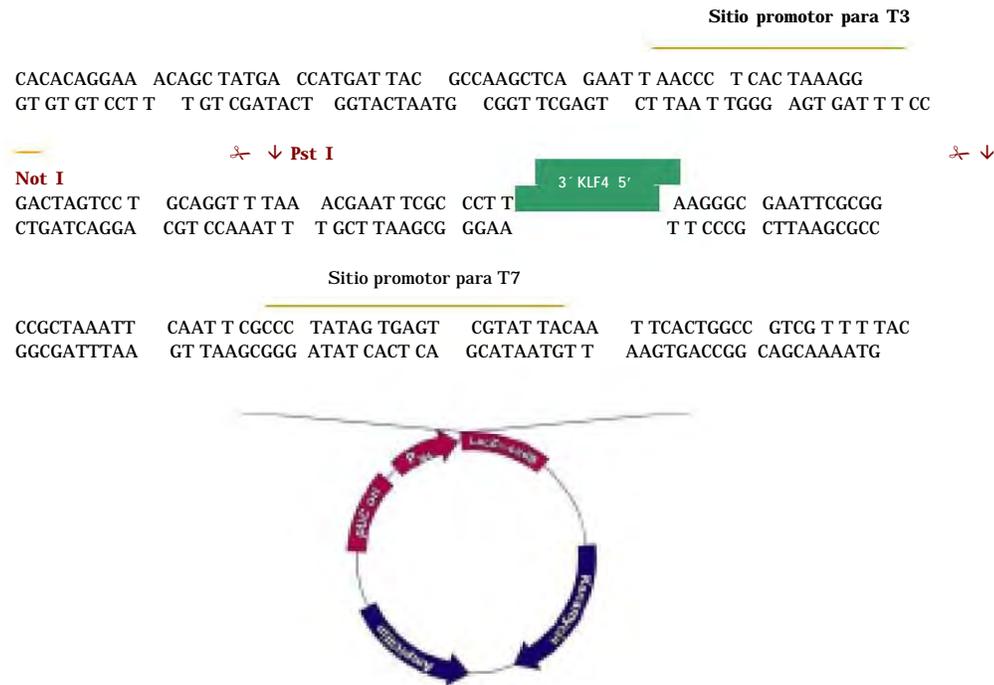


Figura 17. Representación esquemática del plásmido pCR-IV-Klf4. Se muestran los sitios de restricción PstI y NotI (rojo), además de los promotores para la ARN polimerasa T3 y T7 (líneas amarillas).

Para el marcaje de la sonda se preparó una mezcla que contenía 70 pmolas de UTP frío y 125 pmolas de  $\gamma$ -dUTP [ $^{35}$ S]. El nucleótido marcado se colocó en un tubo eppendorf y se secó durante 15 minutos en un liofilizador (Savant), posteriormente se adicionaron 1 µl de buffer de transcripción 10X [40 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 2 mM espermidina, pH 7.9 ] para T7 o bien 1 µl de buffer de transcripcion 10X [40 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 4 mM espermidina, 0.002% polidocanol pH 8.0] para T3, 1 µl de DTT 100 mM disuelto en H<sub>2</sub>O recién preparado, 1.5 µl de la mezcla de NTP´s (A, G, y C 10 mM), 1 µg de ADN del plásmido linearizado previamente

desnaturalizado a 65°C/5 minutos, 1 µl de ARNsin (400 U/µl), 1 µl ARN polimerasa T7 (50 U/µl; NEB) para el sentido o de T3 (20 U/µl; Boeringer) para el antisentido y H<sub>2</sub>O para llevar a un volumen final de 10 µl, incubando 1 hr a 37°C. Transcurrido ese tiempo se agregó 1 µl más de la ARN polimerasa correspondiente incubando bajo las mismas condiciones. Posteriormente se adicionó 1 µl de tARN (10 mg/ml), 1 µl de ARNsin (40 U/ul) y 0.5 µl de ADNsa I (10 U/ul), se mezcló suavemente y se incubó nuevamente a 37°C durante 45 minutos<sup>83</sup>.

Para detener la reacción se adicionaron 86.5 µl de “ribostop” [0.6 M NaOAc pH 4.0, 10 mM EDTA y SDS al 1%) tomando 1 µl de la mezcla para determinar la eficiencia de incorporacion del nucleótido marcado. Se realizó una extracción (1:1) con 100 µl de fenol y 100 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) centrifugando a 7000 rpm/TA durante 5 minutos; se colectó el sobrenadante y se realizó otra extracción con 100 µl de cloroformo:alcohol isoamílico agitando suavemente y centrifugando a 7,000 rpm/5 minutos, se colectó el sobrenadante para precipitar con 0.3 M NaOAc pH 7.0 y 3 vol de etanol absoluto durante toda la noche a -20°C<sup>83</sup>.

Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 15,000 rpm/4°C decantando y secando a TA por un tiempo aproximado de 10 minutos. La pastilla se resuspendió en 45 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC tomando 1 µl para determinar la actividad específica de la sonda, el resto se almacenó a -70°C hasta su uso<sup>83</sup>.

### Preparación de los tejidos

Las secciones almacenadas a -70°C fueron descongeladas con aire caliente, para posteriormente ser fijadas durante 10 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS 1X (PBS 10X = NaCl 1.36 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14.7 mM,

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM, KCl 26.8 mM). A continuación se realizaron dos lavados durante 5 minutos con PBS 1X, un paso de acetilación (4X SSC, 0.25% anhídrido acético y 0.1 M trietanolamina) durante 10 min, un lavado durante 2 minutos en SSC 2X, deshidratación en series de etanol al 75, 80, 95 y 100 % 2 min cada uno, deslipidación por 5 minutos en clorofomo, un lavado con etanol al 100% e hidratación con etanol al 95% dos minutos cada uno y secadas a temperatura ambiente<sup>83</sup>.

#### Hibridación y revelado

Posterior al tratamiento de fijación, los cortes se cubrieron con 45 µl de mezcla de hibridación [10 % Dextran sulfato, 2X SSC, 100 µg/ml tARN de levadura, 1X Denhardtts, 500 µg/ml ADN de esperma de salmón (previamente desnaturalizado a 65 °C/5min), 50% formamida desionizada y 100 mM de DTT (disuelto en NaOAc 0.01 M) conteniendo 3x10<sup>6</sup> cpm del transcrito marcado con <sup>35</sup>S por laminilla. La sonda fue desnaturalizada 65 °C/5 minutos. Los tejidos se cubrieron con papel Parafilm y se hibridaron a 50 °C durante 12 hrs en una cámara húmeda (saturada con 50% de formamida en agua)<sup>83</sup>.

Al día siguiente se retiró el Parafilm con SSC 1X a TA y se realizaron los siguientes lavados a TA con agitación: dos lavados de 15 min con SSC 1X, un lavado con SSC 1X por 5 minutos, un lavado con SSC 1X por 20 minutos y dos lavados con SSC 2X por 5 minutos. Posteriormente las laminillas se incubaron durante 30 minutos en SSC 2X conteniendo 30 µg/ml ARNsa y 1 mM EDTA a 37 °C, seguido por dos lavados a 52 °C durante 3 minutos con SSC 2X y 50% formamida. Finalmente las laminillas fueron incubadas por 3 minutos en series de etanol al 70, 80 y 95 %, tres inmersiones rápidas en agua y dos pases rápidos en etanol al 75%<sup>83</sup>.

Los tejidos se secaron en forma vertical y posteriormente se expusieron a una película fotográfica Biomax-Kodak durante 3 días para detectar la señal a nivel macroscópico. Transcurrido ese tiempo la película se reveló en completa oscuridad sumergiéndola en revelador GBX durante 3 minutos, en agua destilada 1 minuto y en fijador GBX por cuatro minutos.

Para revelar la señal de hibridación sobre las células, los tejidos se cubrieron en oscuridad con emulsión fotográfica Kodak diluída en un volumen de agua manteniéndose durante 10 días a 4°C. Finalmente los tejidos se tiñieron con hematoxilina de Harris .

La cuantificación celular se llevo a cabo en tres campos elegidos al azar para cada zona a un aumento de 40X. El número total de células por zona estuvo en el rango de 1425-1450, excepto en las células ependimales del ventrículo lateral en P7. Las células se consideraron positivas cuando contenían 6 granos o mas depositados sobre el núcleo.

#### Análisis estadístico

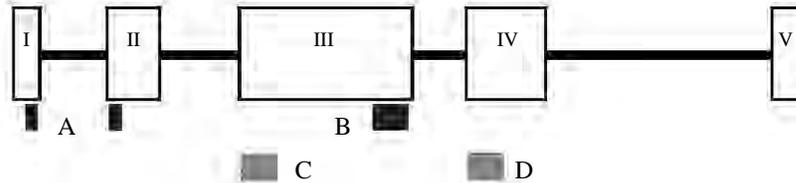
Los datos obtenidos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA (Statview) seguida de una prueba de comparación múltiple de Duncan (Superanova-Statview) para definir la significancia entre los puntos experimentales.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 OPTIMIZACIÓN DE RT-PCR SEMICUANTITATIVA PARA EL ARNm DE KLF-4

Las condiciones óptimas para la determinación de los niveles de expresión de un ARNm mediante RT-PCR consisten básicamente en: (1) obtener oligonucleótidos con una secuencia que corresponda sólo al cADN para el cual se diseñaron; (2) conocer la cinética de la reacción para seleccionar un ciclo en que el producto de PCR se encuentre en la fase logarítmica, de forma que las mediciones reflejen fielmente la cantidad del ARNm; (3) seleccionar la temperatura de hibridación adecuada, para amplificar de manera específica el ARNm de interés<sup>84</sup>.

Con base en la secuencia del ARNm de Klf-4 de rata (Figura 18) se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos, denominados KRU01 y KRU02, que al compararse contra el banco de genes mediante el BLAST<sup>79</sup> reconocen a la secuencia de Klf-4 como primera opción (Figura 19).



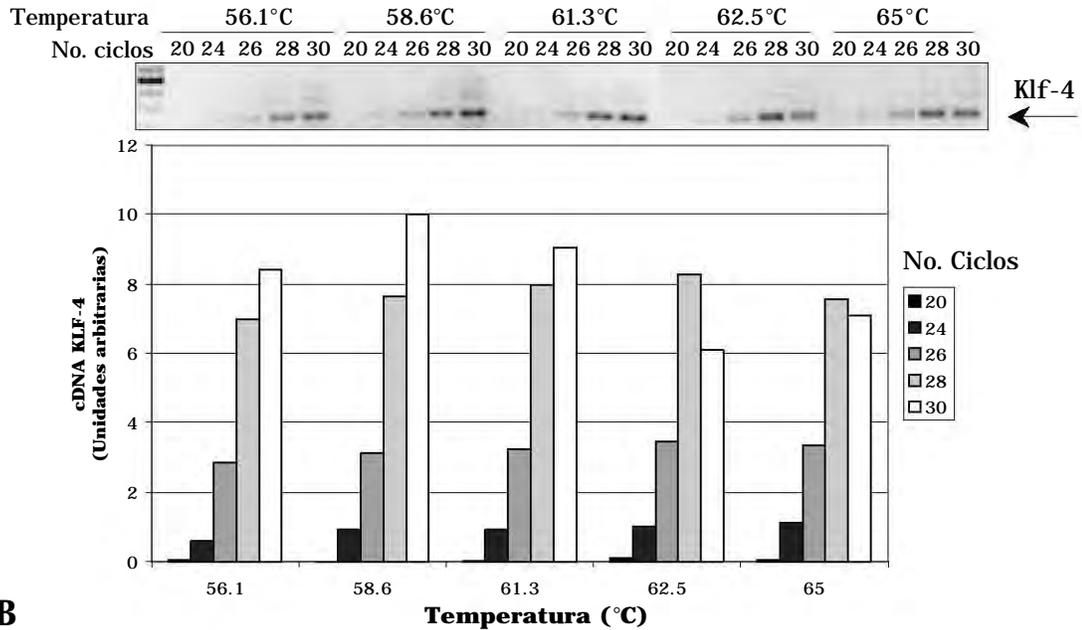
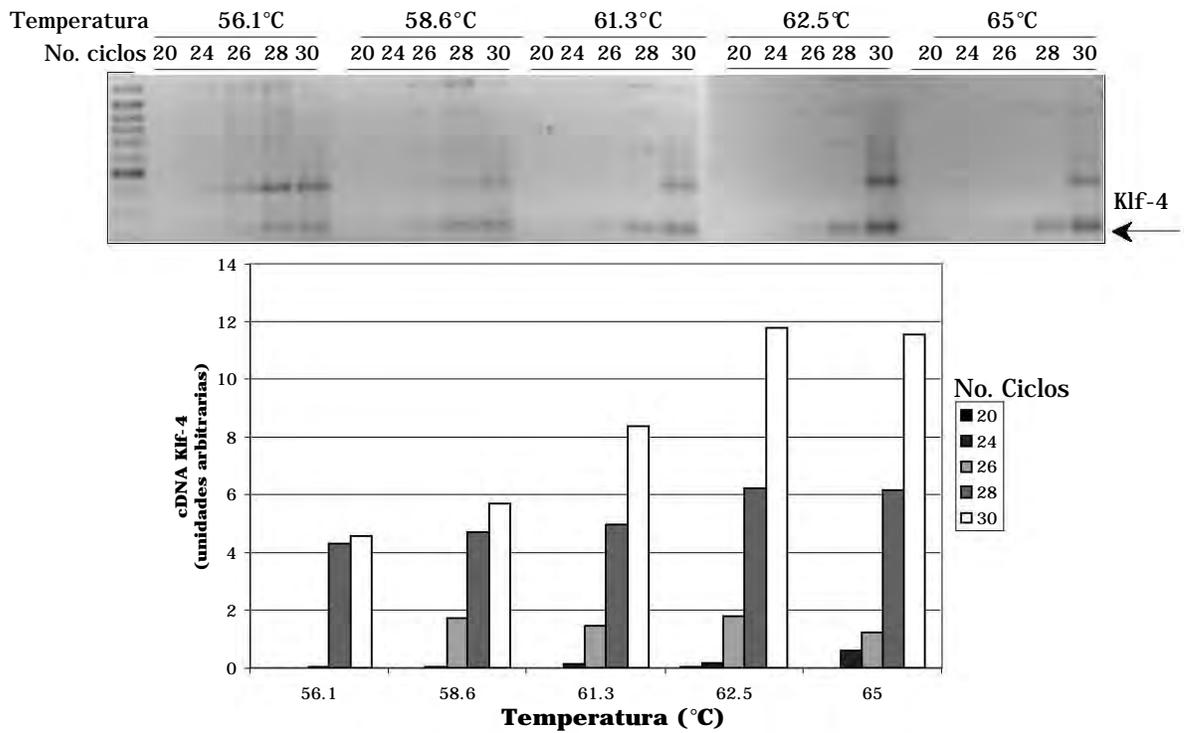
**Figura 18.** Organización estructural del gen de Klf-4 en rata. Las cajas representan los cinco exones separados por cuatro intrones (línea). Los juegos de oligonucleótidos se encuentran en la parte inferior y corresponden a: KRU01 sentido (C), KRU01 antisentido (D); KRU02 sentido (A) y KRU02 antisentido (B). Número de acceso en el GenBank U20344.

La estandarización de las condiciones de PCR se realizó utilizando hipotálamos de embriones de rata de 18 días de gestación (E18). Este estadio se utilizó con base a datos previos que muestran la expresión del ARNm de KLF4 en cultivos primarios de hipotálamo fetal de E17 (51b). Las condiciones

de transcripción reversa fueron las que previamente se estandarizaron en el laboratorio<sup>85</sup>. Brevemente consistió en adicionar 1 µg de ARN total a un volumen final de reacción de 32 µl, incubando a 37°C durante 2 hrs. Para la optimización de la PCR se utilizó un volumen fijo del templado generado por transcripción reversa (6 µl cADN). Éste se amplificó por diferentes ciclos (20-30) junto con un gradiente de temperatura (56-65°C).

No. de referencia	Secuencia que produce alineamiento significativo
<b>KRU01</b> <a href="#">gi 16758529 ref NM_053713.1 </a> <a href="#">gi 74189985 dbj AK141244.1 </a> <a href="#">gi 16307508 gb BC010301.1 </a> <a href="#">gi 74201416 dbj AK144942.1 </a> <a href="#">gi 74199366 dbj AK155343.1 </a> <a href="#">gi 55249672 gb BC085720.1 </a> <a href="#">gi 14794473 gb AF390546.1 </a> <a href="#">gi 18175567 gb AY071827.1 </a> <a href="#">gi 6754455 ref NM_010637.1 </a> <a href="#">gi 29329841 emb AL732494.16 </a> <a href="#">gi 4325028 gb AF117109.1 AF117109</a> <a href="#">gi 1589926 gb U70662.1 MMU70662</a> <a href="#">gi 912487 gb U20344.1 MMU20344</a>	Rattus norvegicus Kruppel-like fact *Mus musculus ES cells cADN, RIKEN... Mus musculus Kruppel-like factor 4... *Mus musculus mammary gland RCB-05... *Mus musculus NOD-derived CD11c +v... Rattus norvegicus Kruppel-like fac... Rattus norvegicus gut-enriched kru... Mus musculus gut-enriched kruppel-... Mus musculus Kruppel-like factor 4 *Mouse ADN sequence from clone RP... Mus musculus gut-enriched K... Mouse epithelial zinc-finger ... Mus musculus gut-enriched Krup...
<b>KRU02</b> <a href="#">gi 16758529 ref NM_053713.1 </a> <a href="#">gi 55249672 gb BC085720.1 </a> <a href="#">gi 14794473 gb AF390546.1 </a> <a href="#">gi 34916057 ref NM_004235.3 </a> <a href="#">gi 20987475 gb BC029923.1 </a> <a href="#">gi 76661935 ref XM_876350.1 </a> <a href="#">gi 76661933 ref XM_876283.1 </a> <a href="#">gi 76661931 ref XM_599092.2 </a> <a href="#">gi 76661929 ref XM_876162.1 </a> <a href="#">gi 76661927 ref XM_876099.1 </a> <a href="#">gi 74201416 dbj AK144942.1 </a> <a href="#">gi 74199366 dbj AK155343.1 </a> <a href="#">gi 16307508 gb BC010301.1 </a> <a href="#">gi 67972243 dbj AB179413.1 </a> <a href="#">gi 6754455 ref NM_010637.1 </a> <a href="#">gi 5353532 gb AF105036.1 AF105036</a> <a href="#">gi 1589926 gb U70662.1 MMU70662</a> <a href="#">gi 912487 gb U20344.1 MMU20344</a>	Rattus norvegicus Kruppel-like fact Rattus norvegicus Kruppel-like fac... Rattus norvegicus gut-enriched kru... Homo sapiens Kruppel-like factor 4 Homo sapiens Kruppel-like factor 4... **PREDICTED: Bos taurus similar to... **PREDICTED: Bos taurus similar to... **PREDICTED: Bos taurus similar to... **PREDICTED: Bos taurus similar to... **PREDICTED: Bos taurus similar to... *Mus musculus mammary gland RCB-05... *Mus musculus NOD-derived CD11c +v... Mus musculus Kruppel-like factor 4... Macaca fascicularis testis cADN c... Mus musculus Kruppel-like factor 4 ( Homo sapiens zinc finger tr... Mouse epithelial zinc-finger ... Mus musculus gut-enriched Krup...

Figura 19. Alineamiento de los oligonucleótidos en el banco de genes. La comparación de las secuencias de oligonucleotidos KRU01 y KRU02 contra el banco de genes mediante el BLAST muestra que cada par reconoce en conjunto a la secuencia del gen de Klf-4. (\*) corresponde a secuencias parciales de Klf-4 identificadas en diversas líneas celulares, (\*\*) corresponde a las secuencias de Klf-4 en otros mamíferos.

**A****B**

**Figura 20. Determinación de las condiciones óptimas de PCR para Klf-4.** A partir de 1 µg de ARN total se realizó una transcripción reversa durante 2 hrs. a 37°C. De la mezcla anterior se tomaron 6µl de cADN para realizar reacción de PCR a diferentes ciclos (20-30) y con diferentes temperaturas de hibridación de 56-65°C. (A) empleando el juego de oligonucleótidos KRU01 y (B) para el juego denominado KRU02. En la parte superior de cada figura se muestra una imagen representativa del gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. La gráfica inferior muestra las densidades ópticas del producto de PCR en unidades arbitrarias para los diferentes puntos.

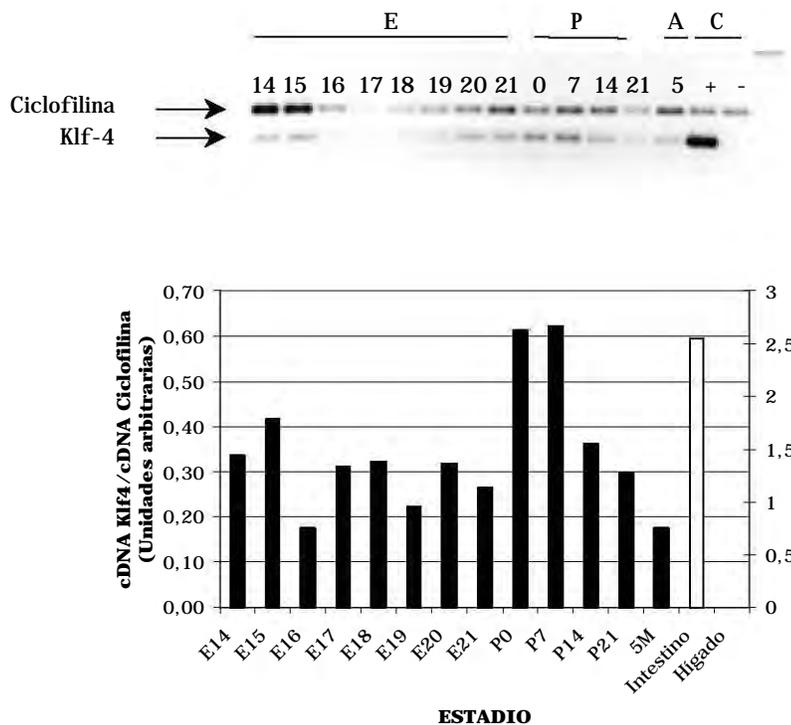
Como se puede observar en la Figura 20A, para el caso de los oligonucleótidos KRU01, el punto medio en la fase logarítmica se encuentra independientemente de las temperaturas, en 26 ciclos. Sin embargo a 56 y 58°C se observan bandas de productos inespecíficas, mientras que la amplificación es menos eficiente a 62.5 y 65°C. Por lo que decidimos que para el juego de oligonucleótidos KRU01 una amplificación por 26 ciclos a una temperatura de 61°C son condiciones adecuadas para determinar los niveles del ARNm de KLF4 con el juego de oligonucleótidos KRU01.

Para el caso de KRU02 (Figura 20B), y utilizando las mismas condiciones que para KRU01, observamos bandas inespecíficas en todas las temperaturas, por lo que decidimos analizar la cinética (26-32 ciclos) incrementando la temperatura a 66°C (datos no mostrados). A esta temperatura observamos que las bandas inespecíficas se eliminan, mientras que la fase logarítmica se encuentra en el punto medio en 29 ciclos, por lo que para el juego de oligonucleótidos KRU02 66°C durante 29 ciclos son las condiciones óptimas para la amplificación del ARNm de Klf4. Adicionalmente, al omitir la transcripción reversa previa a la reacción de PCR no se generaba producto, descartando la posibilidad de que dichos productos fuesen resultado de contaminación con ADN genómico (datos no mostrados).

Los datos anteriores muestran que los niveles de expresión del ARNm de Klf-4 pueden ser analizados de manera específica y eficiente con ambos juegos de oligonucleotidos con ciertas diferencias en las condiciones. Utilizando estas condiciones (KRU01 a 61°C y 26 ciclos) (KRU02 a 66°C y 29 ciclos) se amplifica un sólo producto de 218 y 231 pb respectivamente.

Análisis previos por Northern blot en cerebro total de adulto reportan niveles bajos<sup>67</sup> o indetectables<sup>65</sup> para el ARNm de KLF4. Sin embargo, el

análisis del transcriptoma de las células TRHérgicas<sup>60</sup> realizado previamente en el laboratorio muestra que este factor de transcripción se encuentra enriquecido en estas células en etapas embrionarias, por lo que decidimos analizar los niveles de expresión de su ARNm por RT-PCR semicuantitativa durante el desarrollo en hipotálamo de rata, para lo cual utilizamos el juego de oligonucleótidos KRU01 y como control interno al gen de ciclofilina, cuyos niveles de ARNm no varían a lo largo del desarrollo<sup>86</sup> (Figura 21).



**Figura 21.** Cambios en los niveles del ARNm de Klf-4 durante el desarrollo en el hipotálamo de rata. En el panel superior se muestra un gel representativo del producto de PCR teñido con bromuro de etidio. Cada punto representa un estadio en etapas embrionarias (E) desde el día 14 hasta el 21, postnatales (P) a los días 0, 7 y 14 así como el adulto (A) de 5 meses de edad. La expresión del ARNm de Klf4 para los controles (C) positivo-intestino y negativo-hígado (barras blancas) se refiere respecto a la escala de a izquierda. Cada valor representa la media de dos experimentos independientes.

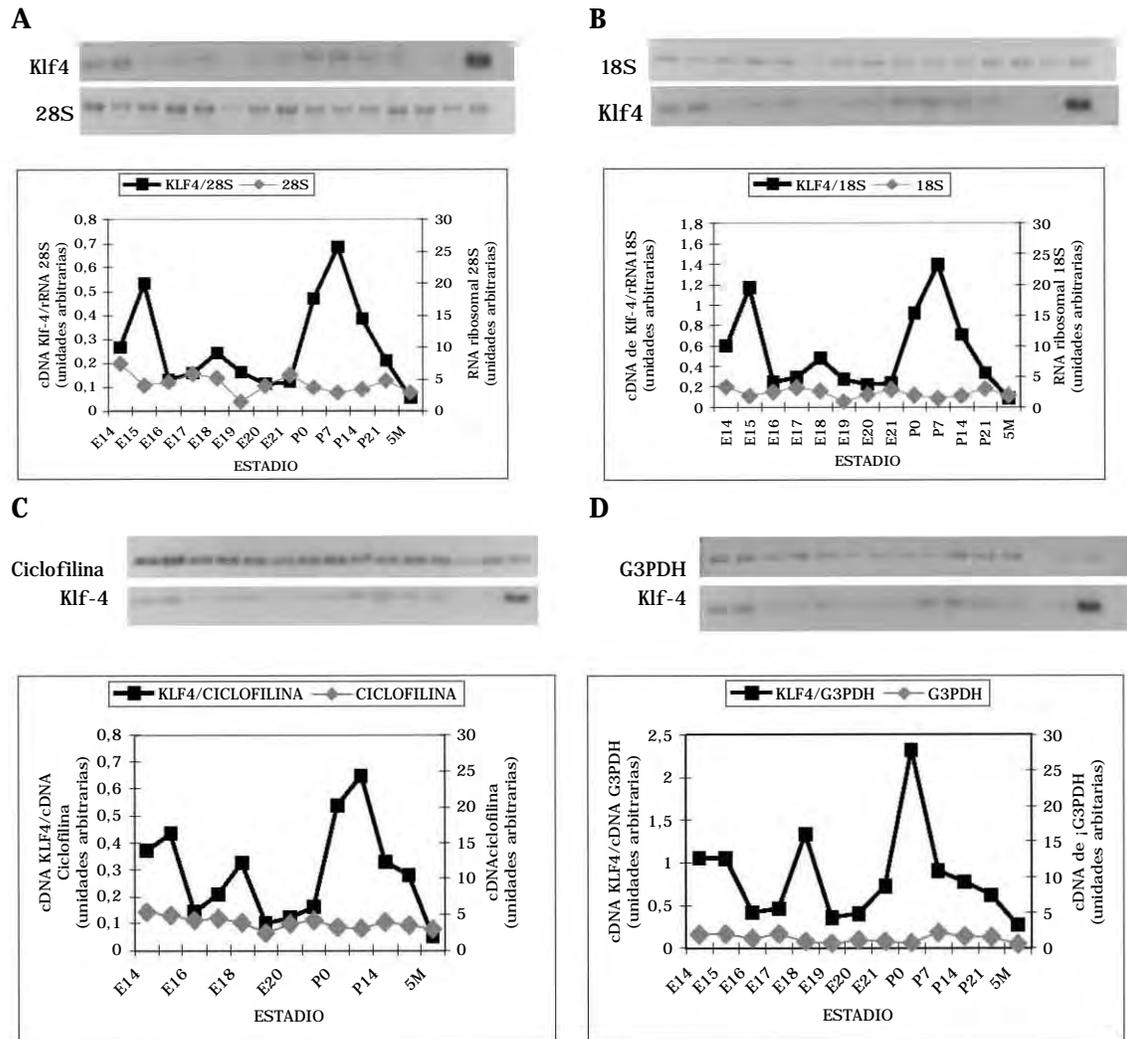
Nuestros resultados revelan que la expresión del ARNm de Klf4 es regulada durante el desarrollo del hipotálamo de rata. El ARNm de Klf4 es

detectable desde el día E14 con un pico de expresión al día E15, alcanzando un máximo a los días postnatales P0 y P7 y disminuyendo en adulto (Figura 21). Como controles positivo y negativo para la expresión del ARNm de Klf-4 se emplearon los cADNs obtenidos a partir de extractos de ARN total de intestino e hígado, respectivamente, los cuales concuerdan con lo previamente reportado<sup>65</sup>.

Aunque en numerosos trabajos publicados han utilizado el ARNm de ciclofilina como control interno en ensayos de RT-PCR<sup>86-88</sup> decidimos monitorear la expresión de otros controles con la idea de seleccionar el más adecuado que permitiese eliminar las variaciones en el producto de PCR debidas a posibles diferencias en la eficiencia de las reacciones de RT y PCR. Para esto analizamos durante la ontogenia los niveles de expresión del ARNm de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH)<sup>89</sup>, así como las subunidades ribosomales 28S<sup>90</sup> y 18S<sup>91</sup>.

En un ensayo independiente y utilizando el mismo juego de oligonucleótidos que en el anterior, observamos las mismas tendencias en los niveles de expresión del ARNm de Klf4 durante el desarrollo hipotalámico (Figura 22). Sin embargo, dependiendo del control interno que se emplee para corregir, los cambios en los niveles de expresión son más o menos evidentes. Con las subunidades ribosomales 28S y 18S, por ejemplo observamos un incremento a los días E15 y P7 (Figura 22 A y B). Al normalizar con respecto al ARNm de ciclofilina (Figura 22 C) las tendencias se mantienen excepto que el pico a E18 es mucho más evidente. Por otro lado, al corregir con respecto al ARNm de G3PDH aunque las tendencias se mantienen los niveles de expresión del ARNm de Klf4 cambian. No se detecta el pico a E15 ya que los niveles del ARNm están elevados desde E14. Los niveles de expresión a E18

son ligeramente mayores con respecto a E15, lo cual es diferente a lo observado con ciclofilina o con las subunidades ribosomales. Finalmente, el pico que se había observado entre las etapa P0-P7 ahora se detecta únicamente en P0 (Figura 22D).



**Figura 22. Patrón de expresión de KLF4 y de diferentes controles internos durante la ontogenia del hipotálamo.** Utilizando el juego de oligonucleótidos KRU01, se analizó una ontogenia hipotalámica para Klf-4 con diferentes controles internos (A) subunidad ribosomal 28S, (B) subunidad ribosomal 18S, (C) ciclofilina y (D) G3PDH. En la parte superior de cada panel se muestra un gel representativo de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a partir del cual se cuantificó la señal del producto de PCR o ARN en un densitómetro. Las gráficas muestran las relaciones entre el cADN de KIF-4 y el cADN del gen endógeno o de la subunidad ribosomal (■) así como el nivel del control endógeno exclusivamente (◆), todo en unidades arbitrarias.

El análisis de los niveles de expresión del ARNm de Klf-4 con el juego de oligonucleótidos KRU02 (Figura 23) mostró un patrón similar al obtenido con KRU01. En este experimento observamos también aumentos en los niveles del ARNm a los días E15 y P7, tanto con las subunidades ribosomales 28S y 18S (Figura 23 A y B) como con el gen de ciclofilina (Figura 23 C), mientras que para los tres casos se percibe un pequeño aumento al día E17. Por otro lado, la corrección con el gen endógeno G3PDH muestra que los ascensos en E15, E17 y P7 son de una magnitud similar entre ellos y poco evidentes al compararlos con el resto de la ontogenia.

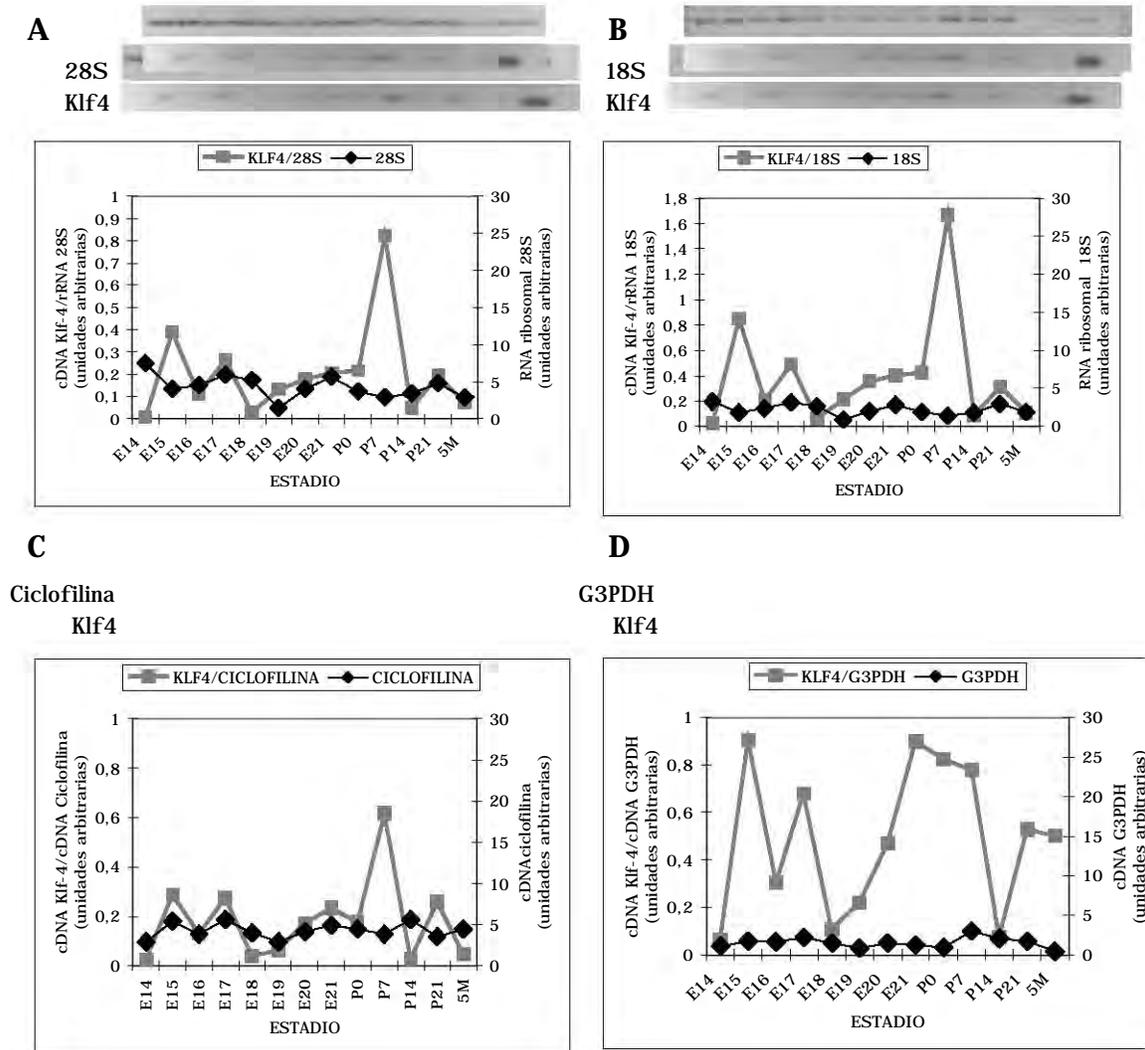
Aunque los datos parecen reproducirse con ambos juegos de oligonucleótidos, los resultados son más consistentes al utilizar el juego denominado KRU01, por lo cual decidimos utilizar este par para el análisis de nuestra ontogenia y como control interno al ARNm de ciclofilina.

## 8.2 ANÁLISIS DEL ARNm DE KLF-4 DURANTE EL DESARROLLO HIPOTALÁMICO DE RATA POR RT-PCR

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la RT-PCR con el juego de oligonucleótidos KRU01 y el gen de ciclofilina como control interno, analizamos tres experimentos independientes en donde detectamos niveles significativos del ARNm de KLF4 en hipotálamo desde el día E14 con picos de expresión respecto al adulto. Al día E15 observamos se incrementa 1.5 veces la relación cADN KLF4/cADN ciclofilina respecto al adulto, mientras que en los días P0 y P7 este aumento es de aproximadamente 3.5 veces (Figura 24).

Estos datos en conjunto indican que los niveles del ARNm de KLF4 se regulan durante el desarrollo del hipotálamo de rata, con tres picos máximos

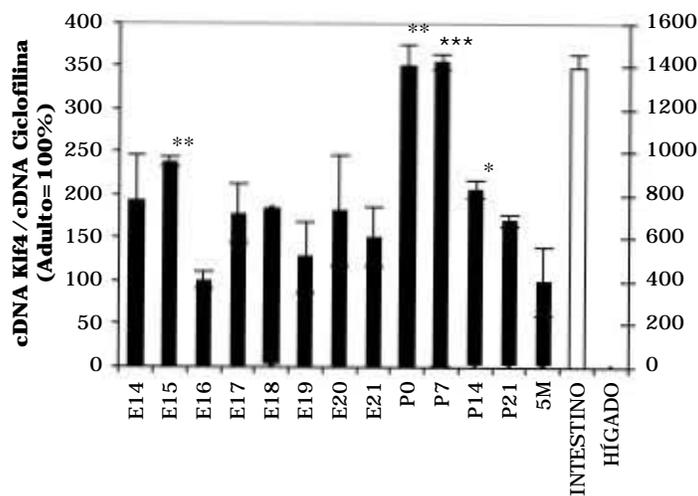
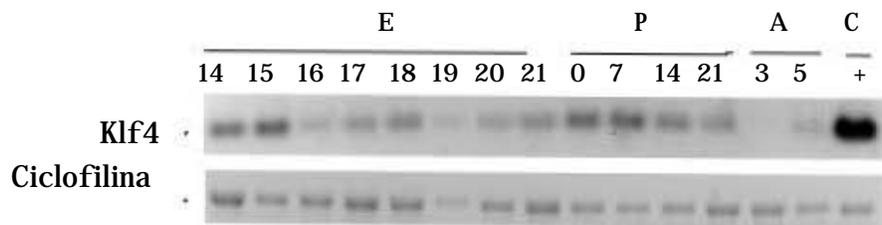
de expresión, el primero al día E15 y los siguientes a los días P0 y P7. La posible relevancia de estos cambios se discutirá más adelante.



**Figura 23. Patrón de expresión de diferentes de controles internos durante la ontogenia del hipotálamo.** Empleando el juego de oligonucleótidos KRU02, se analizó una ontogenia hipotalámica para el ARNm de Klf-4 con diferentes controles internos (A) subunidad ribosomal 28S, (B) subunidad ribosomal 18S, (C) Ciclofilina y (D) G3PDH. En la parte superior de cada panel se muestra un gel representativo de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a partir del cual se cuantificó la señal del producto de PCR o ARN en un densitómetro. Las gráficas muestran las relaciones entre el cADN de Klf-4/cADN del gen endógeno o de la subunidad ribosomal en unidades arbitrarias (■), así como los niveles del control endógeno (◆) en unidades arbitrarias.

### 8.3 ANÁLISIS DEL ARNm DE KLF-4 DURANTE EL DESARROLLO POR NORTHERN BLOT

Con el fin de corroborar los datos obtenidos por RT-PCR decidimos analizar los niveles del ARNm de Klf4 por Northern blot, siguiendo las condiciones previamente estandarizadas en el laboratorio<sup>81</sup>. Las sondas de hibridación se generaron a partir de hipotálamos de E18, purificando los productos de PCR para Klf4 y ciclofilina. Estos se marcaron por “Random Primer” con  $\gamma$ -dCTP [32P] para, posteriormente, hibridar la membrana a la que previamente se transfirieron 10  $\mu$ g de ARN total para cada uno de los puntos dentro de la ontogenia.



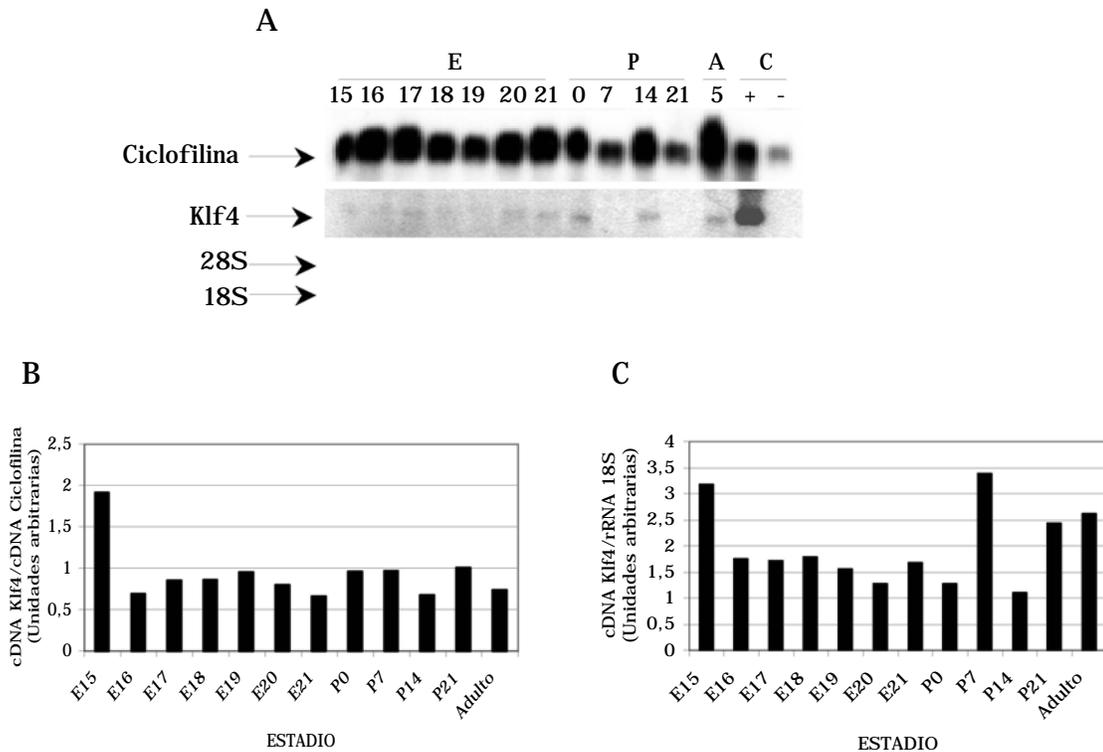
Como se puede observar en la imagen del gel adquirida antes de la transferencia (Figura 25A) la cantidad de ARN total que se cargó no fue homogénea entre las muestras, por lo que al momento de realizar la corrección contra el ARNm de ciclofilina (Figura 25B) el patrón no corresponde al obtenido previamente por RT-PCR. Por lo que decidimos utilizar la subunidad ribosomal 18S para corregir la ontogenia debido a que el rARN fluctúa menos con respecto al ARNm<sup>87</sup>, además de que permite analizar los cambios respecto a la cantidad de ARN total cargado.

El análisis de los diferentes estadios al utilizar la subunidad 18S (Figura 25C) muestra un patrón similar al observado por los ensayos de RT-PCR. Se observaron dos picos en los niveles de expresión del ARNm de Klf4 a los días E15 y P7. Aunque el pico P0 detectado por RT-PCR no se observó en este ensayo, podemos decir que las tendencias en general fueron parecidas en ambos casos.

Con base a los datos mostrados tanto por RT-PCR como por Northern blot, podemos decir que la expresión del ARNm de Klf4 es regulada durante el desarrollo en el hipotálamo de rata, alcanzando los niveles máximos de expresión a los días E15, P0, P7 y disminuyendo en adulto.

---

**Figura 24. Patrón de expresión del ARNm de Klf4 durante la ontogenia del hipotálamo de rata.** El análisis por RT-PCR utilizando el juego de oligonucleótidos KRU1, se llevó a cabo empleando hipotálamos en diferentes estadios embrionarios (E) (14-21 días), postnatales (P) (0, 7, 14 y 21 días), así como adultos (A) de 3 y 5 meses de edad, además de intestino (I) como control positivo e hígado como control negativo, estos últimos referidos a la escala de la derecha. En la parte superior se muestra un imagen representativa de un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En la gráfica inferior cada valor representa la media  $\pm$ EE (n=8, en 4 experimentos independientes). El análisis estadístico consistió en un ANOVA seguido de una comparación múltiple \*P < 0.05, \*\* P < 0.01m \*\*\*P < 0.001 de las relaciones cADN Klf-4/cADN ciclofilina comparadas contra el adulto de 5 meses.



**Figura 25. Expresión del ARNm de Klf-4 durante la ontogenia en hipotálamo de rata analizado por Northern blot.** La señal autoradiográfica obtenida de la hibridación del ARN total de hipotálamo de rata con el cADN de Klf4 marcado por "Random primer" con dCTP [<sup>32</sup>P] se corrigió contra el gen de ciclofilina (B) y las subunidad ribosomal 18S (C). En el panel A se muestra la señal autoradiográfica para el ARNm de Klf4 y el ARNm de ciclofilina, así como las muestras de ARN total teñidas con bromuro de etidio antes de la transferencia a la membrana de nylon. El análisis se llevó a cabo en muestras de hipotálamo en estadios embrionarios (E) a los días 15-21; postnatales (P) al día 0, 7, 14 y 21, y en adulto de 5 meses de edad, El ARN obtenido a partir del intestino e hígado de rata adulta se utilizó como control (C) positivo (+) y negativo (-) de especificidad de la sonda.

#### 8.4 EXPRESIÓN DEL ARNm DE KLF-4 A NIVEL CELULAR POR HIBRIDACIÓN IN SITU

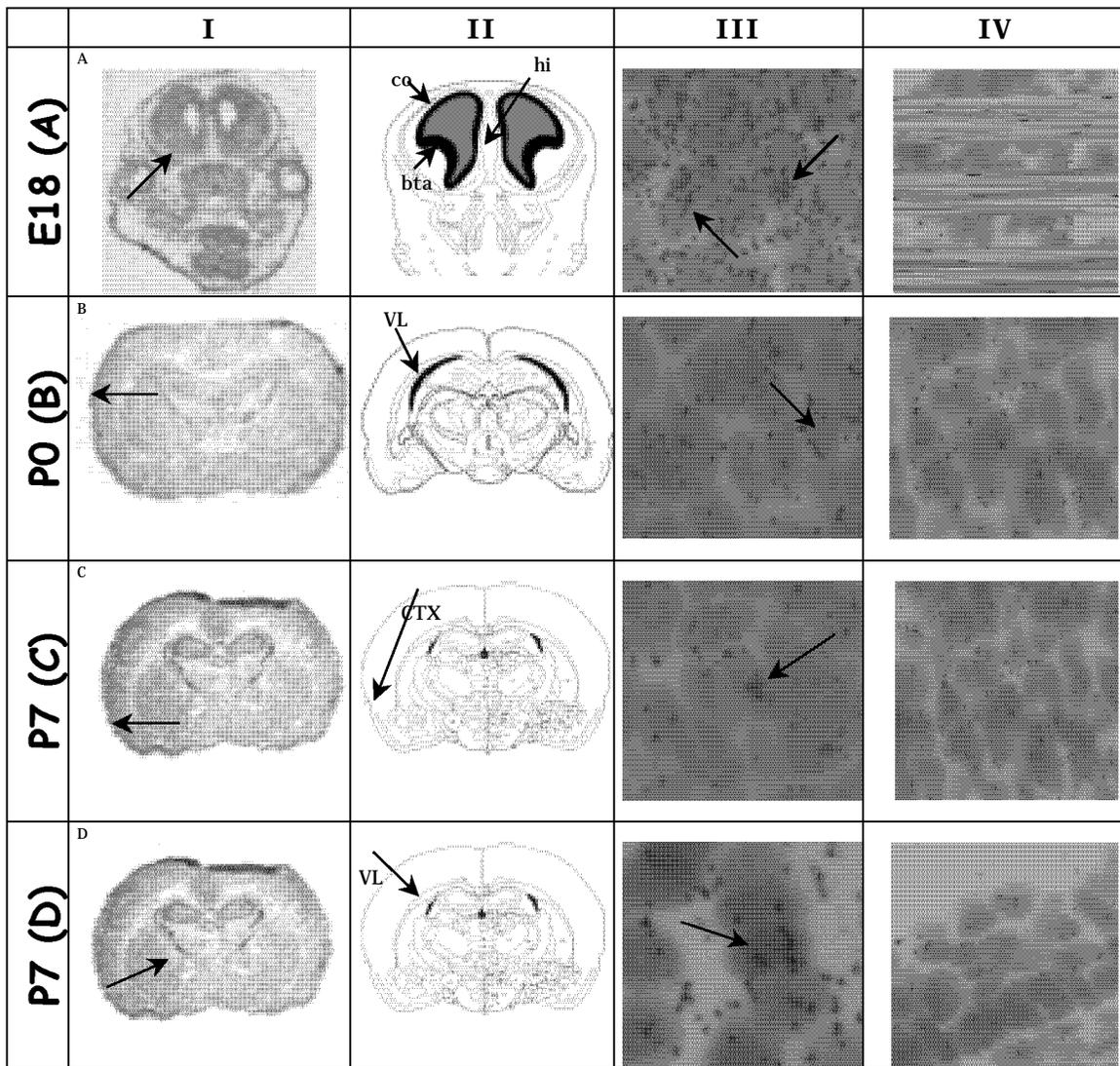
Con el fin de determinar la ubicación de las células que expresan KLF4, decidimos analizar el patrón de expresión del ARNm de KLF4 a nivel celular por hibridación in situ (ISH). Para ello utilizamos los puntos donde se obtuvieron niveles máximos de expresión por Northern blot y RT-PCR (E15, P0 y P7) incluyendo además hipotálamos de E18 y adulto. Los ensayos de HIS

se realizaron de acuerdo al protocolo estandarizado previamente en el laboratorio<sup>83</sup> utilizando una sonda de cARN marcada con [<sup>35</sup>S]. Ésta se generó a partir de clonar el producto de PCR de Klf4 de hipotálamo de E18, en el vector pCR4-TOPO<sup>82</sup>.

Los cortes sagitales de embrión de E15 y E18 y así como cortes coronales de cerebro a los días E18, P0, P7 y adulto, fueron hibridados y expuestos a una película fotográfica durante 72 hrs. Tras el revelado se obtuvo un patrón de distribución e intensidad de la señal distintivo para cada estadio.

El análisis a nivel de film muestra que al día E18 el ARNm de Klf4 se detectó en las zonas ventricular y subventricular, principalmente, en la placa basal telencefálica (bta), el neuroepitelio cortical (co) y el neuroepitelio de la formación hipocampal (hi) (Figura 26A); mientras que la señal al día P7 abarca solamente las células endociliares de los ventrículos laterales (Figura 26D). Por otro lado, el análisis en los cortes de P0 permite observar una señal específica en las células de la capa I, la más externa, de la neocorteza (Figura 26B), lo cual se repite al día P7 (Figura 26C). Es importante resaltar que en el análisis de la zona que comprende al PVN en todos los cortes incluidos, no se obtuvo señal específica, al igual que en la corteza de E18.

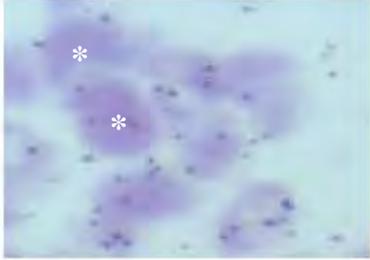
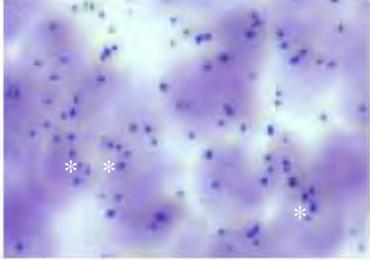
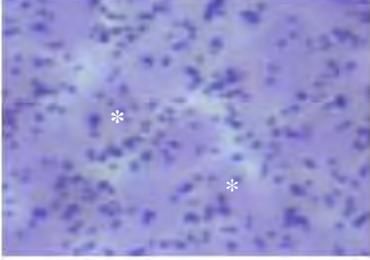
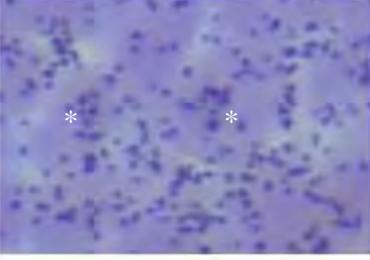
En cortes sagitales de embrión de E18 se observa una señal de hibridación específica con la hebra antisentido, que coincide con lo reportado para piel<sup>69</sup>, intestino<sup>93</sup> y cornea<sup>94</sup>, mientras que con la sonda sentido no se observa señal de hibridación (datos no mostrados y Figura 26 columna IV)



**Figura 26. Detección del transcrito de Klf4 en cortes coronales de la zona media del hipotálamo.** La hibridación de cortes coronales de cerebro con una sonda de cARN específica para el ARNm de Klf4 y marcada con [<sup>35</sup>S] permitió detectar señal de hibridación a nivel autoradiográfico (columna I), en donde se marca, con una flecha, la señal obtenida en las células endocelulares del ventrículo lateral (VL), corteza (CTX), neuroepitelio cortical (co), placa basal telencefálica anterior (bta) y neuroepitelio de la formación hipocámpica (hi). Se muestran microfotografías representativas a 40X de las secciones emulsionadas y contrateñidas con hematoxilina para la hebra antisentido (columna III) y sentido (columna IV), aquí las flechas apuntan hacia células consideradas como positivas dentro de cada región. En la segunda columna se muestra como referencia un esquema destacando con flechas los sitios con señal positiva. (Esquemas modificados del Atlas de Paxinos y Watson, 1996)<sup>92</sup>

Para la caracterización semi-cuantitativa de la expresión del ARNm de Klf4 a nivel celular, algunas de las secciones fueron emulsionadas,

contrateñidas y examinadas bajo el microscopio de luz. Previo al análisis, se establecieron diferentes categorías para agrupar a las células de acuerdo al número de granos de plata depositados sobre los núcleos: Categoría A: 6-7 granos; Categoría B: 8-11 granos; Categoría C: 12-20 granos (Figura 27).

<b>Células negativas</b> (0-5 granos de plata)	<b>Categoría A</b> (6-7 granos de plata)
	
<b>Categoría B</b> (8-11 granos de plata)	<b>Categoría C</b> (12-20 granos de plata)
	

**Figura 27. Categorías establecidas para el análisis a nivel celular de hibridación in situ.** De acuerdo al número de granos de plata depositados sobre las células sometidas a hibridación in situ, emulsionadas y contrateñidas con hematoxilina, se establecieron tres categorías. Categoría A: 6-7 granos de plata; categoría B: 8-11 granos de plata; Categoría C: 12-20 granos de plata; Células negativas: 0-5 granos de plata. Células positivas para cada categoría (\*). Las fotografías se tomaron en el microscopio de luz a un aumento de 40X.

El primer estadio en el que observamos la expresión del ARNm de KLF4 por RT-PCR fue al día E15; sin embargo, al analizar diferentes regiones del cerebro como hipotálamo, tercer ventrículo, hipocampo o corteza, tanto a nivel de film como celular, no encontramos señal de hibridación específica. Este fenómeno se repite en los cortes de adulto (datos no mostrados).

Al día E18 el 62% de las células de VL resultó positiva para la expresión del ARNm de Klf-4 (Tabla 3), expresándolo de manera abundante

(categoría B) hacia el neuroepitelio cortical (co), la placa basal telencefálica anterior (bta) y al neuroepitelio de la formación hipocampal (hi) (Figura 26A), tal y como se observó a nivel autoradiográfico. Durante el estadio P0 el 99.8% de las células que constituyen la capa mas externa de la neocorteza expresan este factor de transcripción, aunque la mayoría cae dentro de la categoría A (Figura 28). Finalmente, al día P7 observamos que el 32% de las células de la neocorteza expresan el ARNm de KLF-4 (Tabla 3), aunque de manera escasa, ya que cerca del 90% de las células caen dentro de la categoría A (Figura 28). En este mismo estadio, el transcrito de Klf4 puede también localizarse en el 80% de las células que constituyen la capa endodimal de los ventrículos laterales (Tabla 3), aunque nuevamente de manera escasa (Figura 28).

Si bien observamos que el transcrito de Klf4 puede ser detectado en diferentes zonas del cerebro, los niveles son relativamente bajos. Con excepción de los ventrículos laterales en E18 (para los cuales el 65% de las células positivas se clasifican dentro de la categoría B), la mayoría de las células positivas para los otros estadios, caen dentro de la categoría A (Figura 28).

		CATEGORÍA			NEGATIVAS	% CÉLULAS POSITIVAS
		A	B	C		
E18	VL	257	577	53	543	62.0 %
P0	CTX	1,414	31	2	3	99.8 %
P7	VL	581	28	2	152	80.1 %
	CTX	344	40	0	817	32.0%

Tabla 3. Expresión a nivel celular del ARNm de Klf-4. En los diferentes estadios y zonas analizadas y de acuerdo a las categorías establecidas se analizaron  $1425 \pm 25$  células en tres campos elegidos al azar. Los datos representan el número de células positivas detectadas por HIS de acuerdo a las categorías previamente establecidas. VL=ventrículo lateral y CTX=corteza.

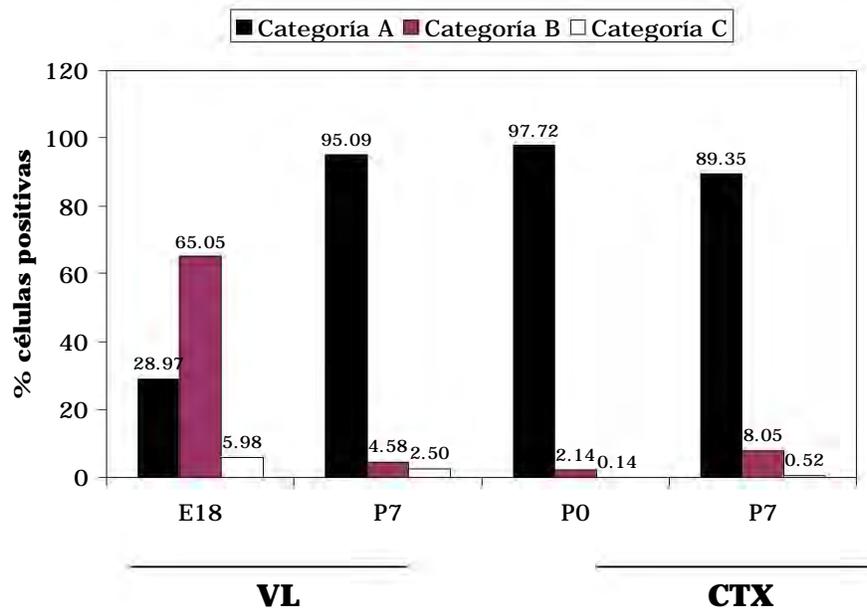


Figura 28. Comparación a nivel de categorías en la expresión de Klf4 por regiones. Las células positivas para la expresión del ARNm de Klf4, se clasificaron de acuerdo a las categorías previamente establecidas para la cuantificación de granos de plata/célula. Los porcentajes se expresan respecto al número total de células positivas cuantificadas (763-1450). VL = ventrículo lateral; CTX = corteza.

A partir de los datos obtenidos por HIS, observamos que el ARNm de Klf4 se expresa en zonas bien definidas dentro del cerebro de rata, principalmente en las zonas subventricular (bta, co e hi) y ventricular a los días E18 y P7, respectivamente. Además puede ser localizado en un grupo reducido de células en la capa más externa y adyacentes a la placa cortical en los estadios P0 y P7.

## 9 DISCUSIÓN

---

La neurogénesis es un proceso sumamente regulado que involucra la interacción dinámica entre señales intracelulares y extracelulares, con el fin de restringir el potencial de las células progenitoras al expresar de manera espacio-temporal genes que controlan el nacimiento, morfología, trayectoria, localización final y sinapsis establecidas por las neuronas<sup>95-97</sup>. Los factores de transcripción juegan una papel crucial en este proceso, al regular la activación de genes a través de la unión específica a secuencias del ADN, ya sea de manera individual o formando dímeros con ellos mismos u otros factores de transcripción<sup>14</sup>.

En los últimos años se han caracterizado numerosas proteínas proneurales pertenecientes a la familia bHLH que promueven la diferenciación de neuronas a partir de progenitores neurales regulando etapas tanto de determinación como de diferenciación<sup>5</sup>, además de factores de otras familias que pueden actuar de manera sinérgica con los primeros, como es el caso de Rel<sup>98</sup> y Senseless<sup>99</sup>. Sin embargo, para el caso de los fenotipos neuroendócrinos, hasta el momento se han caracterizado pocos factores involucrados en la regulación de la neurogénesis ya sea en etapas tempranas o en la diferenciación terminal<sup>38-44,100,101</sup>.

Este estudio resulta sumamente novedoso ya que, a diferencia de otros grupos<sup>65</sup> demostramos que el ARNm de Klf4 no sólo se expresa en el cerebro de rata (especialmente en el hipotálamo), sino además, que su expresión es regulada a lo largo del desarrollo hipotalámico, alcanzando niveles máximos de expresión a los días E15, P0 y P7.

Asimismo, el análisis por hibridación in situ en cortes coronales de cerebro, permitió localizar al ARNm de Klf4 alrededor de los ventrículos laterales al día E18, en especial en la placa basal telencefálica, el neuroepitelio cortical y el neuroepitelio de la formación hipocampal, así como en las células ependimales del ventrículo lateral al día P7. Además de un grupo reducido de células en la capa I de la neocorteza en los estadios P0 y P7.

### **9.1 EXPRESIÓN DEL ARNM DE KLF4 EN ESTADOS EMBRIONARIOS**

Estudios realizados con analogos de timidina (BrdU o timidina [<sup>3</sup>H]) han permitido identificar el día de nacimiento de las neuronas que conforman el cerebro de la rata. Las diferentes zonas que integran al hipotálamo muestran patrones de nacimiento sobrelapados que van desde E12 hasta E18; sin embargo, al día E15 se observa un nacimiento importante a nivel de diferentes núcleos (supraóptico, paraventricular, ventromedial, dorsomedial, arcuato, supraquiasmático, así como en los cuerpos mamilares), por lo que el aumento detectado por RT-PCR y Northern blot en la expresión del ARNm de Klf4 al día E15, nos sugiere que este factor pudiera estar participando en el nacimiento de las neuronas hipotalámicas que se está dando durante este estadio.

Aunque a nivel de HIS no detectamos señal de hibridación en E15, consideramos que al incluir únicamente cortes que abarcan la zona del PVN se descartaron otros núcleos hipotalámicos en los que Klf4 pudiese estar actuando y que sí fueron incluidos en los ensayos de RT-PCR y Northern blot.

Como se mencionó en la introducción, la región promotora del gen de TRH contiene secuencias consenso que pueden unir a miembros de la familia

KLF. Por ensayos de movilidad electroforética (EMSA) preliminares realizados en el laboratorio, en donde oligonucleotidos que contienen dichas secuencias son marcados con [<sup>32</sup>P] e incubados con extractos de proteínas nucleares de hipotálamo a diferentes estadios, se ha observado la formación de complejos ADN-proteína tanto en E15 como en P7<sup>82</sup>, lo cual apunta nuevamente a que Klf4 pudiera estar participando en algún evento temprano en la diferenciación neuronal (E15) o bien o en mantenimiento del mismo (P7).

A partir de experimentos con timidina [<sup>3</sup>H] se ha demostrado que aproximadamente el 40% de las células que forman las capas IV-II de la neocorteza nacen a partir del neuroepitelio cortical entre los días E15-E18, mientras que las células que originaran al hipocampo comienzan a nacer del neuroepitelio de la formación hipocampal al día E18<sup>102</sup>, por lo que la señal detectada por HIS en los neuroepitelios cortical y de la formación hipocampal, en este estadio, nos hacen pensar nuevamente que Klf4 puede estar participando en algún evento en la neurogénesis, a través de alguno de los mecanismos propuestos más adelante.

## **9.2 EXPRESIÓN DEL ARNm DE KLF4 POSTNATAL**

El otro pico importante en la expresión del ARNm de Klf4 detectado por RT-PCR y Northern blot en el hipotálamo fue a los días P0 y P7, etapas en que si bien, ya han nacido la mayoría de las neuronas, se da una gran actividad de los genes involucrados en mielinización<sup>103</sup>, así como de aquellos que participan en la remodelación a nivel neurítico y de sinaptogénesis. Por otro lado, es al día P2 cuando las terminales nerviosas inmunorreactivas a TRH entran en contacto con los vasos sanguíneos del sistema porta-hipofisiario<sup>104</sup>, mientras que en P7 dichas neuronas comienzan a ser reguladas negativamente

por las hormonas tiroideas. Estos datos sugieren que Klf4 pudiera estar actuando en estas etapas a nivel de diferenciación terminal, al regular, como se verá más adelante, genes involucrados en estos procesos.

El análisis por HIS en estadios postnatales, permitió detectar el transcrito de Klf4 en las células endoteliales en los ventrículos laterales en P7, zona en que se sabe existe neurogénesis no sólo en la vida embrionaria, sino también en el adulto, por lo que una vez más la evidencia nos conduce a pensar que Klf4 pudiese estar participando en el proceso neurogénico.

Si bien se sabe que las neuronas de la corteza se forman y hacen sinapsis antes del nacimiento<sup>102</sup> es durante las primeras semanas de la vida postnatal cuando se da crecimiento y retracción de axones y dendritas, así como estabilización de las sinapsis<sup>105</sup>. La señal detectada en las células de la capa I de la corteza, nos lleva a pensar que Klf4 pudiese estar participando en procesos de diferenciación terminal al regular procesos morfológicos, de sinapsis o bien de migración.

En los últimos años, varios miembros de la familia de Klf4 se han involucrado en diferentes procesos durante el desarrollo de mamíferos, en especial de crecimiento celular, proliferación y diferenciación, como KLF1 (EKLF) que controla la proliferación de eritrocitos y regula la actividad de B-globina; KLF2 (LKLF) que contribuye a la formación del pulmón, a la estabilización de vasos sanguíneos y a la quiescencia en linfocitos T o KLF5 (IKLF) que participa en la regulación cardiovascular<sup>63</sup>. Sin embargo sólo, Klf6<sup>106</sup> y Klf7<sup>107</sup> han sido estudiados a nivel del sistema nervioso, en donde por su patrón de expresión espacio-temporal se piensa pudiese participar en el establecimiento de las motoneuronas de la médula espinal, en la

sinaptogénesis y desarrollo de circuitos sinápticos en la vida post-natal y en la sobrevivencia y mantenimiento de la función neuronal en el adulto.

La evidencia existente hasta el momento, nos hace pensar que el papel de Klf4 durante la neurogénesis puede darse a través de dos vías principales, las cuales se describen a continuación.

### **9.3 ¿CÓMO PODRÍA KLF4 PARTICIPAR EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL?**

#### **Ciclo celular**

La salida del ciclo celular es una condición obligatoria para la neurogénesis<sup>108</sup>. Varias líneas de investigación indican que Klf4 juega un papel importante en la proliferación celular, por ejemplo, el transcrito de Klf4 en ratón, comienza a ser detectable al día E13 alcanzado su expresión máxima al día E17, lo cual correlaciona con un periodo crítico en la morfogénesis epitelial<sup>109</sup>.

En fibroblastos NIH 3T3 se observa un aumento en la expresión de Klf4 asociado a condiciones que promueven el arresto celular, como son la privación de suero, la inhibición por contacto<sup>65</sup> y el daño a ADN<sup>73</sup>, mientras que los niveles descienden drásticamente en la fase exponencial de proliferación<sup>65</sup>. Asimismo, la producción constitutiva de Klf4 resulta en la inhibición de la síntesis de ADN<sup>65</sup>.

Por otro lado, la expresión constitutiva de Klf4 en la línea HT-29 (adenocarcinoma de colon humano) disminuye la incorporación de timidina [<sup>3</sup>H], mientras que la supresión del gen con cADN antisentido incrementa la síntesis de ADN<sup>74</sup>.

El mecanismo por el que KLF4 regula la salida del ciclo celular pone de manifiesto el papel dual que este factor puede realizar durante el desarrollo,

lo cual involucra a) la activación del promotor de p21 un inhibidor de diferentes ciclinas dependientes de cinasas, a través de la unión de Klf4 a una secuencia rica en GC que sirve para el reconocimiento de Sp1, función que además depende de la actividad de p53<sup>73</sup>; b) **reprimiendo** al promotor de la ciclina D1<sup>74</sup> e induciendo el arresto en la transición G1/S<sup>110-111</sup>.

### Diferenciación neuronal

La diferenciación terminal es un paso crucial durante el desarrollo de cualquier órgano, y aunque la evidencia indica que la salida del ciclo celular es requerida para el proceso de diferenciación neuronal, ésta no es suficiente, por lo que también es necesaria la activación de mecanismos para la transcripción de genes específicos.

Estudios realizados por otros grupos *in vivo*, detectan que la expresión del ARNm de Klf4 se restringe a las criptas epiteliales en intestino de adulto, constituidas por células que han salido del ciclo celular y que comienzan a diferenciarse en colonocitos<sup>70</sup>, en las células postmitóticas que constituyen la epidermis,<sup>69,71</sup> así como en las células caliciformes del colon<sup>72</sup>.

La generación del ratón Klf4<sup>-/-</sup>, el cual muere a las pocas horas de nacido por fallas en la función protectora de la piel, ha permitido identificar que si bien Klf4 participa en la diferenciación terminal tanto de keratinocitos<sup>69</sup> como de células caliciformes<sup>72</sup>, el mecanismo a través del cual lo hace no involucra cambios en las tasas de proliferación.

Si bien el mecanismo a través del cual Klf4 regula la diferenciación terminal en ambos epitelios está aún por elucidarse, las propuestas de ambos grupos apuntan a la regulación en la expresión de genes cruciales para la diferenciación terminal como GCSI-BP<sup>72</sup>.

Por otro lado, se ha demostrado que la actividad transcripcional de Klf4 en el epitelio escamoso del esófago, promueve la expresión de genes de diferenciación tardía como la Queratina 19<sup>111</sup>, mientras que Klf4 actúa de manera sinérgica con p53, CREB y CBP para activar al gen del receptor 2 para bradicinina, el cual se sabe participa in vivo en la diferenciación terminal de nefronas<sup>112</sup>.

Si bien es necesario realizar un gran número de experimentos con el fin de elucidar la posible función de Klf4 en el desarrollo del hipotálamo (ver perspectivas) nuestros datos en conjunto con la evidencia antes mencionada nos llevan a proponer que Klf4 puede estar participando en la neurogénesis a) en etapas tempranas al promover la salida del ciclo celular ya sea a través de la activación de p21 o bien por la inactivación de la ciclina D1; o bien, b) en la diferenciación terminal al activar de manera directa o indirecta genes involucrados en la expresión de neuropéptidos, en el crecimiento axonal y desarrollo neurítico o en el mantenimiento de la viabilidad.

## **10 CONCLUSIONES**

---

- El factor de transcripción KLF4 se expresa de manera significativa en el hipotálamo de rata desde etapas embrionarias hasta el adulto.
- La expresión del ARNm de KLF4 es regulada durante el desarrollo hipotalámico con picos máximos de expresión a los días E15, P0 y P7
- A nivel celular el ARNm de KLF4 se detectó en los ventrículos laterales tanto al día E18 como al P7, así como en la capa I de la neocorteza en los estadios P0 y P7

## 11 PERSPECTIVAS

---

- Con el fin de obtener datos cuantitativos, se realizará nuevamente el análisis de la ontogenia de hipotálamo de rata por Northern blot, utilizando concentraciones mayores de RNA total así como una curva estándar para su posterior corrección.
- Para mostrar que Klf4 juega un papel importante en la expresión de TRH, se determinará su expresión en células TRHérgicas por hibridación *in situ* doble en rebanadas de cerebro de rata.
- Dado que Klf4 promueven la salida del ciclo celular y que esto es un requisito para el inicio de la diferenciación neuronal, determinaremos si la carencia de este factor tienen algún efecto sobre el desarrollo del hipotálamo, para lo cual analizaremos la anatomía hipotalámica en ratones carentes de Klf4 y se compararan con cortes histológicos de ratones silvestres.

## 12 REFERENCIAS

---

- 1 Gilbert, SF (1997) *Developmental Biology*, 5<sup>th</sup> ed. Sunderland, Sinauer Associates
- 2 Kandel, EJ Schwartz y T Jessell (2000) *Principles of Neural Science*, 4<sup>th</sup> ed. McGraw Hill
- 3 Eggen, B y AH Brivanlou (2001) BMP antagonist and neural induction. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Londres, Nature Publishing Group. <http://www.els.net/>.
- 4 Torroja, H (2001) *Drosophila* neural development. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Londres, Nature Publishing Group. <http://www.els.net/>.
- 5 Bertrand N, D Castro y F Guillemot (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Reviews Neurosci* **3**:517-530
- 6 Vetter M y W Harris (2001) Neural development: bHLH genes. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Londres, Nature Publishing Group <http://www.els.net/>.
- 7 Baker NE (2000) Notch signalling in the nervous system. Pieces still missing from the puzzle. *Bioessays* **22**:264-273
- 8 Alberts B, A Johnson, J Lewis, M Raff, K Roberts, P Walter (2002) *Molecular Biology of the cell*, 4<sup>th</sup> ed. New York Garland Sciences
- 9 Tomita K, K Miroyoshi, S Nakanishi, F Guillemot y R Kageyama (2000) Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *EMBO Journal* **19**:5460-5472
- 10 Nieto M, C Schuurmans, O Britz y F Guillemot (2001) Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* **29**:401-413
- 11 Kessaris N., N. Pringle y W.D. Richardson (2001) Ventral neurogenesis and the neuron-glial switch. *Neuron* **31**:667-680
- 12 Sun Y, M Nadal-Vicens, S Misono, MZ Lin, A Zubiaga, X Hua, G Fan y ME Greenberg (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* **104**:365-376
- 13 Nakashima K, M Yanagisawa, H Arakawa, N Kimura, T Hisatsune, M Kawabata, K Miyazono, A Taga (1999) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* **284**:479-482
- 14 Lodish H, A Berk, SL Zipursky, P Matsudaira, D Baltimore y J Darnell (1999) *Molecular Cell Biology* 4<sup>th</sup> ed. W.H. Freeman & Co.
- 15 Halevy O, BG Novitch, DB Spicer, SX Skapek, J Rhee, GJ Hannon, D Beach y AB Lassar (1995) Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* **268**:963-964
- 16 Farah, MH, JM Olson, HB Sucic, RI Hume, SJ Tapscott y DL Turner (2000) Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* **127**:693-702
- 17 Mizuguchi R, M Sugimori, H Takebayashi, H Kosako, M Nagao, S Yoshida, Y Nabeshima, K Shimamura y M Nakafuku (2001) Combinatorial roles of olig1 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype specific properties of motoneuron. *Neuron* **31**: 757-771

- 18 Mutoh H, FJ Nava, MJ Tsai, AB Leiter (1998) The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of ecretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes Development* **12**:820-830
- 19 Lee JE, SM Hollenberg, L Snider, DL Turner, N Lipnick y H Wintraub (1995) Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* **268**:836-844
- 20 Liu M, SJ Pleasure, AE Collins, JL Noebels, FJ Nava, MJ Tsai y DH Lowenstein (2000) Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:865-870
- 21 Miyata T, T Maeda y JE Lee (1999) NeuroD is requerides for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Development* **13**:1647-1652
- 22 Olson JM, A Asakura, L Snider, R Hawkes, A Strand, J Stoeck, A Hallahan, J Pritchard y SJ Tapscott (2001) NeuroD2 is necessary for development and survival of central nervous system neurons. *Developmental Biology* **234**:174-187
- 23 Schwab MH, A Bartholomae, B Heimrich, D Feldmeyer, S Druffel-Augustin, S Goebbels, FJ Naya, S Zhao, M Frotscher, MJ Tsai y KA Nave (2000) Neuronal basic helix-loop-helix protein (NEX and BETA2/NeuroD) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J Neurosci* **20**:3714-3721
- 24 Wong K, JY Wu, y Y Rao (2002) Neuronal migration. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Londres, Nature Publishing Group. <http://www.els.net/>.
- 25 Ross EM y CA Walsh (2001) Human brain malformations and their lessons for neuronal migration. *Annual Review of Neurosc* **24**:1041-1070
- 26 Reiner O y T Sapir (2006) Cdk5 checks p27<sup>kip1</sup> in neuronal migration. *Nature Cell Biology* **8**:11-13
- 27 Pozas E, y CF Ibañez (2005) GDNF and GFR promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. *Neuron* **45**:701-713
- 28 Cobos I, ME Calcagnotto, AJ Vilaythong, TN Thwin, JL Noebels, SC Baraban y JL Rubenstein (2005) Mice lacking *Dlx1* show subtype specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nature Neuroscience*. **8**:1059-1068
- 29 Kidokoro Y (2001) Synapse formation. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Londres, Nature Publishing Group. <http://www.els.net/>.
- 30 Bibel M, y YA Barde (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Development* **14**:2919-2937
- 31 Lachyankar MB, PJ Condon, PJ Quesenberry, NS Litofsky, LD Recht y AH Ross (1997) Embryonic precursor cells that express Trk receptors: induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3, and CNTF. *Experimental Neurology* **144**:250-360
- 32 Cattaneo E y R McKay (1990) Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* **347**:762-765
- 33 Ahmed S, BA Reynolds, S Weiss (1995) BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J Neurosc* **15**:5765-5778
- 34 Ghosh A, y ME Greenberg (1995) Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* **15**:249:252

- 35 Barres, BA, MC Raff, F Gaese, I Kartke, G Dechant y YA Barde (1994) A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature* **367**:371-372
- 36 Lu J, W Yan, N Sousa y OFX Almeida (2005) SMAD pathway mediation of BDNF and TGF $\beta$  regulation of proliferation and differentiation of hippocampal granule neurons. *Development*. **132**:3231-3242
- 37 Zigmong MJ, FE Bloom, SC Landis, JL Roberts y LR Squire (1999) *Fundamental Neuroscience* Academic Press.
- 38 Acampora D, MP Postiglione, V Avantagegiato, M Di Bonito, FM Vaccarino, J Michaud y A Simeone (1999) Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the *Orthopedia* gene. *Genes Development* **13**:2787-2800
- 39 Wang W y T Lufkin (2000) The murine *Otp* homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Developmental Biology* **15**:432-449.
- 40 Li P, X He, MR Guerrero, M Mok, A Aggarwal y MG Rosenfeld (1993) Spacing and orientation of bipartite DNA-binding motifs as potential functional determinants for POU domain factors. *Genes Development* **7**:2483-2496.
- 41 Schonemann MD, AK Ryan, RJ McEvelly, SM O'Connell, CA Arias, KA Kalla, P Li, PE Sawchenko y MG Rosenfeld (1995) Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor *Brn-2*. *Genes Development*. **9**:3122-3135
- 42 Michaud, JL, T Rosenquist, NR May y C Fan (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor *SIM1*. *Genes and Development*. **15**:3264-3275.
- 43 Michaud JL, C DeRossi, NR May, BC Holdener y C Fan (2000) *ARNT2* acts as the dimerization partner of *SIM1* for the development of the hypothalamus. *Mechanisms of Development*. **90**:253-261.
- 44 Pérez-Martínez, L y JL Charli (2006) Factors involved in the establishment of hypothalamic neuroendocrine phenotypes. *Molecular Endocrinology*. Ed. Joseph-Bravo P., Research Signpost. EUA
- 45 Lechan RM, P Wu y IM Jackson (1986). Immunolocalization of the Thyrotropin-Releasing Prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology* **119**:1210-1216
- 46 Segerson TP, H Hoefler, H Childers, P Wolfer, M Jackson y RM Lechan (1987). Localization of Thyrotropin-Releasing Prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* **121**:98-107
- 47 Joseph-Bravo P, RM Uribe, MA Vargas, Pérez-Martínez L, T Zoeller y JL Charli (1998). Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol* **18**:231-247
- 48 Aratan SS, R Schafmann y RM Lechan (1990). ProTRH gene expression by fetal pancreatic islets in culture. *Biochem Biophys Res Commun* **168**:952-958
- 49 Carnell, N. E., P. Feng, N.E. Kim y J.F. Wilber (1992) Preprothyrotropin-Releasing Hormone and TRH are present in the rat heart. *Neuropeptides* **22**:209-212

- 50 Feng P, J Gu, U Kim, NE Carnell y JF Wilber (1993). Identification and localization and developmental studies of rat Prepro Thyrotropin-Releasing Hormone mRNA in the testis. *Neuropeptides*. **24**:63-69
- 51 Metcal G y Jackson IMD (1989) Thyrotropin-Releasing Hormone: biomedical significance. *Annals of the New York Academic of Sciences* **553**:579-582, 269-304, 610-614.
- 52 Lee SL, K Steward y RH Goodman (1988) Structure of the gene encoding rat Thyrotropin-Releasing Hormone. *Journal of Biol Chem* **263**:16604-16609
- 53 Joseph-Bravo P, RM Uribe, MA Vargas, L Pérez-Martinez, T Zoeller y JL Charli (1998) Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol* **18**:231-247.
- 54 Markakis EA y LW Swanson (1997) Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system. *Brain Res Brain Res Rev* **24**:255-291.
- 55 Burgunder JM y T Taylor (1989) Ontogeny of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the rat diencephalon. *Neuroendocrinology* **49**:631-640
- 56 Taylor T, P Gyves y JM Bungunder (1990) Thyroid hormone regulation of TRH mRNA levels in rat paraventricular nucleus of the hypothalamus changes during ontogeny. *Neuroendocrinology* **52**:262-267
- 57 Gonzalez-Sánchez JA (2001) Expresión del mRNA que codifica al receptor de neurotrofinas TrkB en el núcleo paraventricular del hipotálamo de rata durante el desarrollo, y su relación con la expresión del mRNA de la hormona liberadora de tirotropina. Tesis de Maestría, UNAM
- 58 Guerra-Crespo M, R Ubieta, P Joseph-Bravo, JL Charli, L Pérez-Martínez (2001) BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture. *Eur J Neurosci* **14**:483-94.
- 59 Guerra-Crespo M, Charli JL, Rosales-García VH, Pedraza-Alva G, Pérez-Martínez L (2003) Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons. *J Neurosci Methods* **127**:179-192.
- 60 Guerra-Crespo M (2004) Estudio de la biosíntesis de la TRH en etapa de diferenciación terminal en cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata. Tesis de Doctorado, UNAM
- 61a Roxanne C. Lariviere, Jean-Pierre Julián (2004) Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol* **58**:131-148
- 61b Bunge MB, Williams AK, Wood PM, Uitto J y Jeffrey JJ (1980) Comparison of nerve cell and nerve cell plus Schwann cell cultures, with particular emphasis on basal lamina and collagen formation. *J Cell Biol* **84**:184-202.
- 62 Greenberg JH, Foidart JM y Greene RM (1980) Collagen synthesis in cultures of differentiating neural crest cells. *Cell Differ* **9**:153-163.
- 63 Dang DT, J Pevsner y VW Yang (2000) The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **32**:1103-1121
- 64 Zhang P, P Basu, LC Redmond, PE Morris, JW Rupon, GD Ginder y JA Lloyd (2005) A functional screen for Kruppel-like factors that regulate the human gamma-globin gene through the CACCC promoter element. *Blood Cells Mol Dis* **35**:227-235.

- 65 Shields JM, RJ Christy y VW Yang (1996) Identification and characterization of a Gene Encoding a Gut-enriched krüppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* **271**:20009-20017.
- 66 Turner J y M Crossley (1999) Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci* **24**:236-240
- 67 Panigada M, S Porcellini, F Sutti, L Doneda, O Pozzoli, G Gonzalez, M Guttinger, F Grassi (1999) GKLf in thymus epithelium as a developmentally regulated element of thymocyte-stroma cross-talk. *Mech Dev* **81**:103-113.
- 68 Jenkins TD, OG Opitz, J Okano y AK Rustgi (1998) Transactivation of the human keratin 4 and Epstein-Barr virus ED-L2 promoters by gut-enriched Kruppel-like factor. *J Biol Chem* **273**:10747-54.
- 69 Segre JA, C Bauer y E Fuchs (1999) Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* **22**:356-360.
- 70 Garrett-Sinha LA, H Eberspaecher, MF Seldin, B de Crombrughe (1996) A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem* **271**:31384-31390.
- 71 Jaubert J, J Cheng y JA Segre (2003) Ectopic expression of kruppel like factor 4 (Klf4) accelerates formation of the epidermal permeability barrier. *Development* **130**:2767-2777.
- 72 Katz JP, N Perreault, BG Goldstein, CS Lee, PA Labosky, VW Yang, KH Kaestner. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* **129**:2619-2628.
- 73 Zhang W, DE Geiman, JM Shields, DT Dang, CS Mahatan, KH Kaestner, JR Biggs, AS Kraft, VW Yang (2000) The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21<sup>WAF1/Cip1</sup> promoter. *J Biol Chem* **275**:18391-18398.
- 74 Shie JL, ZY Chen, M Fu, RG Pestell, CC Tseng (2000) Gut-enriched Krüppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res* **28**:2969-2976.
- 75 Cartharius K, K Frech, G Grote, B Klocke, M Haltmeier, A Klingenhoff, M Frisch, M Bayerlein y T Werner (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**:2933-2942.
- 76 Ohyama K, P Ellis, S Kimura y M Placzek (2005) Directed differentiation of neural cells to hypothalamic dopaminergic neurons. *Development* **132**:5185-5197.
- 77 Nilaweera KN, C Ellis, P Barret, JG Mercer y PJ Morgan (2002) Hypothalamic bHLH transcription factors are novel candidates in the regulation of energy balance. *European Journal of Neuroscience* **15**:644-650
- 78 Chomczynski P. Y N Sacchi (1987) Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**:156-159
- 79 Altschul SF, TL Madden, AA Schäffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller y DJ Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402

- 80 Pérez-Martínez L, Charli JL, Joseph-Bravo P (2001) Development of pro-TRH gene expression in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain Res Dev Brain Res* **130**:73-81
- 81 Covarrubias L, RM Uribe, M Mendez, JL Charli, P Joseph-Bravo (1988) Neuronal TRH synthesis: developmental and circadian TRH mRNA levels. *Biochem Biophys Res Commun* **151**:615-622.
- 82 Pérez-Monter JC (2006) Mecanismos moleculares que regulan el establecimiento y manteniendo del fenotipo TRHérgico del hipotálamo. Tesis de doctorado, UNAM.
- 83 Sánchez E, RM Uribe, G Corkidi, RT Zoeller, M Cisneros, M Zacarias, C Morales-Chapa, JL Charli Y P Joseph-Bravo (2001) Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* **74**:407-422.
- 84 Ambion (2006) Basics RT-PCR. The 10 most common quantitative RT-PCR pitfalls. *Boletín técnico* 165. <http://www.ambion.com/>
- 85 Pérez-Martínez L, A Carreon-Rodríguez, ME Gonzalez-Alzati, C Morales, JL Charli, P Joseph-Bravo (1998) Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* **68**:345-354
- 86 Botte MC, AM Chamagne, MC Carre, R Counis y ML Kottler (1998) Fetal expression of GnRH and GnRH receptor genes in rat testis and ovary. *J Endocrinol* **159**:179-189.
- 87 Al-Bader, MD y HA Al-Sarraf (2005) Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Brain Res Dev Brain Res* **156**:38-45
- 88 Aguilar-Valles A. (2005) Activación de las neuronas TRHérgicas en hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto de Morris. Tesis de Maestría, UNAM.
- 89 Robbins M, y M McKinney (1992) Transcriptional regulation of neuromodulin (GAP-43) in mouse neuroblastoma clone N1E-115 as evaluated by the RT/PCR method. *Brain Res Mol Brain Res* **13**:83-92.
- 90 Leeuw WJF de, PE Slagboom y J Vijg (1989) Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control. *Nucleic Acids Research* **17**:10137-10138
- 91 Morse DL, D Carroll, L Weberg, MC Borgstrom, J Ranger-Moore y RJ Gillies (2005) Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Anal. Biochem* **342**:69-77
- 92 Paxinos G y C Watson (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates* 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, San Diego.
- 93 Dang DT, W Zhao, CS Matan, DE Geiman y VW Yang (2002) Opposing effects of kruppel-like factor 4 (gut-enriched kruppel-like factor) and kruppel-like factor 5 (intestinal-enriched kruppel-like factor) on the promoter of the kruppel-like factor 4 gene. *Nucleic acids res* **27**:36-41
- 94 Chiambaretta F (2004) Cell and tissue specific expression of human kruppel-like transcription factors in human ocular surface. *Molecular vision* **10**:901-910

- 95 Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**:1123-1133.
- 96 Jessell TM, Sanes JR (2000) Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol* **10**:599-611.
- 97 Marin O y JL Rubenstein (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* **26**:441-483.
- 98 Culi J, J Modolell (1998) Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes Dev* **12**:2036-2047.
- 99 Nolo R, LA Abbott, HJ Bellen (2000) Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* **102**:349-362
- 100 Hosoya T, Y Oda, S Takahashi, M Morita, S Kawauchi, M Ema, M Yamamoto, Y Fujii-Kuriyama (2001) Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes Cells* **6**:361-374.
- 101 Goshu E, H Jin, J Lovejoy, JF Marion, JL Michaud, CM Fan (2004) Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol Endocrinol* **18**:1251-1262.
- 102 Paxinos G. (1995) *The rat nervous System* 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press.
- 103 Stead JD, C Neal, F Meng, Y Wang, S Evans, DM Vázquez, SJ Watson, H Akil (2006) Transcriptional profiling of the developing rat brain reveals that the most dramatic regional differentiation in gene expression occurs postpartum. *J Neurosci* **26**:345-353
- 104 Shioda S, Y Nakai (1983) Ontogenetic development of TRH-like immunoreactive nerve terminals in the median eminence of the rat. *Anat Embryol* **167**:371-378.
- 105 Yuste R y M Sur (1999) Development and plasticity of the cerebral cortex: from molecules to maps. *J Neurobiol* **41**:1-6.
- 106 Laub F, R Aldabe, F Ramírez, S Friedman (2001) Embryonic expression of Kruppel-like factor 6 in neural and non-neural tissues. *Mech Develop* **106**:167-170
- 107 Laub F, R Aldabe, V Friedrich, S Ohnishi, T Yoshida, y F Ramírez (2001) Developmental expression of mouse krüppel-like transcription factor KLF suggests a potential role in neurogenesis. *Devel Biol* **233**:305-318.
- 108 Farah MH, JM Olson, HB Sucic, RI Hume, SJ Tapscott, DL Turner (2000) Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* **127**:693-702.
- 109 Ton-That H, KH Kaestner, JM Shields, CS Mahatanankoon, VW Yang (1997) Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene during development and intestinal tumorigenesis. *FEBS Lett* **419**:239-243.
- 110 Chen X, DC Johns, DE Geiman, E Marban, DT Dang, G Hamlin, R Sun, VW Yang (2001) Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle. *J Biol Chem* **276**:30423-30428.
- 111 Brembeck FH y AK Rustgi AK (2000) The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GKLf/KLF4 and Sp1. *J Biol Chem* **275**:28230-28239.
- 112 Saifudeen Z, S Dipp, H Fan, SS El-Dahr (2005) Combinatorial control of the bradykinin B2 receptor promoter by p53, CREB, KLF-4, and CBP: implications for terminal nephron differentiation. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**:F899-F909.

