



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



**Maestría en Ciencias Bioquímicas**

**“Diferenciación de células troncales embrionarias por  
sobre-expresión de factores bHLH”**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A:  
**BIOL. ERIKA SÁNCHEZ CRUZ**

Tutor: **DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ**

**FEBRERO 2009**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## ÍNDICE

Resumen . . . . .	. 3
Introducción . . . . .	. 4
1. Desarrollo Sistema Nervioso . . . . .	. 4
2. Neurogénesis . . . . .	. 6
3. Moléculas involucradas en la diferenciación del SN. . . . .	. 8
4. Familia de proteínas Hélice Asa Hélice con región básica (bHLH). . . . .	. 11
4.1 Familia de proteínas de las Neurogeninas . . . . .	. 14
4.1.1 Neurogenina 1 . . . . .	. 15
5. Células troncales embrionarias. . . . .	. 19
6. Diferenciación neural de células troncales . . . . .	. 20
Antecedentes . . . . .	. 22
Justificación . . . . .	. 23
Hipótesis . . . . .	. 24
Objetivo general . . . . .	. 24
Objetivos particulares . . . . .	. 24
Metodología . . . . .	. 25
1. Extracción de DNA plasmídico por el estuche de <i>QIAGEN (Miniprep)</i> . . . . .	. 25
2. Electroforesis en geles de agarosa . . . . .	. 26
3. Secuenciación. . . . .	. 27
4. Restricción enzimática de DNA . . . . .	. 28
5. Cultivo celular. . . . .	. 29
6. Inactivación de células. . . . .	. 30
7. Congelación de células . . . . .	. 31
8. Electroporación . . . . .	. 32

9. Inmunocitoquímica . . . . .	. 33
10. Extracción de RNA . . . . .	. 34
11. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) .	. 35
12. Diferenciación por ácido retinoico. . . . .	. 36
13. Diferenciación con células estromales (PA6) . . . . .	. 37
Resultados . . . . .	. 38
Análisis de secuenciación. . . . .	. 39
Electroporación de células . . . . .	. 40
Cultivo de células ESR1 y electroporación . . . . .	. 44
Diferenciación de células transgénicas con ácido retinoico . . . . .	. 50
Diferenciación de células transgénicas con células estromales PA6 . . . . .	. 53
Discusión . . . . .	. 56
Conclusiones . . . . .	. 58
Perspectivas . . . . .	. 58
Apéndice . . . . .	. 59
I. Abreviaturas. . . . .	. 59
II. Soluciones . . . . .	. 61
Referencias . . . . .	. 65

## RESUMEN

Los procesos de diferenciación neuronal son indispensables para la formación del sistema nervioso central. La diferenciación de células troncales neurales está influenciada por la expresión de factores transcripcionales que regulan genes importantes para la adquisición de un fenotipo neuronal. El papel de la Neurogenina 1 (Ngn1) en la diferenciación neuronal de células troncales neurales multipotentes ha sido establecido recientemente. Sin embargo, no se conoce si la expresión de Ngn1 es capaz de diferenciar a células troncales embrionarias (pluripotentes) hacia neuronas.

El objetivo principal de este trabajo fue analizar el efecto sobre la diferenciación de células troncales embrionarias (*ES*, por sus siglas en Inglés) que fueron electroporadas con construcciones que contienen el transgen de Ngn1, permitiéndonos seleccionar células *ES* de la línea R1 transgénicas que sobre-expresen Ngn1.

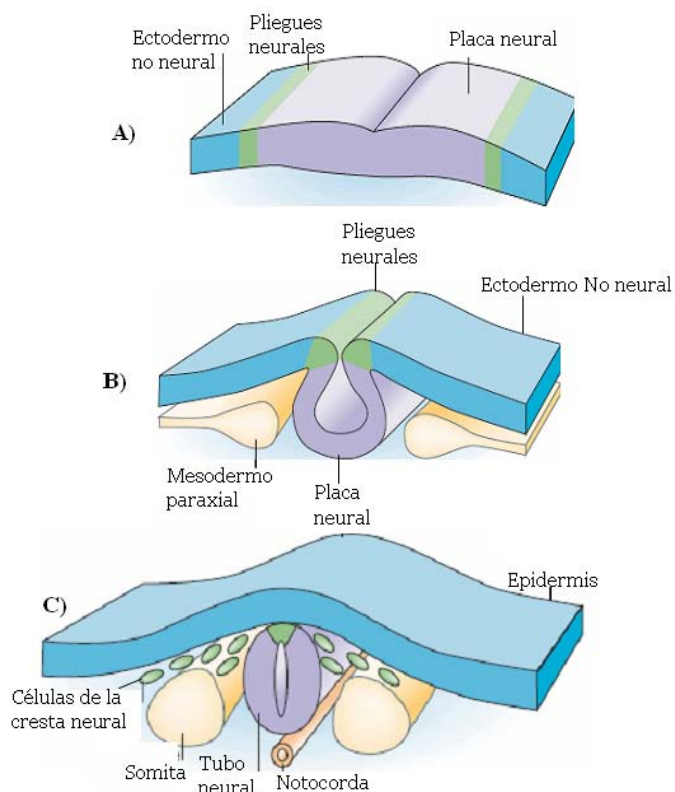
Una vez obtenidas estas líneas celulares transgénicas se indujo la diferenciación neuronal, mediante dos protocolos ya establecidos, el de AR (Bain *et al.*, 1995) y el de co-cultivo con células estromales PA6 (Kawasaki *et al.*, 2000; Barberi *et al.*, 2003), con la finalidad de analizar si las células transgénicas producían una mayor cantidad de neuronas.

Después de las células que expresaban Ngn1, se observó la expresión del marcador para neuronas jóvenes TUJ1. Sin embargo, no hay una diferencia significativa con respecto al número de neuronas presentes los controles, ni se observó la diferenciación neuronal hacia un linaje en particular.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Desarrollo del Sistema Nervioso

La formación del Sistema Nervioso (SN) en vertebrados, se da a partir del ectodermo, las células ectodérmicas se engrosan para formar la placa neural, que se puede dividir en tres regiones: 1) El ectodermo no neural, que formará la epidermis, 2) los pliegues neurales que originarán la cresta neural y 3) la placa neural que dará origen al tubo neural (Fig.1).



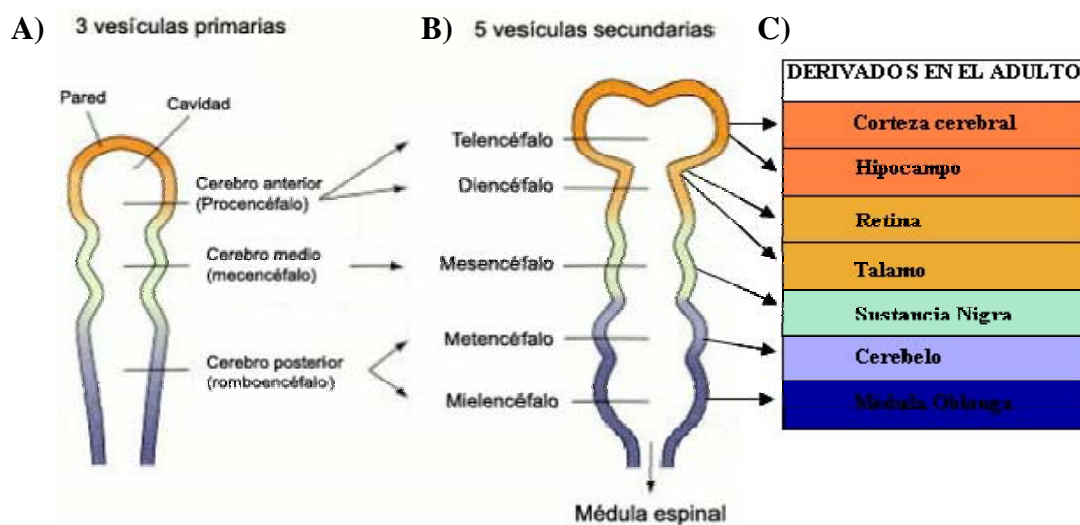
**Fig. 1. Formación del Sistema Nervioso.** Representación del ectodermo en donde se distinguen el ectodermo no neural, los pliegues neurales y la placa neural. **A)** Las células de la placa neural se encuentran en la región dorsal del ectodermo, seguida de los pliegues neurales y del ectodermo no neural. **B)** Los pliegues neurales se elevan mientras que la futura epidermis avanza hasta la línea media. **C)** Los pliegues neurales van a formar las células de la cresta neural que se dispersan separando al tubo neural de la epidermis. Modificada de Gammill y Bronner Fraser, 2003.

Por encima del tubo neural, el epitelio no neural, dará lugar a la epidermis, en un principio, el ectodermo no neural se disponía lateralmente y al final se fusiona recubriendo el tubo neural y todo el embrión (Gilbert, 2003).

Los bordes de la placa neural, los pliegues neurales, se dirigen desde lados opuestos del ectodermo hacia la línea media. Estas células formarán la cresta neural,

células que constituyen el sistema nervioso periférico (SNP), que al diferenciarse *in vivo* dan lugar a melanocitos, células de los ganglios de la raíz dorsal, neuronas adrenomedulares y células de Schwann (Gammill y Bronner Fraser, 2003; Le Douarin et al., 2004).

Cuando la placa neural se pliega sobre sí misma (Fig.1), por la inducción embrionaria primaria del mesodermo notocordal, que se encuentra localizado por debajo del ectodermo. La placa neural se alarga por acción de la notocorda, las células epidérmicas adyacentes se mueven hacia el centro de la placa neural produciendo un plegamiento y una elevación de la placa para formar un surco, el tubo neural se forma al cerrarse el surco neural, el cual dará lugar al cerebro y la médula espinal (ME), es decir al sistema nervioso central (SNC; Gilbert, 2003).



**Fig. 2. Desarrollo del SNC y estructuras derivadas en el adulto.** A) Regionalización del tubo neural en 3 vesículas: cerebro anterior, medio y posterior. B) Posteriormente estas tres vesículas se subdividen en 5 zonas que constituirán finalmente a todas las regiones del cerebro: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo. C) Algunas regiones se encuentran en el cerebro adulto y su origen embrionario. Tomada de Gilbert, 2003.

Después de la formación del tubo neural (Fig. 2), comienzan a distinguirse estructuras globulares llamadas vesículas. Alrededor del día E8.5 en ratón pueden distinguirse 3 vesículas que constituyen las divisiones básicas del cerebro: cerebro anterior, medio y posterior ó prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo respectivamente (Ybot-Gonzalez *et al.*, 2007). Conforme avanza el desarrollo

embrionario estas vesículas se subdividen para dar origen a 5 regiones. El procencéfalo se divide en telencéfalo y diencéfalo, el mesencéfalo se conserva y el romboencéfalo se subdivide en metencéfalo y mielencéfalo. Cada una de estas vesículas va a formar diferentes estructuras que se enlistan en la figura 2.

## 2. Neurogénesis

Las células del SNC y SNP se pueden originar de una población multipotente común de células troncales neurales (CTN), durante estados tempranos del desarrollo y conforme va avanzando el desarrollo se vuelven más especializadas (Fig. 3; Mujtaba *et al.*, 1999; Temple, 2001), llegando a ser menos abundantes y restringiendo su capacidad para generar los todos los tipos celulares (Baizabal *et al.*, 2003; Santa-Olalla *et al.*, 2003).

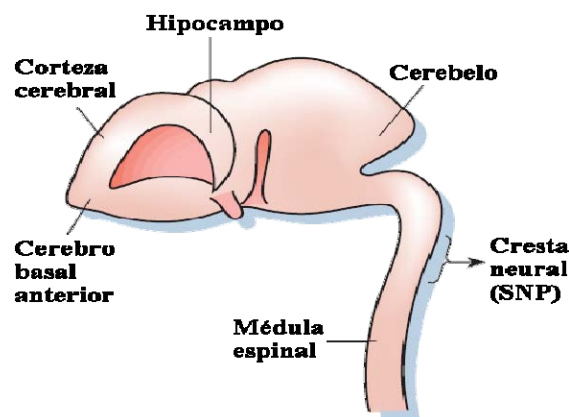


Fig. 3. Zonas de neurogénesis en el sistema nervioso fetal. Tomada de Temple, 2001.

Durante la formación de la placa neural aparecen las CTN y son el tipo celular más abundante en el neuroectodermo temprano (Temple, 2001). Estas CTN poseen la habilidad de autorenovarse y mantienen la capacidad de generar los tres tipos celulares del sistema nervioso: astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Fig. 4). Una CTN se deriva de células primitivas que tienen la capacidad de generar células troncales neurales y de otros tejidos (Gage, 2000).



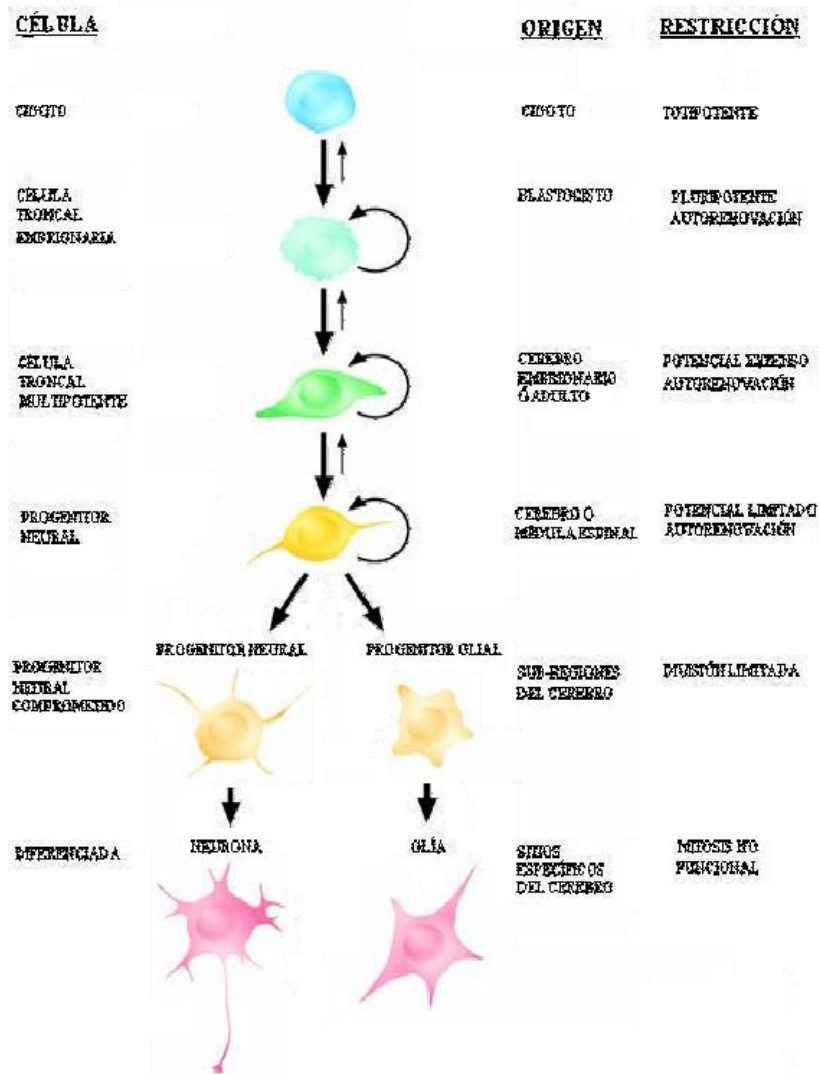


Fig. 4. Potencial de las células troncales con destino Neural. Esquematación de la restricción celular en el linaje neural, desde el cigoto hasta células ya diferenciadas. (Tomada de Gage, 2000).

Para que las CTN se puedan diferenciar adecuadamente es necesaria la participación de ciertas moléculas de señalización que promueven la proliferación y la diferenciación *in vivo* e *in vitro*. En particular el factor de crecimiento fibroblástico (por sus siglas en Inglés, FGF) 2 y el factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en Inglés, EGF) son factores mitogénicos para las CNT. Hay otras moléculas involucradas como: el ácido retinoico (AR) involucrado en la diferenciación neuronal, las proteínas morfogenéticas de hueso (por sus siglas en Inglés, BMPs) en la diferenciación neuronal y glial, el factor neurotrófico ciliar (por sus siglas en Inglés, CNTF) en la diferenciación

astrocítica y Notch que participa en la inhibición de la diferenciación neuronal. Más adelante se abundará en la función de cada morfógeno y factores transcripcionales.

Además de las señales morfogénicas, en la neurogénesis se requiere de la participación de diferentes factores transcripcionales, incluyendo la familia que contiene un dominio básico seguido de un motivo hélice-asa-hélice (bHLH), los cuales se han clasificado en: 1) los factores proneurales como las Neurogeninas y Mash1 involucrados en la neurogénesis inicial y 2) los factores de diferenciación neuronal (NeuroD) involucrados en la diferenciación terminal (Lo *et al.*, 1997; Bertrand *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2003).

En el sistema nervioso adulto se ha demostrado la presencia de CTN en zonas como: la zona sub-granular (ZSG) del hipocampo y en la zona sub-ventricular (ZSV; Gage, 2000; Álvarez-Buylla *et al.*, 2001). Estas células ya están más comprometidas a producir linajes neurales específicos *in vivo*. Se ha propuesto que en estas regiones que contienen CTN existen nichos que se parecen al ambiente embrionario que permiten el mantenimiento de CTN en el adulto (Álvarez-Buylla y Lim, 2004).

### **3. Moléculas involucradas en la diferenciación del SN**

El FGF2 y el EGF han sido identificados como factores que son requeridos para la proliferación de las células troncales neurales *in vitro*, además de que las bajas concentraciones de FGFs inducen neurogénesis (Vacarino *et al.*, 1999) y que el EGF diferencia las células en astrositos (Reynolds *et al.*, 1992).

Una molécula derivada de la vitamina A que está estrechamente involucrada en el proceso de desarrollo neural, es el AR implicado en la formación de los diferentes tipos celulares en los ejes antero-posterior y dorso-ventral, por el control de la expresión de cientos de genes (Maden 2002).

Cuando se sometió a embriones de codornices a una deficiencia total de retinoides, el cerebro posterior y mielencéfalo mostraron malformaciones. Mientras que el tratamiento con AR de embriones de *Xenopus* en estado de néurula causa una reducción en los tejidos del cerebro anterior y cerebro medio, y la exposición en las regiones posteriores se presenta una marcada expansión, esto nos lleva a la conclusión que el efecto del AR es conferir un carácter posterior al tejido neural, por lo que el requerimiento de retinoides en el desarrollo del cerebro es crucial (Maden 2002).

El AR induce la expresión de NeuroM, un marcador temprano de la diferenciación neural. En el modelo de codornices a los cuales se les sometió a una deficiencia total de retinoides, se observa una reducción en el número de neuronas y en la expresión de genes neurogénicos como Delta1, Ngn1 y 2. La ausencia del AR también disminuye la expresión de los marcadores ventrales de la ME como Pax6, Irx3, Dbx1 y Dbx2 teniendo como resultado la desaparición de neuronas ventrales, incluyendo las neuronas motoras (Wilson y Maden 2005).

Las BMPs son proteínas secretadas que interactúan con receptores específicos. Los efectos de las BMPs sobre las CTN son diversos debido a la diferencia en los protocolos de aislamiento de células, edad de los embriones y las diferentes especies de roedores que se han utilizado (Gajavelli *et al.*, 2004). Se sabe que en los días embrionarios (E) E12 - E13 en la zona ventricular de ratón hay diferenciación neuronal, mientras que en estados tardíos la diferenciación se dirige hacia astrocitos. En cultivos de CTN de ratón de E14 se ha observado que las BMPs actúan sinérgicamente con CNTF promoviendo una diferenciación astrocítica, mientras que en el día E14 de rata, las BMPs causan dorsalización de las CTN ya que al diferenciarse dan lugar a una gran variedad de linajes en la cresta neural, a glía periférica e incluso hacia músculo liso, pero no astrocitos (Gajavelli *et al.*, 2004).

El CNTF fue identificado como un factor soluble que ayuda a la supervivencia de neuronas ciliares de ganglios parasimpáticos de pollo y en ciertas poblaciones de neuronas en el SNC (Oppenheim et al., 1991). El tratamiento de pollos *in ovo* con CNTF en los días embrionarios E6 - E9 rescata una parte de las neuronas que normalmente mueren. En ratones, la administración *in vivo* de CNTF incrementa la supervivencia en una fracción de neuronas motoras y no tiene ningún efecto sobre el crecimiento y la diferenciación de estas neuronas (Houenou et al., 1994).

Se conoce que el CNTF es sintetizado en astrocitos, además de que promueve la supervivencia y la maduración de cultivos de oligodendrocitos, estimulando la proliferación y la diferenciación de células progenitoras O-2A. La diferenciación de los oligodendrocitos ocurre constitutivamente mientras que los astrocitos de tipo 2 requieren de señales extracelulares para la diferenciación (Louis et al., 1993). En ratones, la sobre-expresión de CNTF altera el número de oligodendrocitos, sugiriendo que CNTF puede jugar un papel en la diferenciación a oligodendrocitos (Henderson et al., 1994).

Notch es una proteína transmembranal que es activada por los ligandos Delta y Jagged, los cuales son también proteínas transmembranales expresadas por células vecinas. La activación de Notch permite la liberación del dominio intracelular, el cual es transferido al núcleo y forma un complejo con la proteína RBP-J que se asocia al DNA (Gaiano *et al.*, 2000; Kageyama *et al.*, 2005). RBP-J es un regulador de la transcripción que reprime la expresión de Hes1 y 5 por unión al promotor de estos factores y cuando RBP-J forma un complejo con el dominio intracelular de Notch, este complejo activa la transcripción e induce la expresión de Hes1 y Hes5, indicando que éstos actúan como efectores esenciales de la señalización activada por Notch. Los genes Hes son

expresados por las células troncales neurales e inhiben la diferenciación neuronal y mantienen el estado de glía radial (Kageyama *et al.*, 2005).

#### 4. Familia de proteínas Hélice Asa Hélice con región básica (bHLH)

Existe una gran variedad de proteínas que promueven o reprimen la transcripción génica. Las proteínas pueden unir al DNA en secuencias consenso. Estos sitios de reconocimiento tienen una alta afinidad por algunas proteínas y la interacción requiere de una cierta conformación para que se forme el complejo y se lleve a cabo el cambio estructural del DNA que permitirá la transcripción (Acosta-Viana y Zavala-Castro, 1996).

Un tipo de proteínas que interacciona con el DNA son las proteínas bHLH. Su estructura de unión al DNA está formada por dos  $\alpha$ -hélices, las cuales constan de 30-40 residuos de aminoácidos y están unidas por un asa. También contienen una región básica que es rica en arginina y lisina que consta de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos y es la responsable de unirse al surco mayor del DNA (Pabo y Sauer, 1992; Massari y Murre, 2000). El dominio HLH promueve la dimerización entre proteínas iguales o entre diferentes miembros de la familia para la formación de homodímeros o heterodímeros respectivamente (Ledent *et al.*, 2002).

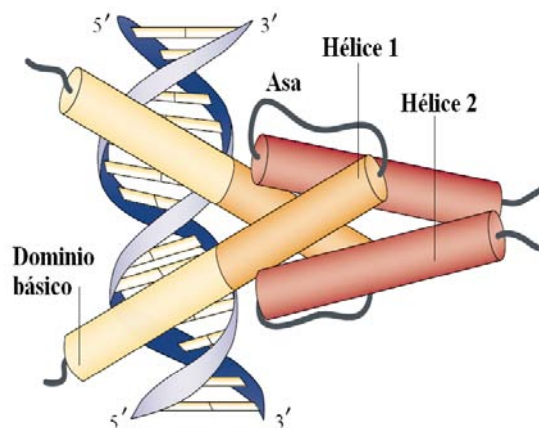


Fig. 5. Conformación de un dímero de una proteína bHLH y su interacción con el DNA. Solamente se señalan los motivos estructurales de una subunidad. Tomada de Bertrand *et al.*, 2002.

Todos los factores de la familia bHLH comparten un 80% de identidad en el dominio HLH y sus miembros se caracterizan por la presencia de un dominio básico adyacente (Fisher *et al.*, 1992). La región básica y la hélice 1 del dominio bHLH forman una larga  $\alpha$  hélice que está conectada por la región del asa a la hélice 2 (Fig. 5; Bertrand *et al.*, 2002).

El dominio básico de estas proteínas controla la unión a la secuencia consenso del DNA, la cual contiene seis nucleótidos: citosina, adenina, nucleótido, nucleótido, timina y guanina (CANNTG) y es conocida como la caja E (E-box; Bertrand *et al.*, 2002), y funciona como una secuencia de reconocimiento en los promotores y potenciadores de ciertos genes (Acosta-Viana y Zavala-Castro, 1996).

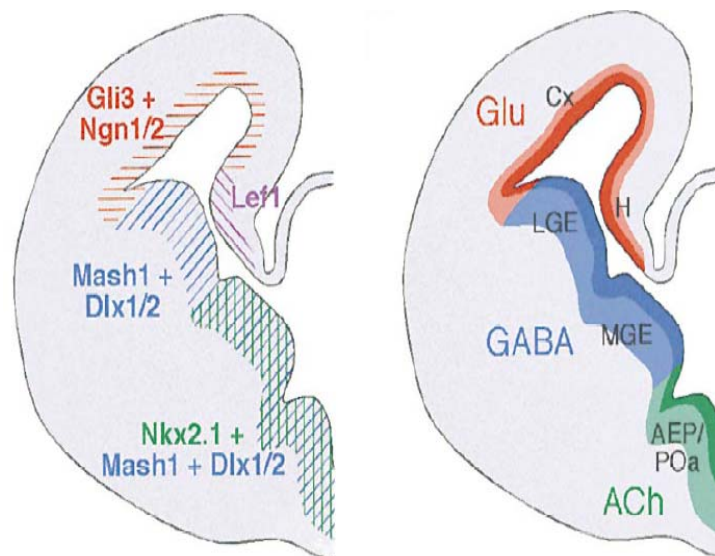
Para que ocurra la transcripción, es necesaria la interacción de heterodímeros y coactivadores, este proceso es llamado transactivación. En el caso de las bHLH, los coactivadores p300/CBP y PCAF favorecen la acetilación de histonas, facilitando que se desenrolle el DNA en una estructura más accesible para la maquinaria de la transcripción (Bertrand *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2003).

Las proteínas bHLH se encuentran en una gran diversidad de organismos desde las levaduras hasta los humanos. En los mamíferos en etapas críticas del desarrollo juegan un papel importante en la determinación del destino celular de diferentes linajes en los tejidos como los musculares, hematopoyéticos y formando parte integral de algunos procesos como la neurogénesis (Weintraub, 1993; Jan y Jan, 1994; Guillemot, 1995; Ledent *et al.*, 2002; Talikka *et al.*, 2002; Mizuseki *et al.*, 2003; Hjalt, 2004; Jones, 2004).

Dentro de las particularidades que presentan las proteínas bHLH, están: 1) Todas las proteínas bHLH tienen una alta afinidad por las proteínas E (E2A, E12 y E47). 2) La familia de los factores bHLH proneurales conservan nueve de los 10 residuos de

contacto con el DNA y éstas se unen a las bases conservadas de la caja E. 3) La especificidad de la unión de cada proteína bHLH, las hace actuar de manera diferente en cada proceso involucrado. 4) El dímero de bHLH está basado en interacciones entre las dos hélices de cada proteína, para formar un conjunto de 4 hélices, según lo muestra la estructura cristalina del dominio bHLH de MyoD, Max y E47. (Bertrand *et al.*, 2002).

Se conocen hasta el momento tres factores bHLH proneurales: Mash1 (del Inglés, *mammalian homolog of the Drosophila proneural genes achaete-scute 1*), Ngn1 y Ngn2 (Lo *et al.*, 1991; Guillemot y Joyner, 1993; Guillemot *et al.*, 1993; Anderson, *et al.* 1997; Sommer *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1999; Wilson y Rubenstein, 2000; Jones, 2004), éstos factores forman heterodímeros con E47, que se expresan en diferentes regiones del telencéfalo (Fig. 6; Kageyama *et al.*, 2005).



**Fig. 6. Esquema de expresión de factores transcripcionales en el telencéfalo del lado izquierdo y los fenotipos de neuronas que generan en distintas regiones cerebrales (derecha), hemisferio derecho del telencéfalo durante el desarrollo en el ratón (E14).** La localización de los factores proneurales: Ngn1, Ngn2 y Mash1 muestran el patrón de diferenciación neuronal para cada gen proneural. Gli3: Del Inglés *Glioblastoma 3*. Ngn 1/2: Neurogenina 1 y 2. Mash1: Homologo de *achaete scute* en mamíferos 1. Dlx1/2: del Inglés *distal-less homeobox 1 y 2*. Nkx2.1: también llamado *thyroid transcription factor 1*. Lef1: Factor de unión al potenciador de linfoides 1. Glu: Glutamato. GABA: Ácido gama-amino-butírico. ACh: Acetilcolina. Cx: Corteza. LGE: Elevaciones gangliónicas laterales. MGE: Elevaciones gangliónicas mediales. AEP: Área entopeduncular anterior. POa: Área preóptica anterior. H: Hipocampo. Tomada de Wilson y Rubenstein, 2000.

Durante las etapas tempranas del desarrollo, estas proteínas proneurales están en niveles bajos. Los progenitores neurales incrementan la expresión de estos factores promoviendo la neurogénesis e inhibiendo la gliogénesis, contribuyendo a la salida del

ciclo inhibiendo directamente a cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) y en algunos casos especifican el subtipo neuronal (Bertrand *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2003; Kageyama *et al.*, 2005).

En el desarrollo del telencéfalo en la parte ventral (subpallium) y dorsal (pallium), la localización de los factores proneurales Ngn1, Ngn2 y Mash1, así como el patrón de diferenciación neuronal se muestra en la figura 6. En mamíferos, el subpallium consistirá en las elevaciones gangliónicas medias (MGE del Inglés, *Medial ganglionic eminence*) y las elevaciones gangliónicas laterales (LGE del Inglés, *Lateral ganglionic eminence*) que después formarán el estriado y el globo pálido, los cuales son componentes de los ganglios basales y el *pallium* dará lugar a la corteza cerebral (Wilson y Rubenstein, 2000). La expresión de Ngn1 y 2 en el telencéfalo dorsal permiten la diferenciación hacia neuronas glutamatérgicas, mientras que Mash1 es predominantemente expresado en el telencéfalo ventral, jugando un papel importante en la generación de neuronas gabaérgicas y colinérgicas (Fig. 6; Wilson y Rubenstein, 2000; Watanabe *et al.*, 2005).

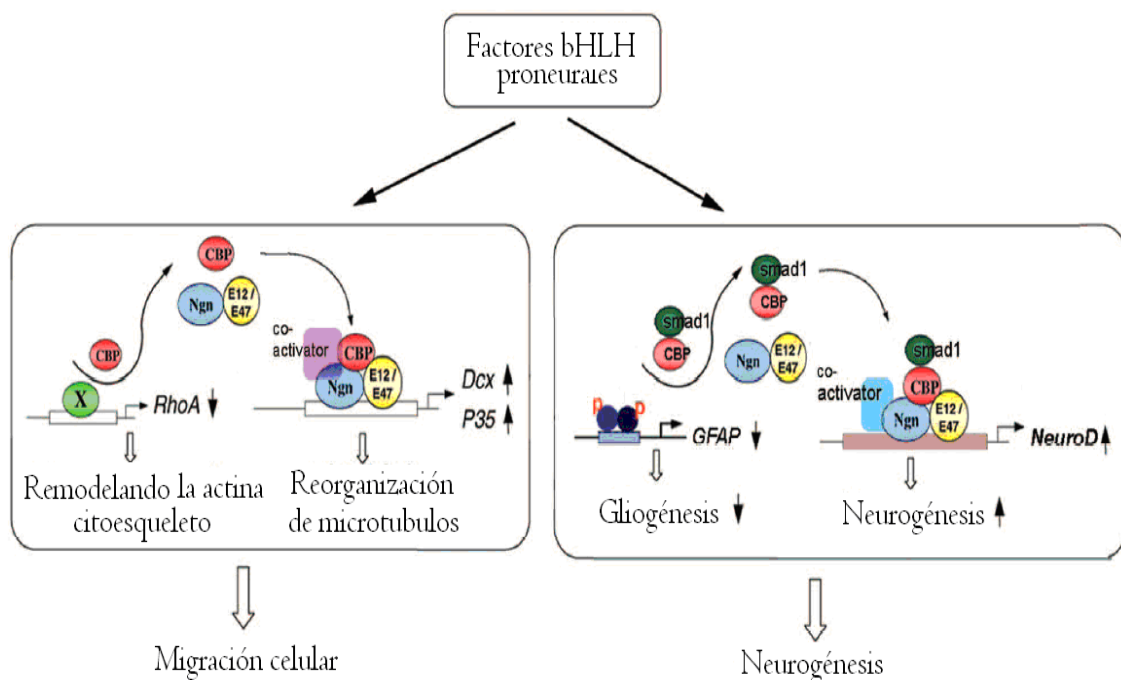
#### **4.1. Familia de proteínas de las Neurogeninas**

Esta familia la componen tres proteínas: Ngn1, Ngn2 y Ngn3, las cuales tienen diferencias importantes en el patrón de expresión. Las Ngns 1 y 2 muestran heterogeneidad en la expresión en los diversos precursores del SNC y SNP. Se expresan fuertemente en la zona ventricular (ZV) del tubo neural ventral y en un área limitada del tubo neural dorsal, cerca de la placa del techo neural (Sommer *et al.*, 1996). Además, Ngn1 se expresa en una parte lateral de la ZV y Ngn2 en la parte lateral y en la medial de la ZV. Por otro lado, el RNA mensajero que codifica para la Ngn3 se expresa



fuertemente en una región restringida de la ME, justo en la parte dorsal de la placa del piso neural (Sommer *et al.*, 1996).

En el neuroepitelio cortical del cerebro, el RNA mensajero de Ngn2 se ha detectado en altos niveles y el de Ngn1 en muy bajos niveles. Una expresión similar se presenta en una región del diencefalo (Sommer *et al.*, 1996). Existe una relación entre la expresión de NeuroD y las Ngns, que siguen el mismo patrón de expresión (Sommer *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1996).



**Fig. 7. Papel de factores proneurales en la migración y diferenciación Neuronal.** Modelo en el cual se ve la interacción de Ngn uniéndose a diferentes moléculas como coactivadores (CBP, del inglés CREB binding protein) y proteínas E que llevan a la remodelación de actina o microtubulos que desencadenaran la migración de las células o promoviendo diferenciación neuronal uniéndose a coactivadores y a Smad1. Tomada de Ge et al. 2006.

En estudios recientes se reporta que los factores Ngn1 y Ngn2, están involucrados en la diferenciación neuronal y en la migración, donde regula a la baja a *RhoA* (del Inglés, Ras homolog gene family, miembro A), una pequeña proteína GTPasa conocida por regular la actina del citoesqueleto en la formación de fibras de estrés y promueve la regulación de p35 (proteína nuclear de 53 KDa) que es esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del DNA controlando el ciclo celular

además de doblecortina (Dcx, del Inglés double cortin) llevando a la remodelación de actina y microtubulos del citoesqueleto, preparando las células para la migración (Fig. 7). Se propone que este proceso participa en la redistribución de coactivadores como CBP, que coordina la activación y el silenciamiento de genes (Ge et al. 2006).

#### **4.1.1. Neurogenina 1**

La identificación del gen de *Ngn1* se logró al seleccionar secuencias conservadas de *Mash1* y *NeuroD*, con las que se diseñaron los oligonucleótidos utilizados en la obtención de cDNA por la técnica de RT-PCR (del Inglés, *reverse transcription-polymerase chain reaction*), a partir de muestras de ganglios de la raíz dorsal (GRD) de fetos de rata E13.5 (Ma et al., 1996).

Los productos derivados del RT-PCR revelaron un nuevo cDNA de 1.7 kb, el cual codifica para una proteína de 244 residuos de aminoácidos. La Neurogenina 1 muestra un 67% de similitud con NeuroD y está relacionada con otros miembros de la familia bHLH (Ma et al., 1996).

Existe un cDNA en *Xenopus* que muestra un gran parecido con la *Ngn1* murina, por lo que este cDNA fue llamado *gen relacionado con Ngn1 de Xenopus (X-ngnr-1)*, el cual codifica para un polipéptido de 215 aminoácidos con un 82% de identidad con la secuencia de *Ngn1* de la rata en el dominio bHLH. Algunos experimentos indicaron que al micro-inyectar el RNA mensajero de *Ngn1* en embriones de *Xenopus* se promueve la neurogénesis (Ma et al., 1996).

Ahora se sabe que durante la neurogénesis, la *Ngn1* es expresada en los ganglios craneales y ganglios sensoriales espinales, en las regiones dorsales y ventrales de la médula espinal, en el epitelio olfatorio, el telencéfalo dorsal y en regiones específicas en el cerebro medio y anterior (Sommer et al., 1996; Ma et al., 1996,1997; Lee, 1997; Cau et al., 2002; Nakada et al., 2004). La expresión de *Ngn1* y de otros genes está regulada

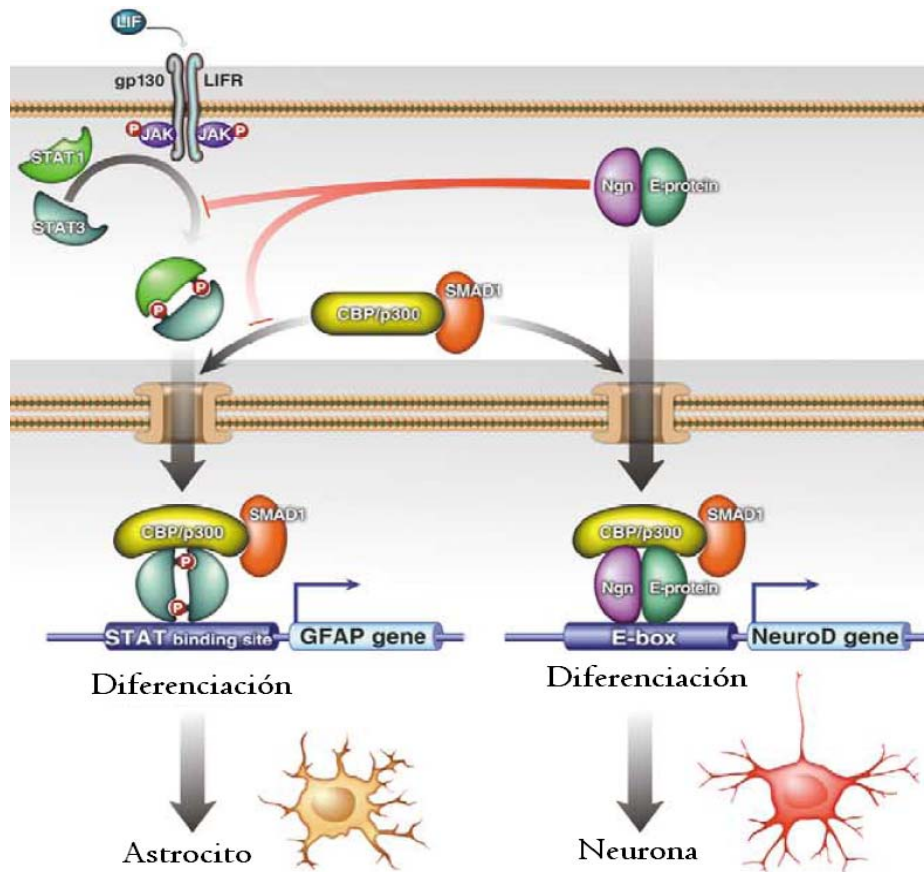
durante el desarrollo, por lo que se piensa que estos genes participan en los mecanismos moleculares involucrados en la generación del número correcto y el tipo de neuronas que se tendrán después del nacimiento y en el adulto (Nakada *et al.*, 2004).

Ngn1, Ngn2 y Mash1 tienen secuencias consenso que corresponden a sitios de fosforilación por GSK3 (del Inglés, *Glycogen Synthase Kinase 3*), sugiriendo que esto puede representar un mecanismo común para regular la actividad de estos factores bHLH (Moore *et al.*, 2002; Jones, 2004).

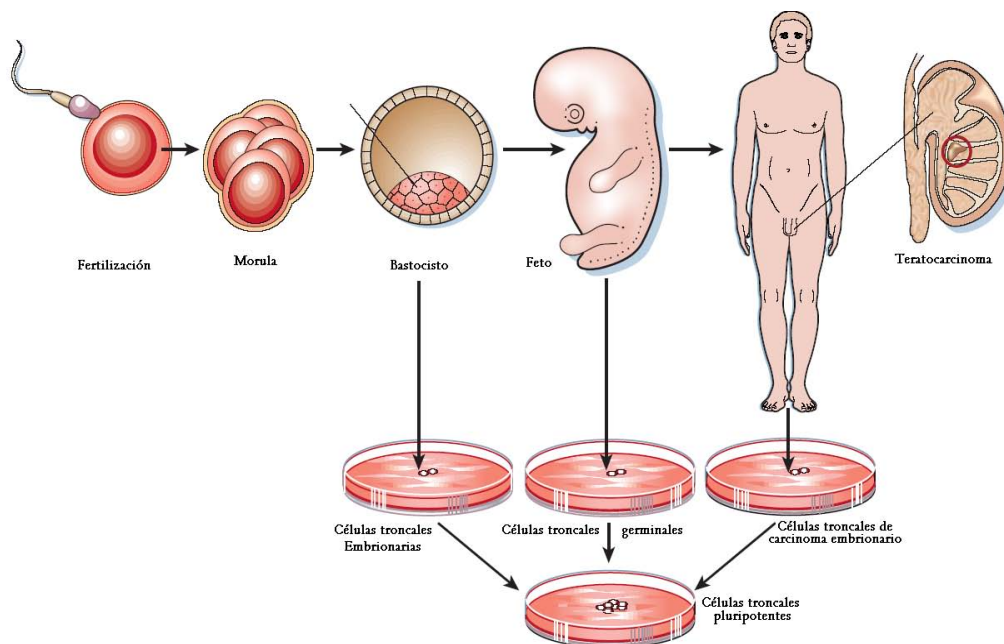
La Ngn1 induce diferenciación neuronal en células progenitoras de la corteza cerebral (Sun *et al.*, 2001), en células de carcinoma embrionario (Farah *et al.*, 2000) y en el tubo neural de pollo, de *Xenopus* y del pez cebra (Ma *et al.*, 1996; Gowan *et al.*, 2001). Además de inducir la diferenciación neuronal, Ngn1 participa en la determinación del subtipo neuronal en el sistema nervioso periférico y en el tubo neural dorsal (Pérez *et al.*, 1999; Gowan *et al.*, 2001).

Además de Ngn1, la Ngn2 es requerida durante diferentes fases de la neurogénesis, en particular en la generación de diferentes tipos de neuronas sensoriales. Durante la etapa temprana (E12) se necesita de Ngn2 y cuando su expresión disminuye se da entonces la aparición de Ngn1. La Ngn1 se requiere exclusivamente durante la fase tardía del desarrollo de los GRD, lo cual fue demostrado mediante el estudio de dobles mutantes para estos dos factores de transcripción, en donde se observó la ausencia de ganglios (Moore *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 1999).

En precursores neurales la diferenciación glial es regulada por STAT1/3 y Smad1 (Fig. 8), formando complejo que se une con el coactivador p300 e induciendo la expresión de la proteína glial fibrilar ácida (por sus siglas en inglés, GFAP). En presencia de la Ngn1, ésta secuestra al complejo p300-Smad1 de los promotores gliales



**Fig. 8. Acción de neurogenina 1 en precursores neurales.** Se ha propuesto que Ngn1 actúa uniéndose a una proteína E (E47), así se transloca al núcleo y forma un complejo con CBP/p300/ Smad1 para promover la diferenciación neuronal. Tomada de Hsieh y Gage. 2004.



**Fig. 9. Obtención de las diferentes células troncales pluripotentes ES, EG, EC, para su posterior estudio *in vitro*.** Tomada de Donovan y Gearhart, 2001.

inhibiendo la diferenciación glial e induciendo la diferenciación neuronal (Sun *et al.*, 2001; Kageyama *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2005).

Otros estudios muestran una interacción entre *Brg1*, *Ngn1* y *NeuroD*, los cuales juegan un papel esencial en la neurogénesis de vertebrados como *Xenopus*, ya que las células que tienen bloqueado el gen de *Brg1* muestran una pérdida significativa de la diferenciación neuronal (Seo *et al.*, 2005). Sin embargo, aun se estudia a profundidad este mecanismo.

## **5. Células troncales embrionarias**

Las células troncales pluripotentes han sido objeto de diversos estudios *in vitro*, utilizando factores de crecimiento y técnicas de marcaje para su posterior selección, con la finalidad de obtener la diferenciación de un linaje específico (Czyz y Wobus, 2001).

Hasta el momento se han aislado tres tipos de CT pluripotentes (Fig. 9): las células troncales embrionarias (ES), las células troncales del carcinoma embrionario (EC) y las células troncales germinales embrionarias (EG).

En particular nos enfocaremos a las ES, estas células han sido usadas como un modelo experimental para analizar eventos de diferenciación temprana (Czyz y Wobus, 2001). Cuando son cultivadas bajo condiciones apropiadas, se pueden diferenciar en células cardíacas, hematopoyéticas, musculares, epiteliales, adipocitos, condrocitos (Czyz y Wobus, 2001) y células neurales (Bain *et al.*, 1995; Okabe *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 2000).

Las células ES son derivadas de la masa celular interna de blastocistos (Fig. 9; Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981; Brook y Gardner, 1997) y crecen en colonias multicelulares con la capacidad de autorenovarse y diferenciarse en células de las tres capas embrionarias (Martin, 1981; Weissman, 2000a, b; Czyz y Wobus, 2001; Donovan

y Gearhart, 2001; Weissman, 2002). El mantenimiento del estado indiferenciado se favorece en presencia de la citocina LIF (del Inglés, *leukemia inhibitory factor*), la cual activa una vía de señalización que promueve la autorenovación de las células ES de ratón (Rossant, 2001). El LIF inhibe la diferenciación y mantiene la alta proliferación en cultivos *in vitro*.

LIF se une a un complejo receptor de dos partes que consiste del receptor a LIF y a la proteína gp130. La unión del ligando al receptor dispara la activación del factor de transcripción STAT3, a través de la vía de señalización JAK/STAT. En más detalle, la unión del ligando, LIF en este caso, activa a las cinasas llamadas JAKs (Janus kinases) acopladas a ciertos dominios citoplasmáticos del receptor. Las JAKs se autofosforilan y esto permite la fosforilación de los propios receptores en varios sitios. Al fosforilarse los receptores se permite la fosforilación de STAT3 causando su activación, dimerización y translocación al núcleo donde actúa como factor de transcripción (Kristensen *et al.*, 2005). Otra forma de mantener las células ES en estado indiferenciado es cultivarlas sobre una monocapa de fibroblastos los cuales han sido inactivados mitóticamente, que actúa secretando a la citocina LIF.

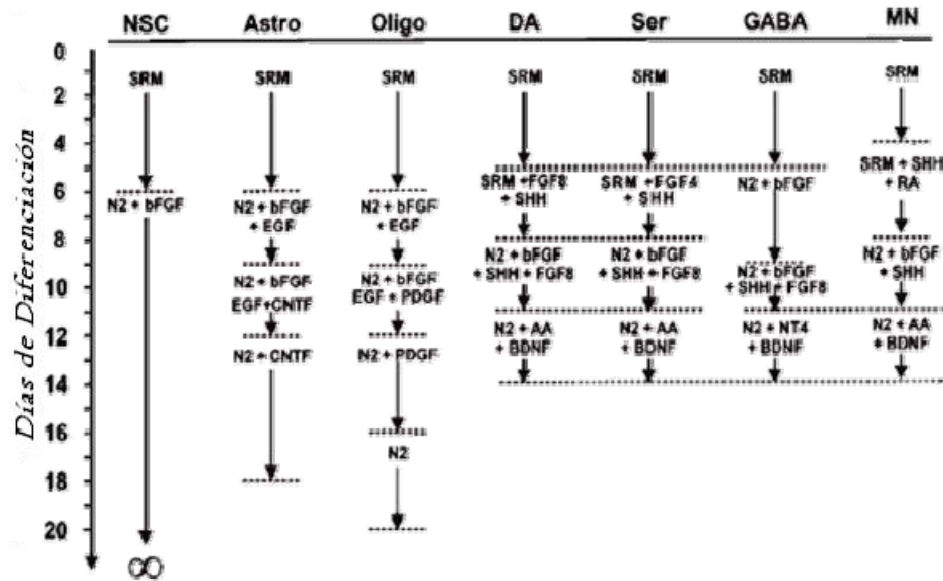
Las células ES se caracterizan por la expresión de marcadores específicos, como los antígenos de superficie SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 (del Inglés, *state-specific embryonic antigens*), los antígenos de reconocimiento tumoral (del Inglés, *tumor recognition antigen*) TRA-1-60 y TRA-1-81, de los factores transcripcionales Oct-4 y Nanog (Chambers *et al.*, 2003), por la fosfatasa alcalina (FA), y por su alta actividad de telomerasa (Thomson *et al.*, 1998; Thomson y Marshall, 1998; Thomson y Odorico, 2000; Donovan y Gearhart, 2001).

Otras características importantes que presentan estas células son: el crecimiento como colonias compactas y su cariotipo normal (Shamblott *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 1998; Thomson y Odorico, 2000; Kim *et al.*, 2002).

## **6. Diferenciación neural de células troncales embrionarias**

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que las células troncales embrionarias sembradas sobre una monocapa de células estromales son capaces de generar diversos linajes celulares del sistema nervioso, y que cuando son tratadas con diferentes factores de crecimiento pueden generar colonias de células precursoras neurales, las cuales son inmunoreactivas para marcadores de precursores neurales como nestina, moléculas de adhesión celular neural (NCAMs) y Musashi. La exposición temprana de señales de morfógenos como el *Sonic Hedgehog* (Shh) promueve la diferenciación de precursores ventrales como: oligodendrocitos y motoneuronas (Panchision y McKay, 2002; Yeo y Gautier, 2004).

En cuanto a la diferenciación neuronal de las células ES de ratón, se sabe que sustancias como el AR (Bain *et al.*, 1995), factores de crecimiento fibroblástico (FGF) 4, FGF8 ó bFGF promueven el enriquecimiento de neuronas colinérgicas, serotoninérgicas, dopaminérgicas y gabaérgicas (Barberi *et al.*, 2003).



**Fig. 10. Obtención de diferentes linajes neurales al diferenciar células ES.** NSC: Células troncales neurales (del Inglés, neural stem cells). Astro: Astrocitos. Oligo: Oligodendrocitos. DA: Neuronas dopaminérgicas. Ser: Neuronas serotoninérgicas. GABA: Neuronas gabaérgicas. MN: Neuronas Motoras. SRM: Medio con reemplazo de suero. N2: Medio N2. bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico. EGF: Factor de crecimiento epidermal. CNTF: Factor neurotrófico ciliar. PDGF: Factor derivado de plaquetas. SHH: Sonic Hedgehog. AA: Ácido ascórbico. BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro. NT4: Neurotrofina 4. RA: Ácido retinoico. Tomada de Barberi *et al.*, 2003.

La figura 10 muestra las diferentes condiciones para la obtención de los diferentes linajes neurales tanto en el tiempo como en los tratamientos que se combinaron con la actividad inductora derivada de células estromales (Kawasaki *et al.*, 2000; Barberi *et al.*, 2003).

Estudios recientes han demostrado que las células ES de primate y de ratón tratadas con la proteína morfogénica de hueso (BMP) 4 se diferencian hacia células de la cresta neural, y en particular se promueve la diferenciación hacia neuronas autónomas a concentraciones altas de BMPs, mientras que una baja concentración induce la formación de neuronas sensoriales.

Además, se ha observado que el Shh induce la diferenciación de células de la placa del piso y el crecimiento axonal, promoviendo así la diferenciación a células con características del sistema nervioso central (SNC) ventral y suprimiendo los fenotipos dorsales (Mizuseki *et al.*, 2003).



## ANTECEDENTES

El tratamiento con AR en células pluripotentes P19 induce la expresión de numerosos genes bHLH incluyendo Mash1 y NeuroD2/NDRF (Farah *et al.*, 2000), diferenciando estas células en neuronas y glía (Bain *et al.*, 1995). El patrón de expresión de Mash1 en células P19 durante la diferenciación neuronal es similar al observado *in vivo*. Sin embargo, la expresión forzada de Mash1 no es suficiente para inducir la diferenciación neuronal (McCormick *et al.*, 1996).

En el estudio realizado por Kanda y colaboradores se utilizaron células ES donde se hicieron co-transfecciones con Mash1 y NeuroD2. Se midió la proporción de las células positivas para TUJ1 (marcador de neuronas jóvenes), en células transfectadas con Mash1, el porcentaje de expresión fue del 51.1 % y en las células transfectadas con NeuroD2 fue del 38.5 % a los 12 días de diferenciación. Esta proporción incrementó cuando las células ES se dejaron 5 días más para su diferenciación y el porcentaje fue del 77.3% de las células transfectadas con Mash1 y el 57.5% de las transfectadas con NeuroD2. La adición del cofactor E12 no se requirió en este estudio, sugiriendo que las cantidades de la proteína E12 endógena en células ES fueron suficientes para la formación de los complejos con la sobre-expresión de NeuroD2 o Mash1 (Kanda *et al.* 2004).

En otro estudio se determinó el efecto del AR sobre la cascada de factores bHLH incluyendo Ngn1 y NeuroD durante la diferenciación neuronal en células P19, donde la expresión de Ngn1 fue suficiente para inducir la diferenciación neuronal medida por el marcador de neuronas jóvenes TUJ-1. Sin embargo la presencia de ambos (Ngn1 y AR) aumenta el número de células positivas para TUJ-1 (Kim *et al.*, 2004).

## JUSTIFICACIÓN

Estamos interesados en conocer si Ngn 1 puede promover la diferenciación de células ES hacia derivados neuronales, como se reportado con las células P19 ((Farah *et al.*, 2000; McCormick *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2004), utilizando dos protocolos que se sabe promueven la diferenciación neuronal. El primero es el protocolo de diferenciación con AR (Bain *et al.*, 1995) y el segundo protocolo involucra el co-cultivo con células estromales PA6 (Barberi *et al.*, 2003). Si esta estrategia resulta exitosa, se podría aplicar en la diferenciación de células ES hacia fenotipos específicos de linaje neuronal.

## HIPÓTESIS

La expresión de Ngn1 facilitará la diferenciación neuronal *in vitro*, en células pluripotentes ES de ratón.

## OBJETIVO GENERAL

Encontrar condiciones en las que la sobre-expresión de Ngn1 resulte en una diferenciación neuronal eficiente a partir de células troncales pluripotentes.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecimiento de las líneas celulares que expresan el transgen de Ngn1
2. Diferenciación neuronal de células que sobre-expresen Ngn1 por el protocolo de AR y por el protocolo de células estromales PA6.
3. Estudiar qué tipo(s) neuronal(es) se genera al sobre-expresar Ngn1, mediante marcadores como enzimas biosintéticas de neurotransmisores o moléculas acarreadoras de neurotransmisores.

## METODOLOGÍA

### 1) Extracción de DNA plasmídico por el estuche de *QIAGEN (Miniprep)*

Se transfectaron bacterias competentes con el plásmido que contenía a Ngn 1. De las colonias resultantes se hizo una selección con el antibiótico ampicilina, se escogieron las colonias que estaban aisladas y después se recuperaron en tubos de 50 ml que contenían 5 ml de medio LB y antibiótico (ampicilina, 50 µg/ml) para su posterior crecimiento.

Se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante de 250 rpm y a la mañana siguiente se agregó un mililitro de suspensión celular en un tubo de 1.5 ml, posteriormente se centrifugó 5 minutos a 13 200 rpm para obtener una pastilla de células, se retiró el sobrenadante y posteriormente se agregó 250 µl de amortiguador P1 o de resuspensión (para composición véase el Apéndice II) el cual contiene RNasa que ayuda a eliminar al RNA evitando la contaminación del DNA, se resuspendió el botón de bacterias por agitación con un *vórtex* para resuspender las células, después se agregaron 250 µl de amortiguador P2 (Apéndice II) en el que se lleva a cabo la lisis, ya que contiene detergentes que degradan la membrana celular permitiendo que se libere el DNA, se agitó por inversión, se adicionaron 350 µl de amortiguador N3 (Apéndice II) para neutralizar la solución, se invirtió el tubo y se centrifugó por 10 minutos a 13 200 rpm. Posteriormente se transfirieron 750 µl del sobrenadante, el cual posee el DNA plasmídico, a una columna *QIAprep*, se centrifugó 1 minuto a 13 000 rpm. Con este paso se aseguró que el DNA se quedó adherido por carga a la membrana.

Posteriormente se desechó el eluido, se lavó la columna con 500 µl de amortiguador PB (Apéndice II) mediante centrifugación durante 1 minuto a 13 000 rpm para eliminar las nucleasas, después se descarta el sobrenadante.

Se lavó nuevamente la columna por centrifugación se adicionó 750 µl de amortiguador PE (Apéndice II) que contiene etanol con el cual se removieron completamente las sales adheridas al DNA, se centrifugó 1 minuto y se desechó el eluido, a continuación se centrifugó un minuto más a 13 000 rpm, para asegurar la eliminación del líquido restante de la columna.

La columna se colocó en un tubo de 1.5 ml limpio y para eluir el DNA se utilizaron 15 µl de agua desionizada (*MilliQ*) y se centrifugó por 1 minuto a 13 000 rpm, lo cual permitió que el DNA que se adhirió a la membrana se despegará. Posteriormente se añadieron 15 µl de agua *MilliQ* y se centrifugó 1 minuto a 13 000 rpm, con el objetivo de que todo el DNA unido a la columna se eluyera. El DNA se almacenó a – 20° C hasta que se usó.

Con la finalidad de conocer la pureza y la concentración del DNA, se añadió a un tubo estéril 1 µl de la solución con DNA, se le agregaron 59 µl de agua *MilliQ* y se mezcló. La muestra se colocó en celdas de cuarzo para medir la absorbancia a  $\lambda 260$  nm y  $\lambda 280$  nm en un espectrofotómetro *Beckman DU\_600*.

La cuantificación del DNA (en luz UV del espectrofotómetro) se obtuvo mediante la siguiente fórmula: densidad óptica a  $\lambda 260$  x Factor de dilución x 50 µg/ml =X µg/ml. El grado de pureza se calculó con la siguiente fórmula: densidad óptica  $\lambda 260$  /  $\lambda 280$  =Y (si este valor oscila entre 1.5 – 1.9, el DNA obtenido se encuentra libre de contaminantes celulares, mientras que valores por debajo de 1.5, indican contaminación con proteínas).

## **2) Electroforesis en geles de agarosa**

Los geles de agarosa se prepararon con bromuro de etidio (BrEt, [0.16 µg/ml]), los porcentajes de la agarosa fueron 1% para fragmentos de 1000pb en adelante y al 2%

para los productos de la PCR (por sus siglas del Inglés, Polymerase Chain Reaction), estos porcentajes permiten observar con mayor claridad los diferentes tamaños de los plásmidos que se obtendrán al digerir los plásmidos con las endonucleasas y los productos de la PCR. Los geles se colocaron dentro de una cámara de electroforesis con amortiguador TBE 1X (ver Apéndice II). Para correr las muestras se usó el amortiguador de corrida de DNA 5X (*Quality Biological Inc.* 351-028-031) y los marcadores *2-Log DNA Ladder* (*New England Biolabs*, N3200S) y *MassRuler™ DNA Ladders* (*Fermentas*, SM0393). Una vez que se colocaron las muestras, se corrió el gel por 30 minutos a 50 Volts, y posteriormente se analizó el DNA mediante luz ultravioleta en un transiluminador y finalmente se realizó el registro fotográfico.

### **3) Secuenciación**

La secuenciación del DNA se realizó por el método automático, donde las diferentes bases están marcadas con diferentes moléculas fluorescentes. Este sistema permite leer las nuevas cadenas de DNA al mismo tiempo que se van sintetizando en cada una de las mezclas. Con el empleo de los nuevos y diferentes fluorocromos se pueden combinar entre si y el resultado de las cuatro reacciones se coloca en un mismo carril del gel en donde el color de la banda corresponde al dideoxinucleótido 3'-terminal, el sistema de localización de cada par de base se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, de manera que se observan las bandas que van pasando por el láser detectando su color. La información se registra en la computadora donde se procesan los datos dando la interpretación final del fragmento secuenciado.

Los *primers* utilizados para secuenciar el fragmento de Ngn1 son los mostrados en la tabla 2, de los cuales 2, 3, 4 y 5 fueron diseñados en el laboratorio y mandados

sintetizar en los laboratorios SIGMA, el 1 fue proporcionado por la unidad de biología molecular del Instituto de Fisiología Celular, donde se secuenciaron las muestras.

*Tabla 1. Primers utilizados para secuenciar el gen de Ngn1*

NOMBRE DE OLIGOS	SECUENCIA
<b>T7 Promotor</b>	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG G - 3'
<b>NgnII</b>	5' TGA TCT CGA CTG CTC C 3' TM= 48.7 - 50 PB=16
<b>NgnIM</b>	5' ACG AAG AGC AGG AAC GG 3' TM= 52.2 - 54 PB=17
<b>NgnIF</b>	5' AGG TTG CTG CAC CCT CG 3' TM= 54.6 - 56 PB=17
<b>pcNgn1</b>	5' GGT AGG CGT GTA CGG TG 3' TM= 47.4 - 56 PB=17

La secuenciación es un método que permitió verificar que el fragmento de DNA de los vectores pcS2MT, pcDNA3.1/Neo contienen el gen de *Ngn1*. Una vez que se obtuvo la secuencia, se comparó por medio del algoritmo **BLAST** en la base de datos *GenBank* para confirmar que era la secuencia codificante para *Ngn1* de ratón. Posteriormente se realizaron las digestiones de los vectores para linearizarlos y electroporarlos en las células ESR1.

#### 4) Restricción enzimática de DNA

Con el propósito de obtener la linearización del vector que contenía el transgen de *Ngn1* en los vectores pcDNA3.1/Neo-*Ngn1* y pcDNA3.1/Hygro-*Ngn1* para su posterior introducción en las células troncales embrionarias de ratón ESR1 y la obtención de clonas, se utilizó la enzima de restricción *BglII* de la marca *New England biolabs (NEB)*. Esta enzima reconoce la secuencia GATC (Guanina, Adenina, Timina, Citocina). Para hacer las digestiones, se colocó la cantidad correspondiente a 10 µg de DNA a un tubo estéril, se agregó 2 µl de amortiguador de digestión 2, se añadió 1 µl de la enzima y se aforo a 20 µl con agua *MilliQ*. Se incubó a 37°C por 2 horas.

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% como ya se describió, con la finalidad de verificar que las digestiones de los plásmidos correspondían a los pesos moleculares reportados ya linearizados. El peso molecular de los plásmidos pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA3.1/Hygro-Ngn1 es de 6500 y 6700 pares de bases (pb), respectivamente.

## **5) Cultivo celular**

Se sacó un vial del tanque de nitrógeno y se descongelaron las células en un baño María que estaba previamente ajustado a 37°C. Una vez descongelado el vial, se transfirió la suspensión a un tubo estéril de 15 ml, se agregaron 5 ml de medio y se centrifugó a 1 000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón de células en 1 ml de medio. En una caja de cultivo estéril se agregaron 6 ml de y se añadió el mililitro de células previamente centrifugadas con medio, después se introdujo la caja a la incubadora a 37°C con 5 % CO<sub>2</sub>.

Para su mantenimiento, se les cambió el medio de cultivo dos veces por semana. Una vez que las células estuvieron confluentes (aproximadamente dos días) al 80 % de la capacidad de la caja de cultivo, se retiró el medio y se agregaron 5 ml de PBS 1X tres veces y se retiró el PBS (Apéndice II). Se agregó 1 ml de Tripsina- EDTA, se incubó por 5 minutos a 37°C con 5 % CO<sub>2</sub> y a la caja se le agregaron 5 ml de medio con suero fetal bovino (SFB) al 10 %.

Posteriormente se retiraron las células despegadas, se pasaron a un tubo de 15 ml para centrifugarlas por 5 minutos a 1 000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células en 1 ml de medio.

Las células se contaron en un hemocitómetro y se aplicó la siguiente fórmula: [# total de células / # cuadrantes contados] X factor de dilución X volumen en el que se



resuspendieron las células  $\times 10\ 000 = \#$  de células/ml. Se sembraron en cajas de 10 cm de diámetro colocando  $2.5 \times 10^6$  células y se le agregaron 7 ml de medio.

En la siguiente tabla se muestran las líneas celulares usadas, los medios específicos y el % de Tripsina-EDTA empleado.

*Tabla 2. Líneas empleadas para los cultivos con Ngn1*

<b>CÉLULAS</b>	<b>MEDIO</b>	<b>% TRIPSINA-EDTA</b>
STO	DMEM y SFB al 10 %	0.25%
STO neo <sup>R</sup>	DMEM y SFB al 10 %	0.25%
HEK293	DMEM y SFB al 10 %	0.25%
3T3-Swiss	DMEM y SFB al 10 %	0.25%
ES-R1	KOES y SFB al 10 %	0.05%
PA6	$\alpha$ -MEM	0.25%

## **6) Inactivación de Células**

Para este paso es necesario utilizar un reactivo llamado mitomicina C, el cual impide la progresión del ciclo celular de las células, evitando su crecimiento y las cuales servirán como soporte para las células ES. Después de lavar las células que deben de tener la confluencia deseada (80-90 %) se agregaron 7 ml de medio y 70  $\mu$ l mitomicina C (*stock* 1 mg/ml), para tener una concentración final de 10  $\mu$ g/ml. Se incubó por tres horas a 37°C con una atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub>. Una vez que transcurrió el tiempo, se le retiró el medio con mitomicina, se agregaron 5 ml de PBS por tres veces para eliminar por completo la mitomicina, se retiró el PBS, se agregó 1 ml de Tripsina al 0.25 % con EDTA 2.65 mM y se incubó por 5 minutos a 37° C con 5 % CO<sub>2</sub>. Después se le agregaron 5 ml de medio, se retiraron las células despegadas, se pasaron a un tubo de 15 ml y se centrifugaron por 5 minutos a 1 000 rpm.

Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml medio, para poder hacer el conteo celular como ya se describió. Las cajas fueron tratadas previamente con gelatina a 0.1 % (ver Apéndice II), durante 30 minutos para que las células se pudieran adherir al sustrato de la caja evitando que se despeguen, este tiempo es suficiente pero se pueden dejar más tiempo. Las células se sembraron en cajas de

10 cm agregando un promedio de  $2.5 \times 10^6$  células y se aforó a un volumen de 7 ml de medio por caja. Después del tratamiento con mitomicina, las células se pueden congelar como se describe más adelante. Si se resiembran en cajas con 6 pozos, colocar  $0.3 \times 10^6$  células, aforando a 2 ml de volumen final. Hasta que se usen, se les cambia medio cada dos días. Se deben usar hasta una semana después del tratamiento con mitomicina para así evitar que las células se deterioren.

Las células también se pueden inactivar por medio de radiación a 3 000 rads, con una fuente de Cesio que emite rayos gamma durante 11 minutos, posteriormente se resiembran en una caja previamente tratada con gelatina al 0.1% y se cambia medio antes de usarlas. La tabla 3 muestra las células que se inactivaron:

*Tabla 3. Líneas celulares que se inactivaron mitoticamente*

<b>CÉLULAS</b>	<b>MEDIO</b>	<b>% TRIPSINA-EDTA</b>
STO	DMEM y SFB al 10 %	0.25%
STO neo <sup>R</sup>	DMEM y SFB al 10 %	0.25%
PA6	$\alpha$ -MEM	0.25%

## **7) Congelación de células**

El almacenamiento de células en nitrógeno líquido durante largos períodos de tiempo es una forma de mantener a las células sin deterioro celular apreciable. Una vez que se tuvo una caja de cultivo cercana al 80 % de confluencia, se le retiró el medio y se les agregó 1 ml de tripsina-EDTA (al 0.25 % o al 0.05 % según el tipo celular del que se trate). Se incubó por 5 minutos a 37° C a 5 % CO<sub>2</sub>. Posteriormente se les agregó 5 ml de medio, se les colocó en un tubo de 15 ml y se centrifugó a 1 000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo. Se hizo el conteo celular y una vez que se obtuvo el número celular final, se les agregó medio de cultivo con suero y DMSO al 10 % final, para tener  $2.5 \times 10^6$  células en un criovial. Todos los crioviales se colocaron en hielo inmediatamente después de que se cerró el tubo, posteriormente se les colocó en un congelador a -80°C por 1 día y

después se les llevó al tanque de nitrógeno para ser introducidos ahí hasta su posterior uso. Si se van a utilizar constantemente se les puede mantener en el congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **8) Electroporación**

Una vez que las células se despegaron mediante tripsinización, se pasaron a un tubo estéril de 15 ml y posteriormente se centrifugaron, se agregó 1 ml de PSB 1X y se hizo el conteo celular. Una vez que se obtuvo el número de células, se colocaron aproximadamente  $5 \times 10^6$  células en 500  $\mu\text{l}$  de PBS, en una celda estéril de 0.4 cm (*BIO-RAD* 165-2088) y se agregaron 25  $\mu\text{g}$  del vector deseado linearizado con la enzima *BglII* (el control o con *Ngn1*), se trasladaron en hielo hacia el electroporador. Se colocaron las condiciones 0.25 KV, 500  $\mu\text{F}$  y una vez que se dió el choque eléctrico para que se introdujera el DNA a las células, se colocaron inmediatamente en hielo y se incubaron por 15 minutos para que las células se conservaran en buen estado.

A dos cajas de 10 cm previamente tratadas con gelatina 0.1 % se agregaron 7 ml de medio KOES y después de la incubación se colocaron aproximadamente  $2.5 \times 10^6$  células electroporadas y se mantuvieron a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Un día después de la electroporación se inició el tratamiento con G418 (antibiótico análogo de neomicina) o con Higromicina. Se cambió el medio diariamente añadiendo 7  $\mu\text{l}$  LIF y 7  $\mu\text{l}$  de G418 (*stock* 200 mg/ml, concentración final de 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o de higromicina (*stock* 50 mg/ml, concentración final de 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ambos antibióticos permitieron seleccionar las células que incorporaron el plásmido. Las células se mantuvieron en selección durante siete días, las colonias que crecieron en la caja son las portadoras del plásmido de interés y posteriormente se pasaron a cajas multipozos para establecer las líneas celulares que se usarán en un futuro.

## 9) Inmunocitoquímica

Para realizar esta técnica, previamente se fijaron las células con paraformaldehído (PAF) al 4%, se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos. Se permeabilizó con Triton X-100 al 0.3% y suero normal de cabra al 10% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces por cinco minutos con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1% en PBS. Posteriormente se colocó el anticuerpo (AB) primario diluido en PBS y suero normal de cabra, se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó con PBS-albúmina tres veces por 5 minutos. Después se aplicó el anticuerpo secundario en 10% suero normal de cabra en PBS durante dos horas (si se deja más tiempo puede generar ruido de fondo). Se hicieron tres lavados por cinco minutos con PBS-albúmina. Se finalizó agregando el marcador nuclear y se hicieron los tres lavados finales de 5 minutos cada uno con PBS-albúmina. Los anticuerpos que se utilizaron para las inmunocitoquímicas se encuentran en la tabla siguiente, donde se detalla el nombre, y la dilución empleada.

*Tabla 4. Anticuerpos y diluciones empleados para la detección de células no diferenciadas y diferenciadas.*

AB - ESPECIE	DETECTA CÉLULAS:	MARCA - No. CATALOGO	DILUCIÓN
Oct3/4- Ratón	Indiferenciadas	BD transductions laboratories™ 611202	1: 1000
CMyc- Ratón	Flag de Ngn1	Donado por Dr. López Casillas IFC, UNAM	1: 1000
Ngn1- Conejo	Neurogenina1	Donado por Dra. Jane Jonson Universidad de Texas	1: 1000
Nestina- Rata	Precusores neurales	DSHB Rat-401	1: 1000
TUJ1- Ratón	Neuronas jóvenes	COVANCE PRB-315C	
TUJ1- Conejo	Neuronas jóvenes	COVANCE PRB-435P	1: 1000
GFAP- Ratón	Glía	COVANCE MMS-435P	1: 1000
GABA- Conejo	Neuronas gabaérgicas	SIGMA S5545	1: 2000
5HT- Conejo	Neuronas Serotoninérgicas	SIGMA A2052	1: 1000
TH- Ratón	Neuronas dopaminérgicas	SIGMA T1229	1: 1000
Vglut1- Conejo	Neuronas glutamatérgicas	Synaptic Systems 135002	1: 1000
Vglut2- Conejo	Neuronas glutamatérgicas	Synaptic Systems 135102	1: 500
Alexa 568- Ratón	Anticuerpo primario	INVITROGEN A11031	1: 1000
Alexa 568- Conejo	Anticuerpo primario	INVITROGEN A11036	1: 1000
Alexa 488- Ratón	Anticuerpo primario	INVITROGEN A11029	1: 1000
Alexa 488- Conejo	Anticuerpo primario	INVITROGEN A11034	1: 1000
Alexa 568 - Rata	Anticuerpo primario	INVITROGEN A11077	1: 1000
Hoechst 33258	Núcleos	SIGMA 861405	100µg/ml

## 10) Extracción de RNA

Para la extracción de RNA, se parte de condiciones de cultivo, las células se siembran en cajas de 6 pozos (Corning 3516) a una densidad de  $4.5 \times 10^5$  células por pozo. Una vez que se han cumplido 4 días de proliferación se realiza la extracción de RNA por el método de TRIZOL (Invitrogen), siguiente protocolo:

Agregar 1 ml de TRIZOL (Invitrogen) y homogenizar con el vortex 60 seg. Incubar 15 min a  $30^\circ \text{C}$ . Agregar 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo por cada ml de TRIZOL. Agitar en vortex 15 seg. Incubar 3 min a  $30^\circ \text{C}$ . Centrifugar 15 min a 4000 rpm SIGMA a  $-2-8^\circ \text{C}$ . Transferir solo la parte acuosa (parte superior) a un tubo nuevo. Agregar 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol. Agitar en vortex 15 seg. Incubar 10 min a  $30^\circ \text{C}$ . Centrifugar 10 min a 4000 rpm a  $-2-8^\circ \text{C}$ . Quitar el sobrenadante con una pipeta pasteur estirada. Lavar con 1 ml de etanol absoluto. Agitar en vortex 15 seg. Centrifugar 5 min a 4000 rpm a  $-2-8^\circ \text{C}$ . Lavar con 1 ml de etanol al 75%. Agitar en vortex 15 seg. Centrifugar 5 min a 4000 rpm a  $-2-8^\circ \text{C}$ . Quitar el etanol y dejar secar con el tubo eppendorf volteado sobre una sanita. Una vez que se haya evaporado todo el etanol, agregar 20  $\mu\text{l}$  de agua inyectable, raspando las paredes del tubo y resuspendiendo de manera vigorosa. Incubar 10 min a  $60^\circ \text{C}$ . Centrifugar 10 seg. Resuspender nuevamente y tomar 1  $\mu\text{l}$  para correr un gel de agarosa al 1% para observar el ARN ribosomal 18S y 28S. Si se observa íntegro el ARN, tomar 1  $\mu\text{l}$  en 59  $\mu\text{l}$  para cuantificar en el espectrofotómetro (Factor de dilución = 60). Para calcular la cantidad de ARN, utilizar la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/ml} = \text{Absorbancia a } 260 \text{ nm} \times \text{Factor de dilución} \times 40$$

## 11) Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Una vez que se ha realizado la extracción de RNA, es necesario retrotranscribirlo para obtener cDNA que pueda ser amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Para esto se utilizan 500 ng de RNA, calculados con la fórmula anterior.

Se pone en cada tubo 500 ng de RNA total de cada condición (electroporadas con los diferentes vectores y extracto de embriones de ratón de estadio E12), se calienta a 65° C durante 15 minutos. Se ponen los tubos en hielo durante 5 minutos. Preparar una mezcla de la tabla 5 por cada tubo:

*Tabla 5. Volumen de los reactivos empleados para iniciar la RT-PCR.*

<b>VOLUMEN</b>	<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACION del Stock</b>
1 µl	Primers (hexámeros) aleatorios	5 nmol/ml, 50µM
1 µl	Mezcla de dNTPs	10 mM
l.q.f. 13 µl	H <sub>2</sub> O inyectable	

Posteriormente se calientan las muestras a 65° C durante 5 minutos, luego se incuban en hielo durante 1 minuto. Centrifugar brevemente. Agregar por tubo los reactivos de la tabla 6.

*Tabla 6. Volumen de los reactivos empleados para la RT-PCR.*

<b>VOLUMEN</b>	<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACION del Stock</b>
4 µl	First-strand buffer	5X
1 µl	DTT	0.1 M
1 µl	RNAse OUT	40 U Inhibidor de RNAse recombinante
1 µl	SuperScript III RT	200 U/ µl
Final de 20 µl		

Mezclar con la pipeta suavemente, y si se está trabajando con primers aleatorios, incubar a 25° C durante 5 minutos. Incubar a 50° C durante 1 hora. Inactivar la reacción a 70° C durante 15 minutos. Cuantificar y utilizar 500 ng de cDNA para la PCR, utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/ml} = \text{Absorbancia a } 260 \text{ nm} \times \text{Factor de dilución} \times 50$$

Una vez cuantificado, el cDNA puede ser utilizado para amplificación por PCR mediante el siguiente protocolo: Agregar a cada tubo 500 ng de cDNA de cada condición y a cada tubo de PCR, agregarle el volumen de los reactivos de la tabla 7.

*Tabla 7. Volumen de los reactivos que se emplearon para la PCR.*

VOLUMEN	REACTIVO	CONCENTRACION del Stock
5 µl	Buffer PCR	10X
1.5 µl	MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
1 µl	Mezcla de dNTPs	10 mM
1 µl	Primer para amplificar 5'→3'	20 pmol
1 µl	Primer para amplificar 3'→5'	20 pmol
0.4 µl	Taq polimerasa de DNA	5 U/µl
l.f.p 50 µl	H <sub>2</sub> O inyectable	

Posteriormente se mezclan suavemente y centrifugar de 2 a 5 segundos.

Las condiciones de la PCR se ajustaron como se muestra en la tabla 5.

*Tabla 5. Condiciones empleadas para realizar la PCR.*

ETAPAS	TEMPERATURA Y TIEMPO
Primers	Ngn1 y GAPDH
Desnaturalización	95° C durante 15 minutos
Ciclos	35 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 1 minuto
Alineación	53.4° C durante 1 minuto
Polimerización	72° C durante 1 minuto
Extensión	74° C durante 10 minutos

Se utilizó como control negativo de la reacción una mezcla de reactivos agregando RNA, y como control positivo se usó cDNA de embriones de ratón de E12, se ha reportado en la literatura la expresión de Ngn1 en este estadio del desarrollo.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y el tamaño de los productos de la reacción fue determinando mediante la comparación con un estándar de peso molecular después de teñir el gel con bromuro de etidio.

## **12) Diferenciación con Ácido Retinoico (AR)**

Para este protocolo es necesaria la formación de cuerpos embrionarios (del Inglés embryonic bodies, EB), que se tratan con AR, durante 4 días y después se disociaran para diferenciar las células por 4 días mas.

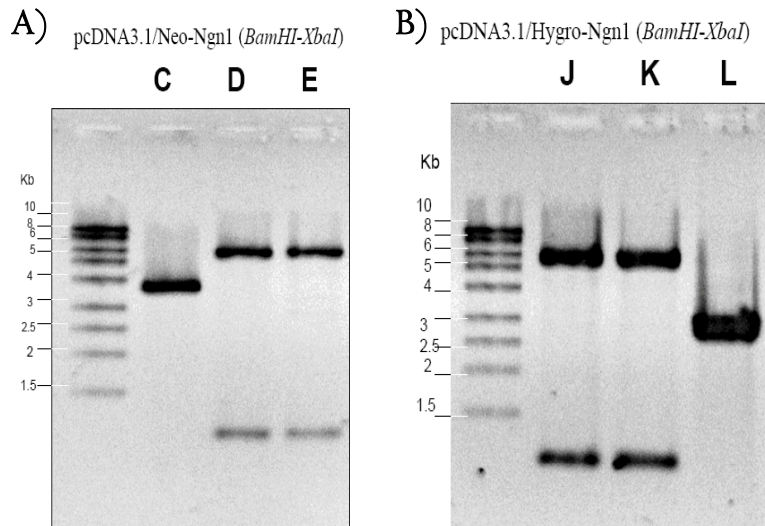
Las células ES fueron lavadas con PBS por tres veces, posteriormente se agregaron 5 ml de PBS-EDTA se dejó por 1 minuto se agitó y se retiró, finalmente se le agregó 1 ml de Tripsina al 0.05 % con EDTA 0.53 mM y se incubó por 5 minutos a 37°C con 5 % CO<sub>2</sub>. Las células que se despegaron se pasaron a un tubo de 15 ml para que posteriormente se centrifugaran a 1 000 rpm a 4°C por 5 minutos, se le retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio KO-ES, después se hizo el conteo celular. Una vez que se obtuvo el número de células, se sembraron nuevamente sobre una caja de petri con la finalidad de que no se adhirieran a la superficie de la caja y así generar los EBs, estos se mantuvieron en medio KO-ES durante 4 días en ausencia de LIF, para lograr el proceso de diferenciación los cuerpos embrionarios fueron tratados con AR 2 µM durante 4 días más. Después, los EBs fueron disociados con 1 ml de Tripsina al 0.25 % con EDTA 2.65 mM y se incubó por 5 minutos, transcurrido el tiempo se hizo disociación mecánica, posteriormente las células fueron resembradas en cajas que fueron previamente tratadas con poliornitina [1.5µg/ml]/ laminina [1µg/ml]/ fibronectina [1µg/ml], en cajas de 24 pozos. Se uso medio N2 (ver Apéndice II para su composición), durante 4 días para permitir la diferenciación neuronal. Finalmente se realizaron las inmunocitoquímicas.

### **13) Diferenciación con células estromales (PA6)**

Después de que las células ES transgénicas llegaron a su confluencia y una vez que las células PA6 estuvieron inactivas a estas últimas se les colocaron las células ES transgénicas con medio KO-ES, al día siguiente se le cambió el medio por medio N2 (Apéndice II), durante 4 días para la diferenciación neuronal. Una vez transcurrido el tiempo de diferenciación se fijaron las células para realizar la inmunocitoquímica.







**Fig. 12.** Verificación de inserción en las construcciones pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA3.1/Hygro-Ngn1. A) Digestiones de los plásmidos C-E en *BamHI* y *XbaI*. B) Plásmidos J-L digeridos en los sitios *BamHI* y *XbaI*.

Los demás vectores mostraron fragmentos de diferentes tamaños que no correspondían al peso molecular de *Ngn1*. Estos últimos se descartaron y solo se utilizaron los vectores (D y J) para los experimentos posteriores de electroporación.

### Análisis por secuenciación

Para corroborar que el cDNA de *Ngn1* no tenía ninguna alteración, se secuenciaron los vectores con tres oligonucleótidos que se localizan en tres sitios diferentes de *Ngn1* (Fig. 13). La clonación produce una proteína de fusión con una bandera de seis epítopes de *c-Myc* (utilizado para la identificación del transgen), en el extremo amino de la secuencia codificante para *Ngn1*.

La secuenciación del fragmento de *Ngn1* de ratón nos permitió analizar nucleótido por nucleótido corroborando que no se encontraba ninguna mutación que impidiera su correcta expresión. La figura 13 muestra la secuencia completa del transgen y las metioninas de inicio del primer epítope de *c-Myc* (en fucsia) y la metionina de *Ngn1* (en verde).

Una vez corroborado que los insertos carecían de mutaciones se iniciaron los estudios de electroporación.

```

* * * * *
nnn nnn aan nnn nnn nnn nnn nnn nnn SITO DE CORTE CON BamHI nnn nnn
M E Q K L I S E E D L N E M E Q K
atg gag caa aag ctc att tct gaa gag gac ttg aat gaa atg gag caa aag
L I S E E D L N E M E Q K L I S E
ctc att tct gaa gag gac ttg aat gaa atg gag caa aag ctc att tct gaa
E D L N E M E Q K L I S E E D L N
gag gac ttg aat gaa atg gag caa aag ctc att tct gaa gag gac ttg aat
E M E Q K L I S E E D L N E M E S
gaa atg gag caa aag ctc att tct gaa gag gac ttg aat gaa atg gag agc
L G D L T M E Q K L I S E E D L N
ttg ggc gac ctc acc atg gag caa aag ctc att tct gaa gag gac ttg aat
S R P A P L E T C I S D L D C S
tca agg cct gcc cct ttg gag acc tgc atc tct gat ctc gac tgc tcc
S S N S S S D L S S F L T D E E D
agc agc aac agc agc agc gac ctg tcc agc ttc ctc acc gac gag gag gac
C A R L Q P L A S T S G L S V P A
tgt gcc agg cta cag ccc cta gcc tcc acc tcg ggg ctg tcc gtg cca gcc
R R S A P A L S G A S N V P G A Q
cgg agg agc gct ccc gcc ctc tcc ggg gca tcg aat gtt ccc ggt gcc cag
D E E Q E R R R R G R A R V R S
gac gaa gag cag gaa cgg cgg agg cgg cga ggt cgc gct cgg gtg cgg tcc
E A L L H S L R R S R R V K A N D
gag gct ctg ctg cac tcc ctg cgg agg agt cgt cgc gtc aaa gcc aac gat
R E R N R M H N L N A A L D A L R
cgc gag cgc aac cgc atg cac aac ctc aac gct gcg ctg gac gcc ttg cgc
S V L P S F P D D T K L T K I E T
agc gtg ctg ccc tcg ttc ccc gac gac acc aag ctc acc aag att gag acg
L R F A Y N Y I W A L A E T L R L
ctg cgc ttc gcc tac aac tac atc tgg gcc ctg gct gag aca ctg cgc ctg
A D Q G L P G G S A R E R L L P P
gca gat caa ggg ctc ccc ggg ggc agt gcc cgg gag cgc ctc ctg cct ccg
Q C V P C L P G P P S P A S D T E
cag tgt gtc ccc tgt ctg ccc ggg ccc ccg agc ccg gcc agc act gag
S W G S G A A A S P C A T V A S P
tcc tgg ggt tcc ggg gcc gct gcc tcc ccc tgc gcc act gtg gca tca cca
L S D P S S P S A S E D F T Y G P
ctc tct gac ccc agt agt ccc tcg gct tca gaa gac ttc acc tat ggc ccg
G D P L F S F P G L P K D L L H T
ggc gat ccc ctt ttc tcc ttt cct ggc ctg gcc aaa gac ctg ctc cac acg
T P C F I P Y H * * *
agc ccc tgt ttc atc cca tac cac tag taa gaa

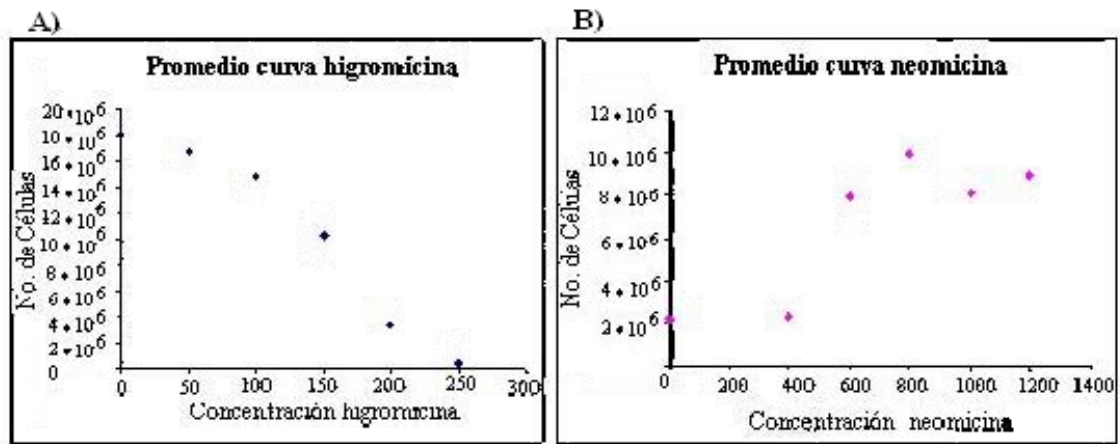
```

**Fig. 13. Mapa de la secuencia de *Ngn1*.** Secuencia de *Ngn1* y aminoácidos a los que codifica. Azul: Sitio del epítotope *c-Myc*. Rojo: Inicio de la secuencia codificante para *Ngn1*.

## Electroporación de células

Como un control para la electroporación de los vectores de expresión de *Ngn1*, se iniciaron los cultivos de células HEK293. En estas células se realizaron curvas para saber la susceptibilidad de las células HEK293 a los diferentes antibióticos usados, durante 10 días. La Figura 14 muestra que se obtuvo una susceptibilidad para

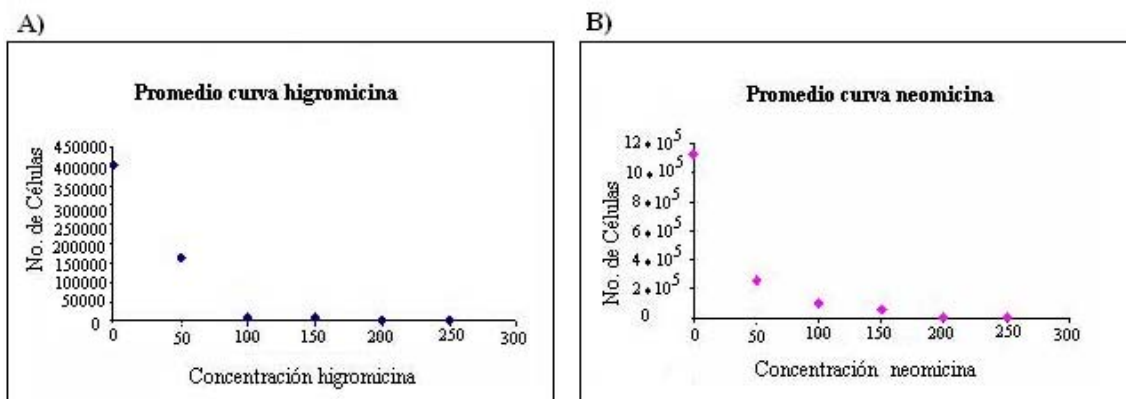
higromicina, pero no el comportamiento esperado de las células con el antibiótico de G418 (Fig. 14 B); al parecer las células eran resistentes a este antibiótico.



**Fig. 14.** Curva de resistencia de las Células HEK293 después de la electroporación, posterior al tratamiento con antibióticos. (A y B) Conteo de células HEK293 posterior al tratamiento con antibióticos. A) Células HEK293 tratadas con diferentes concentraciones del antibiótico Higromicina. B) Células HEK293 tratadas con diferentes concentraciones del antibiótico Neomicina. N=2.

Estas células solo nos servirían como control de las células con el vector con resistencia a higromicina, por lo que se descartaron y las HEK293 se reemplazaron por células 3T3-Swiss (Fibroblastos embrionarios de ratón albino Swiss).

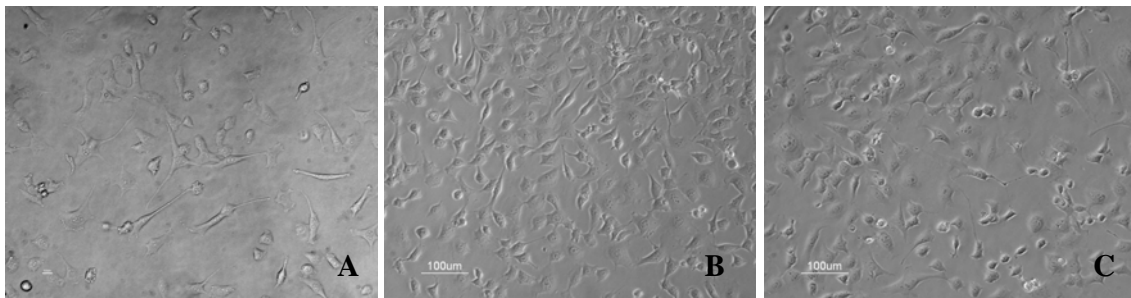
Las células 3T3-Swiss, se usaron para evaluar la actividad de los productos de los genes de resistencia (higromicina y neomicina) de los vectores. Estas células 3T3 Swiss crecen rápidamente y son usadas en diversos estudios; su nombre se debe a que cada tercer día se necesitan pasar a una nueva caja de cultivo.



**Fig. 15.** Curva de resistencia de las Células 3T3-Swiss antes de la electroporación, posterior al tratamiento con antibióticos. (A y B) Conteo de células 3T3-Swiss después de 7 días de tratamiento con antibióticos. (A) Células 3T3-Swiss tratadas con diferentes concentraciones del antibiótico Higromicina. (B) Células 3T3-Swiss tratadas con diferentes concentraciones del antibiótico Neomicina. N=2.

Con estas células se realizaron las curvas de resistencia a los antibióticos durante 7 días (Fig. 15), donde se confirmó que estas células no tenían resistencia a los antibióticos higromicina y neomicina, el crecimiento de estas células a diferentes concentraciones muestra una disminución en el número de células el cual se observó a partir de 50 mg/ml. Posterior a estos experimentos se realizó la electroporación para las células ESR1.

Las células 3T3-Swiss fueron electroporadas con los vectores, pcDNA3.1/Hygro, pcDNA3.1/Hygro-Ngn1, pcDNA3.1/Neo y pcDNA3.1/Neo-Ngn1. Las células 3T3-Swiss que fueron electroporadas se les dio tratamiento por 10 días con los antibióticos higromicina a 150 mg/ml de y neomicina a 180 mg/ml. La figura 16 muestra que no hubo alteración morfológica de las células no electroporadas con respecto a las electroporadas con los vectores de resistencia a neomicina sin selección (Fig. 16 B y C), sin embargo en estas últimas se observó un gran número de células flotando (células esféricas) 3 días después de comenzada la selección. Una vez transcurrido el período de selección se pasaron las células sobrevivientes a nuevas cajas de cultivo. Las células electroporadas con el vector con resistencia higromicina se congelaron para estudios posteriores.

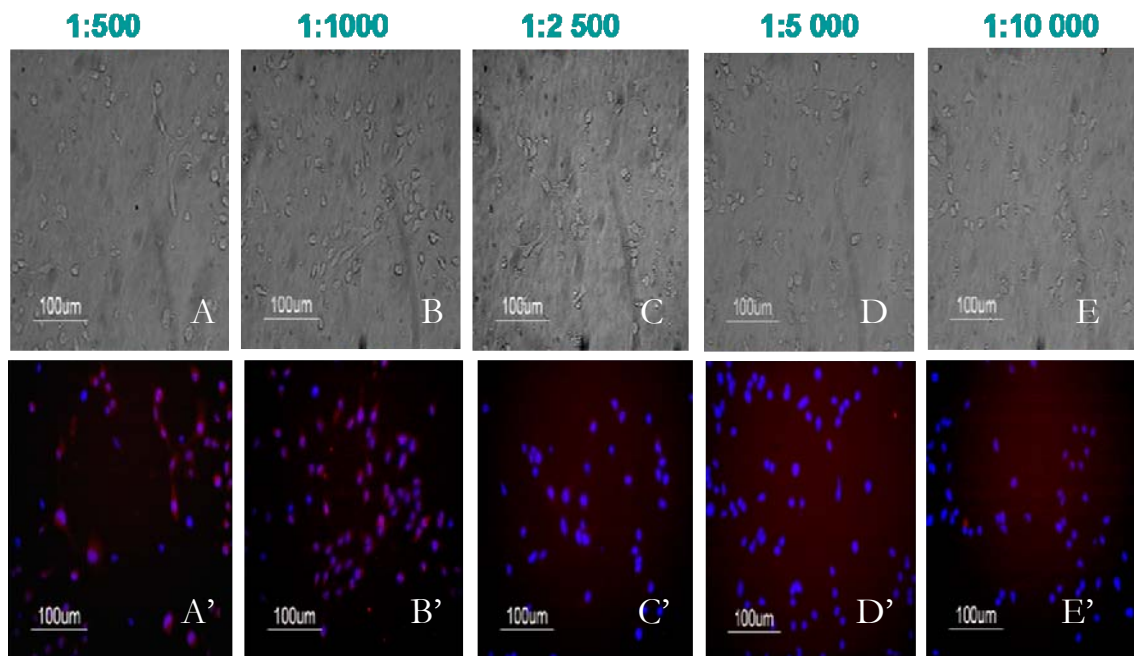


**Fig. 16. Microfotografías de las Células 3T3-Swiss electroporadas y después del tratamiento con antibióticos.** A) Células 3T3-Swiss sin electroporar. B) Células 3T3-Swiss electroporadas con el vector con pcDNA3.1/Neo. C) Células 3T3-Swiss electroporadas con el vector con pcDNA3.1/Neo-Ngn1. (B y C) Después de 3 días del tratamiento con neomicina. Las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando contraste de fases.

Para confirmar que la proteína de Ngn1 se expresaba en las células electroporadas se hicieron las pruebas de inmunocitoquímica con un anticuerpo contra

Ngn 1 (Donado por la Dra. J. Jonson). Se realizó una curva de diluciones, en células de corteza cerebral de día embrionario 14 de rata, las cuales se sabe que expresan Ngn1. Estas células fueron tratadas con el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) para promover su proliferación. La figura 17 muestra estas células después de la inmunofluorescencia contra Ngn1 (rojo), donde encontramos que las mejores diluciones fueron las de 1:500 y 1:1000. Para los posteriores experimentos de inmunocitoquímicas empleados en este estudio se utilizó la concentración 1:1000.

### Dilución

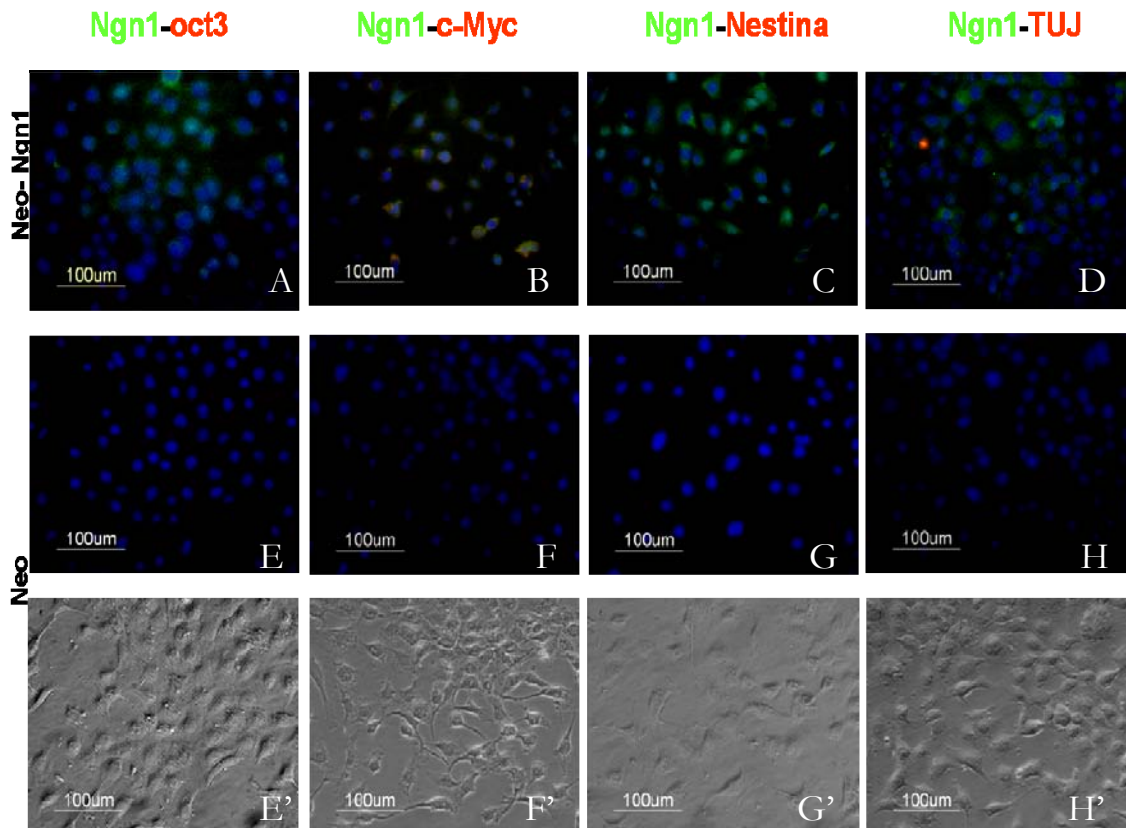


**Fig. 17. Prueba de dilución para ver la marca de Ngn1 en células de corteza E14.** Establecimiento de la dilución del anticuerpo anti-Ngn1 que permite la detección en células troncales neurales de la corteza cerebral, que son usadas como un control positivo. (A, B, C, D y E) Campo claro de células de corteza de E14 en pasaje 2. (A', B', C', D' y E') Inmunocitoquímica en estas mismas células, en rojo marca contra Ngn1. Las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando contraste de fases y epifluorescencia.

Una vez estandarizada la concentración para el uso del anticuerpo contra Ngn1, se iniciaron las inmunocitoquímicas en las células 3T3-Swiss electroporadas con el vector con resistencia a neomicina.

La figura 18 muestra la inmunocitoquímica para las células 3T3-Swiss con los vectores pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA3.1/Neo. Ngn1 se encontró en todas las células en concordancia con la detección del epítipo c-Myc. Como era de esperarse no se

detectó expresión de Oct3/4 (marcador de pluripotencia), Nestina (precursores neurales), ni TUJ1 (neuronas jóvenes) ya que son células fibroblásticas.

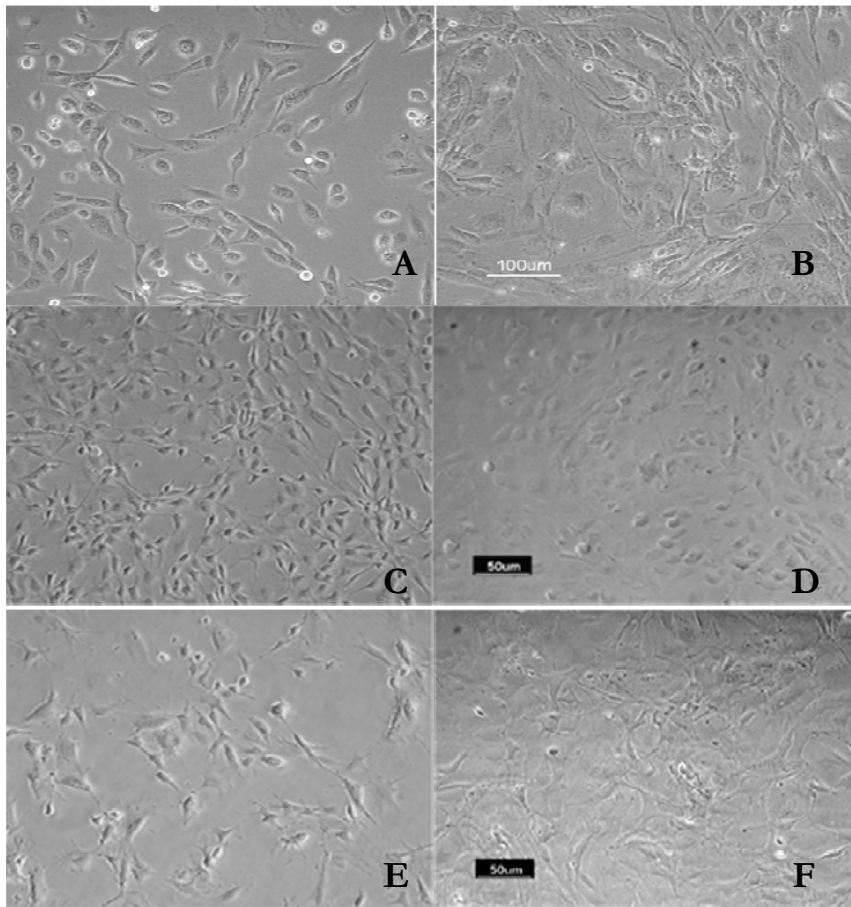


**Fig. 18. Inmunofluorescencia en células 3T3-Swiss transgénicas.** (A, B, C, D, E, F, G y H) Inmunocitoquímica para Ngn1 en células 3T3-Swiss transgénicas (verde en todos los campos); Oct3 en A y E (rojo); c-Myc en B y F (rojo), Nestina en C y G (rojo); TUJ en D y H (rojo). (A, B, C y D) Células electroporadas con Ngn1 (pcDNA3.1/Neo-Ngn1). (E, F, G y H) Células electroporadas con pcDNA3.1/Neo. (E', F', G' y H') Células electroporadas con pcDNA3.1/Neo, campo claro. Las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando contraste de fases y epifluorescencia.

Después de las pruebas de detección de Ngn1 en fibroblastos electroporados, se prosiguió a establecer clonas transgénicas de células troncales embrionarias de la línea ESR1. Se realizaron las electroporaciones con ambos vectores descritos, sin embargo solo se realizaron los estudios con el vector que contenía la resistencia a neomicina. Las células con resistencia a higromicina fueron criopreservadas en nitrógeno líquido para estudios posteriores.

## Cultivo de células ESR1 y electroporación

El cultivo de fibroblastos es un paso previo para empezar a crecer las células ES. Los fibroblastos fueron crecidos y después de tenerlos las líneas celulares STO, STO-Neo<sup>R</sup> (resistentes a G418 un análogo de neomicina) y MEFs-Hygro<sup>R</sup> (fibroblastos resistentes a higromicina; *Specialty Media*), se crecieron e inactivaron mitóticamente para que sean utilizados posteriormente.



**Fig. 19. Cultivos de fibroblastos.** (A, C y E) Cultivo de fibroblastos STO, STO-Neo<sup>R</sup> y MEFs-Hygro<sup>R</sup> en proliferación. (B, D y F) Fibroblastos STO, STO-Neo<sup>R</sup> y MEFs-Hygro<sup>R</sup> inactivos con Mitomicina C. Todas las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando contraste de fases.

Todos los fibroblastos se crecieron a una densidad del 80%, posteriormente se inactivaron con mitomicina C, lo cual evita una competencia por los nutrientes entre las células ES y los fibroblastos. La figura 19 muestra cultivos de fibroblastos STO, STO-Neo<sup>R</sup> y MEFs-Hygro<sup>R</sup> en crecimiento (A, C y E) y fibroblastos después del tratamiento con mitomicina C (B, D y F).



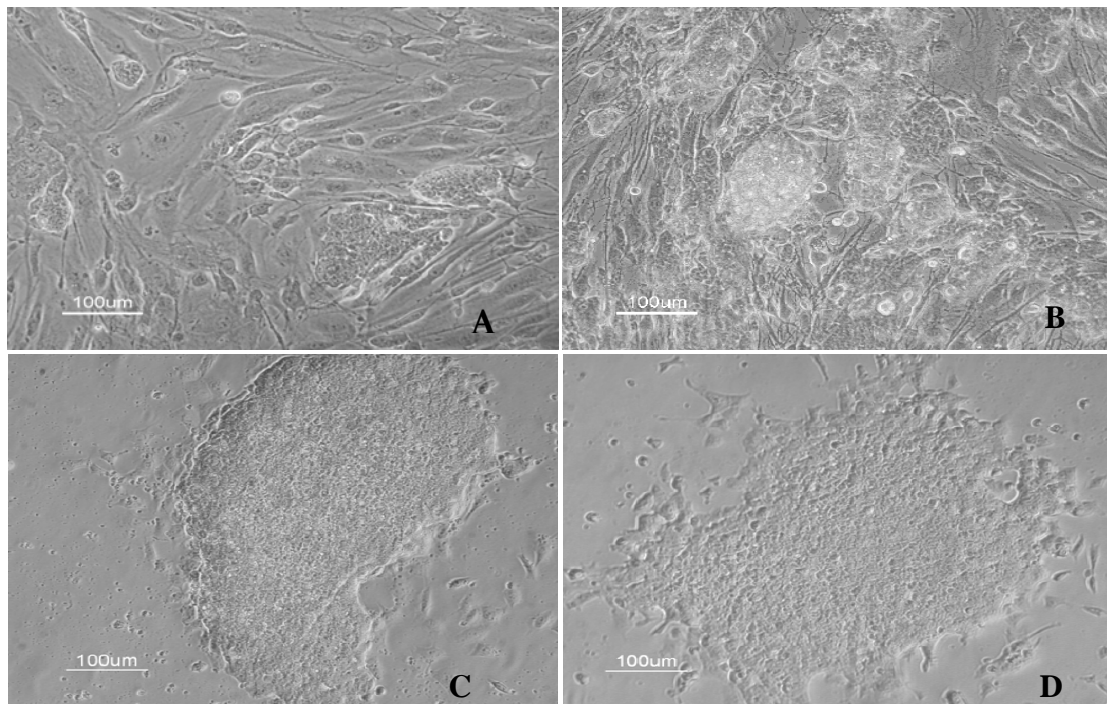
Una vez que los fibroblastos estuvieron con las condiciones adecuadas (inactivos mitóticamente) para el cultivo de las células troncales embrionarias, se expandieron células de la línea celular R1 (ESR1), con la finalidad de tener grandes lotes de este tipo celular. Las células ESR1 se mantuvieron en estado indiferenciado mediante la adición del LIF. Con estas células se iniciaron los experimentos de electroporación con los vectores de expresión construidos y así establecer líneas celulares transgénicas de ESR1-Ngn1.

En algunos experimentos preliminares se utilizaron los vectores D (pcDNA3.1/Neo-Ngn1) y J (pcDNA3.1/Hygro-Ngn1), de los cuales el vector D tiene resistencia a neomicina y J tiene resistencia a higromicina. Estos vectores se linearizaron con la enzima *BglIII*, por ser un sitio de corte único y que no está dentro del marco de lectura del gen ni del epítipo de marcaje c-Myc (se encuentra localizado río arriba del promotor de CMV). Una vez que se tuvieron linerizados los vectores se inició la electroporación bajo las condiciones ya descritas en metodología.

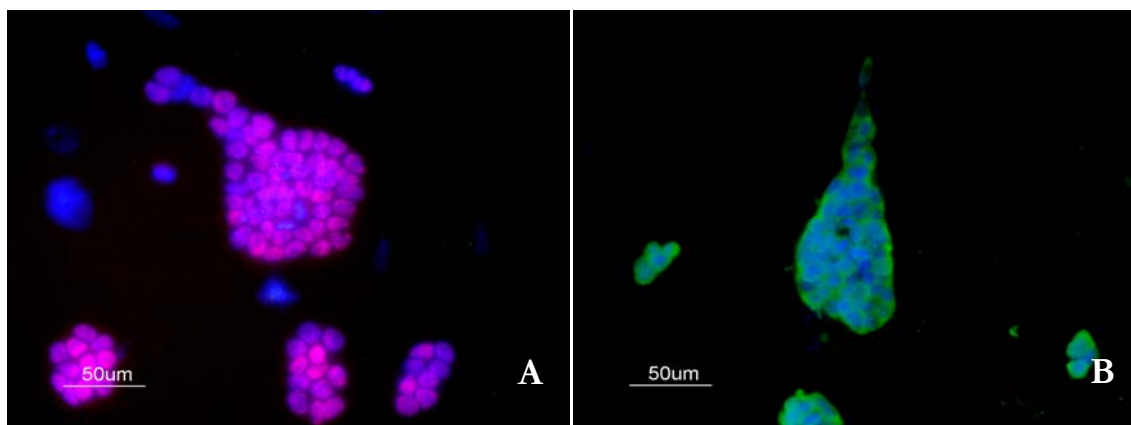
Posterior a la electroporación las células fueron sembradas en medio con LIF y se dejaron recuperar toda la noche. Al día siguiente se empezó el tratamiento con los antibióticos durante 10 días para la selección de las células que integraron el vector.

La figura 20 A, muestra el crecimiento en colonias de las células ESR1. En la figura 20 B se muestra un campo en el cual las células troncales están a una mayor densidad, aunque conservan su estado indiferenciado al mantenerse en colonias compactas y con bordes definidos. En esta figura, también puede observarse que las células ESR1-Neo (Fig. 20 C), son más densas en la parte central que las electroporadas con los vectores que expresan a Ngn1 (también llamado vector D), sin embargo las células electroporadas con este vector D. Solo se muestran células electroporadas con D

y no con J cuyas colonias fueron mucho más pequeñas pero muy parecidas a las células electroporadas con D.



**Fig. 20. Células ESR1 de ratón. No electroporadas y electroporadas.** (A y B) Células no electroporadas. (C y D) Células electroporadas A) A una confluencia del 20%. B) Colonias de ESR1 no electroporadas a una confluencia del 80%. C) Colonias de ESR1 electroporadas con el vector resistente a Neomicina. D) Colonia de ES electroporada con el vector que contiene Ngn1. Todas las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando contraste de fases.

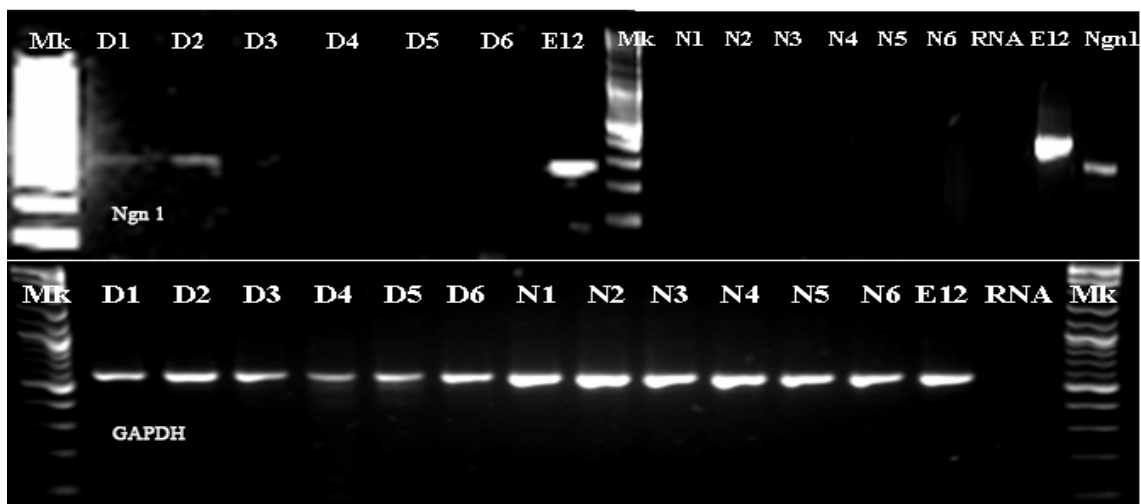


**Fig. 21. Células ESR1/neo-Ngn1 transgénicas posterior a la selección con G418.** A) Células ESR1 transgénicas mostrando colocalización para el marcador de pluripotencia Oct3/4 (rojo) y Hoechst (azul). B) Inmunocitoquímica de células ESR1 transgénicas contra la bandera de c-Myc (verde) y Hoechst (azul). Todos los campos fueron obtenidos después del tratamiento con antibiótico durante 10 días. Las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando epifluorescencia.

Después del tratamiento, se aislaron 6 colonias resistentes de ESR1-neo y 3 ESR1/neo-Ngn1 controles, que se expandieron para probar la expresión del transgen además de tener una parte en criopreservación para hacer los cultivos de diferenciación.

A una de las colonias que se expandieron se le realizó una inmunocitoquímica, que nos permitiría detectar si las células seguían en un estado indiferenciado mediante la detección Oct3/4, que en estudios previos se ha reportado como un marcador específico para el estado indiferenciado de las ES (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981). Los resultados de la figura 21 demuestran que nuestras células ES preservaron su estado indiferenciado (expresión de Oct3/4) y sugirieron que además expresaron el transgen ya que todas las células fueron positivas para c-Myc.

Para corroborar si en todas las colonias seleccionadas se estaba expresando *el transgen*, se realizó un RT-PCR para Ngn1. Las clonas transgénicas se nombraron D por el vector de expresión (pcDNA3.1/Neo-Ngn1) ó N (pcDNA3.1/Neo) y el número de colonia. La figura 22 muestra el tamizado realizado para detectar las líneas que expresaron el transgen de Ngn1 (D1y D2). Como control positivo se utilizó el cDNA de ratón de E12, y como control de carga se usó GAPDH, un gen que se expresa constitutivamente en las células (parte inferior de la figura 22).



**Fig. 22. Detección del transcrito de Ngn1 en las células ES1 transgénicas.** Electroporación control con pcDNA3.1/Neo. N1-N6: Colonias electroporadas con el vector de expresión de Ngn1, D1-D6. Ngn1 último carril de la parte superior. Control positivo cDNA de ratón de E12. Y control de carga GAPDH. Mk: marcador 2-long NEB. Se colocaron 5 µl de la reacción de PCR. Gel de agarosa al 2%.

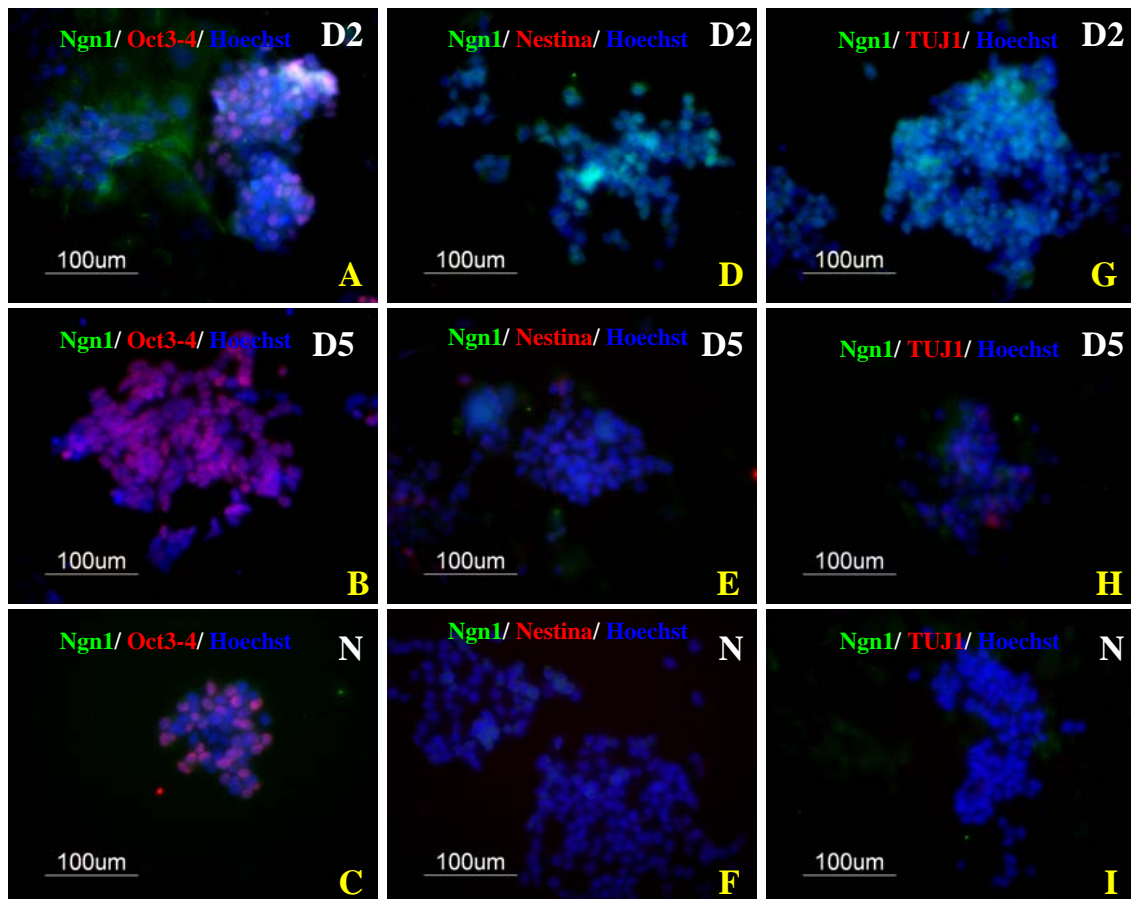
Como se puede observar sólo en las líneas que se denominaron D1 y D2 se detectó la expresión del mRNA de Ngn1 (Fig. 22). Las líneas que se electroporaron con el vector vacío (N1-N6), como era de esperarse no amplificaron ningún fragmento.

Las clonas que se utilizaron para los experimentos posteriores fueron: D2 (que expresa *Ngn1*), D5 (transfectadas con el vector que tiene a *Ngn1*, pero que no la expresa) y N3 (electroporadas con el vector vacío).

Sabíamos por nuestros resultados previos que las células transgénicas expresaban Oct3/4 (Fig. 23). También quisimos corroborar que estas células no hubieran cambiado su destino a precursor neural, por lo que hicimos una inmunodetección contra Nestina; otra posibilidad es que estas células se estuvieran diferenciando espontáneamente a neuronas, para lo cual realizamos inmunodetección para  $\beta$ -III-tubulina (TUJ1).

De acuerdo con lo obtenido por RT-PCR, las células D2 fueron positivas para *Ngn1* (Fig. 22). Interesantemente éstas presentaron una morfología diferente a una célula ES y además en las células que expresaban Oct3/4 no hubo colocalización con *Ngn1* (las células se verían verdes y rojas). Ésto nos sugiere que la expresión forzada de *Ngn1* en células ES afecta la expresión de Oct3/4, sin embargo no las está dirigiendo a un fenotipo de precursor neural o de neurona joven, ya que no expresan Nestina ni TUJ1. Como era de esperarse, en la clona D5 y en la control no se detectó *Ngn1*.

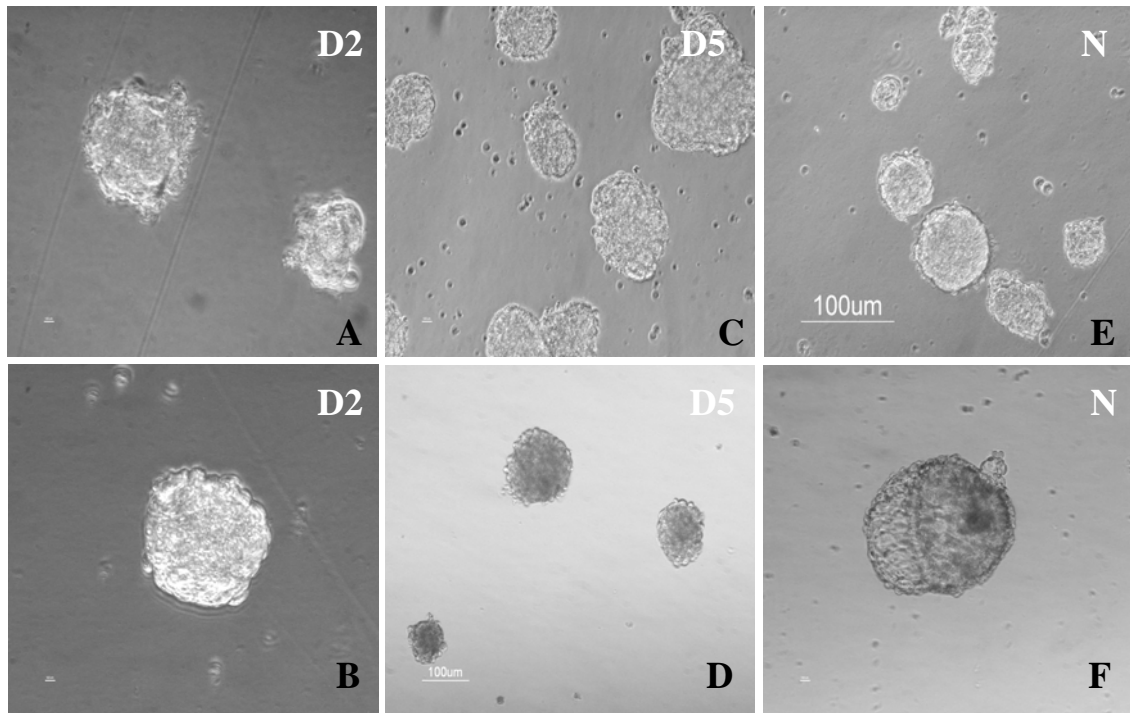
Es de notar que *Ngn1* en estas inmunocitoquímicas se encontró más localizada en el citoplasma que en el núcleo, cuando se esperarían encontrar una marca más definida o más ubicada en este último organelo, debido a que es un factor de transcripción.



**Fig. 23. Inmunocitoquímica de las Células ESR1 transgénicas no diferenciadas.** (A, B y C) Células ESR1 transgénicas marcaje para Ngn1 en verde, Oct3/4 en Rojo y Hoechst en Azul. (D, E y F) Células ESR1 transgénicas marcaje para Ngn1 (verde), Nestina (Rojo) y Hoechst (Azul). (G, H e I) Células ESR1 transgénicas marcaje para Ngn1 en verde, TUJ1 en Rojo y Hoechst en Azul. Las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando epifluorescencia.

### Diferenciación de células transgénicas con ácido retinoico

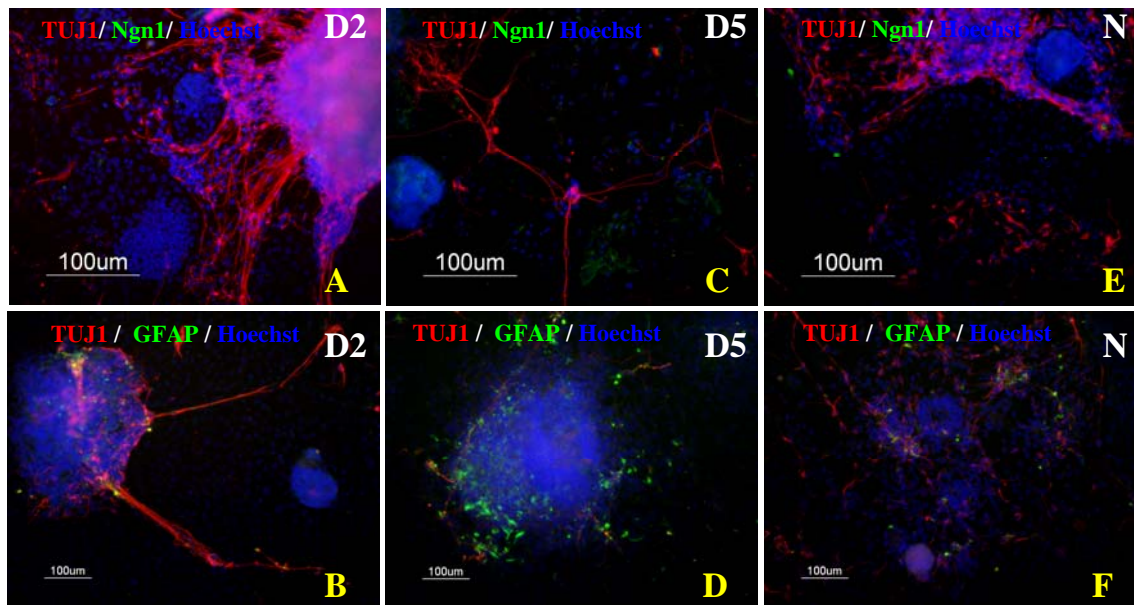
Posterior a los experimentos descritos las clonas seleccionadas se sometieron a el protocolo de diferenciación con ácido retinoico (AR). Este procedimiento consiste en disociar enzimáticamente a las células ES para permitir que se asocien y formar estructuras flotantes conocidas como cuerpos embrionarios (EBs). Después de 4 días, los EBs se incubaron por 4 días adicionales con AR 2  $\mu$ M (Fig. 24).



**Fig. 24. Cuerpos embrionarios (EBs) de las diferentes líneas transgénicas.** (A, C y E) La parte superior muestra EBs antes del tratamiento con AR, y la inferior EBs expuestos con AR (B, D y F). Nótese que las barras de escala son diferentes y que por lo tanto hay una gran variabilidad en el tamaño de los EBs. Todos los campos se tomaron en un microscopio invertido usando contraste de fases.

La parte inferior de la figura 24 muestra la morfología de los EBs durante el tratamiento de AR, en donde encontramos diferencias significativas. En las líneas celulares transgénicas, se observó que durante el tratamiento con AR de la línea D1 (que también expresaba Ngn1) tenía menor capacidad de proliferación, en las tres repeticiones el número de células fue muy bajo, aunque inicialmente se colocaba el mismo número celular que con las demás líneas.

Posterior al tratamiento con AR, las células fueron disociadas y sembradas en cajas de cultivo tratadas previamente con poliornitina/laminina/fibronectina. Estas células se dejaron diferenciar con medio N2 por cuatro días más y posteriormente se sometieron a inmunocitoquímica para detectar diferentes marcadores.



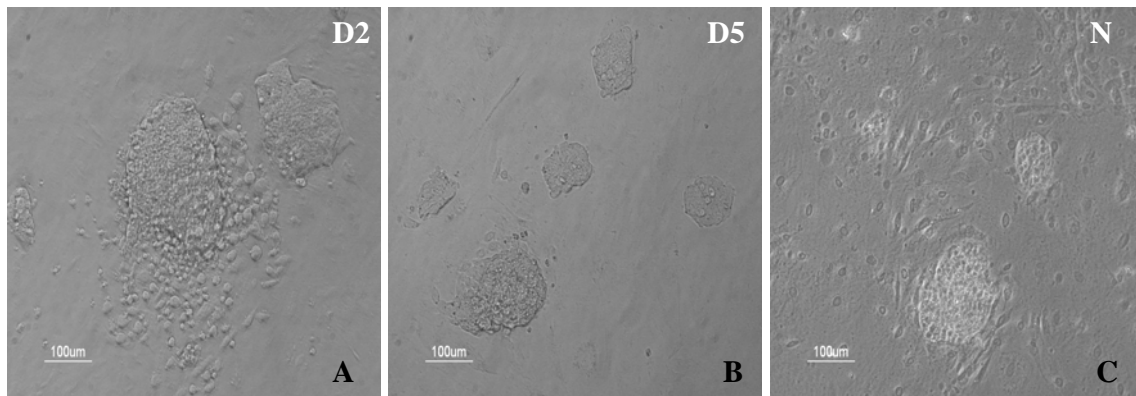
**Fig. 25. Diferenciación neuronal de las células ES transgénicas.** Después del tratamiento con AR, los cultivos se disociaron y resembraron. Posteriormente se realizó la inmunodetección de Ngn1 (A, C y E), TUJ1 (rojo en todas las fotografías) y GFAP en Verde (B, D y E). Los núcleos se tiñeron con Hoechst y se muestran en azul. Las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando epifluorescencia.

La figura 25 (A, C y E) muestra que el marcaje para TUJ1 fue claro en todas las colonias tanto para las células que expresaban Ngn1 como para las que no, indicándonos de que el tratamiento con AR permitió la diferenciación neuronal. Curiosamente, no se observó marca para Ngn1 o para la bandera de c-Myc con TUJ1 (datos no mostrados) en la línea D2, lo que nos hizo pensar que el transgen se silenció, que se expresó abajo del límite de resolución de la técnica, o que se seleccionó una población de células que no expresaron a este factor.

Para analizar si la expresión de Ngn1, aunque hubiera sido transitoria, promovía una diferenciación hacia un linaje astrocítico se realizó la inmunocitoquímica para el marcador de la proteína fibrilar glial ácida, (GFAP; Fig. 25 B, D y F). No se observó una expresión marcada de esta proteína. Otro detalle que nos llamó la atención, es que conforme continuábamos sub-cultivando a las células y por lo tanto aumentando su número de pases la diferenciación va disminuyendo, lo que se observó mas claramente en las células diferenciadas sobre PA6 (ver adelante).

## Diferenciación de células transgénicas con células estromales PA6

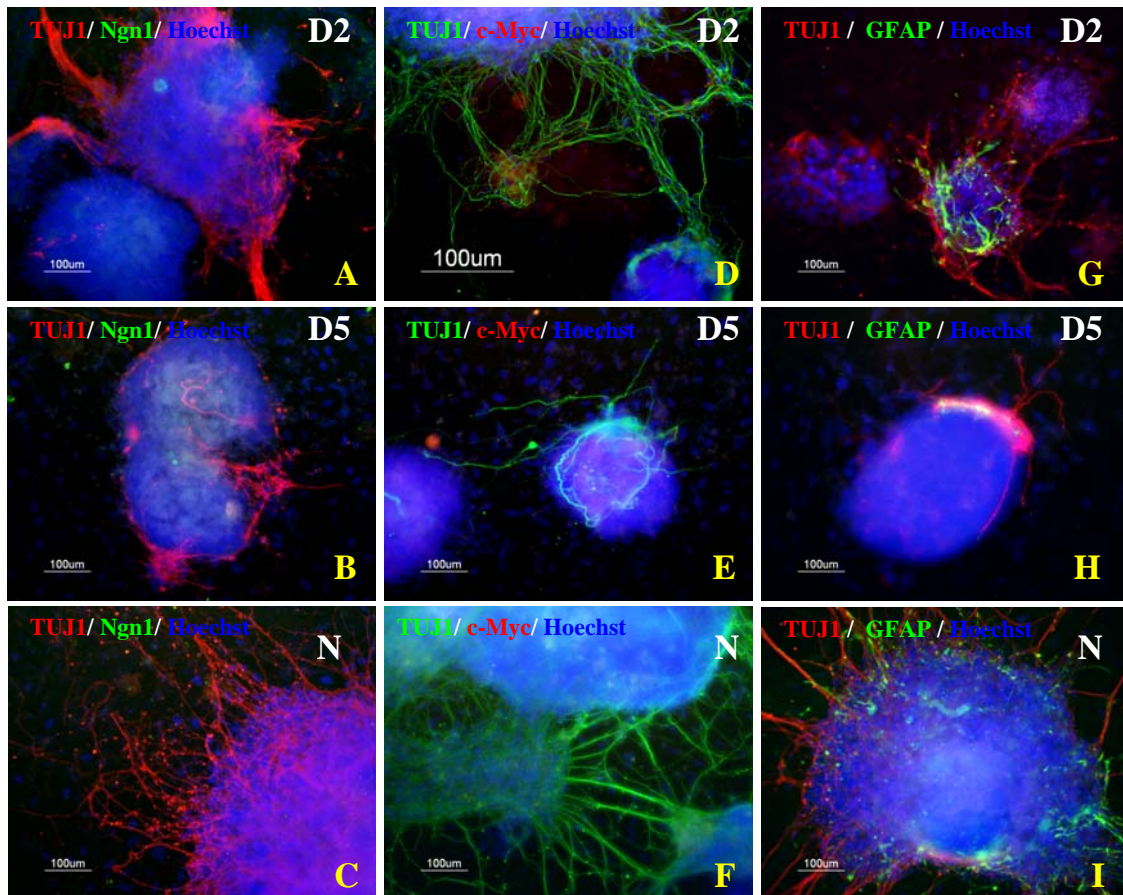
Una vez que se terminaron los estudios de diferenciación con AR, las mismas líneas celulares fueron utilizadas para observar su diferenciación sobre células estromales PA6, las cuales se ha reportado que tienen la capacidad de inducir la diferenciación neural (Kawasaki *et al.*, 2000; Barberi *et al.*, 2003).



**Fig. 26. Microfotografías de las células ESR1 transgénicas sobre células estromales PA6.** Las colonias de células ES pueden observarse creciendo sobre células grandes y aplanadas (PA6). Las fotografías se tomaron al día 3 diferenciación, en un microscopio invertido usando contraste de fases.

Las células estromales PA6 fueron requeridas para inducir la diferenciación se inactivaron mitóticamente previo al co-cultivo con células ES. Posteriormente se sembraron y fueron mantenidas durante 6 días en medio KO-RS (Knock out con reemplazo de suero, ver apéndice II). Después de este tiempo, se inició el período de diferenciación con medio N2 para promover el linaje neural por 6 días más. La morfología de estas células se puede observar en la figura 26. Una vez terminado este período las células fueron fijadas y se les realizó la inmunocitoquímica para detectar marcadores de linaje neural.





**Fig. 27.** Diferenciación neuronal de las células ES transgénicas mediante el protocolo de inducción con células estromales PA6. En todos los paneles se muestra marcaje de  $\beta$ -III tubulina (TUJ1). Se realizó también la detección de Ngn1 (A, B y C), c-Myc (D, E y F) y GFAP (G, H e I). Los núcleos se tiñeron con Hoechst y se muestran en azul. Las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando epifluorescencia.

La figura 27, muestra fotografías de los ensayos inmunocitoquímica para detectar la expresión del transgen de Ngn1 y la proteína  $\beta$ -III tubulina mediante el anticuerpo TUJ1. Como puede observarse, en todas las condiciones encontramos neuronas positivas a TUJ1. Sin embargo, fuera de una tinción que parece estar en el centro de las colonias, Ngn1 no pudo detectarse en la clona D2. Sólo en algunas células de la clona D2 se encontró colocalización del epítipo de c-Myc y TUJ1 (Fig. 27 D). Sin embargo en la mayoría de las colonias la marca fué en el centro de la colonia y la marca de ambos anticuerpos no colocalizó (Datos no mostrados). Estos resultados nuevamente sugieren que en estas células de pasaje posterior el transgen ya no se expresó.

No hubo diferencias entre la línea D2 como en las líneas utilizadas, lo que sugiere nuevamente que la expresión transitoria (si se tuvo en un estadio previo) de

Ngn1 no contribuyó a un incremento en la formación de neuronas. También puede observarse que las diferencias en la proporción de células GFAP positivas no fueron significativas en ninguna de las células transgénicas.

Estos resultados en conjunto sugieren que la expresión constitutiva de Ngn1 en células ES deteriora su pluripotencialidad, y que con los pases o al diferenciarlas al linaje neural con AR o por medio del co-cultivo con células PA6, se tiende a seleccionar una población de células dejan de expresar Ngn1. Nuevas estrategias deberán establecerse para encontrar las condiciones en las que la sobre-expresión de Ngn1 resulte en una diferenciación neuronal eficiente a partir de células troncales pluripotentes.

## DISCUSIÓN

Los estudios realizados hasta la fecha con factores bHLH proneurales y células troncales pluripotentes son muy escasos (Farah *et al.*, 2000; Nakada *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). Esos estudios se reportan un aumento en la diferenciación hacia linaje neural. Nuestros resultados con células ES no confirman estos datos. Una posible explicación es que desde la selección, las células ESR1 transgénicas mostraban diferencias en cuanto a la expresión de Ngn1 entre las diferentes colonias y entre células de una misma colonia. Las distintas clonas pudieron incorporar el cDNA de Ngn1 en diferentes lugares de su genoma, llevando a una expresión diferencial o silenciamiento del gen posteriormente.

Otra explicación es que las células transgénicas al momento de sobre-expresar Ngn1 salen del ciclo celular, provocando que las células de la colonia no proliferen y que se queden en estado latente, pero no se comprometen a un linaje neural ya que no pudimos detectar los marcadores Nestina y TUJ1. La pérdida de expresión de Oct 3/4 en células Ngn1 positivas. Esto implica competencia entre las células que silencian transgen y siguen pluripotentes con las que pierden pluripotencia y expresan Ngn1.

Si las células que tienen el transgen de Ngn1 inician el programa de diferenciación antes de que nosotros lo induzcamos, y que al momento en el que inducimos la diferenciación estas células mueran provocando que no veamos una tendencia en la diferenciación, más evidente en el caso de D1.

Kanda y colaboradores en el 2004, sugieren que en sus estudios de diferenciación las células con Ngn1 tienen cantidades suficientes de proteína E y esto ayuda a una diferenciación neuronal eficiente. Sabemos que la proteína E es importante para formar el complejo con Ngn1 que se translocará al núcleo (Hsieh y Gage. 2004),

por lo que creemos que una posibilidad es que aún en presencia de Ngn1 las células ES no tengan niveles suficientes de proteína E.

Los protocolos de diferenciación que se utilizaron reportan que con células estromales (PA6) se ha obtenido un 30% de células totales que se diferencian hacia un linaje neural (Barberi et al., 2003) y con AR el porcentaje es del 77.3% en células P19 (Nakada et al., 2004). Una observación a este respecto es que independientemente del protocolo de diferenciación usado, no observamos diferencias significativas, pero notamos que las células transgénicas van perdiendo la capacidad de diferenciación conforme se pasaban, porque en los experimentos descritos en la última parte notamos una menor cantidad de neuronas.

Con el establecimiento de las líneas celulares que expresan el transgen de Ngn1 (D1, D2) y la serie de experimentos de diferenciación con (AR y PA6), se observó una diferenciación hacia linaje neural, sin embargo no hay una diferencia significativa con respecto a los controles que fueron resistentes al antibiótico pero cuyo vector no incluyó la secuenciación de Ngn1

Recientemente se reportó (Reyes et al., 2008) que la expresión transitoria de Ngn1 dirigida mediante un promotor activado por tetraciclina y agregando los factores de crecimiento BDNF y GDNF, promueve una diferenciación glutamatérgica en células ES, sugiriéndonos que Ngn1 no es suficiente para inducir un destino neural, y que se requerirían de factores solubles adicionales para la diferenciación. En nuestro caso sería interesante probar una forma inducible de Ngn1, expresándose en diferentes etapas de la diferenciación neuronal para ver si en estas condiciones se obtiene una diferencia significativa.

El análisis de los distintos tipos de neuronas generados (gabaérgico, serotoninérgico, cateclaminérgicas) tampoco arrojó diferencias importantes entre las líneas estudiadas (datos no mostrados)

## CONCLUSION

Se pudieron establecer líneas que expresaban constitutivamente el RNA y la proteína de Ngn1. Esta expresión se perdió durante el cultivo de las células ES, por lo que no se pudo establecer la participación de Ngn1 en la inducción de tejido neural, en células pluripotentes.

## PERSPECTIVAS

1. Verificar si las células que se electroporaron tienen diferencias en el número de copias de Ngn1 incorporando a su genoma, para elucidar si esto tiene que ver con la expresión del transgen.
2. Estudiar los efectos en la diferenciación en células que expresan Ngn1 con tratamientos con diferentes factores de crecimiento.
3. Evaluar las concentraciones de proteína E y si se requiere, sobre-expresarla en las células transgénicas, para promover la diferenciación neuronal.

## APENDICE I: Abreviaturas

AA: Ácido ascórbico

ACh: Acetilcolina

AEP: Área entopeduncular anterior

AR: Ácido Retinoico

Astro: Astrocitos

bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico

bHLH: Hélice asa hélice con región básica

BMP: Proteínas morfogénicas de hueso

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CBP: Proteína de unión a CREB

Cdks: Cinasas dependientes de ciclinas

CNTF: Factor neurotrófico ciliar

CT: Células troncales

CTN: Células troncales neurales

Cx: Corteza

DA: Dopamina

Dcx: Doblecortina

Dlx1/2: Gen homeobox less distal 1/2

FA: Fosfatasa Alcalina

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

EC: Células troncales del carcinoma embrionario

EG: Células troncales germinales embrionarias

EGF: Factor de crecimiento epidermal

ES: Células troncales embrionarias

GABA: Ácido gama-amino butírico

GFAP: Proteína fibrilar glial ácida

Gli: Glioblastoma

GRD: Ganglio de la raíz dorsal

GSK3: Glicógeno sintasa cinasa 3

Glu: Glutamato

H: Hipocampo

JAKs: Janus cinasa

Lef1: Factor de unión al enhancer en linfoides 1

LGE: Elevación gangliónica lateral

LIF: Factor inhibidor de leucemia

Mash1: Homólogo de *achaete-scute* en mamíferos 1

MGE: Elevación gangliónica medial

MN: Neuronas Motoras

N2: Medio DMEM/ F12 con suplemento N2

NCAMs: Moléculas de adhesión celular neural

Ngn: Neurogenina

NT4: Neurotrofina 4

Oligo: Oligodendrocitos

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGC: Células de primordios germinales

POa: Área preóptica anterior

RA: Ácido retinoico

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa



Ser: Serotonina

SFB: Suero fetal bovino

Shh: Sonic hedgehog

SN: Sistema nervioso

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

SOX: Factores de transcripción relacionada con SRY en la caja HMG

SRM: Medio con reemplazo de suero

SSEA: Antígenos embrionarios estado específicos

STAT: Señal de transcripción activadora y transductora

TRA: Antígeno de reconocimiento tumoral

ZSG: Zona sub-granular

ZSV: Zona sub-ventricular

ZV: Zona ventricular

## APENDICE II: Soluciones

### 1) Amortiguador de digestión (*NEB*)

Tris-HCl (pH=8)	25 mM
Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Agua destilada aforar a	1 L

### 2) Amortiguador P1, 1L

Tris-base	6.06 g
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	3.72 g
Agua destilada aforar a	1 L
Agregar:	
RNasa	100 mg

### 3) Amortiguador P2, 1L

NaOH	8 g
SDS (20 %)	50 ml
Agua destilada aforar a	1 L

### 4) Amortiguador N3, 100 ml

Acetato de potasio 5 mM	60 ml
Ácido acético glacial	11.5 ml
Agua destilada aforar a	100 ml

### 5) Amortiguador PB, 100 ml

Isopropanol	100 ml
Endonucleasas	100 mg/ml

### 6) Amortiguador PE, 100 ml

Etanol	80 ml
Agua destilada aforar a	100 ml

7) Amortiguador PBS (de sales fosfato) 10X, 1L

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	27.07 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4 g
Agua destilada aforar a	1 L
Calentar y filtrar ó esterilizar en autoclave	

8) Amortiguador TBE 5X, 1L

Tris Base	54.0 g
Ácido Bórico	27.5 g
EDTA 0.5	20 ml
Agua destilada aforar a	1 L
Ajustar el pH a 8.0	

9) Amortiguado de PCR 10X

Tris-HCl	200 mM
KCl	500mM

10) Gelatina al 0.1%, 1L

Gelatina	1 g
Agua destilada aforar a	1 L
Esterilizar en autoclave	

11) Medio  $\alpha$ MEM

$\alpha$ MEM	500 ml
SFB (SFB)	50 ml
Penicillin-Streptomycin-Glutamine	5 ml
Glutamina	5 ml

12) Medio DMEM

DMEM	1000 ml
SFB (SFB)	100 ml
Penicillin-Streptomycin-Glutamine	10 ml

13) Medio KO-ES

Knock-DMEM	425 ml
SFB	75 ml
MEM Non-Essential amino acid solution	5 ml
Penicillin-Streptomycin-Glutamin	5 ml
2-mercaptoetanol	0.5 ml

14) Medio N2

DMEM/F12	1000 ml
Penicillina-Streptomycina	10 ml
Putresina	1 $\mu$ l
Progesterona	66.6 $\mu$ l
Selenito de Sodio	60 $\mu$ l
Glucosa	1.55 g
Glutamina	0.073 g
NaHCO <sub>3</sub>	1.69 g
Insulina	0.025 g
Apotransferrina	0.1 g
Ajustar el pH a 7.2 y filtrar	

15) Medio Luria Base (LB), 1L

NaCl	10 g
Peptona-Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada aforar a	1 L
Ajustar el pH a 7.0 y esterilizar	

16) Medio S. O. C.

Peptona	2 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl <sub>2</sub> .	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucosa	20 mM

17) Penicilina- Estreptomina, 100 ml

Penicilina	5 000 U/ ml
Estreptomina	5 000 U/ ml
en solución salina al 0.85 %	

18) Tripsina al 0.05 %, 100 ml

Tripsina (1: 250)	0.5 g
EDTA (0.53 mM)	0.2 g
en HBSS sin Ca <sup>++</sup> y Mg <sup>++</sup>	

19) Tripsina al 0.25 %, 100 ml

Tripsina	2.5 g
EDTA (2.65 mM)	0.38 g
en HBSS sin Ca <sup>++</sup> y Mg <sup>++</sup>	

## REFERENCIAS

- Acosta-Viana KY, Zavala-Castro JE (1996) Proteínas de unión a DNA. *Rev. Biomed.* Jul-Sep; **7**:163-172.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**:683-686.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* **2**:287-293.
- Anderson DJ, Groves A, Lo L, Ma Q, Rao M, Shah NM, Sommer L (1997) Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**:493-504.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* **168**:342-357.
- Baizabal JM, Furlan-Magaril M, Santa-Olalla J, Covarrubias L (2003) Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Arch Med Res* **34**:572-588.
- Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* **21**:1200-1207.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**:517-530.
- Brook FA, Gardner RL (1997) The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:5709-5712.
- Cau E, Casarosa S, Guillemot F (2002) Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* **129**:1871-1880.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**:643-655.
- Czyz J, Wobus A (2001) Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors. *Differentiation* **68**:167-174.
- Donovan PJ, Gearhart J (2001) The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* **414**:92-97.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**:154-156.
- Farah MH, Olson JM, Sucic HB, Hume RI, Tapscott SJ, Turner DL (2000) Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* **127**:693-702.
- Fisher DE, Parent LA, Sharp PA (1992) Myc/Max and other helix-loop-helix/leucine zipper proteins bend DNA toward the minor groove. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:11779-11783.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* **287**:1433-1438.

- Gaiano N, Nye JS, Fishell G (2000) Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* **26**:395-404.
- Gajavelli S, Wood PM, Pennica D, Whittemore SR, Tsoulfas P (2004) BMP signaling initiates a neural crest differentiation program in embryonic rat CNS stem cells. *Exp Neurol* **188**:205-223.
- Gammill L .S, Bronner Fraser (2003) Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci.* **4(10)**:795-805
- Ge W, He F, Kim KJ, Blanchi B, Coskun V, Nguyen L, Wu X, Zhao J, Heng JI, Martinowich K, Tao J, Wu H, Castro D, Sobeih MM, Corfas G, Gleeson JG, Greenberg ME, Guillemot F, Sun YE (2006) Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1319-1324.
- Gilbert, SF. (2003) *Developmental Biology*. Seventh Edition. Sinauer Associates. Inc.
- Gowan K, Helms AW, Hunsaker TL, Collisson T, Ebert PJ, Odom R, Johnson JE (2001) Crossinhibitory activities of Ngn1 and Math1 allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* **31**:219-232.
- Guillemot F (1995) Analysis of the role of basic-helix-loop-helix transcription factors in the development of neural lineages in the mouse. *Biol Cell* **84**:3-6.
- Guillemot F, Joyner AL (1993) Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech Dev* **42**:171-185.
- Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* **75**:463-476.
- Henderson JT, Seniuk NA, Roder JC (1994) Localization of CNTF immunoreactivity to neurons and astroglia in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res.* **22(1-4)**:151-65 .
- Hjalt T (2004) Basic helix-loop-helix proteins expressed during early embryonic organogenesis. *Int Rev Cytol* **236**:251-280.
- Houenou LJ, Li L, Lo AC, Yan Q, Oppenheim RW (1994) Naturally occurring and axotomy-induced motoneuron death and its prevention by neurotrophic agents: a comparison between chick and mouse. *Prog Brain Res.* **102**:217-26
- Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH (2004) Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16659-16664.
- Jan YN, Jan LY (1994) Neuronal cell fate specification in Drosophila. *Curr Opin Neurobiol* **4**:8-13.
- Jones S (2004) An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol* **5**:226.
- Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R (2005) Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* **306**:343-348.
- Kanda S, Tamada Y, Yoshidome A, Hayashi I, Nishiyama T (2004) Over-expression of bHLH genes facilitate neural formation of mouse embryonic stem (ES) cells in vitro. *Int J Dev Neurosci* **22**:149-156.

- Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y (2000) Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28**:31-40.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**:50-56.
- Kim S, Yoon YS, Kim JW, Jung M, Kim SU, Lee YD, Suh-Kim H (2004) Neurogenin1 is sufficient to induce neuronal differentiation of embryonal carcinoma P19 cells in the absence of retinoic acid. *Cell Mol Neurobiol* **24**:343-356.
- Kristensen DM, Kalisz M, Nielsen JH (2005) Cytokine signalling in embryonic stem cells. *Apmis* **113**:756-772.
- Ledent V, Paquet O, Vervoort M (2002) Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol* **3**:RESEARCH0030.
- Le Douarin NM, Creuzet S, Couly G, Dupin E (2004) Neural crest cell plasticity and its limits. *Development*. **131**(19):4637-50.
- Lee JE (1997) Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* **7**:13-20.
- Lo L, Sommer L, Anderson DJ (1997) MASH1 maintains competence for BMP2-induced neuronal differentiation in post-migratory neural crest cells. *Curr Biol* **7**:440-450.
- Lo LC, Johnson JE, Wuenschell CW, Saito T, Anderson DJ (1991) Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev* **5**:1524-1537.
- Louis JC, Magal E, Takayama S, Varon S (1993) CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science*. 1993 Jan 29;259(5095):689-92.
- Ma Q, Kintner C, Anderson DJ (1996) Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* **87**:43-52.
- Ma Q, Sommer L, Cserjesi P, Anderson DJ (1997) Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J Neurosci* **17**:3644-3652.
- Ma Q, Fode C, Guillemot F, Anderson DJ (1999) Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev* **13**:1717-1728.
- Maden M (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* **3**:843-853.
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:7634-7638.
- Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**:429-440.



- McCormick MB, Tamimi RM, Snider L, Asakura A, Bergstrom D, Tapscott SJ (1996) NeuroD2 and neuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the neuroD gene family. *Mol Cell Biol* **16**:5792-5800.
- Mizuseki K, Sakamoto T, Watanabe K, Muguruma K, Ikeya M, Nishiyama A, Arakawa A, Suemori H, Nakatsuji N, Kawasaki H, Murakami F, Sasai Y (2003) Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5828-5833.
- Moore KB, Schneider ML, Vetter ML (2002) Posttranslational mechanisms control the timing of bHLH function and regulate retinal cell fate. *Neuron* **34**:183-195.
- Mujtaba T, Piper DR, Kalyani A, Groves AK, Lucero MT, Rao MS (1999) Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. *Dev Biol* **214**:113-127.
- Nakada Y, Hunsaker TL, Henke RM, Johnson JE (2004) Distinct domains within Mash1 and Math1 are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification. *Development* **131**:1319-1330.
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* **59**:89-102.
- Oppenheim RW, Prevette D, Yin QW, Collins F, MacDonald J (1991) Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* **29**; 251(5001):1616-8
- Pabo CO, Sauer RT (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* **61**:1053-1095.
- Panchision y McKay, 2002
- Perez SE, Rebelo S, Anderson DJ (1999) Early specification of sensory neuron fate revealed by expression and function of neurogenins in the chick embryo. *Development* **126**:1715-1728.
- Reyes JH, O'Shea KS, Wys NL, Velkey JM, Prieskorn DM, Wesolowski K, Miller JM, Altschuler RA. (2008) Glutamatergic neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells after transient expression of neurogenin 1 and treatment with BDNF and GDNF: in vitro and in vivo studies. *J. Neurosci.* **26**; 28(48):12622-31.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* **12**:4565-4574.
- Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD (2003) Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* **39**:13-25.
- Rossant J (2001) Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* **19**:477-482.
- Santa-Olalla J, Baizabal JM, Fregoso M, del Carmen Cardenas M, Covarrubias L (2003) The in vivo positional identity gene expression code is not preserved in neural stem cells grown in culture. *Eur J Neurosci* **18**:1073-1084.

- Seo S, Richardson GA, Kroll KL (2005) The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* **132**:105-115.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13726-13731.
- Sommer L, Ma Q, Anderson DJ (1996) neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* **8**:221-241.
- Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X, Fan G, Greenberg ME (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* **104**:365-376.
- Talikka M, Perez SE, Zimmerman K (2002) Distinct patterns of downstream target activation are specified by the helix-loop-helix domain of proneural basic helix-loop-helix transcription factors. *Dev Biol* **247**:137-148.
- Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* **414**:112-117.
- Thomson JA, Marshall VS, Trojanowski JQ (1998) Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells. *Apmis* **106**:149-156; discussion 156-147.
- Thomson JA, Marshall VS (1998) Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* **38**:133-165.
- Thomson JA, Odorico JS (2000) Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends Biotechnol* **18**:53-57.
- Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, Nilsen J, Rhee J, Zhou M, Doetschman T, Coffin JD, Wyland JJ, Hung YT. (1999) Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci*. **2**(9):848
- Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, Watanabe Y, Mizuseki K, Sasai Y (2005) Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* **8**:288-296.
- Weintraub H (1993) The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* **75**:1241-1244.
- Weissman IL (2000a) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* **287**:1442-1446.
- Weissman IL (2000b) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**:157-168.
- Weissman IL (2002) Stem cells--scientific, medical, and political issues. *N Engl J Med* **346**:1576-1579.
- Wilson L, Maden M (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* **282**:1-13.
- Wilson SW, Rubenstein JL (2000) Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* **28**:641-651.

Ybot-Gonzalez P, Gaston-Massuet C, Girdler G, Klingensmith J, Arkell R, Greene ND, Copp AJ (2007) Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development* **134**:3203-3211.

Yeo W, Gautier J (2004) Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev Biol* **274**:233-244.