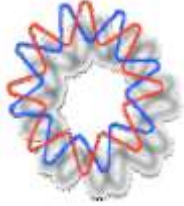




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA INDUCIR DIFERENCIACIÓN EN
MONOCAPA ADHERENTE DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIÓNICAS DE
RATÓN A CÉLULAS PRECURSORAS NEURALES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

MARÍA CONCEPCIÓN CRUZ SANTOS

DIRIGIDA POR

DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD

CUERNAVACA, MORELOS, OCTUBRE DE 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"Around here, however, we don't look backwards for very long.

We keep moving forward, opening up new doors and doing new things, because we're curious and curiosity keeps leading us down new paths."

W. D.

A mis padres: Nicolás e Isabel.

A mis hermanos: Mauro, Agustín, Roxana, Gabriela, Nicolás y Juan Pablo.

Siempre se merecerán lo mejor de mí, lo mantendré en mente.

GRACIAS...

A CONACYT, por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles, por permitirme estar dentro de su grupo de trabajo y por su asesoría para la realización de este trabajo.

Al Dr. Christopher David Wood, por haberme aceptado como su alumna, por su apoyo y por poner a mi disposición los recursos necesarios para la realización del trabajo.

A mi comité tutorial, Dra. Diana Escalante Alcalde y Dr. Enrique Salas Vidal, por sus comentarios y evaluaciones en el trayecto de la realización de este trabajo.

A mi comité de sinodales: Dra. Hilda Lomelí Buyoli, Dra. Leonor Pérez Martínez, Dra. Denhi Schnabel Peraza, Dra. Verónica Narváez Padilla y Dr. Joseph Dubrovsky, por su tiempo, atención y comentarios para mejorar esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, por sus comentarios y sugerencias a este trabajo y por su apoyo, Aimée, Gilda, Rayo, Susana, Daniel, David y Ximena.

A mis amigos durante la maestría: Leidy, Wendy Ivette, Elva, Israim, Bivi, Ana, Wendy Villamizar, Celina, Conchita y Raúl, por hacer agradable el trayecto.

A mis amigos de muchos años: Linka, Laura, Sol, Dan, Goretti, Rafael R., simplemente gracias por su apoyo. Los quiero mucho.

A quienes en distintas etapas de mi formación académica han confiado en mí: Prof. Fernando Sánchez Montes[†], siempre sabías cual era la manera correcta de retarme y por ti me enteré de la existencia de las células troncales., Dra. María Guadalupe García Alcocer, Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar, su apoyo fue y será siempre invaluable.

ÍNDICE

Contenido	Página
ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1 El establecimiento del tubo neural en vertebrados	6
2.2 Características de las células troncales embriónicas pluripotentes de ratón	7
2.3 Mantenimiento del estado pluripotente de las células troncales embriónicas de ratón en cultivo	9
2.3.1 La vía de LIF/Jak/Stat3	9
2.3.2 La vía LIF/Jak/Stat3 en combinación con la vía Bmp4/Smad/Dusp9	10
2.3.3 Inhibición de la señalización Fgf4/Erk y el estímulo de la señalización de Wnt (condición 2i)	12
2.4 Obtención de precursores neurales <i>in vitro</i>	13
2.4.1 Características de la diferenciación en monocapa adherente	14
2.5 ¿Por qué optimizar el protocolo de Ying y Smith para inducir diferenciación en monocapa adherente?	18
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 General	23
4.2 Particulares	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Cultivo rutinario de las líneas de mESC sin células alimentadoras	25
5.1.1 Descongelación de mESC	25

5.1.2	Subcultivo de mESC	25
5.1.3	Congelación de mESC	27
5.1.4	Composición de soluciones y medios empleados durante el cultivo rutinario de mESC	28
5.2	Obtención de precursores neurales de mESC en monocapa adherente	29
5.2.1	Protocolo “clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente	30
5.2.1.1	Protocolo “clásico” para inducir diferenciación de mESC a NPC en monocapa adherente (Ying and Smith, 2003)	30
5.2.1.2	Composición de los medios de cultivo y soluciones empleadas en el protocolo “clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente	31
5.2.2	Modificaciones al protocolo “clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente para la obtención de NPC de mESC	34
5.2.2.1	Protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente modificado con período de adaptación a medio sin suero	34
5.2.2.2	Protocolo “casi clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente	36
5.2.2.3	Experimentos en substratos diferentes	37
5.2.2.4	Composición de los medios de cultivo y soluciones empleadas en el protocolo modificado y “casi clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente	40
5.3	Ensayos de inmunofluorescencia	43
5.3.1	Inmunocitoquímica	43
5.3.2	Preparación de soluciones para inmunocitoquímica	43
5.4	Medición de la eficiencia de obtención de NPC por citometría de flujo en el citómetro FACSCanto II	45

5.4.1 Subcultivo y fijado de las células después de la inducción de diferenciación	45
5.4.2 Medición en citómetro de flujo	46
5.4.2.1 Adquisición de datos	46
5.4.2.2 Análisis de datos	50
5.4.3 Preparación de soluciones para análisis por citometría de flujo	51
6. RESULTADOS	52
6.1 Las línea celulares de mESC, RFP y R1B5, cultivadas rutinariamente sobre células alimentadoras, inducidas a diferenciar siguiendo el protocolo “clásico”	52
6.2 Las líneas celulares de mESC 46C (<i>sox1</i> -GFP) y Oct4-GiP (Oct4-GFP) cultivadas rutinariamente sin células alimentadoras	55
6.2.1 Las líneas celulares de mESC 46C (<i>sox1</i> -GFP) y Oct4-GiP (Oct4-GFP) inducidas a diferenciar en monocapa adherente, siguiendo el protocolo modificado con un período de adaptación a medio sin suero	57
6.2.2 Las líneas celulares 46C (<i>sox1</i> -GFP) y Oct4-GiP (Oct4-GFP) inducidas a diferenciar en monocapa adherente siguiendo el protocolo “casi clásico”	61
6.2.3 Experimentos con el protocolo “casi clásico” para inducir diferenciación sobre substratos diferentes, en medio N2B27 adicionado con 1% KSR	65
6.2.3.1 Inducción de la diferenciación sobre poli-d-lisina/laminina como sustrato	65
6.2.3.2 Inducción de la diferenciación en poli-l ornitina/laminina como sustrato	69
6.2.3.3 Inducción de la diferenciación en gelatina como sustrato empleando un procedimiento modificado para recubrir cajas con gelatina	71
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	78

7.1 El cambio en las condiciones de cultivo, en el protocolo “clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente y anomalías cromosómicas, como posibles limitantes en la obtención de precursores neurales	78
7.2 Un período de adaptación a medio sin suero, empleando las líneas celulares 46C y Oct4GiP incrementa –en nuestras condiciones- las posibilidades de obtención de precursores neurales	79
7.3 Adherencia baja de las células 46C y Oct4GiP a la caja de cultivo, durante la inducción de la diferenciación, limita la obtención de precursores neurales en nuestras condiciones	81
7.4 La optimización del protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente podría depender de ajustes en la composición del medio de cultivo, un sustrato óptimo y de las condiciones de cultivo previas a la diferenciación	83
8. CONCLUSIONES	86
9. PERSPECTIVAS	87
10. BIBLIOGRAFÍA	88
ANEXO	92

ABREVIATURAS

Bmp4	Proteína morfogenética de hueso 4
<i>brn2</i>	Referido al gen del factor de transcripción 2, clase 3, dominio POU
BSA	Albúmina sérica bovina
<i>cdx2</i>	Se refiere al gen de homeocaja caudal tipo 2 , de ratón
c-Myc	Factor transcripcional mielocitomatosis
Dusp9	Fosfatasa 9 dual específica de Erk
EpiSC	Células troncales epiblasticas
Erk	Cinasa regulada por señal extracelular, mediador intracelular de la vía de las proteína cinasas activadas por mitógenos
FACS	Clasificación de células activada por fluorescencia
Fgf4	Factor de crecimiento de fibroblastos 4
<i>fgf5</i>	Referido al gen del factor de crecimiento de fibroblastos 5
Fgf8	Factor de crecimiento de fibroblastos 8
GFP	Proteína verde fluorescente
GPS	Glutamina-penicilina-estreptomicina
GSK-3	Cinasa 3 de la glicógeno sintasa
ICM	Masa celular interna
Id	Proteínas inhibidoras de la diferenciación
iPS	Células troncales pluripotentes inducidas
Jak	Proteínas cinasas Janus
<i>klf4</i>	Se refiere al gen de ratón del factor 4 kruppel-like
KSR	Reemplazo de suero
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LPA	Ácido lisofosfatídico
mESC	Células troncales embrionarias de ratón
<i>nanog</i>	Gen de homeocaja Nanog
NPC	Células precursoras neurales
<i>oct4</i>	Gen de ratón del factor de transcripción 1 de dominio POU, clase 5,

<i>otx2</i>	Homólogo 2 del gen <i>orthodenticle</i>
<i>pax6</i>	gene 6 de caja pareada
PDL/L	Poli-d-lisina/laminina
PLO/L	Poli-l-ornitina/laminina
Shh	Morfógeno <i>sonic hedgehog</i>
Smad	Referido a las proteínas efectoras de la señalización de BMPs
<i>sox1</i>	Se refiere al gen 1 conteniendo la caja SRY, de ratón
<i>sox2</i>	Se refiere al gen 2 conteniendo la caja SRY, de ratón
Stat3	Proteínas 3 transductora de señal y activadora de la transcripción
Wnt	Proteína relacionada a <i>wingless</i>
ZO-1	Proteína 1 de uniones ocluyentes

RESUMEN

Desde la derivación de las células troncales pluripotentes de ratón (mESC), en 1981 por Evans y Kaufman, estas células han sido ampliamente estudiadas debido a sus características de auto-renovación a largo plazo y de dar lugar a cualquier tipo celular del embrión incluyendo la línea germinal, lo que abre la posibilidad de su empleo para reparación y reemplazo de tejidos perdidos ó dañados. Con este objeto las mESC han sido empleadas como modelo de estudio del proceso de diferenciación *in vitro* para la obtención de células precursoras neurales (NPC). En este trabajo realizamos modificaciones al protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente para la obtención de NPC a partir de ESC, reportado por Ying y Smith en el 2003. Este método de diferenciación rinde un alto porcentaje de NPC (75%) en corto tiempo (4 días), es un sistema libre de suero y co-cultivo, emplea un medio completamente definido y esto permite el estudio del efecto de inhibidores y factores de crecimiento durante la inducción de diferenciación. Empero sus ventajas, las células ESC inducidas a diferenciar en monocapa, presentan dos principales crisis durante la misma (muerte y dificultad para mantenerse adheridas a la caja de cultivo). Con el objetivo de superar esas limitaciones, nos interesamos en conocer el efecto de la introducción de un período de cultivo libre de suero, en medio N2B27 adicionado con LIF (factor inhibidor de leucemia) en el desempeño de este protocolo. Hemos encontrado que un período de cultivo libre de suero previo a la diferenciación, parece no ser un factor determinante en el comportamiento de este método. Por ende, hemos realizado ajustes a la composición del medio de cultivo, pruebas en diferentes sustratos y modificaciones al procedimiento para recubrir cajas con gelatina (el sustrato ideal para la diferenciación). Hemos identificado factores, que al combinarse permiten tener nuestro mayor porcentaje de NPC en el décimo día de diferenciación. Cabe aclarar que aún con esta combinación de factores este sistema para inducir diferenciación ha mostrado ser poco robusto, obteniendo porcentajes de NPC que van desde el 19.6 % hasta el 47.2%.

ABSTRACT

Mouse embryonic stem cells (mESC) have been widely studied, due to their ability to self-renew and give rise to all the cell types in the embryo. This offers the possibility of being an unlimited source of cells that could be used for cell replacement therapy (e.g. in neurodegenerative disorders). As a prerequisite to achieve this goal, we must identify and characterize the mechanisms of neurogenesis in the embryo. In the present work we are interested in the optimization of the protocol for inducing differentiation in adherent monolayer, which is used to obtain NPCs from ESC (previously reported by Ying in 2003) by introducing a period of serum free culture, prior cell differentiation. We found that this period of serum free culture is not the most important factor in determining the optimal outcome of this method, and hence, we implemented adjustments in medium composition and the procedure to cover culture plates with gelatin. Optimizing these factors produced the highest percentage of neural precursor cells, by the tenth day of differentiation. However, despite these modifications, this method for inducing differentiation is not robust in our laboratory conditions; in consequence, the differentiation efficiency fluctuates from 19.6% to 47.2%.

1. INTRODUCCIÓN

Las dos principales características que definen a una célula como troncal, son la capacidad de auto-renovación por largo plazo, sin presentar senescencia, y la capacidad para diferenciar en uno o más tipos de células especializadas (Rippon and Bishop, 2004). El equilibrio entre estos procesos permite el desarrollo apropiado de un organismo, así como la renovación y el mantenimiento de los tejidos, asegurando así su integridad y funcionamiento correcto en la edad adulta. Teniendo en cuenta estas características, las células troncales pueden clasificarse de la siguiente manera (Baizabal et al., 2003):

Células troncales totipotentes, son células que tienen la capacidad de dar origen a todos los tejidos del embrión y a tejidos extra-embriónicos.

Células troncales pluripotentes, son células con capacidad de dar origen a todos los tejidos embrionarios, incluyendo la línea germinal, pero no pueden formar tejido extraembrionario.

Células troncales multipotentes, definidas como células que dan origen a un número limitado de tipos celulares, dentro de este tipo se encuentran las células troncales del adulto.

Las cualidades de las células troncales las colocan como blanco de interés terapéutico, dadas sus propiedades que pueden ser aplicadas en reparación o reemplazo de tejidos dañados. Esto sumado al hecho del descubrimiento de neurogénesis en el cerebro adulto, sugiere la posibilidad de emplearlas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, caracterizadas por pérdida masiva y progresiva de neuronas en el cerebro ó en la médula espinal.

La terapia celular empleando células troncales pluripotentes embrionarias (ESC) para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, ofrece la posibilidad de ser una fuente de producción a gran escala del tipo neuronal que sea necesario reemplazar ó

de ser empleadas para proveer un ambiente enriquecido, a través del implante de células precursoras neurales (NPC) que permitan la supervivencia de las neuronas huésped mediante la producción y liberación de factores neurotróficos. El objetivo al que la terapia celular se enfoque, dependerá de la patología de cada enfermedad (Lunn et al., 2011).

Las enfermedades neurodegenerativas para las cuales se ha propuesto el uso de células troncales como terapia, incluye la enfermedad de Parkinson, Huntington, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y atrofia espinal muscular. El trasplante de injertos de tejido fetal, NPC, neuronas derivadas de ESC, células troncales mesenquimales y de células troncales pluripotentes inducidas (iPS,) se ha llevado a cabo en modelos roedores de esas enfermedades, encontrando mejora en las funciones perdidas (Lunn et al., 2011). En el 2008 se reportó que esas enfermedades incurables, representan un problema económico y social que afectó a más de 20 millones de personas alrededor del mundo (Ormerod et al., 2008).

El trasplante de tejido neural fetal se ha realizado a personas con Parkinson, encontrando cierto grado de alivio en la sintomatología de los pacientes (Piccini et al., 1999). Sin embargo, esta alternativa presenta objeciones como la limitada disponibilidad de tejidos fetales y que los injertos causan reacciones secundarias en los pacientes (Okano, 2010). Los resultados de esos estudios clínicos son variables, encontrando casos en los que se ha observado recuperación y casos en los que esta es poca o nula. Se ha sugerido que esto es debido a la diversidad en los procedimientos empleados en la manipulación del tejido, lo que acarrea una variación significativa en su composición (Winkler et al., 2005).

Por otra parte, pensar en la regeneración de una zona del sistema nervioso, involucra la recuperación del tipo neuronal degenerado, que las proyecciones axonales se regeneren en la dirección adecuada y la reparación de las funciones neuronales perdidas. Esto exige la comprensión del desarrollo del sistema nervioso, desde la diferenciación de células troncales pluripotentes hasta células troncales neurales y de este punto hacia los tres sub-linajes neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

La comprensión del desarrollo neural nos permitiría la recapitulación del mismo y se podría emplear este conocimiento para la regeneración de tipos neuronales dañados (Okano, 2010). Para tal efecto deben definirse los factores genéticos, epigenéticos, y la contribución de factores ambientales que puedan dirigir la diferenciación de las células troncales hacia un tipo celular en particular (Brignier and Gewirtz, 2010, Niwa, 2007). Con el objetivo de comprender la señalización implicada durante la diferenciación, se ha empleado como modelo a las mESC. A la fecha se han desarrollado varios protocolos para inducir diferenciación *in vitro* de mESC a precursores neurales, que posteriormente puedan ser diferenciados hacia tipos neuronales específicos (ej. neuronas dopaminérgicas, gabaérgicas, motoras), astrocitos y oligodendrocitos.

En este trabajo, nos interesamos en realizar modificaciones para la optimización del protocolo para inducir diferenciación en monocapa de células (en adelante protocolo para inducir diferenciación en monocapa) de mESC a NPC, dado que se reportó una alta eficiencia de obtención de NPC en corto tiempo, es un sistema menos heterogéneo que la diferenciación vía cuerpos embrioides y se lleva a cabo en un medio químicamente definido (Aiba et al., 2006; Ying and Smith, 2003). No obstante las ventajas del sistema para inducir diferenciación en monocapa, presenta dificultad para mantener a las células adheridas a la caja de cultivo y ha reportado abundante muerte celular durante la inducción de la diferenciación, estas dificultades han sido asociadas al cambio de condiciones de cultivo (Ying and Smith, 2003). Lo anterior debido a que las que las células son mantenidas de manera rutinaria en medio con suero y densidades altas, respecto a cuando son inducidas a diferenciar (medio sin suero, baja densidad, sin factores de crecimiento). Consistente con las dificultades mencionadas, los autores de este método de diferenciación, Ying y Smith, proponen estrategias para superar estos problemas, de manera que a partir de sus propuestas, la experiencia propia obtenida durante nuestros experimentos y el análisis de los reportes de diferentes condiciones de cultivo para el mantenimiento del estado pluripotente *in vitro*, en este trabajo nos interesamos en saber si el hecho de introducir un período de cultivo, previo a la diferenciación en medio libre de suero puede aumentar la adherencia de las células y la eficiencia de obtención de NPC de mESC.

2. ANTECEDENTES

2.1 El establecimiento del tubo neural en vertebrados

En el comienzo del desarrollo, el cigoto comienza una serie de divisiones celulares, dando lugar a un embrión de 2, 4, 8 células. En este momento las células de la superficie externa del embrión se polarizan, se incrementa la expresión de Cdx2 (proteína del gen de homeocaja caudal tipo 2 de ratón) que actúa reprimiendo la expresión de Oct4 (factor de transcripción 1 de dominio POU, clase 5) y Nanog (Factor de transcripción del gen de homeocaja nanog). Estos eventos definen la especificación de linaje más temprana y se establecen las células que darán lugar al trofoectodermo (que da lugar a tejido extraembrionario) y a las células de la masa celular interna (ICM, que dan lugar a tejido embrionario) (Ralston and Rossant, 2008). Para el tiempo en que el embrión se implanta, las ICM han dado lugar al epiblasto y comienza la gastrulación. Este proceso es caracterizado por: 1) transición epitelio-mesénquima, en el que las células del epiblasto migran a lo largo del surco primitivo 2) Extensión convergente en el que el embrión sufre una extensión de eje corporal, en el que hay movimiento de células organizado y coordinado, resultando en intercalación de células, re-arreglo de su posición original y en el establecimiento de las tres capas germinales (Stepniak et al., 2009).

Después de la gastrulación el mesodermo es dividido en dos regiones definiendo así el lado derecho e izquierdo del cuerpo, esta separación es efectuada por el notocordo, un grupo de células caracterizado por la expresión de Brachyury. El notocordo se encuentra rodeado de ectodermo por arriba de él, el endodermo debajo y el mesodermo a los lados derecho e izquierdo. La placa neural se establece por la actividad de Fgf8 (factor de crecimiento de fibroblastos 8) proveniente del endodermo primario sobre el ectodermo y posteriormente la neurogénesis se mantiene por la inhibición de la señalización de BMP (proteína morfogenética de hueso) (Vieira et al., 2010). En la placa neural la expresión de E-cadherina se reemplaza por N-cadherina (Stepniak et al., 2009).

En la parte central del ectodermo, comienza la neurulación, proceso en el que la placa neural se engrosa y se enrolla como un tubo, originando así el tubo neural, que dará origen al cerebro y la médula espinal. Los mecanismos por los cuales la neurulación tiene lugar, es a través del empaquetamiento y cambio de forma de las células para favorecer que el ectodermo se enrolle y se cierre por la parte dorsal, formando así el tubo neural (Vieira et al., 2010).

2.2 Características de las células troncales embriónicas pluripotentes de ratón

Las células troncales embriónicas pluripotentes (ESC) poseen la capacidad de auto-renovarse y de generar una progenie diferenciada (Watt and Driskell, 2010). Tienen el potencial de generar un organismo completo (contribuyendo incluso a la línea germinal) sin dar lugar a tejido extraembrionario. Las células troncales pluripotentes de ratón, son el modelo *in vitro* de las células de la masa celular interna del embrión en etapa de blastocisto del cual son derivadas (figura 1a).

Las ESC de ratón fueron derivadas por primera vez por Evans y Kaufman en 1981, ellos disectaron las células de la masa celular interna del blastocisto y las disociaron en suspensión de célula única, en un medio enriquecido con suero fetal bovino inactivado por calor, sobre una capa de fibroblastos irradiados. Bajo estas condiciones de cultivo emergieron colonias morfológicamente similares a las células derivadas de carcinoma embrionario, estas células fueron llamadas mESC y a diferencia de aquellas presentan cariotipo normal (Armstrong et al., 2012).

Las ESC poseen la capacidad de integrarse en un embrión huésped, que posteriormente es implantado en una hembra pseudopreñada dando lugar a ratones quiméricos (Rossant, 2008). Morfológicamente las ESC de ratón crecen como colonias compactas, refringentes y abultadas (figura 1b).

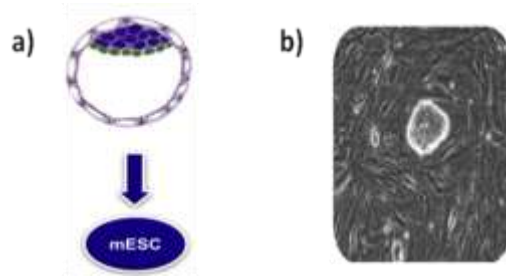


Fig. 1 | a) Esquema de las células del embrión de ratón en etapa de blastocisto, En color azul se presentan las células de la masa celular interna de las cuales son derivadas las células troncales pluripotentes de ratón; b) Fotografía de la morfología de una colonia típica de células troncales embrionarias de ratón creciendo sobre una capa de células alimentadoras (Chenoweth et al., 2010).

Las mESC se distinguen por la expresión de factores de transcripción que regulan el estado pluripotente (Oct4, Nanog, Sox2) a través de un circuito de autorregulación, en el que estos factores de transcripción se unen a sus propios promotores (figura 2).

Oct4 participa previniendo la diferenciación hacia trofoectodermo interactuando con Cdx2 formando un sistema de inhibición recíproco, la sobreexpresión de Oct4 estimula la diferenciación en endodermo primitivo, de manera que la ESC son altamente sensibles a los niveles de expresión de *oct4*. Nanog por su parte interviene a través de limitar la frecuencia con que las mESC se comprometen a diferenciar, su sobreexpresión es capaz de mantener la pluripotencia de las mESC en ausencia de LIF. Sox2 coopera con Oct4 en la activación de sus genes blanco (*oct4*, *sox2*, *nanog*), los embriones *sox2* nulos mueren después de la implantación y en las ESC *knockdown* de *sox2* se induce diferenciación hacia varios linajes y a trofoectodermo (Niwa, 2007).

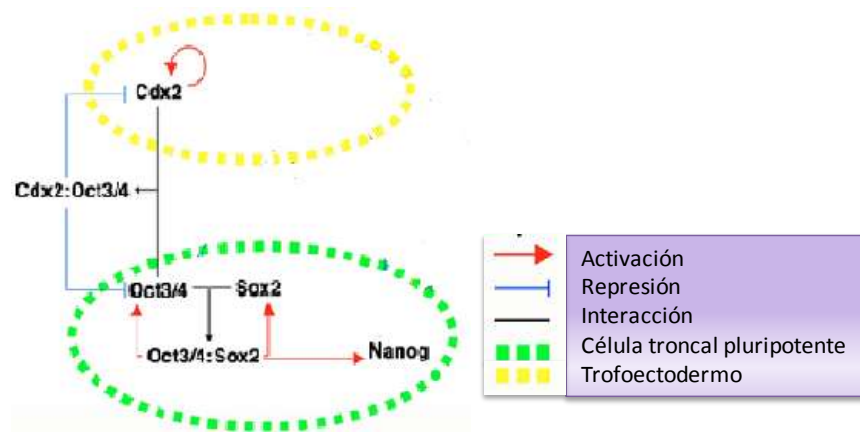


Fig. 2| Red de los principales factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog que controlan el estado pluripotente de las mESC. Oct4 interactúa con Cdx2 formando un complejo de inhibición recíproco. Oct4 y Sox2 forman un complejo que se une a sus propios promotores para activar su transcripción, de igual manera activan la transcripción de *nanog* (Modificado de Niwa, 2007).

2.3 Mantenimiento del estado pluripotente de las células troncales embriónicas de ratón en cultivo

El mantenimiento del estado pluripotente de las mESC en cultivo, está dado a través de varias vías de señalización, que tienen por objetivo estimular la auto-renovación al prevenir la diferenciación durante la proliferación.

El estímulo o bloqueo de estas vías de señalización, en diferentes condiciones de cultivo, permite mantener la pluripotencia de las mESC. Las vías de señalización involucradas se describen a continuación:

2.3.1 La vía de LIF/Jak/Stat3

La adición de LIF o la liberación del mismo de fibroblastos mitóticamente inactivos, activa la vía canónica Jak/Stat3 (proteína cinasa Janus / proteína 3 transductora y activadora de la transcripción). La activación de esta vía en medio

de cultivo con suero ha sido la condición en la que las mESC han sido derivadas y cultivadas por largo tiempo. Esta vía se activa como consecuencia de la unión de LIF a un receptor heterodimérico compuesto del receptor- β de LIF y gp130, Jak fosforila y activa a Stat3, que entra al núcleo para activar la transcripción de genes blanco (Burdon et al., 2002).

Dentro de los blancos propuestos para Stat3 se encuentra c-Myc, factor de transcripción que promueve la expresión de la ciclina E, favoreciendo la transición G1/S en el ciclo celular. La sobreexpresión de una mutante constitutivamente activa de *c-myc* ha mostrado ser capaz de mantener la auto-renovación de las mESC de manera independiente de LIF (Niwa, 2007).

Otro de los blancos propuestos para la señalización de LIF/Jak/Stat3 es el factor de transcripción Klf4 cuyos niveles de expresión cambian rápidamente en respuesta a adicionar ó retirar LIF del medio de cultivo. Se ha determinado que en respuesta a LIF la consecuente localización de Stat3 en el núcleo promueve la transcripción de *klf4*, el papel de Klf4 se da a través de inducir la transcripción de *nanog* por unirse a regiones proximales y distales de su promotor (Zhang et al. 2010).

2.3.2 La vía LIF/Jak/Stat3 en combinación con la vía Bmp4/Smad/Dusp9

En medio de cultivo libre de suero la vía de LIF/Jak/Stat3 actúa a través de la estimulación de la transcripción de *c-myc* y *klf4*, como se describió en la sección 2.3.1. Por su parte la señalización Bmp4/Smad/Dusp9 actúa como se describe a continuación: Bmp4 se a su receptor tipo serina-treonina y promueve la fosforilación y activación de sus efectores las proteínas Smad, Smad1/5 y Smad4 se internan en el núcleo y se unen a la región del promotor de *dusp9* y activan su transcripción. Posteriormente Dusp9 (Fosfatasa 9 dual específica de Erk) actúa sobre Erk1/2 (Cinasa regulada por señal extracelular) removiendo su fosfato y en consecuencia inhibiendo la señalización Fgf4/Erk; ésta vía de

señalización fue reportada como la principal responsable de la salida del estado pluripotente de mESC, al permitir la adquisición de capacidad de responder a las señales de inducción para la segregación de las tres capas germinales (Kunath et al., 2007, Li et al., 2012).

Además de la prevención de la diferenciación a través de Dusp9, la señalización Bmp4/Smad actúa promoviendo la transcripción de los genes *id* (figura 3). Las proteínas Id (inhibidoras de la diferenciación) se unen a los factores de transcripción pro-neurales tipo bHLH, como Mash1 y Neurogenina 2 y favorece su degradación por el proteasoma. En ausencia de Id, Mash1 forma heterodímeros con las proteínas E, el heterodímero permite la fosforilación de Mash1 causando un incremento de su estabilidad y esto promueve la transcripción de sus genes blanco. (Vinals et al., 2004; Ying et al., 2003a).

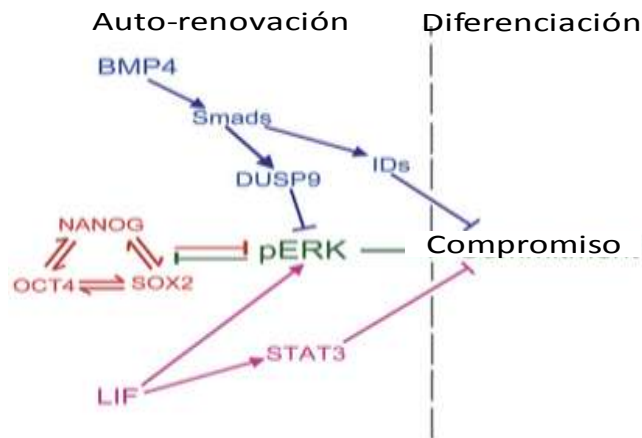


Fig. 3| Modelo propuesto para el mantenimiento del estado pluripotente de las mESC en medio de cultivo libre de suero (N2B7) adicionado con LIF y BMP4. Del lado izquierdo se muestran que LIF actúa a través de la fosforilación de STAT3 y así promueve el mantenimiento de los factores de transcripción que regulan el estado pluripotente. Por su parte BMP4 actúa a través de sus efectores Smad1/5 que se unen a Smad4, este complejo entra al núcleo favoreciendo la transcripción de DUSP9 que a su vez inhibe la fosforilación de ERK; de manera paralela BMP4 induce la expresión de proteínas Id lo que favorece la degradación de factores de transcripción pro-neurales. Como efecto final LIF y BMP4 bloquean el compromiso y favorecen la auto-renovación de las mESC (Modificado de Li, et al., 2012).

2.3.3 Inhibición de la señalización de Fgf4/Erk y el estímulo de la señalización de Wnt (Condición 2i)

Se ha descrito que las ESC *fgf4*^{-/-} inducidas a diferenciación neural o mesodermal siguen expresando Oct4 y Nanog, estas características son compartida por las ESC *erk2*^{-/-}. De esta manera se llegó a la conclusión de que la señalización Fgf4/Erk permite la transición de la auto-renovación a la adquisición de competencia para diferenciar a un linaje (Kunath et al., 2007). Con base en estos resultados, Ying y col., en el 2008 emplearon el inhibidor de Mek (PD0325901) para inhibir la señalización Fgf4/Erk y así mantener la auto-renovación de las mESC. Sin embargo, notaron que al solo inhibir esta vía, gran cantidad de mESC morían y tomando en cuenta el reporte de que la inhibición de Gsk3 mantiene indiferenciadas a células ESC de ratón y humano (Sato et al., 2004) ; decidieron inhibir paralelamente a Gsk3 (Cinasa 3 de la glicógeno sintasa) mediante el uso del inhibidor CHIR99021, lo que aumentó la supervivencia de las mESC cultivadas en medio libre de suero (figura 4).

La inhibición de Gsk3 mantiene constitutivamente activa la señalización de Wnt, por ser parte del complejo que en ausencia de Wnt fosforila a β -catenina, haciéndola blanco de degradación por el proteasoma. Con respecto a ello se ha reportado que la señalización de Wnt regula la transición del estado pluripotente de ESC a células troncales epiblasticas (EpisC) y que el estímulo de esta vía mediante Wnt3a, en presencia de LIF y en medio libre de suero, es capaz de soportar la auto-renovación y pluripotencia de las ESC (ten Berge et al., 2011).

Mediante el uso de estos dos inhibidores (2i) es posible mantener a las ESC indiferenciadas y proliferando, con capacidad de integrarse en blastocistos y dar origen a ratones quiméricos que transmiten a la línea germinal (Ying et al., 2008). Estas condiciones de cultivo (2i en medio libre de suero) son las más estrictas para el mantenimiento del estado pluripotente reportadas al día de hoy.

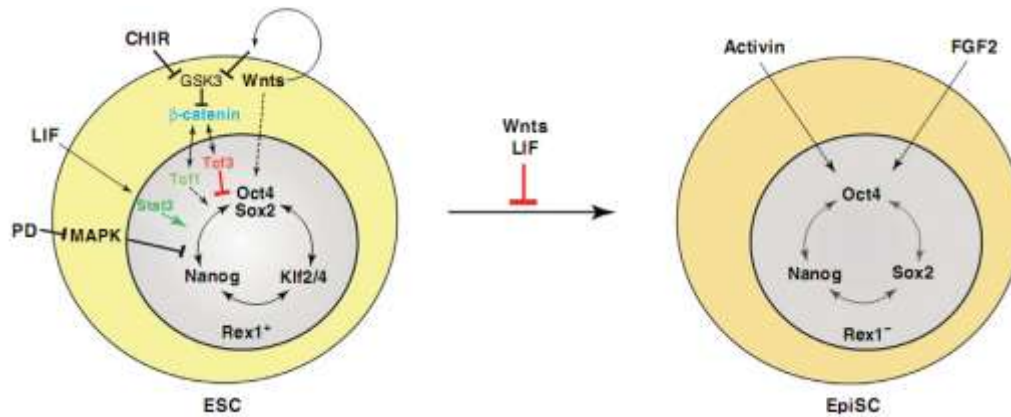


Fig. 4| El cultivo en medio N2B27 ha permitido la identificación de las vías de señalización que mantienen el estado pluripotente de las mESC (izquierda), por promover su proliferación e inhibir los estímulos que promueven la diferenciación hacia el estado pluripotente de células troncales epiblastémicas (Derecha). LIF contribuye a la expresión de los factores de transcripción del estado pluripotente (Oct4, Sox2 y Nanog) a través de la activación de STAT3. La inhibición de Mek y por lo tanto de la vía Fgf4/Erk bloquea la adquisición de competencia de las mESC para diferenciar a un linaje. Por su parte la activación de la vía de Wnt, por el inhibidor de Gsk-3, favorece la auto-renovación a través de la interacción de β -catenina con Oct4 incrementando así la expresión de los genes blancos de Oct4 (Ying, 2008, Wray and Hartmann, 2012).

2.4 Obtención de precursores neurales *in vitro*

La obtención de tipos celulares neuronales ó gliales *in vitro*, como modelos de estudio de diferenciación, involucra la derivación de células precursoras neurales, definidas como células con capacidad de auto-renovarse y de diferenciar a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Las NPC expresan factores de transcripción Sox1, Sox2, Pax6, Otx2 como marcadores de células precursoras multipotentes. Los enfoques en los que se ha basado el desarrollo de protocolos de diferenciación para la obtención de NPC son principalmente (Cai and Grabel, 2007):

- a) Imitando el ambiente del embrión, permitiendo la interacción entre células que dé lugar a la señalización apropiada para el establecimiento del neuroectodermo.

Esto a partir de la formación de cuerpos embrioides, entidades formadas en el proceso de cultivo de células troncales en suspensión, en los que se adopta una estructura casi esférica que imita un estado de cigoto post-implantación (Niwa, 2007).

- b) Mediante el cultivo de las ESC en densidad baja y en medio libre de suero, permite el establecimiento de neuroectodermo a través del mecanismo por *default*, eliminando las fuentes de moléculas inhibitoras de la diferenciación neural y donde la señalización autócrina juega un papel esencial.

Independientemente del enfoque usado para la obtención de NPC, la diferenciación de las ESC se da a través de múltiples pasos que son comparables a la neurogénesis en el embrión, donde las células transitan de un estado pluripotente como células de la masa celular interna a células pluripotentes del epiblasto, con capacidad para segregar a las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. Del ectodermo se establece el neuroectodermo, que origina el sistema nervioso central (Abranches et al., 2009; Aiba et al., 2006; Sternecker et al., 2010).

2.4.1 Características de la diferenciación en monocapa adherente

La metodología de diferenciación en monocapa adherente, permite la inducción de la diferenciación de células troncales embrionarias de ratón a precursores neurales. Esta técnica ofrece un alto rendimiento en la obtención de precursores, en un período de tiempo corto en comparación a otros métodos. En este protocolo, en el quinto día de cultivo más del 75% de las células expresaron marcadores propios de neuroectodermo y NPC (ver figura 5).

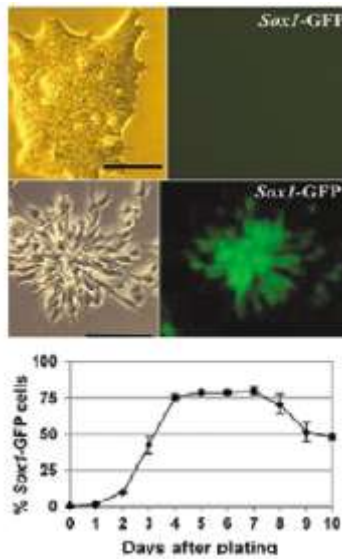


Fig. 5] Adquisición de la expresión de GFP en la línea celular 46C (*sox1-gfp*) durante la diferenciación en monocapa adherente. Arriba se presenta una colonia de mESC de la línea celular 46C sin diferenciar en campo claro (izquierda) y que por lo tanto no expresa GFP (derecha). En medio se muestra una roseta neural (izquierda) obtenida por diferenciación en monocapa adherente, la expresión de GFP (derecha) como reportero de Sox1 indica que han adquirido identidad de precursor neural. Abajo se muestra la cinética del porcentaje de células que adquieren identidad de NPC en cada día de diferenciación (Modificada de Ying, 2003).

La mayoría de los precursores neurales obtenidos mediante este sistema de diferenciación dan lugar principalmente a neuronas gabaérgicas. Sin embargo son capaces de responder *in vitro* a Shh y Fgf8 (figura 6), llegando a expresar marcadores propios de neuronas dopaminérgicas como Tirosina hidroxilasa (Th). Además conservan capacidad de diferenciar como astrocitos y oligodendrocitos (Ying and Smith, 2003).

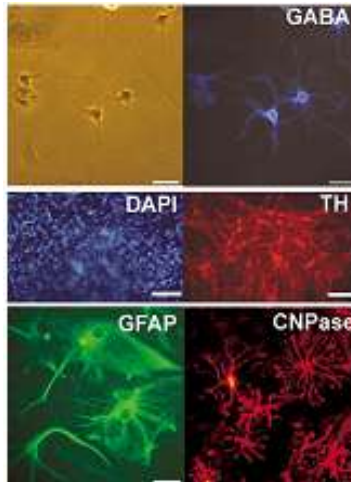


Fig.6] Arriba: las NPC obtenidas en monocapa tienden a diferenciarse como neuronas GABAérgicas que expresan el neurotransmisor GABA. En medio: las NPC obtenidas en monocapa conservan capacidad para responder a *shh* y *fgf8* para dar lugar a neuronas TH positivas (marcador de neuronas dopaminérgicas). Abajo: las NPC son capaces de diferenciarse a astrocitos y oligodendrocitos, marcados con GFAP y CNPase respectivamente (Ying, 2003).

Es importante indicar que el análisis del perfil de expresión sugiere que durante la diferenciación de ESC a NPC en monocapa, se tiene un sistema de diferenciación menos heterogéneo que en el sistema de cuerpos embrioides tratados con ácido retinoico. Además a lo largo de 6 días de diferenciación en monocapa, se distinguen dos transiciones en el perfil de expresión, dividiendo este proceso en tres fases, que correlacionan con los pasos de diferenciación *in vivo*, como se describe a continuación:

Durante la diferenciación en monocapa adherente las células ESC, pasan de una identidad de ICM a ectodermo primitivo y de esta etapa a neuroectodermo. El nivel de expresión de *oct4* (marcador de pluripotencia) disminuye precipitadamente después de los tres días de diferenciación al tiempo que la expresión de *pou3f2/brn2*, requerido para establecer el linaje neural, se incrementa justo después del tercer día al igual que otros genes relacionados con el linaje neural, como *ascl1/mash1*, *zic1*, *pax6*.

Por otra parte, *Fgf5*, marcador de ectodermo primitivo, aumenta en el día 1, tiene un pico en el nivel de expresión al día 2 y disminuye su expresión al día 4. De esta manera se definen las tres etapas de la diferenciación en monocapa (ver figura 7), sugiriendo que la diferenciación hacia progenitores neurales ocurre vía ectodermo primitivo, tal como ocurre en el desarrollo *in vivo* (Aiba et al., 2006).

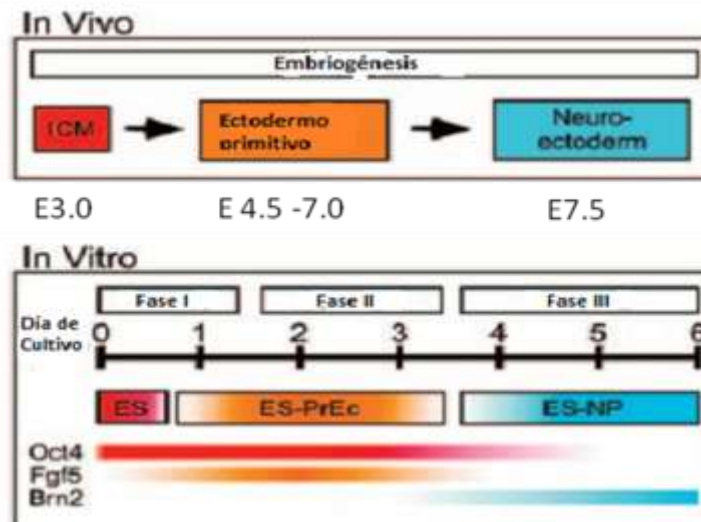


Fig. 7] Comparación de las fases embrionarias en el desarrollo a neuroectodermo (arriba) con las fases de diferenciación de mESC a NPC en cultivo en monocapa (abajo). *In vitro* las células ESC representan a las ICM del embrión. Las ICM se desarrollan como ectodermo primitivo en el embrión e *in vitro* las ESC diferencian a células semejantes a ectodermo primitivo. En el embrión el ectodermo primitivo da lugar al neuroectodermo, mientras que *in vitro* las células semejantes a ectodermo primitivo diferencian a NPC que representan al neuroectodermo en el embrión (E=día embrionario, Modificado de Aiba et al., 2006)

Los precursores neurales obtenidos en este sistema de diferenciación pueden formar rosetas neurales, alrededor de sexto y séptimo día de diferenciación, asemejando la formación del tubo neural *in vivo*. En las rosetas la proteína ZO-1 es detectada en la parte central, semejante a como es localizada en la zona apical de las células neuroepiteliales. Además la marca de β -III tubulina como marcador de neuronas inmaduras, es detectada inicialmente en la superficie externa de la roseta, como ocurre

en el tubo neural en desarrollo en donde las neuronas comienzan a emerger en la superficie pial (Abranches et al., 2009) (figura 8).

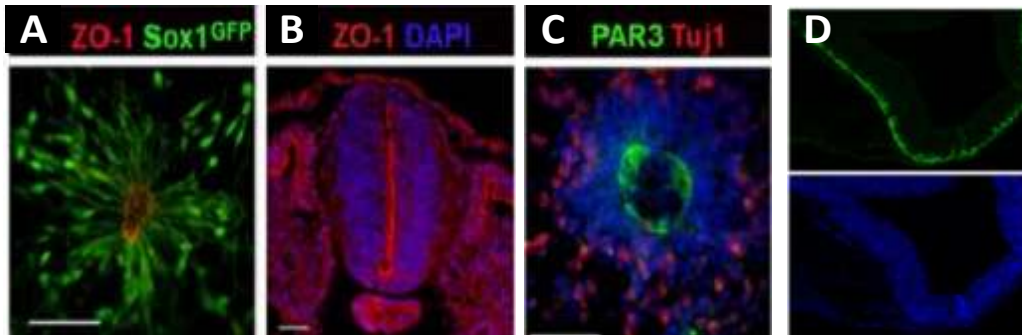


Fig. 8| A) Localización de la proteína ZO-1 (como marcador de uniones estrechas en epitelio) en la parte central de la roseta neural obtenida por diferenciación de ESC en monocapa adherente. B) Localización de la proteína ZO-1 en la superficie luminal del tubo neural embrionario. C) Marca de β III-tubulina (como marcador de neuronas inmaduras) en la parte exterior de la roseta. D) Marca de β III-tubulina en la superficie pial del tubo neural en desarrollo de un embrión de ratón E10.5 (Modificado Abranches et al., 2009).

Finalmente el método de diferenciación de células mESC a NPC en monocapa adherente, permite el análisis y manipulación del proceso de diferenciación, disminuye las confusiones que se puedan general del co-cultivo sobre células estromales, evita el uso de medio con componentes no bien caracterizados (suero). También evita el uso de ácido retinoico que tiene un efecto pleiotrópico y afecta la especificación regional de las neuronas obtenidas (Ying and Smith, 2003).

2.5 ¿Por qué optimizar el protocolo de Ying y Smith para inducir diferenciación en monocapa adherente?

Nuestro interés en inducir diferenciación en monocapa adherente se basa en tres características de este método:

1. Las condiciones de cultivo: como la diferenciación se lleva a cabo en un medio libre de suero se reduce la variabilidad en la calidad de cultivo entre distintos lotes de suero. El medio es químicamente definido, lo que permite conocer el efecto de la adición de factores solubles en la obtención de NPC.
2. Facilita el seguimiento bajo el microscopio del proceso de diferenciación porque las células se mantienen adheridas al plato de cultivo.
3. Se tienen poblaciones celulares más homogéneas durante la diferenciación con respecto a otros métodos (ej. método de los cinco pasos). Esto permitiría estudiar las propiedades de cada población con respecto a su potencial de diferenciación a un tipo neuronal específico.

Sin embargo hay dos problemas durante la diferenciación en monocapa adherente, asociados al cambio de condiciones de cultivo de las mESC: 1) poca eficiencia en la adherencia de las mESC a la caja de cultivo, 2) muerte celular durante la diferenciación (Ying and Smith, 2003). Además existen varios reportes en los que ha sido necesario hacer modificaciones al medio de cultivo ó hacer uso de estrategias en el cambio de condiciones de cultivo de las células, de medio con suero a medio sin suero para la obtención de NPC en monocapa (Abranches et al., 2009, Cambray, et al., 2012, Sternecker, et al., 2010, Zeng et al, 2011).

Por estas razones, nos hemos interesado en averiguar y plantear alternativas, para superar los problemas que los autores, Ying y Smith (así como otros grupos) han reportaron durante la diferenciación en monocapa.

Las alternativas de Ying y Smith son:

- Adicionar glutamina y β -mercaptoetanol, a concentraciones de 0.5-1mM y 0.1mM respectivamente.
- Aumentar la proporción de medio neurobasal y suplemento B27, respecto de la proporción de medio DMEM/F12 y suplemento N2, en el medio N2B27, lo cual

favorecería el pegado de las células y su viabilidad, sin embargo podría disminuir la eficiencia de obtención de NPC.

- Aumentar la densidad en que se colocan las células en el plato para comenzar la diferenciación, lo cual puede disminuir la cantidad de muerte celular, pero también disminuye el porcentaje de células diferenciadas.
- Adicionar LIF durante el primer día de cultivo sin suero a baja densidad, aumenta la eficiencia de adherencia de las células a la caja pero retrasa la diferenciación.

En nuestro caso, la adición de LIF en las primeras 24 h a baja densidad, es de particular interés por el hecho de que el mismo autor, Ying, reportó que el uso de BMP4 en combinación con LIF, en el medio N2B27, suprime la diferenciación y mantiene la auto-renovación de las mESC sin necesidad de células alimentadoras (Ying et al., 2003a).

La propuesta del uso de BMP4 surgió de la observación de que en el medio N2B27 la adición de LIF, no es suficiente para mantener el estado pluripotente de las mESC. Las mESC cultivadas en N2B27+LIF tienen atenuación en la auto-renovación y después de 2-3 pases de cultivo, la proporción de células diferenciadas aumenta. Las células que emergen expresan GFP en la línea celular 46C (*sox1-gfp*), es decir, adquieren identidad de precursores neurales. Con base en lo anterior, ellos emplearon un conocido antagonista de la diferenciación neural: BMP4, que en combinación con LIF mantienen el estado pluripotente (Ying et al., 2003a) . Un resumen del efecto de LIF y BMP4 en el cultivo de las mESC se presenta en la tabla de la figura 9.

Efecto de LIF y BMP4 en el cultivo de mESC			
Medio	Con suero	Sin suero (N2B27)	Sin suero (N2B27)
Adición de LIF	si	si	si
Adición de BMP4	no	no	si
Resultado	Mantiene pluripotencia de las mESC	<ul style="list-style-type: none"> •El porcentaje mESC que expresa oct4 disminuye •Una proporción de células adquiere expresión de Sox1 (marcador de NPC) 	Mantiene pluripotencia de las mESC

Fig. 9| Tabla que resume el efecto de LIF y BMP4 en las mESC cultivadas en medio con ó sin suero.

Sin embargo, la adquisición de identidad de NPC en medio N2B27+LIF comienza a presentarse hasta el 2-3 pase de cultivo. Esto sugiere que es posible encontrar un punto en el tiempo de cultivo de las mESC en N2B27+LIF, en el que el LIF sea retirado y la densidad de células por cm^2 sea disminuida para acelerar el proceso de diferenciación, con un óptimo rendimiento y sin las dificultades técnicas que hay en el cambio de condiciones como en el protocolo “clásico” reportado por Ying y Smith, para inducir diferenciación en monocapa adherente. De manera que nuestro interés se enfoca en introducir un período de cultivo en medio N2B27 + LIF previo a la inducción de la diferenciación.

3. HIPÓTESIS

La supervivencia y eficiencia en la obtención de NPC a partir de ESC usando el protocolo para inducir diferenciación en monocapa, se puede mejorar por introducir un período de cultivo en medio sin suero adicionado con LIF previo a la diferenciación.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Optimizar el protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente para la obtención de precursores neurales de manera eficiente.

4.2 Particulares

- Implementar las condiciones de cultivo, en nuestro laboratorio, para inducir diferenciación en monocapa adherente para la obtención NPC de mESC.
- Comparar el porcentaje de células que adquieran la identidad de precursores neurales en diferentes condiciones de cultivo previas a la diferenciación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

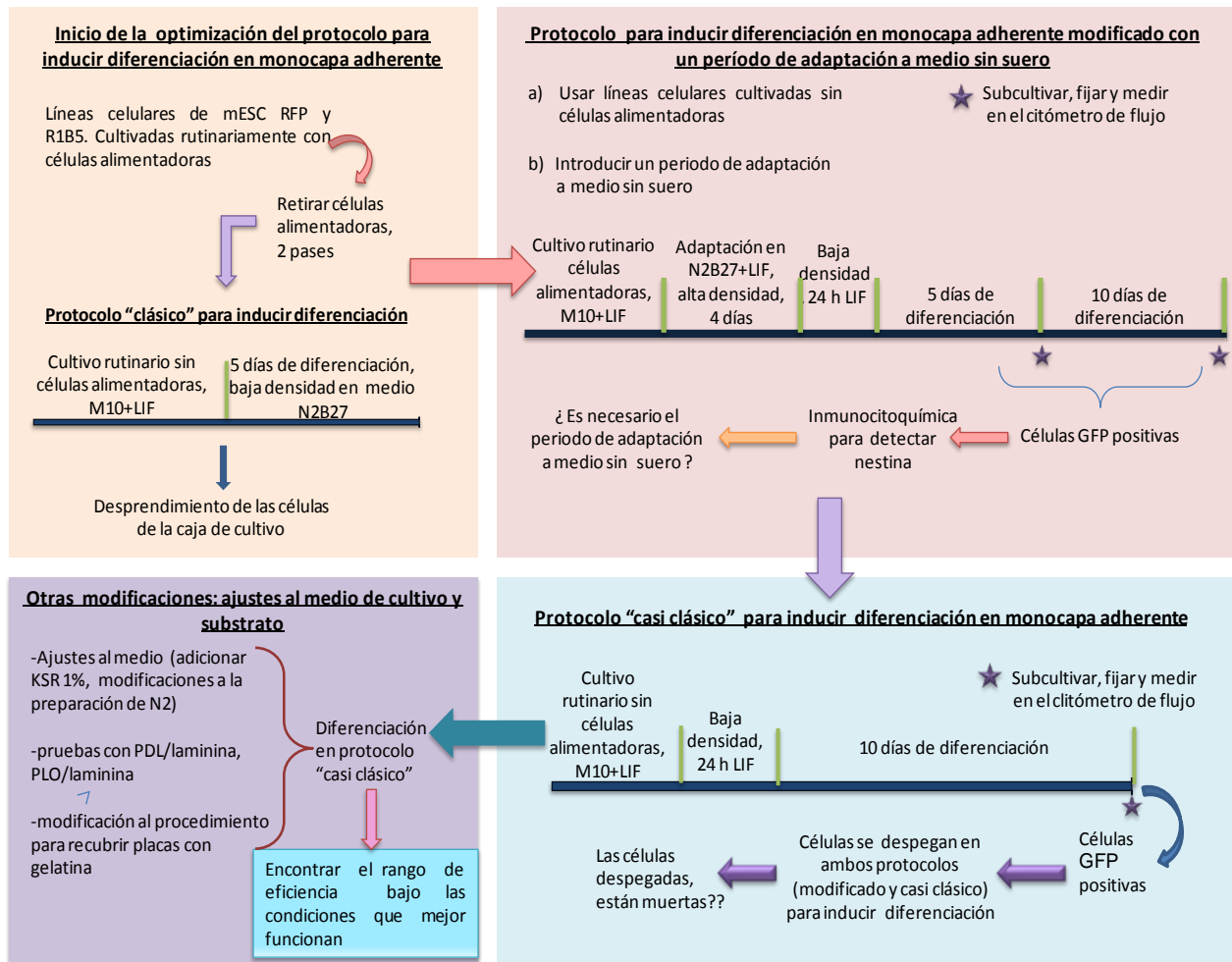


Fig. 10 Diagrama de la estrategia experimental. El recuadro superior a la izquierda muestra las condiciones empleadas en el inicio de la optimización para inducir diferenciación en monocapa adherente, empleando células R1B5 en el protocolo que denominados "clásico" reportado por Ying y Smith en el 2003. El recuadro superior derecho muestra el protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente modificado con un período de adaptación a medio sin suero (N2B27) adicionado con LIF, usando a las líneas celulares 46C y Oct4GiP. El recuadro inferior derecho muestra el protocolo "casi clásico" para inducir diferenciación, realizado con el objetivo de saber si el período de adaptación a medio sin suero es necesario ó si es suficiente con sólo adicionar LIF durante el primer día de cultivo a baja densidad. El recuadro inferior izquierdo describe los ajustes en la composición del medio y en el sustrato que se realizaron para mantener a las células en monocapa durante todo el período de diferenciación. M10: medio para mESC con 10% de suero, N2B27: Medio químicamente definido sin suero, KSR: Suplemento *knockout serum replacement*, empleado como reemplazo de suero en el medio N2B27, PDL: Poli-D-lisina, PLO: Poli-L-ornitina.

5.1 Cultivo Rutinario de las líneas de células troncales embriónicas de ratón sin células alimentadoras

5.1.1 Descongelación de mESC

1. Sacar el vial de células congeladas en el tanque de nitrógeno líquido, y colocarlo dentro de un baño de agua a 37 °C, la descongelación toma como máximo dos minutos.
2. Transferir la suspensión celular dentro de un tubo estéril de 15 ml, agregar lentamente por la pared del tubo 9 ml de medio M10 (previamente incubado a 37°C), agitar ligeramente el tubo al adicionar el medio.
3. Centrifugar durante 4 min a 1000 rpm, retirar el medio.
4. Resuspender el pellet en 1 ml de medio M10, tomar una alícuota de 10 µl, mezclar con 10 µl de azul tripano contar las células y revisar que la viabilidad sea mayor del 50%.
5. Agregar a la caja (de 6 cm) previamente recubierta durante 1h con una solución de gelatina porcina tipo A 0.1%, 3 ml de medio M10 y adicionar la suspensión celular (1 ml).
6. Agregar 1 µl de LIF por cada ml de medio, de manera que el cultivo contenga 1000 U LIF/ µl de medio.
7. Cambiar el medio diariamente y subcultivar cuando el cultivo este 75%-80% de confluencia.

5.1.2 Subcultivo de mESC

Revisar diariamente el cultivo de células ES y subcultivar cuando las colonias no se peguen entre ellas.

1. Aspirar el medio y lavar dos veces con PBS 1X, agregar 0.5 ml de tripsina 0.025% a una caja de 6 cm.
2. Colocar la caja en la incubadora a 37°C durante un minuto y treinta segundos, sacar la caja y mover para terminar de despegar las células e inactivar inmediatamente la tripsina con el suero del medio, agregando 2.5 ml de medio M10.
3. Transferir la suspensión dentro de un tubo estéril de 15 ml, centrifugar 4 min a 1000 rpm, resuspender el pellet con 1 ml de medio M10 subiendo y bajando el medio con una micropipeta de 1000 μ l 15 veces, agregar 2 ml de medio M10 y homogenizar subiendo y bajando 10 veces la suspensión celular por una pipeta de 5ml, cuidando de no hacer burbujas.
4. Tomar 10 μ l de la suspensión, mezclar con 10 μ l de azul tripano y contar el número de células viables.
5. Calcular el volumen de suspensión celular necesario para sembrar el número de células que se desea cultivar, agregar a la caja (de 6 cm) previamente recubierta durante 1h con una solución de gelatina porcina tipo A 0.1%, el volumen de medio M10 necesario de tal manera que el volumen final (volumen de suspensión + volumen de medio) en la caja sea de 4 ml y agregar el volumen calculado de suspensión celular.
6. Agregar 1 μ l de LIF por cada ml de medio, de manera que el cultivo contenga 1000 U LIF/ μ l de medio.
7. Cambiar el medio diariamente y subcultivar cuando el cultivo este 75%-80% de confluencia.

5.1.3 Congelación de mESC

1. Aspirar el medio y lavar dos veces con PBS 1X, agregar 0.5 ml de tripsina 0.025% a una caja de 6 cm.
2. Colocar la caja en la incubadora a 37°C durante un minuto y treinta segundos, sacar la caja y mover para terminar de despegar las células e inactivar inmediatamente la tripsina con el suero del medio, agregando 2.5 ml de medio M10.
3. Transferir la suspensión dentro de un tubo estéril de 15 ml, centrifugar 4 min a 1000 rpm, resuspender el pellet en 1 ml de medio M10 subiendo y bajando el medio con una punta y micropipeta de 1000 μ l 15 veces, agregar 2 ml de medio M10 y homogenizar subiendo y bajando 10 veces la suspensión celular por una pipeta de 5ml, cuidando de no hacer burbujas.
4. Tomar 10 μ l de la suspensión, mezclar con 10 μ l de azul tripano y contar el número de células viables.
5. Volver a centrifugar y resuspender el pellet en el volumen necesario para tener el doble de células por ml de la cantidad que se desea congelar (ej., si desea congelar 1×10^6 células, resuspender en el volumen necesario para tener una suspensión de 2×10^6 células/ml) tomar 0.5 ml de esta suspensión y colocar dentro de un criovial, agregar 0.5 ml de medio de congelación 2X, mezclar por inversión 2 veces.
6. Congelar a -70°C por una semana y después pasar a nitrógeno líquido.

5.1.4 *Composición de soluciones y medios empleados durante el cultivo rutinario de mESC*

PBS 1X (250 ml)

NaCl (Sigma-Aldrich, S5886-500G).....	2g
KCl (Sigma-Aldrich, P5405).....	0.05g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma-Aldrich, S5136-500G.....	0.36g
KH ₂ PO ₄ (ICN Biomedicals, 194846).....	0.051g

Disolver en agua esterilizada, ajustar pH 7.4, esterilizar por filtración con una membrana de 0.22 µm

Tripsina 0.025% (10 ml)

Tripsina 2.5%.....	0.1 ml
Verseno (Gibco, 15040).....	9.9 ml

Gelatina 0.1% (100 mL)

Gelatina porcina tipo A (Sigma-Aldrich, G189-100G).....	0.1 g
Agua estéril.....	100 ml

Pesar la gelatina, colocarla en frasco de y agregar 100 ml de agua, esterilizar en autoclave por 20 min a 121°C, 0.14 MPa de presión.

Medio M10 (100 ml)

DMEM (Gibco, 12100-046).....	82 ml
Suero fetal bovino (Hyclone, SH30070.03).....	10ml
Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco, 11140).....	1ml
Piruvato de sodio 100 mM (Gibco, 11360).....	1ml
GPS 100X.....	1ml
β- mercaptoetanol 55mM (Gibco, 21985-023).....	181µm

Medio de congelación 2X (2 ml)

Medio M10.....	1.2 ml
Suero fetal bovino (Hyclone, SH30070.03).....	400 µl
DMSO (Sigma-Aldrich, D2650).....	400 µl

5.2 Obtención de precursores neurales de células troncales embriónicas pluripotentes de ratón en monocapa adherente

Las líneas celulares 46C y Oct4GiP (donadas por el laboratorio del Dr. Austin Smith, Wellcome Trust, Centre for Stem Cell Research, University of Cambridge, UK), llegaron a nuestro laboratorio en pases 27 y 16 respectivamente, fueron descongeladas y cultivadas para expansión en medio M10 (medio con suero) + 1000 U/ml de LIF, 37°C, 5% CO₂. Se permitió que llegaran al 80% de confluencia en frascos T25, se

subcultivaron, se congelaron viales y se mantuvieron en expansión un pase más, para congelar más viales.

Para los experimentos aquí realizados, empleamos viales congelados en nuestro laboratorio, que fueron sujetos a un par de pases de expansión (adicionales a cuando las líneas arribaron) y entonces empleados para diferenciación.

Cada uno de estos viales fue empleado hasta alcanzar pase 45 en el caso de la línea 46C y 38 en el caso de la línea Oct4GiP.

5.2.1 Protocolo “clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente

5.2.1.1 Protocolo “clásico” para inducir diferenciación de mESC a NPC en monocapa adherente (Ying and Smith, 2003)

1. Las células usadas para el protocolo deben ser mantenidas en condiciones libres de células alimentadoras, si han sido mantenidas sobre una capa de células alimentadoras deben ser adaptadas, por varios pases a cultivo sin células alimentadoras, antes de iniciar el protocolo para inducir diferenciación en monocapa.
2. Previo al inicio de la diferenciación las células ES son sembradas a una densidad relativamente alta ($2-3 \times 10^6$) en frascos T25 y cultivadas por 24 h en medio estándar de células ES conteniendo LIF.
3. Para comenzar la diferenciación en monocapa, las células ES indiferenciadas se disocian usando solución de tripsina 0.025% (0.025% de tripsina, 1.3 mM EDTA, 0.1% de suero de pollo en PBS) a 37 °C.

4. La tripsina es neutralizada con el suero contenido en el medio y las células ES son centrifugadas y resuspendidas en medio N2B27.
5. Las células ES son colocadas sobre una caja de cultivo de plástico cubierta con una solución de gelatina 0.01%, en densidad de $0.5-1.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$. Típicamente 3×10^5 en 3 ml de medio N2B27 son colocadas en por plato de cultivo de 60 mm.
6. En adelante cambiar el medio cada dos días, bajo estas condiciones y en ausencia de LIF, las células ES pierden el estado pluripotente y predominantemente se comprometen a un destino neural en un período de 4-5 días.

Subsecuente a la aparición de precursores neurales, las neuronas aparecen y se incrementa esta población en el cultivo.

5.2.1.2 Composición de los medios de Cultivo y soluciones empleadas en el protocolo “clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente.

Medio estándar de células ES 50 ml (medio M10)

Las células ES son rutinariamente propagadas sin células alimentadoras sobre un plato de plástico cubierto de gelatina en el siguiente medio:

DMEM (Gibco, 12100-046).....	82 ml
Suero fetal bovino (Hyclone, SH30070.03).....	10ml
Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco, 11140).....	1ml
Piruvato de sodio 100 mM (Gibco, 11360).....	1ml

GPS 100X.....1ml
β- mercaptoetanol 55mM (Gibco, 21985-023).....181μm

Agregar 1000 U de LIF/ ml de medio de cultivo

Medio N2B27 100 ml

Medio neurobasal.....50 ml
DMEM/F12.....50 ml
Suplemento B27.....1ml (concentración final 0.5X)
Suplemento N2.....5ml (concentración final 0.5X)
β-mercaptoetanol.....90.9μl (concentración final 0.1 mM)
glutamato.....1ml (concentración final 0.2 mM)

El medio N2B27 deberá ser almacenado a 4°C y usado en el período de una semana.

Suplemento N2

Las alícuotas de N2 pueden ser almacenadas a -20°C, por no más de tres semanas.

La preparación de las soluciones stock se describe a continuación:

- Insulina 25 mg/ml, disolver 100 mg en 4 ml de HCl 0.01 M esterilizado por filtración, la insulina debe ser resuspendida toda la noche a 4°C.
- Apotransferina 100 mg/ml, disolver 500 mg/ 5 ml de agua estéril.
- BSA 75 mg/ml, disolver 75 mg en 1 ml de PBS estéril.

- Progesterona 0.6 mg/ml disolver 6 mg en 10 ml de etanol y entonces esterilizar por filtración.
- Putrescina 160 mg/ml, disolver 1.6 g en 10 ml de agua, esterilizar por filtración.
- Selenito de sodio 3 mM, disolver 2.59 mg/ 5 ml de agua y entonces esterilizar por filtración

Estos stocks son empleados para preparar 40 ml de suplemento N2 como sigue:

DMEM/F12.....	27.5 ml
BSA 75 mg/ml.....	4 ml
Insulina 25 mg/ml.....	4 ml (adicionar de 200 µl a la vez para prevenir precipitación)
Apotransferina 100 mg/ml.....	4 ml
Selenito de sodio 3 mM.....	40 µl
Putrescina 160 mg/ml.....	400 µl
Progesterona 0.6 mg/ml.....	132 µl

Recubrimiento de cajas con gelatina 0.1%

Para cultivo y diferenciación de células ES, cajas y frascos son cubiertos con una solución de gelatina 0.1% por al menos 10 minutos a temperatura ambiente, aspirar el exceso de gelatina previo al uso de la caja, no es necesario lavar con PBS.

5.2.2 Modificaciones al protocolo “clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente para la obtención de NPC de ESC

5.2.2.1 Protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente modificado con período de adaptación a medio sin suero

En este caso, las células se descongelan y se mantienen en medio M10 + LIF (descrito en la sección: cultivo rutinario de células ESC), al estar en 75% de confluencia se realiza un subcultivo como está descrito a continuación:

1. Aspirar el medio y lavar con PBS 1X dos veces.
2. Agregar un 0.5 ml de solución de tripsina (0.025%) por caja de 6 cm, incubar a 37 °C durante un minuto y 30 segundos, inmediatamente inactivar la tripsina diluyendo con 9.5 ml de DMEM/F12, centrifugar a 1000 rpm durante cuatro minutos. Retirar el medio.
3. Resuspender en un mililitro de medio N2B27; subir y bajar con una punta de micropipeta de 1 ml 15 veces, después de esto agregar el volumen restante de N2B27 para tener una suspensión que sea factible contar.
4. Homogenizar la suspensión con una pipeta de 5 ml, inmediatamente tomar una alícuota de 10 µl de la suspensión celular y mezclar con 10 µl de azul tripano, contar la suspensión cuidadosamente.
5. Colocar el volumen necesario de suspensión celular para sembrar 5×10^5 células en una caja de 6 cm previamente cubierta con una solución de gelatina porcina tipo A al 0.1% durante 1h y con la cantidad suficiente de medio N2B27 para tener un volumen total de 4 ml en la caja.
6. Agregar 1000U/ml de N2B27, mantener bajo estas condiciones durante 4 días, cambiar el medio diariamente.

Emplear estas células para comenzar el protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente como se describe a continuación:

1. Aspirar el medio y lavar con PBS 1X dos veces.
2. Agregar un 0.5 ml de solución de tripsina (0.025%) por caja de 6 cm, incubar a 37 °C durante dos minutos y 30 segundos, inmediatamente inactivar la tripsina diluyendo con 9.5 ml de DMEM/F12, centrifugar a 1000 rpm durante cuatro minutos. Retirar el medio.
3. Resuspender en medio N2B27, la suspensión celular debe ser homogénea y quedar como célula única lo mas completamente disgregadas que sea posible. Para esto agregar 1 ml de medio N2B27; subir y bajar con una punta de micropipeta de 1 ml 15 veces, después de esto agregar el volumen restante de N2B27 para tener una suspensión que sea factible contar, subir y bajar la suspensión 10 veces con una pipeta de 5 ml, inmediatamente tomar una alícuota de 10 μ l de la suspensión celular y mezclar con 10 μ l de azul tripano.
4. Contar la suspensión cuidadosamente y verificar que la suspensión sea homogénea, y las células se encuentren completamente disociadas.
5. Colocar el volumen necesario de suspensión celular para sembrar 1.5×10^4 , 2.0×10^4 ó 2.5×10^4 células/ cm^2 en multipozos de 6 (área de cultivo 9.6 cm^2) durante una hora con una solución de gelatina porcina tipo A al 0.1% y con la cantidad suficiente de medio N2B27 para tener un volumen total de 4 ml en la caja.
6. Agregar 1000U/ml de LIF durante el primer día a baja densidad (D0). Al día siguiente retirar el medio con LIF y agregar medio fresco N2B27, cambiar el medio diariamente.

5.2.2.2 Protocolo “casi clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente

Las células serán mantenidas todo el tiempo en medio con suero + LIF, como esta descrito en el apartado de cultivo rutinario de ESC, las células deberán encontrarse en un 75% de confluencia al momento de realizar el subcultivo para bajar la densidad e iniciar el protocolo para inducir diferenciación.

Para el comienzo del protocolo, las células fueron disociadas con solución de tripsina (0.025%), pre-incubada a 37°C, siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Aspirar el medio y lavar con PBS 1X dos veces.
2. Agregar un 0.5 ml de solución de tripsina (0.025%) por caja de 6 cm, incubar a 37 °C durante un minuto y 30 segundos, inmediatamente inactivar la tripsina diluyendo con 9.5 ml de DMEM/F12, centrifugar a 1000 rpm durante cuatro minutos. Retirar el medio.
3. Resuspender en medio N2B27, la suspensión celular debe ser homogénea y quedar como célula única (lo más completamente disgregadas que sea posible). Para esto agregar un mililitro de medio N2B27; subir y bajar con una punta de micropipeta de 1 ml 15 veces, después de esto agregar el volumen restante de N2B27 para tener una suspensión que sea factible contar, subir y bajar la suspensión 10 veces con una pipeta de 5 ml, inmediatamente tomar una alícuota de 10 µl de la suspensión celular y mezclar con 10 µl de azul tripano.
4. Contar la suspensión cuidadosamente y verificar que la suspensión sea homogénea, y las células se encuentren completamente disociadas.
5. Sembrar las células en una densidad que se encuentre dentro del rango de 1.5×10^4 – 2.5×10^4 células/cm², sobre un multipozo de 6 (área de cultivo 9.6 cm²) previamente cubierta con gelatina porcina tipo A al 0.1%, poli-d-lisina/laminina ó poli-l-ornitina/laminina según sea el substrato a probar, los

procedimientos para recubrir cajas con estos sustratos se describen en el siguiente apartado: “Experimentos en sustratos diferentes”.

6. Agregar 1000U/ml de LIF durante el primer día a baja densidad (D0). Al día siguiente retirar el medio con LIF y agregar medio fresco N2B27, cambiar el medio diariamente.

5.2.2.3 Experimentos en sustratos diferentes

Un problema detectado durante la diferenciación es que al tiempo que la diferenciación avanza, una gran cantidad de células se desprenden del fondo de la caja, una parte se desprende y flota en el medio como célula única, otras forman agregados en suspensión. Por lo anterior se emplearon cajas de cultivo recubiertas con poli-d-lisina/laminina y poli-l-ornitina/laminina, cuyo uso no se recomienda por ser asociados a una baja eficiencia de diferenciación, pero exploramos que tanto podía ser afectada la eficiencia de obtención de NPC frente a un posible aumento en la adherencia.

Además se realizaron modificaciones al procedimiento para recubrir cajas con gelatina, que es el sustrato sugerido por los autores del protocolo de diferenciación. Es importante resaltar que todos estos experimentos, fueron llevados a cabo siguiendo el protocolo “casi clásico” para la obtención precursores neurales en monocapa adherente, descrito en la sección 5.2.2.2. Los procedimientos para recubrir cajas se describen a continuación:

a. Procedimiento para recubrir cajas con poli-d-lisina/Laminina

1. Preparar una solución de poli-d-Lisina en agua estéril a una concentración de 10 µg/ml.

2. Colocar 1.5 ml de esta solución en cada pozo de un multipozo de 6, dejar en flujo laminar durante 4h.
3. Retirar el exceso de solución, lavar 3 veces con agua, dejar secar.
4. Agregar una solución de 10 µg/ml de laminina (Invitrogen, 2317-015) en medio neurobasal, cuidar que la solución de laminina mantenga una temperatura por debajo de los 4°C, por lo que debe manejarse en hielo todo el tiempo hasta el momento justo en que sea colocada en la caja, dejar toda la noche en la incubadora a 37°C.
5. Al momento de usar descartar el medio y agregar inmediatamente medio N2B27, después colocar la suspensión celular en la densidad deseada.

b. Procedimiento para recubrir cajas con poli-l-ornitina/Laminina

1. Preparar una solución de poli-l-ornitina (Sigma, P4957) en agua a una concentración de 25 µg/ml.
2. Colocar 1.5 ml de esta solución en cada pozo de un multipozo de 6, dejar en flujo laminar durante 4h.
3. Retirar el exceso de solución, lavar 3 veces con agua, dejar secar.
4. Agregar una solución de 10 µg/ml de laminina (Invitrogen, 2317-015) en medio neurobasal, cuidar que la solución de laminina mantenga una temperatura por debajo de los 4°C, por lo que debe manejarse en hielo todo el tiempo hasta el momento justo en que sea colocada en la caja.
5. Dejar toda la noche en la incubadora a 37°C, al momento de usar descartar el medio y agregar inmediatamente medio N2B27, después colocar la suspensión celular en la densidad deseada.

c. Procedimiento para recubrir cajas con gelatina

El siguiente procedimiento fue modificado con el objetivo de mantener la adherencia de las células durante la diferenciación, este procedimiento es propuesto en base a experimentos empíricos, se describe a continuación:

1. Colocar un multipozo de 6 vacío en la incubadora a 37°C, 5 % CO₂ durante 8 días.
2. Transcurrido el tiempo sacar el multipozo, dejar enfriar y colocar 1.5 ml de la solución de gelatina porcina tipo A 0.1% en cada pozo de un multipozo de 6.
3. Dejar la solución por una hora, retirar el exceso y dejar secar en el flujo laminar, dejar en la incubadora a 37°C, 5 % CO₂ durante una noche.
4. Al día siguiente sacar el multipozo de la incubadora, dejar enfriar y colocar el volumen adecuado de suspensión celular según la densidad deseada.

5.2.2.4 Composición de los medios de Cultivo y soluciones empleadas en el protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente

Medio M10 (100 ml)

DMEM (Gibco, 12100-046).....	82 ml
Suero fetal bovino (Hyclone, SH30070.03).....	10ml
Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco, 11140).....	1ml

Piruvato de sodio 100 mM (Gibco, 11360).....1ml
 GPS 100X.....1ml
 β- mercaptoetanol 55mM (Gibco, 21985-023).....181μm

Medio N2B27 (100 mL)

*Medio neurobasal (Gibco, 21103049)+B27 (Gibco, 17504044).....50 mL
 DMEM/F12 (Gibco, 12400024).....50 mL
 Suplemento N2..... 0.5 mL
 β- mercaptoetanol 55 mM (Gibco, 21985-023).....183.68 μL
 L-Glutamina 200 mM (Millipore, TMS-002-C).....100 μL

Filtrar por membrana de 0.22 μ y agregar 1 ml de KSR

*Mezclar 50 ml de medio neurobasal con 1 ml de suplemento B27

Suplemento N2 (1 mL)

DMEM/F12 (Gibco, 12400024).....587.5 μL
 Insulina (12.5 mg/mL, Sigma-Aldrich, 91077C-100MG).....200 μL
 BSA (75 mg/mL, Sigma-Aldrich, A-3311).....100 μL
 Apotransferina (100mg/mL, Sigma-Aldrich, T2036-100MG).....100 μL
 Progesterone (0.6 mg/ mL,Sigma-Aldrich, P8783-1G).....3.3 μL
 Putrescina (160 mg/mL, Sigma-Aldrich, P5780-5G).....10 μL

Selenito de sodio (3mM, Sigma-Aldrich, S5261-10G).....1 μ L

La solución hasta este punto es de color amarillo claro, neutralizar el HCl 0.1 M (disolvente de insulina) con Hidróxido de Sodio 1M agregando primero 4.5 μ L de NaOH, mezclar por inversión y agregar 3 μ L más de NaOH, mezclar por inversión un par de veces, la solución deberá quedar de color rojo claro.

Preparación de soluciones stock para preparar suplemento N2

El suplemento N2 empleado en este protocolo, tiene una composición modificada del suplemento N2 original, posee una mayor concentración de insulina y se agrega albúmina sérica bovina. La preparación de las soluciones stock se describe a continuación:

6. Insulina 12.5 mg/mL Disolver 5 mg en 400 μ L de HCl 0.01 M, dejar que se disuelva durante una noche a 4 °C en agitación.
7. Apo-transferina 100 mg/mL: Disolver 20 mg en 200 μ L de agua estéril, dejar que se disuelva durante una noche a 4°C en agitación.
8. Albúmina Sérica Bovina (BSA) 75 mg/mL: Disolver 75 mg en 1 ml de PBS estéril.
9. Progesterona 0.6 mg/mL: Disolver 2 mg en 1 mL de etanol, de esta solución (2 mg/mL) tomar 300 μ L y llevar a 1 mL, la solución será de 0.6 mg/mL usar esta solución para la preparación de N2.
10. Putrescina 160 mg/mL: Disolver 80 mg en 500 μ L de agua estéril.

11. Selenito de sodio 3 mM: Disolver 5mg en 960 μ L de agua estéril, esta solución es de 3 mM, tomar 10 μ y agregar 90 μ l de agua estéril, usar esta dilución para preparar N2.

Tripsina 0.025% (10ml)

Tripsina 2.5%..... 0.1 ml

Verseno (Gibco, 15040)..... 9.9 ml

Gelatina 0.1% (100 mL)

Gelatina porcina tipo A (Sigma-Aldrich, G189-100G).....0.1 g

Agua estéril.....100 ml

Pesar la gelatina, colocarla en frasco de y agregar 100 ml de agua, esterilizar en autoclave por 20 min a 121°C, 0.14 MPa de presión.

Ensayos de inmunofluorescencia

5.3.1 Inmunocitoquímica

1. Retirar medio de cultivo y lavar dos veces con PBS 1X, fijar con PFA 4% durante 10 minutos a 4 °C.
2. Lavar dos veces con PBS 1X, permeabilizar con Triton X-100 en PBS 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar dos veces con PBS 1X, incubar con solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar solución de bloqueo y agregar la dilución de anticuerpo primario de ratón (1:500 anti-nestina MAB353, millipore) en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C, en cámara húmeda.
5. Al siguiente día retirar la dilución de anticuerpo primario y lavar dos veces con PBS 1X, incubar con dilución de anticuerpo secundario (1:200 de anti-ratón 557 NL007, R&D systems) por una hora a temperatura ambiente.
6. Lavar dos veces con PBS1X, teñir núcleos con DAPI (D-1306, Invitrogen) de una solución de 5 mg/ml emplear dilución 1:500 durante 1.5 minutos.
7. Lavar una vez con PBS 1X, agregar solución de montaje (buffer de carbonatos y glicerol).

5.3.2 Preparación de soluciones para Inmunocitoquímica

Paraformaldehído (PFA) 4% 30 mL

Agua destilada.....13 ml

Paraformaldehído(Sigma-Aldrich,P6148-500G).....1.2 g

Calentar a 60-70° en campana

Agregar hidróxido de sodio 10N.....30 µL

Agregar PBS 2X.....15 ml

Ajustar pH a 7.2 con HCl (J.T. Baker, 9535-05)

Aforar a 30 ml con agua destilada

Filtrar en membrana de 0.45 µ

PBS 2X 50 mL

NaCl (Sigma-Aldrich 5886-500G)..... 0.8 g

KCl (Sigma-Aldrich, P5405).....0.02 g

Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, S5136-500G).....0.144 g

KH₂PO₄ (ICN Biomedicals, 194846).....0.024 g

Aforar a 50 ml con agua destilada

Hidróxido de sodio 10 N

Disolver 20 g de hidróxido de sodio (J. T. Baker, 37200-01) en agua y aforar a 50 mL con agua destilada.

Triton 1%

Diluir 100 µL de tritón en 10 ml de PBS 1X.

Buffer de carbonatos

Mezclar 25 ml de glicerol con 25 ml de bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, S5761-500G) 0.1 M, pH 9.

5.4 Medición de la eficiencia de obtención de NPC por citometría de flujo en citómetro FACSCanto II

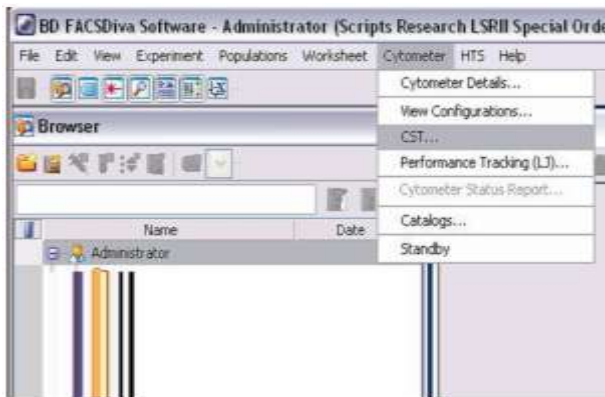
5.4.1 Subcultivo y fijado de las células después de la diferenciación

1. Aspirar el medio, lavar las células dos veces con PBS 1X, despegar con 300 μ L de tripsina 0.25%, 6 minutos a 37°C (es recomendable que al minuto tres se mueva el multipozo para favorecer el despegado de las células).
2. Para el caso de las células ES que se emplean como controles (46C y Oct4GiP sin diferenciar, cultivadas en medio N2B27+LIF+ 2i) despegar con 300 μ L de tripsina 0.025% durante 1.5 minutos a 37 °C.
3. Inactivar la tripsina por dilución agregando 1.7 ml de DMEM-F12 (Gibco, 12400024) centrifugar 4 min a 1000 rpm.
4. Retirar medio y resuspender en 1 ml de PBS 1X, centrifugar 4 min 1000 rpm, retirar PBS.
5. Resuspender en 3 volúmenes de la solución "FACS Flow" 1X por cada volumen de PFA 4%, almacenar a 4°C hasta el momento de la medición.

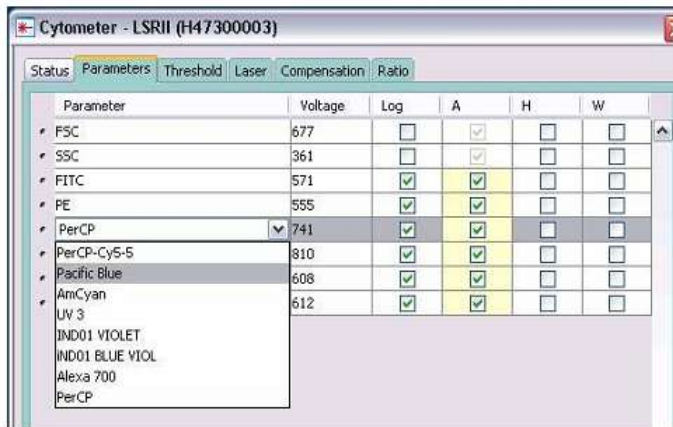
5.4.2 Medición en citómetro de flujo

5.4.2.1 Adquisición de datos

1. Transferir la suspensión celular a un tubo para FACS. La medición en el equipo FACSCanto II se realiza empleando el software FACSDiva versión 6.1.3.
2. Resuspender la suspensión celular con micropipeta de 200 μ L.
3. Optimizar los voltajes para cada laser del equipo introduciendo en el capilar de toma de muestra, un tubo con suspensión de perlas CST (Cytometer Setup and Tracking).



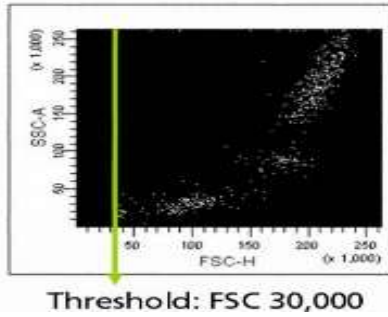
4. En la interfaz del software FACSDiva versión 6.1.3 seleccionar el menú “citómetro” y en éste la opción “CST”, posteriormente seleccionar el lote de perlas que se está empleando y seleccionar el botón “correr”.
5. Una vez optimizados los voltajes, seleccionar los parámetros que se medirán en nuestro experimento, para este caso FSC (Forward Scattered light), SSC (Side Scattered light) y GFP (intensidad de fluorescencia de GFP), eliminar el resto de los parámetros.



- En la ventana “hoja de trabajo global”, abrir un histograma de número de eventos (eje Y) contra intensidad de fluorescencia (eje X) y una gráfica de puntos de SSC (eje Y) contra FSC (eje X).
- Introducir un tubo con la suspensión de células 46C sin diferenciar (que por lo tanto son GFP negativas) en el capilar de toma de muestra. En la ventana de adquisición, presionar el botón “adquirir datos”.



- Establecer el valor de umbral (en la etiqueta Umbral de la ventana citómetro) en 30,000 para descartar todas las partículas con un tamaño por debajo dicho valor de voltaje.



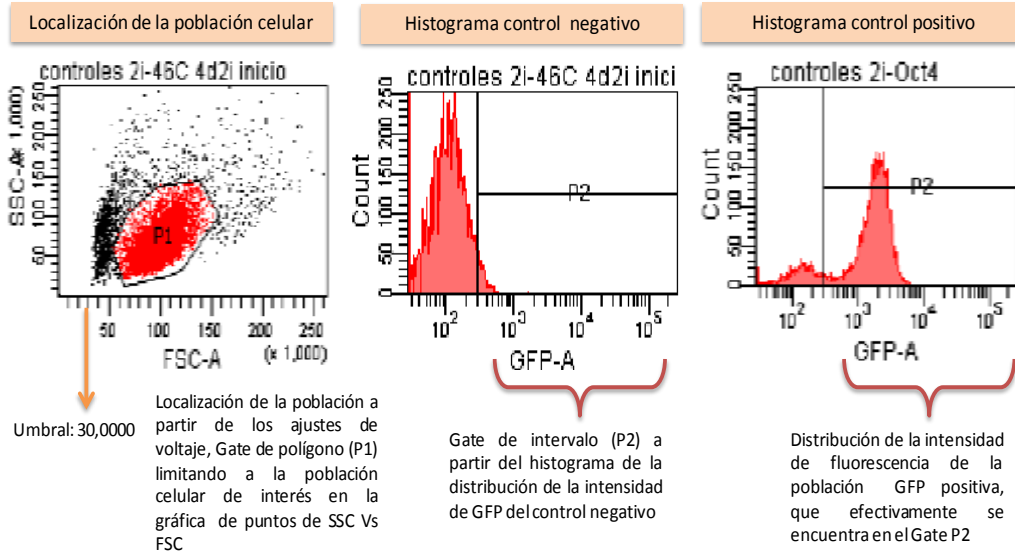
9. Optimizar la sensibilidad del equipo para detectar a nuestra población celular ajustando los parámetros FSC, SSC y GFP a los siguientes valores de voltaje:

- a. FSC.....210
- b. SSC.....370
- c. GFP.....380-390

Cytometer - LSRII (H47300003)

Parameter	Voltage	Log	A	H	W
FSC	677	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SSC	361	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FITC	571	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PE	555	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PerCP	741	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PerCP-Cy5-5	810	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pacific Blue	608	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
AmCyan	612	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
UV 3					
IND01 VIOLET					
IND01 BLUE VIOL					
Alexa 700					
PerCP					

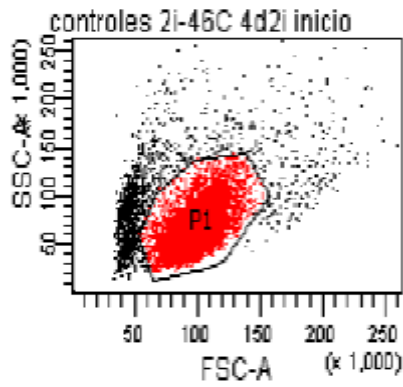
El histograma de distribución de intensidad de GFP debe recorrerse hasta cero en el eje de las abscisas, sin ocultar ninguna parte de la curva. La gráfica de puntos e histogramas, al realizar los ajustes de voltaje, deberán ser como se muestra a continuación:



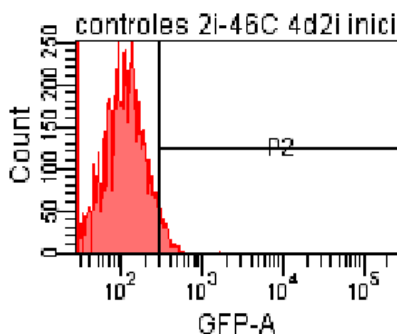
10. Adquirir y registrar 10,000 eventos del control negativo (Células ES, 46C sin diferenciar).
11. Con los mismos parámetros adquirir y registrar 10,000 eventos del control positivo (suspensión de células Oct4GiP, sin diferenciar).
12. Con los parámetros establecidos, adquirir y registrar 10,000 eventos de cada muestra.

5.4.2.2 Análisis de datos

1. En la hoja de trabajo normal, realizar un gate de polígono en la gráfica de puntos de SSC vs FSC para seleccionar la población de interés (P1).



2. En el histograma de Número de células vs GFP mostrar la distribución de intensidad de GFP de la población P1 (dado que P1 se muestra en color rojo, el histograma se mostrará en color rojo).
3. En el histograma de las células 46C control negativo (sin diferenciar), realizar un gate de intervalo a partir de la cola derecha del histograma de intensidad de fluorescencia. En este intervalo (P2) se ubicará la población GFP positiva.



4. Realizar los pasos 1-3 para cada muestra, posteriormente en cada uno de los histogramas, seleccionar la opción de análisis estadístico y editar los parámetros a mostrar, en este caso :

- Numero de eventos

- Porcentaje de parentales
- Porcentaje total
- Media geométrica de la intensidad de fluorescencia

5. El porcentaje de células que ha adquirido (línea 46C) ó retiene (línea Oct4GiP) expresión de GFP durante la diferenciación, será el reportado para la población P2 en la columna de “Porcentaje de parental” (resaltado con contorno rojo en la figura).

Tube Name: 46C 4dLIFg2h 10d dif 2'0				
Record Date: Jun 6, 2012 9:44:11 AM				
Population	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Geo Mean
■ All Events	10,000	####	100.0	####
■ P1	9,320	93.2	93.2	####
☒ P2	2,585	27.7	25.8	1,024

5.4.3 Preparación de soluciones para análisis por citometría de flujo

FACSflow solución salina para FACS 5X 1L

Cloruro de sodio (J. T. Baker, 3624-01).....	40.6 g
Fosfato de potasio monobásico (ICN Biomedicals, 194846).....	1.3 g
Fosfato de sodio dibásico (J. T. Baker, 3828-01).....	11.75 g
Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, P4504).....	1.4 g
EDTA disódico (Research organics, 3002E).....	1.8 g
Cloruro de Litio(Merck, 1056790250).....	2.15 g

6. RESULTADOS

6.1 Las líneas celulares de mESC, RFP y R1B5, cultivadas rutinariamente sobre células alimentadoras, inducidas a diferenciar en monocapa adherente siguiendo el protocolo “clásico”

Al comienzo de la estandarización del protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente se emplearon las líneas celulares de mESC llamadas RFP y R1B5, éstas expresan constitutivamente RFP y GFP respectivamente. Comúnmente en el laboratorio estas líneas son cultivadas sobre células alimentadoras y en medio con suero. Por esta razón fueron adaptadas a condiciones de cultivo libre de células alimentadoras como se describe por (Ying and Smith, 2003) en medio M10 (con 10% de suero) + 1000 U LIF/ml de medio.

La línea de ESC R1B5, a diferencia de la línea RFP, responde bien a este cambio de condiciones y mantiene en su mayoría colonias redondas, compactas, refringentes y abultadas, morfología típica de colonias mESC que se observa en la figura 11b. Pasado el período de adaptación sin células alimentadoras, las células RFP y R1B5 fueron inducidas a diferenciar, sembrándolas a baja densidad en medio N2B27, tal como se describe en Ying y Smith, 2003 (figura 11a). En el caso de la línea RFP las células no se adhieren a la caja de cultivo cuando son sembradas en condiciones para inducir la diferenciación. Por su parte en la línea R1B5 los cambios en morfología (figura 11c) son evidentes desde el día 2 de haber sido inducidas a diferenciar y la morfología de las colonias es semejante a la reportada (figura 11d).

Sin embargo, desde el día 3 de inducción de diferenciación, gran cantidad de células se desprende de la caja, situación que para el día 4 es tal que pocas colonias (de 1 a 3) quedan sobre la caja de cultivo.

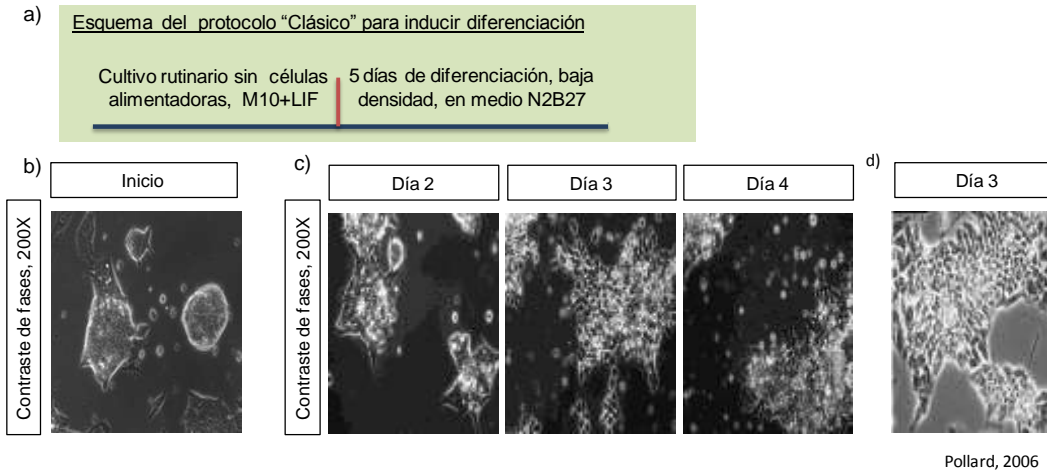


Fig.11 a) Esquema del protocolo de diferenciación "Clásico" reportado por Ying y Smith en el 2003. b) Morfología previa al inicio de la diferenciación de las colonias de la línea de mESC R1B5, cultivadas sin células alimentadoras en medio con suero (M10) + LIF (1000 U/ ml). c) Morfología de las células R1B5 en los días indicados de inducción de diferenciación en una densidad de 1.5×10^4 células/cm². d) Morfología de un cultivo de ESC inducidas a diferenciar (día 3) reportado por Pollard en el 2006.

El hecho de que para el día 4 haya de 1 a 3 colonias de células en la caja, representa una limitación para la obtención NPC porque la mayoría de las células se desprenden entre el día 3 y 4. Ying y Smith reportaron que gran cantidad de células muere a partir del tercer día; por otra parte, Aiba y col., reportaron en el 2006, que en el día 3 de diferenciación las células tienen identidad de ectodermo primitivo. Con base en los reportes previos, concluimos que las células morían antes de que la mayoría de ellas adquiriera identidad de NPC y empleamos las sugerencias de Ying y col., para evitar la *muerte* de casi todas las células en el cultivo:

- a. Adicionar más glutamato y β -mercaptoetanol al medio N2B27.
- b. Hacer un ajuste en la proporción relativa de medio neurobasal-B27 respecto al medio DMEM/F12-suplemento N2 en el medio N2B27.
- c. Agregar LIF en el medio durante el primer día de cultivo a baja densidad y retirarlo al segundo día para permitir la diferenciación.

Aún con las modificaciones propuestas por Ying y Smith, nuestros experimentos no reprodujeron totalmente lo que ha sido reportado para este método. La morfología de las colonias es semejante a la reportada, las células inducidas a diferenciar se desprenden alrededor del tercer día, sin embargo, en nuestras condiciones, para el día 4 no obtuvimos un mayor número de colonias (de 1 a 3) que el que se obtiene sin realizar las modificaciones anteriormente descritas.

Con respecto a lo anterior, ha sido reportado que para el quinto día de cultivo se podría tener hasta un millón de células (Ying et al., 2003b), por lo tanto las modificaciones propuestas por los autores no representan, en nuestro contexto, herramientas que permitan la reproducción del método de diferenciación. Las posibles causas de no haber obtenido NPC al emplear estas líneas celulares se discuten en la sección de discusión de resultados.

La estrategia que decidimos abordar fue cambiar a las líneas celulares 46C (*sox1-GFP*) y Oct4GiP (*oct4-GFP*). Estas líneas son cultivadas cotidianamente sin células alimentadoras y hay reportes de su empleo en éste protocolo para inducir diferenciación (Ying et al., 2003b).

6.2 Las líneas celulares de mESC 46C (*sox1-GFP*) y Oct4GiP (*oct4-GFP*) cultivadas rutinariamente sin células alimentadoras

Durante esta fase del proyecto usamos las líneas celulares empleadas en el reporte original del protocolo para inducir diferenciación de Ying y col. 2003b. Estas son líneas adaptadas a cultivo sin células alimentadoras. En la línea 46C knock-in monoalélica de GFP el marco abierto de lectura del gen *sox1*, se reemplazó por la secuencia codificante de GFP y un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) unido a puromicina (Ying, 2003c). La línea Oct4-GiP fue derivada de embriones de ratón de la cepa 129Ola, llevando el transgén eGFPiresPuro bajo la dirección de las secuencias regulatorias del gen *oct4* de ratón (Ying, 2002).

El uso de las líneas 46C y Oct4GiP nos permiten monitorear el estado de diferenciación de las células. En la línea 46C la adquisición de expresión de GFP indica que Sox1 se está expresando y por lo tanto las células verdes adquirieron identidad de NPC. La línea Oct4 expresa GFP al inicio de la inducción de diferenciación y su expresión disminuye durante la misma; en ésta línea la expresión de GFP indica que Oct4 se está expresando y por lo tanto las células que continúan siendo verdes durante y al final de la inducción de diferenciación fueron resistentes a la misma y mantienen identidad de ESC.

Además del cambio de líneas celulares, introducimos un período de adaptación a cultivo sin suero. La idea fue acercarnos lo más posible a las condiciones de cultivo durante la diferenciación, sin promover completamente la misma. Idea que fue basada en lo descrito en el trabajo de Ying, 2003., en el que se sugiere que el cultivo de las ESC en medio sin suero (N2B27) adicionado con LIF, es un ambiente permisivo a la diferenciación hacia precursores neurales (Ying et al., 2003a).

La expresión de GFP en las dos líneas de mESC en medio sin suero + LIF es similar a cuando son cultivadas en medio con suero + LIF (Fig.12a). El período de adaptación comprendió 4 días, la expectativa fue que las células que pasaron por el período de

adaptación a medio sin suero (Fig. 12b), a pesar de que continuaron expresando marcadores de pluripotencia (GFP en la línea Oct4) y aún no expresaban marcadores de precursores neurales (GFP en la línea 46C), las células pudieron haber adquirido un sesgo a diferenciar a precursores neurales, y al retirar el LIF y disminuir la densidad celular, sería posible obtener NPC en monocapa adherente.

Los resultados de los experimentos con el período de adaptación a medio sin suero se describen en la siguiente sección (6.2.1).

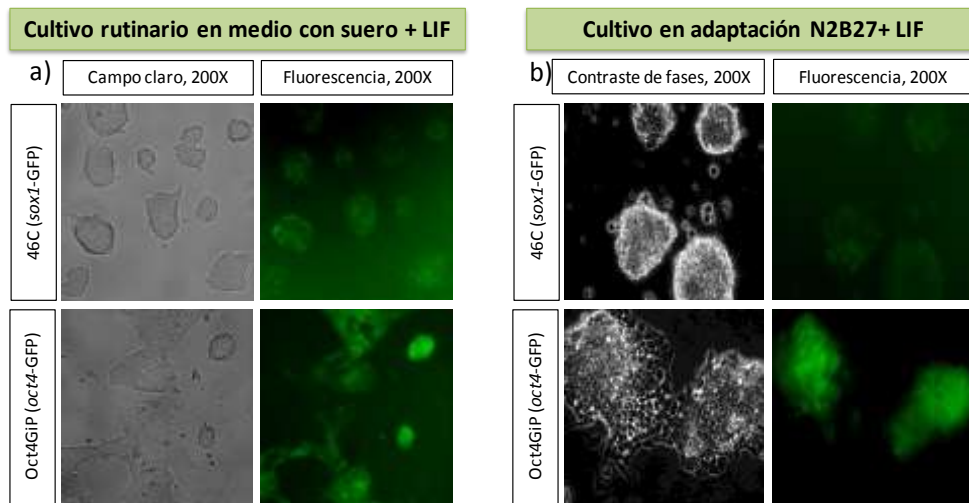


Fig. 12| a) Morfología de las colonias de ESC cultivadas de manera rutinaria en medio con suero M10+LIF (1000 U/ ml); línea 46C (arriba) y Oct4GiP (abajo). b) Morfología de las ESC después de pasar un período de adaptación de 4 días en medio sin suero (N2B27) + LIF (1000 U/ml) línea 46C (arriba) y Oct4GiP (abajo). En las dos condiciones (a y b) las células Oct4GiP expresan Oct4 y en las células 46C aun no se expresa Sox1.

6.2.1 *Las líneas celulares de mESC 46C (sox1-GFP) y Oct4GiP (oct4-GFP) inducidas a diferenciar en monocapa adherente, siguiendo el protocolo modificado con un período de adaptación a medio sin suero*

Luego del período de adaptación a medio sin suero, las células 46C y Oct4GiP fueron inducidas a diferenciar. Se disminuyó la densidad celular y se retiró el LIF del medio N2B27 (Figura 13a). Esta modificación nos permitió por primera vez, con la línea celular 46C, tener colonias que expresaron GFP y que por lo tanto habían adquirido identidad de NPC. Estas células además se arreglaron en roseta (Figura 13b, día 6 y 7 de inducción de la diferenciación). Las rosetas son características del cultivo de precursores neurales *in vitro* y asemeja la formación del tubo neural (Abranches et al., 2009).

Además de la adquisición de la expresión de GFP, para confirmar la adquisición de identidad de NPC, se realizó una inmunocitoquímica y se detectó nestina (otro marcador de precursores neurales) en células 46C en el séptimo día de inducción de diferenciación (Figura 13c).

La introducción de un período de adaptación a medio sin suero, se realizó también en la línea Oct4GiP, esta línea se usó en todos los experimentos únicamente para monitorear la pérdida de expresión de GFP y por lo tanto de Oct4 como marcador de pluripotencia (Figura 14).

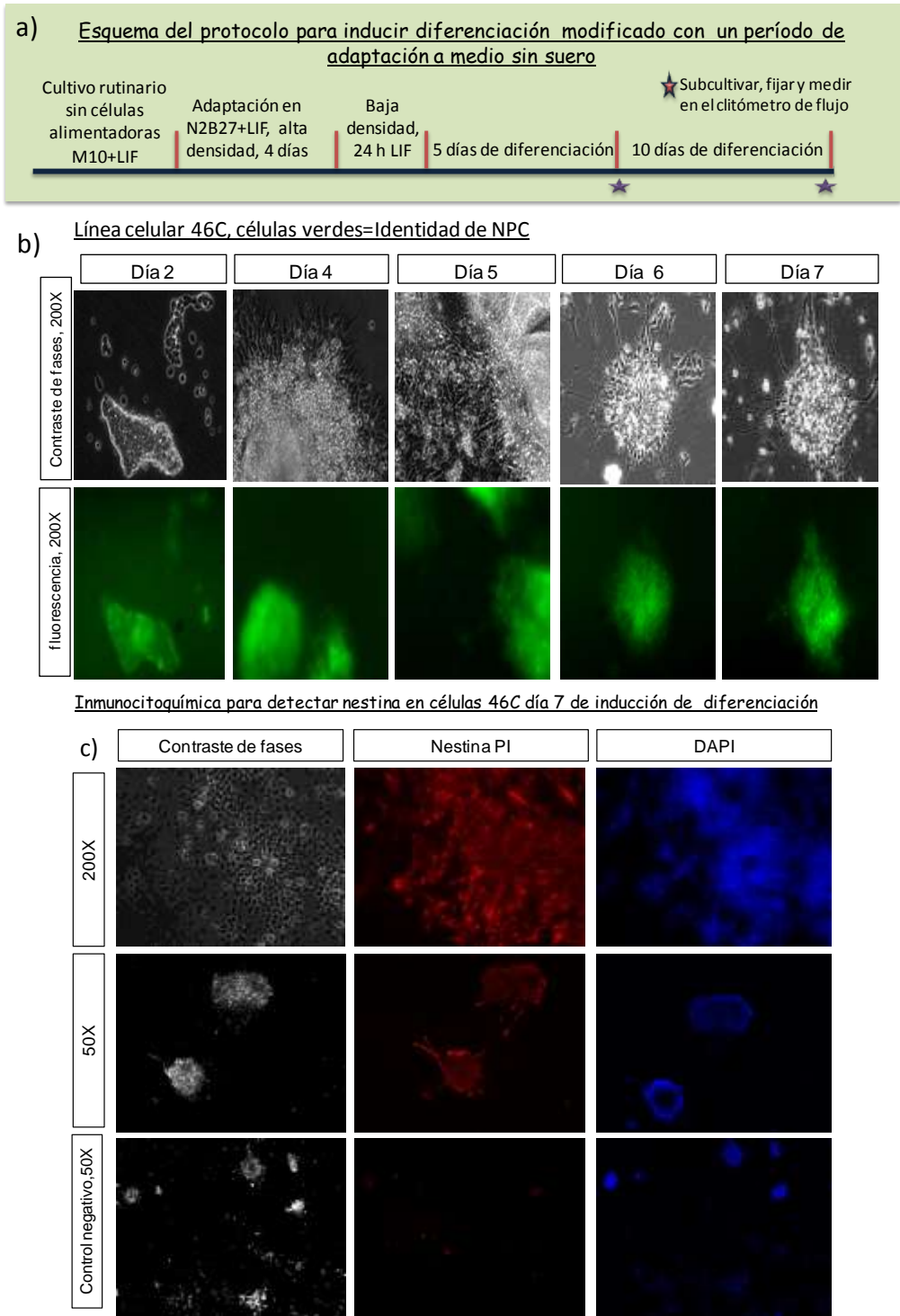


Fig. 13| a) Diagrama del protocolo para inducir diferenciación modificado con período de adaptación a cultivo sin suero (4 días en N2B27 + 1000 U/mL LIF) empleado para los experimentos de esta sección; b) Morfología de las colonias de células 46C en los días (d) indicados de inducción de diferenciación, se

muestran campos tomados al azar, las células se encuentran sobre una capa de gelatina en medio N2B27, en los días 6 y 7 se observan arreglos de roseta característicos durante la diferenciación neural *in vitro*. c) Inmunocitoquímica para detectar nestina en células 46C (*sox1*-GFP) en el séptimo día inducción de diferenciación en monocapa adherente. Las células muestran expresión de nestina -marcador de precursor neural- indicando que han adoptado la identidad de células precursoras neurales. El control negativo es una muestra sin anticuerpo primario.

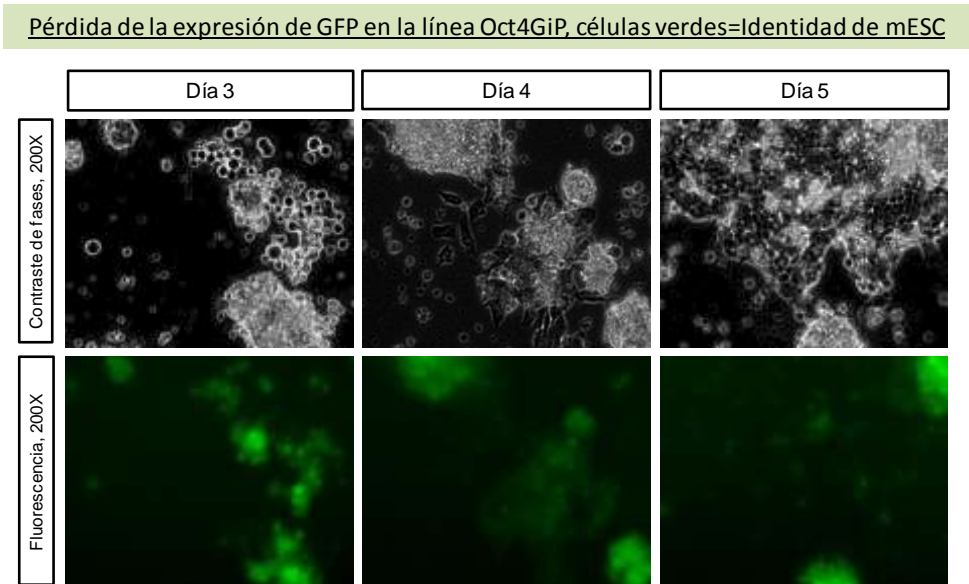


Fig. 14| Morfología de las colonias de células Oct4GiP en los días (d) indicados de inducción de diferenciación y con un período previo de adaptación en medio sin suero N2B27 + 1000 U/mL LIF. Se muestran campos tomados al azar, las células se encuentran sobre una capa de gelatina en medio N2B27.

En el reporte original de Ying y Smith de este método de diferenciación, se describe que desde el cuarto día de cultivo, en la línea 46C se tiene hasta el 75% de células *sox1*-GFP positivas. Nuestro siguiente paso fue medir que porcentaje de la población que había adquirido expresión de GFP en la línea 46C (GFP=identidad de NPC) y células que permanecían positivas para GFP línea Oct4GiP (GFP=identidad mESC) después de 5 días de haber sido inducidas a diferenciación (figura 15).

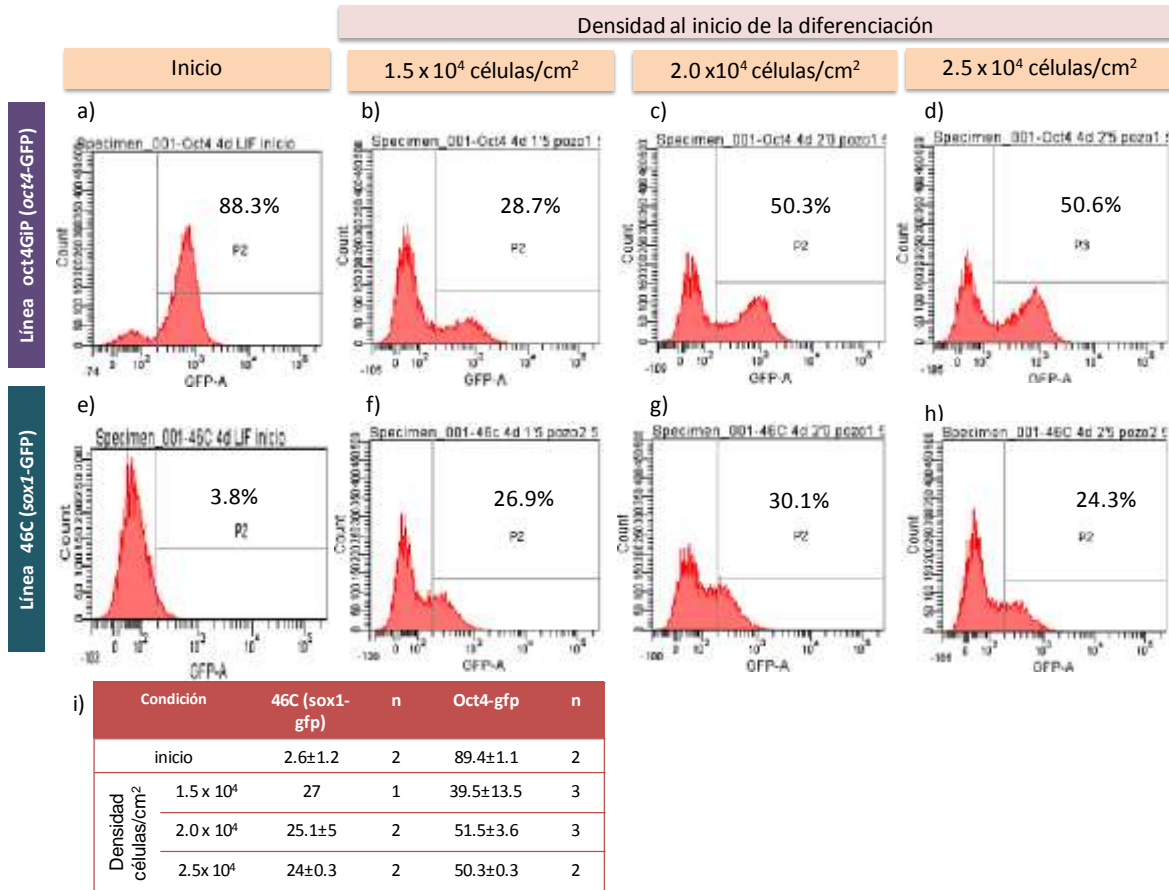


Fig. 15 a ,e) Porcentaje de células GFP positivas, después del período de adaptación de 4 días en medio N2B27+LIF (1000U/ml); b-d) Porcentaje de la población GFP positiva en el día 5 de inducción de la diferenciación en la línea Oct4GfP (GFP=Identidad mESC); f-h) Porcentaje de la población GFP positiva en el día 5 de inducción de la diferenciación en la línea 46C (GFP=Identidad NPC) en las siguientes densidades: b,f) 1.5×10^4 ; c,g) 2×10^4 ; d,h) 2.5×10^4 células/cm², i) Tabla con el promedio de células GFP positivas (en porcentaje ± error estándar) en la línea 46C (GFP=Identidad NPC) y en la línea Oct4 (GFP=Identidad de mESC) a los 5 días de inducción de diferenciación, n = número de experimentos independientes.

De estas mediciones en el día 5 de inducción de diferenciación, el porcentaje de células GFP positivas (24 % a 27 %) es aproximadamente un tercio de lo que había sido reportado (75% de células sox1-GFP positivas al día 4 de inducción de diferenciación) (Ying et al., 2003b).

Teniendo en cuenta que la proporción de células diferenciadas es inferior a la reportada por Ying y Smith, lo cual podría ser reflejo de una cinética de diferenciación más lenta, en los siguientes experimentos medimos el porcentaje de células GFP positivas a los 10 días de inducción de la diferenciación.

No obstante de que la introducción de un periodo de adaptación a medio libre de suero previo a la inducción de la diferenciación, nos permitió la obtención de NPC, esta modificación mantiene la limitante de que al final del experimento se obtienen alrededor de 10, 000 células, que fueron empleadas únicamente para medir el porcentaje de células GFP positivas por citometría de flujo.

6.2.2 Líneas celulares 46C (*sox1-gfp*) y Oct4GiP (*oct4-GFP*) inducidas a diferenciar en monocapa adherente siguiendo el protocolo “casi clásico”

De manera paralela, surgió la duda sobre si al emplear estas nuevas líneas celulares (46C y Oct4-GiP) es realmente necesario el período de adaptación a medio sin suero. Con este fin se emplearon estas líneas celulares para seguir el protocolo “casi clásico” (figura 16) para la obtención de NPC en monocapa adherente. En este protocolo se agrega LIF únicamente durante el primer día de cultivo en medio sin suero y baja densidad.

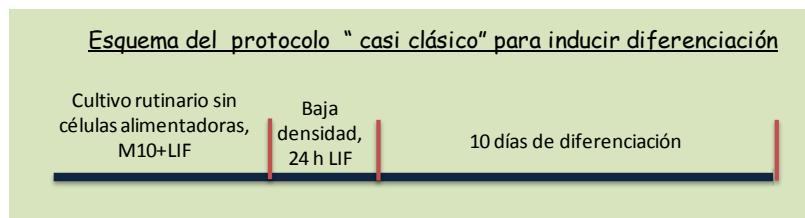


Fig. 16| Diagrama del protocolo “casi clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente. En este protocolo se agrega LIF (1000U/ml) solo durante las primeras 24 h de cultivo sin suero y baja densidad.

Los resultados se encuentran en la figura 17, el porcentaje de células GFP positivas (GFP=identidad de NPC) en la línea 46C a los 10 días de inducción de diferenciación, es menor que el que se tiene al día 5 cuando se introduce el período de adaptación a medio sin suero.

No obstante es necesario resaltar que los datos de la figura 17 fueron obtenidos de una única medición. Esto es debido a que al estar realizando las repeticiones de estos experimentos, por la cantidad de células que se desprendían de la caja era imposible mantener el cultivo más allá de cuatro días, porque todas las células flotaban en la caja de cultivo a pesar de tener gelatina como sustrato.

Al notar el incremento en la cantidad de células que se desprendían de las cajas de cultivo, se adoptaron varias estrategias que se enlistan a continuación:

1. Pensando que el desprendimiento de las células estaba asociado al vial en uso, descongelamos un vial de un pase más joven pero no disminuyó el desprendimiento de las células.
2. Preparando soluciones frescas de insulina y transferina (componentes del suplemento N2 asociados a la viabilidad durante la diferenciación Ying, 2003a) tampoco disminuyó o solucionó el desprendimiento de las células.
3. Composición del suplemento N2: Obtuvimos un procedimiento para la preparación del suplemento N2 proveniente del laboratorio del Dr. Andras Nagy (Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto Canadá) en donde la eficiencia del protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente es alrededor del 70%. Sin embargo, al preparar nuestro suplemento N2 con el nuevo procedimiento no hubo mejora en el método para inducir diferenciación.
4. Uso del suplemento Knockout Serum Replacement (KSR): Otra sugerencia por parte del laboratorio del Dr. Andras Nagy (Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto Canadá), es el empleo de KSR adicionado al 1%

al medio N2B27. En el laboratorio de Andras Nagy, el KSR al 1% mejora la supervivencia durante la diferenciación y la reproducibilidad entre experimentos.

Realizamos las modificaciones a la preparación del medio sugeridas por el laboratorio de Andras Nagy, sin obtener mejoría en la adherencia de las células ni en el porcentaje de NPC obtenidos por el método para inducir diferenciación en monocapa.

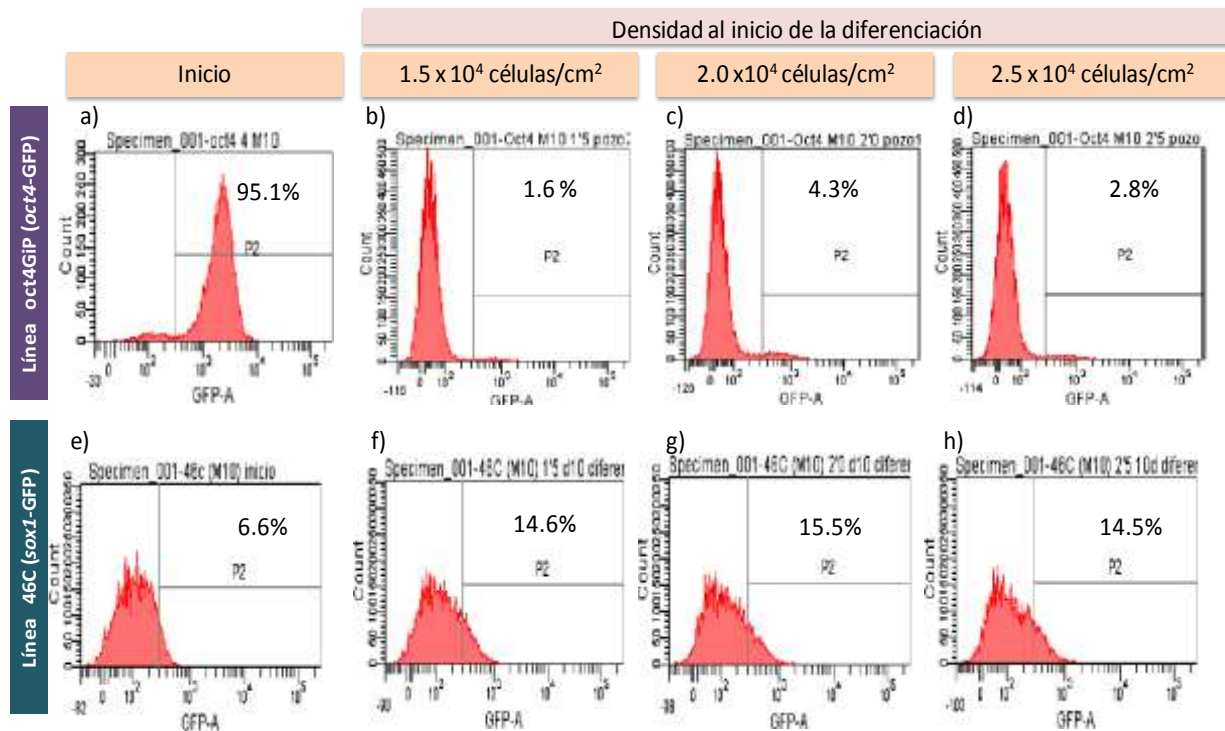


Fig. 17| a,e) Porcentaje de células GFP positivas al inicio de la inducción de diferenciación en células cultivadas en medio M10+LIF1000U/ml., b-d) Pérdida de la expresión de GFP en la línea celular Oct4GiP (GFP=identidad de mESC) después de 10 días de inducción de diferenciación, en ambos casos se siguió el protocolo “casi clásico”, f-h) Adquisición de la expresión de GFP en la línea 46C (GFP=Identidad de NPC) después de 10 días de inducción de diferenciación en las siguientes densidades: b,f) 1.5x10⁴; c,g) 2x10⁴; d,h) 2.5x10⁴ células/cm².

Por otra parte, contrario a lo que habíamos sospechado, encontramos que las células despegadas no eran células muertas. Del medio de un cultivo de día 4, los agregados celulares en suspensión fueron disociados con tripsina 0.025% y teñidos con azul

tripano. Al observar la preparación en el microscopio, encontramos que las células que están en suspensión cómo célula única están muertas pues se tiñen con azul tripano, pero, las células que están en suspensión en agregados como esferas están vivas, aún cuando no pueden mantenerse adheridas al plato de cultivo.

Las células Oct4GiP flotando en agregados continúan expresando GFP en el día 3 de haber sido inducidas a diferenciar (mantienen identidad de mESC). Por su parte células 46C flotando en agregados incluso a los 7 días de inducción de diferenciación no expresan GFP, estas células fueron disgregadas y medidas por citometría de flujo. El resultado de una medición confirma que dentro de los agregados sólo un 6% de células 46C son GFP positivas (6% con identidad de NPC). Los resultados anteriores sugieren que en los agregados esféricos que flotan, las células no son inducidas a adquirir identidad de NPC eficientemente (Anexo figura 2).

Por las razones anteriores el substrato llamó nuestra atención particularmente. Decidimos investigar el efecto de otros substratos y de modificaciones al método de recubrimiento de las cajas con gelatina en la eficiencia del protocolo para inducir diferenciación.

6.2.3 Experimentos con el protocolo “casi clásico” para inducir diferenciación sobre sustratos diferentes, en medio N2B27 adicionado con 1% de KSR

6.2.3.1 Inducción de la diferenciación sobre poli-d-lisina/laminina como sustrato

Aun cuando había sido reportado que el uso de sustratos como poli-d-lisina/laminina y fibronectina promueven la diferenciación hacia otros linajes (Ying et al., 2003a; Ying and Smith, 2003), a través de la inducción de la expresión de proteínas inhibidoras de la diferenciación (Id); decidimos usar estos sustratos, para conocer que tanto podría afectarse el porcentaje de NPC frente a un aumento de la adherencia de las células a la caja.

La adherencia de las células a sustratos como poli-d-lisina/laminina (PDL/L) ó poli-l-ornitina/laminina (PLO/L) es mejor porque en estos experimentos no hubo agregados flotando en suspensión, en ningún día de la inducción de diferenciación. Los resultados de los experimentos independientes sobre estos sustratos se muestran en las figuras 18-21. Las fotografías en campo claro muestran que las células formaron colonias planas y pegadas al fondo de pozo.

A pesar de que estos sustratos incrementan la adherencia, en la figuras 18a y 20a, se muestra que los cultivos con la línea 46C tienen una proporción menor de células GFP positivas (GFP=identidad de NPC) respecto a la proporción que puede obtenerse al usar gelatina como sustrato. De manera inversa, en la línea Oct4GiP hay retención de la expresión de GFP (GFP=identidad de mESC) aun al final de la inducción de diferenciación (figuras 18b y 20b).

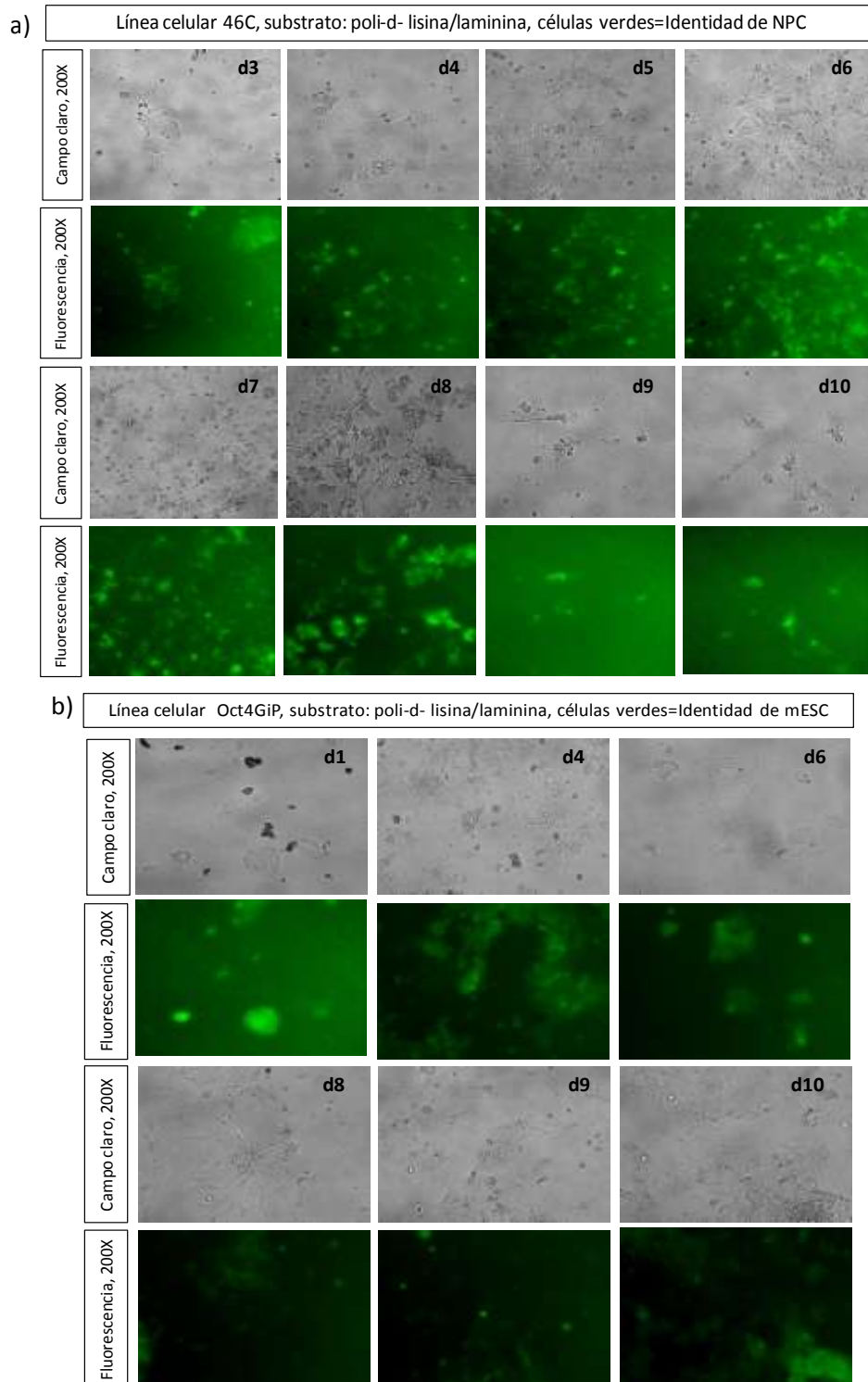


Fig. 18| a) Morfología y aumento en la expresión de GFP de las colonias de células 46C en los días (d) indicados de inducción de diferenciación; b) Morfología y disminución de la expresión de GFP en la línea celular Oct4GiP en los días (d) de inducción de diferenciación. En ambos casos se siguió el protocolo

“casi clásico”, se muestran campos tomados al azar, las células se encuentran sobre una capa de poli-d-lisina/laminina en medio N2B27 + 1% KSR.

A continuación se muestran también los datos de las mediciones realizadas a los 10 días de diferenciación sobre PDL/L y PLO/L (figuras 19 y 21, respectivamente). Los porcentajes obtenidos por citometría de flujo confirman lo mostrado en las fotografías y al igual que se ha reportado en Ying et al., 2003a, Ying y Smith, 2003, en nuestras condiciones estos substratos promueven una eficiencia de diferenciación inferior que al recubrir las cajas con gelatina. El porcentaje de NPC en la línea 46C es de 9-18% que es un porcentaje menor a lo reportado y a lo previamente obtenido en nuestras condiciones (75% ó 25% respectivamente).

Esto sugiere que, aún cuando se tenga una optima adherencia en PDL/L y PLO/L y los ajustes al medio posiblemente mejoran la supervivencia a través de la diferenciación (porque al final del experimento se tienen mayor número de colonias que en los experimentos de las secciones 6.2.1 y 6.2.2, en los cuales se obtuvieron aproximadamente 10,000 células), la eficiencia de diferenciación no necesariamente aumenta en paralelo. En conclusión, era absolutamente necesario encontrar condiciones para recubrir cajas con gelatina, que permitan:

- Mayor adherencia para mantener a las células en monocapa durante todo el período de inducción de diferenciación.
- Obtener un porcentaje mayor de NPC.
- Obtener un número de NPC mayor, lo que depende del porcentaje de NPC y de la cantidad total de células al final de la inducción de la diferenciación.

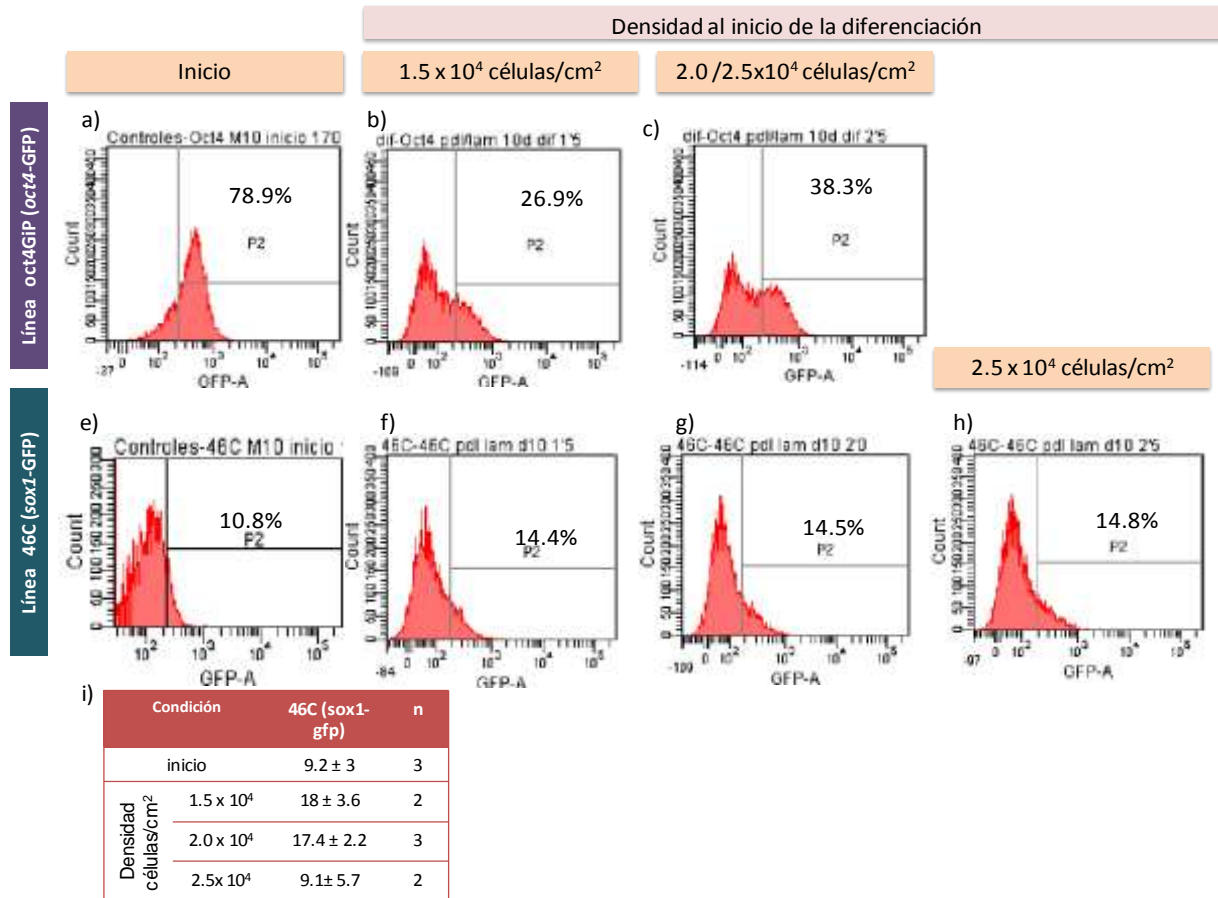


Fig. 19 a,e) Porcentaje de células GFP positivas al inicio de la inducción de diferenciación en células cultivadas en medio M10+LIF1000U/ml., b,c) Pérdida de la expresión de GFP en la línea celular Oct4GiP (GFP=identidad de mESC) después de 10 días de inducción de diferenciación; f-h) Adquisición de la expresión de GFP en la línea 46C (GFP=Identidad de NPC) después de 10 días de inducción de diferenciación. En ambos casos se siguió el protocolo “casi clásico”, el sustrato fue poli-d-lisina/laminina y el medio N2B27+1%KSR, las células fueron sembradas en las siguientes densidades: b,f) 1.5×10^4 ; c,g) 2×10^4 ; h) 2.5×10^4 células/cm²; i) Tabla con el promedio de células GFP positivas (en porcentaje ± error estándar) en la línea 46C (GFP=Identidad NPC) en día 10 de inducción de diferenciación, n = número de experimentos independientes. El porcentaje de células GFP positivas en la línea 46C es inferior a lo que había sido reportado por Ying y Smith en el 2003 y a los porcentajes obtenidos en la figura 15, sección 6.2.1.

6.2.3.2 Inducción de la diferenciación sobre poli-l-ornitina/laminina como sustrato

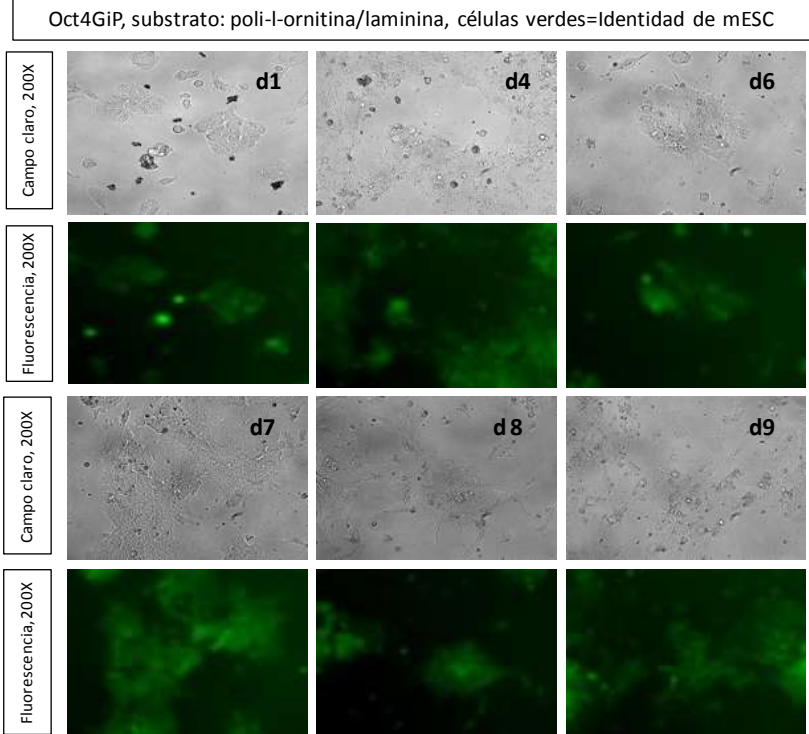
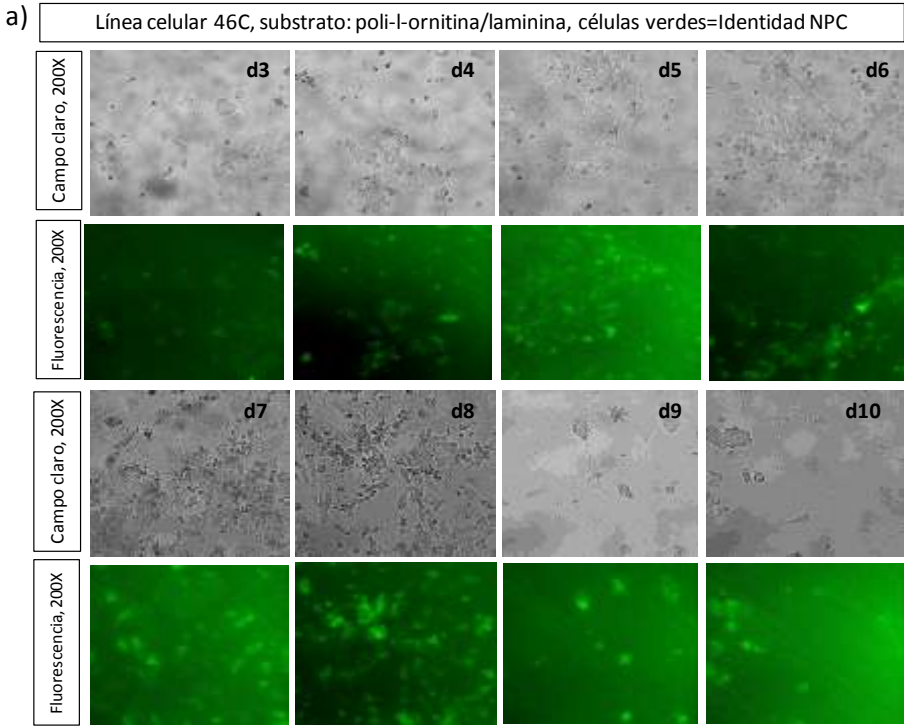


Fig. 20 a) Morfología y aumento en la expresión de GFP de las colonias de células 46C en los días (d) indicados de inducción de diferenciación; b) Morfología y disminución de la expresión de GFP en la línea celular Oct4GiP. En ambos casos no se siguió el protocolo “casi clásico”, se muestran campos tomados al azar, las células se encuentran sobre una capa de poli- l- ornitina/laminina en medio N2B27+ 1% KSR

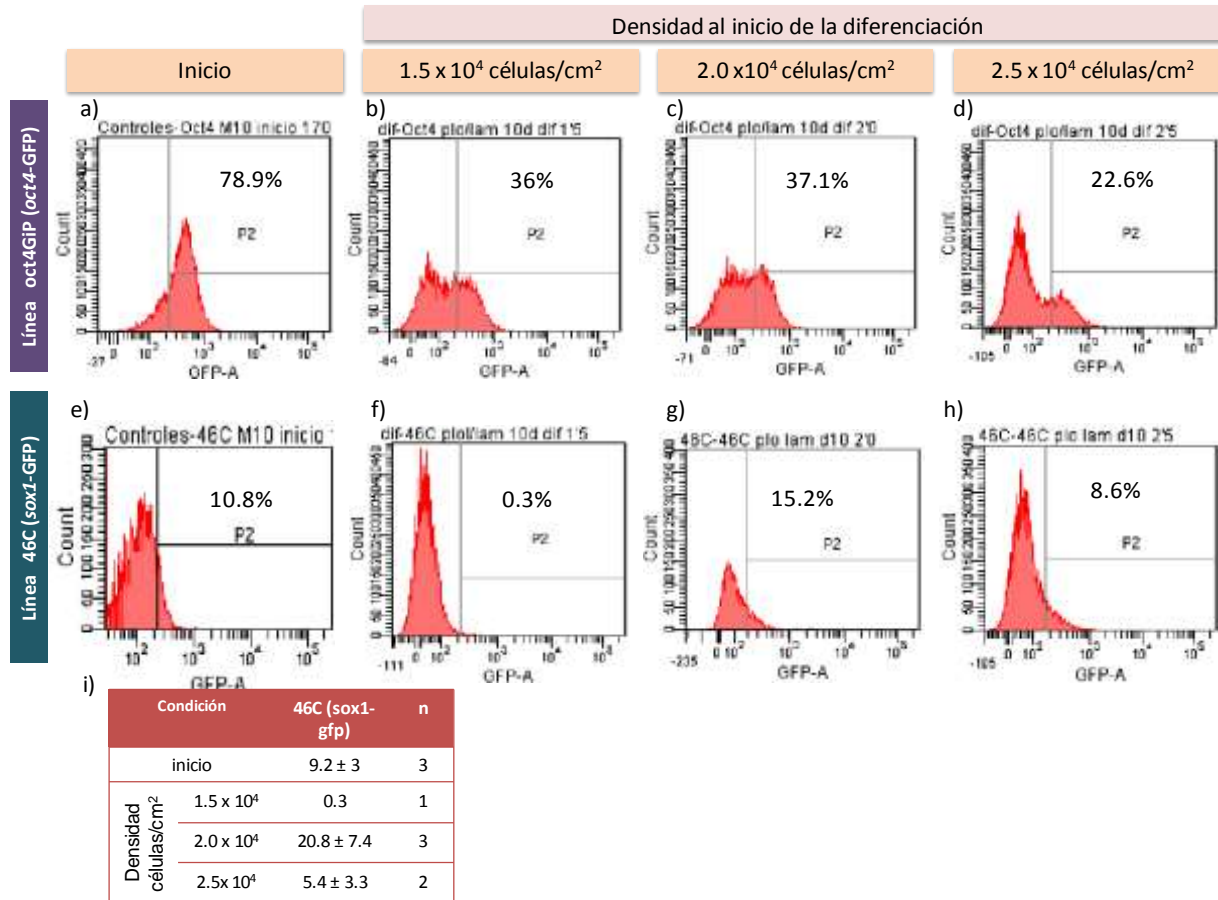


Fig.21 | Porcentaje de células GFP positivas al inicio de la inducción de diferenciación en células cultivadas en medio M10+LIF1000U/ml., b,c) Pérdida de la expresión de GFP en la línea celular Oct4GiP (GFP=identidad de mESC) después de 10 días de inducción de diferenciación; f-h) Adquisición de la expresión de GFP en la línea 46C (GFP=Identidad de NPC) después de 10 días de inducción de diferenciación. En ambos casos se siguió el protocolo “casi clásico” el substrato fue poli-l-ornitina/laminina y el medio:N2B27+1%KSR, las células fueron sembradas en las siguientes densidades: b,f) 1.5x10⁴; c,g) 2x10⁴; d,h) 2.5x10⁴ células/cm²; i) Tabla con el promedio de células GFP positivas (en porcentaje ± error estándar) en la línea 46C (GFP=Identidad NPC) en día 10 de inducción de diferenciación, n = número de experimentos independientes. El porcentaje de células GFP positivas en la línea 46C es inferior a lo que había sido reportado por Ying y Smith en el 2003 y a los porcentajes obtenidos en la figura 15, sección 6.2.1.

6.2.3.3 Inducción de la diferenciación sobre gelatina como sustrato empleando un procedimiento modificado para recubrir placas con gelatina

Durante la realización de los experimentos en los sustratos poli-d- lisina/lamina y poli-l-ornitina/laminina, se empleó gelatina como control y una caja tuvo un procedimiento de recubrimiento con gelatina diferente al reportado (gelatina procedimiento modificado = GM), descrito en la sección 6.2.2.3, inciso c. En esta ocasión se obtuvo un porcentaje de células *sox1*-GFP positivas de 71.1% al octavo día de inducción de diferenciación y de 65.4% al décimo, empleando la línea celular 46C (GFP=Identidad NPC, figura 22b). Cómo se muestra en la figura 22a, la inducción de diferenciación ocurrió en colonias planas, bien pegadas a la caja y se obtuvo un número total de células mayor a 10,000 células. Lo mostrado en las fotografías de campo claro y fluorescencia reflejan los resultados de la medición por citometría de flujo.

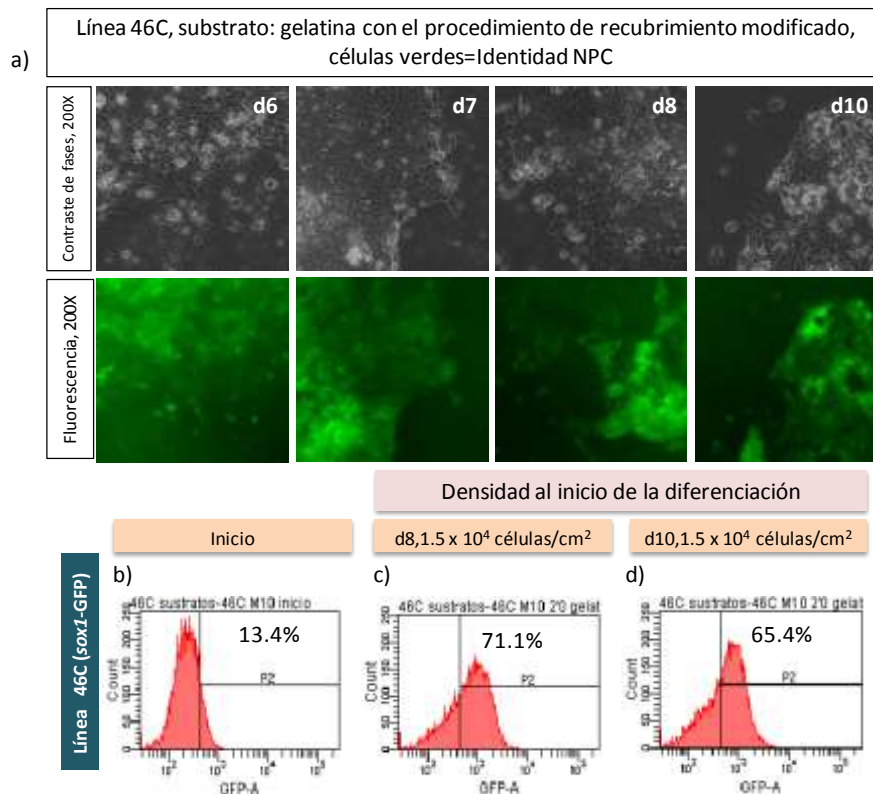
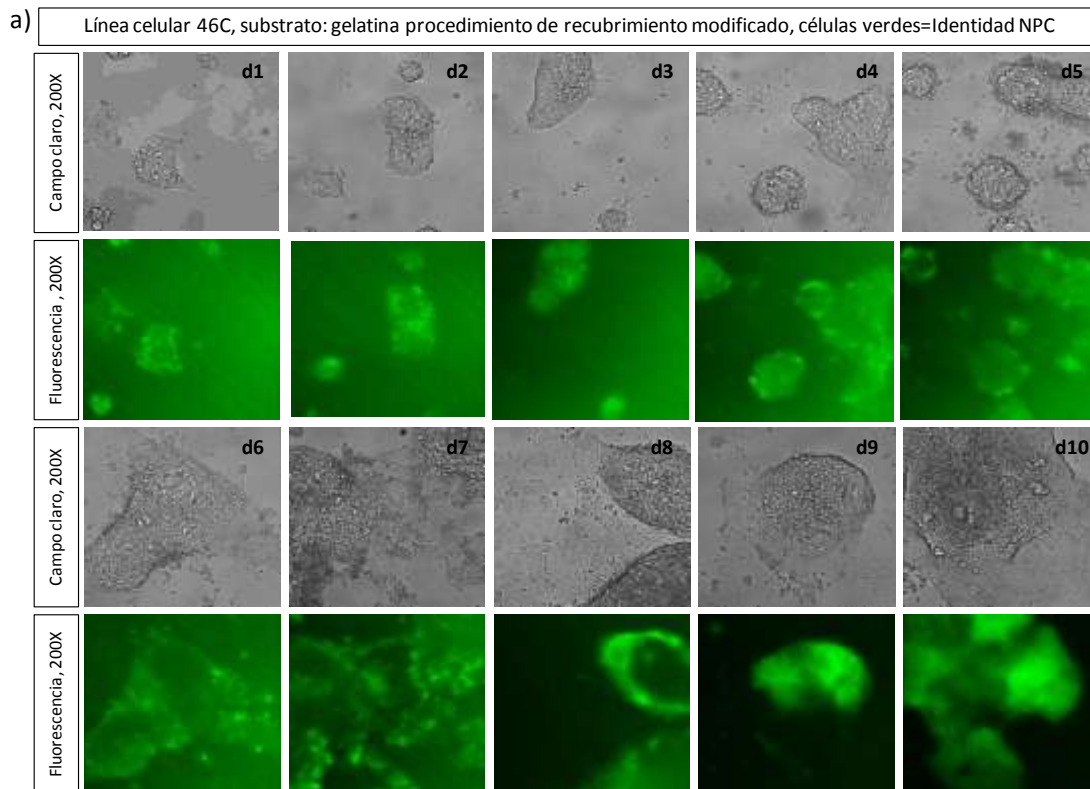


Fig. 22| a) Morfología y aumento en la expresión de GFP (GFP=Identidad de NPC) de las colonias de células 46C (*sox1*-GFP) en los días (d) indicados de inducción de diferenciación siguiendo el protocolo

“casi clásico”, se muestran campos tomados al azar, las células se encuentran sobre una capa de gelatina (procedimiento para recubrir cajas con gelatina modificado) en medio N2B27 + 1% KSR; b-d) medición por citometría de flujo de porcentaje de células que expresan GFP (GFP=Identidad NPC) en distintos tiempos de inducción de diferenciación: b) al inicio; c) a los 8 días; d) a los 10 días.

El siguiente paso fue la repetición del experimento, para averiguar la reproducibilidad del incremento en el porcentaje y el número total de obtención de NPC. Encontramos que, a pesar de que este método de recubrimiento con gelatina, muestra una mejoría reproducible en la adherencia de las células, el porcentaje de obtención de NPC mantiene mayor grado de variabilidad.

Varias colonias (más de 20) se mantienen pegadas a la caja durante todo el tiempo de diferenciación, pero estas colonias son planas en algunas zonas y compactas en otras (figura 23).



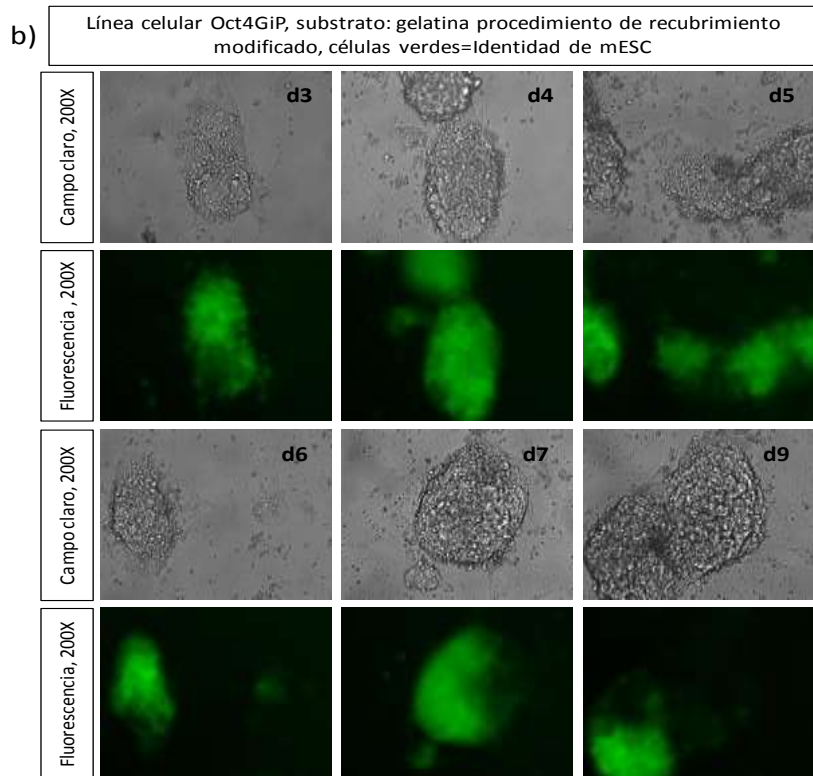


Fig. 23| a) Morfología y aumento en la expresión de GFP de las colonias de células 46C en los días (d) indicados de inducción de diferenciación; b) Morfología y disminución de la expresión de GFP en la línea celular Oct4GiP en los días (d) indicados de inducción de diferenciación. En ambos casos se siguió el protocolo para inducir diferenciación “casi clásico”. Se muestran campos tomados al azar, las células fueron sembradas sobre cajas recubiertas con gelatina con el procedimiento modificado para recubrir cajas con gelatina, descrito en la sección “Experimentos en sustratos diferentes”, en medio N2B27 + 1% KSR.

La figura 24 muestra histogramas de citometría de flujo, de uno de los mejores experimentos con la línea 46C, cuya porcentaje de obtención de NPC tiene un valor aproximado a la media \pm error estándar ($33.13 \% \pm 7.97$, densidad 1.5×10^4 células/cm²). Para la línea Oct4GiP se muestra el porcentaje de un solo experimento, este dato confirma que en las células inducidas a diferenciar con este método disminuye la expresión de Oct4, que es un factor de transcripción propio del estado pluripotente (Figura 24).

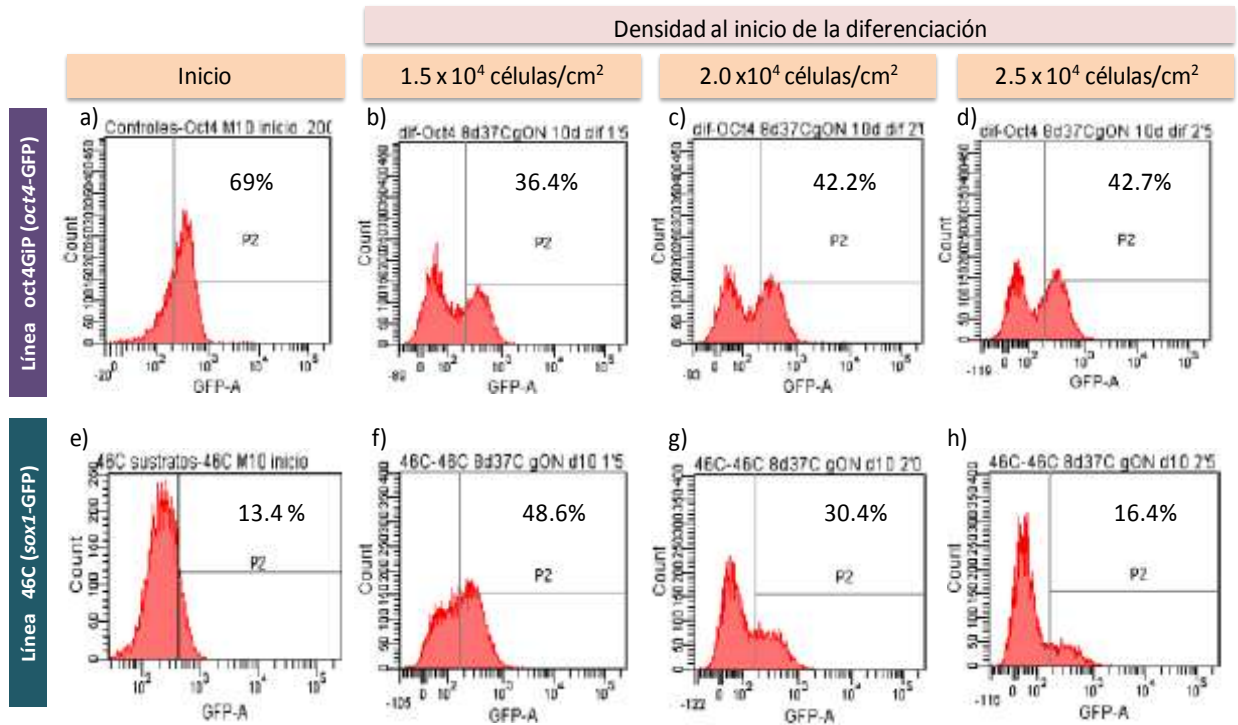


Fig. 24 a, e) Porcentaje de células GFP positivas al inicio de la inducción de diferenciación en células previamente cultivadas en M10+LIF1000U/ml., b,d) Pérdida de la expresión de GFP en la línea celular Oct4GiP (GFP=identidad de mESC) después de 10 días de inducción de diferenciación; f-h) Adquisición de la expresión de GFP en la línea 46C (GFP=Identidad de NPC) después de 10 días de inducción de diferenciación. En ambos casos se siguió el protocolo “casi clásico”, las células fueron sembradas sobre cajas recubiertas con gelatina con el procedimiento modificado para recubrir cajas con gelatina, descrito en la sección “Experimentos en sustratos diferentes”, el medio fue N2B27 + 1% KSR, las células se sembraron en las siguientes densidades: b,f) 1.5×10^4 ; c,g) 2×10^4 ; d,h) 2.5×10^4 células/cm².

En la optimización del protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente se busca tener un porcentaje alto de células con identidad de NPC y un número total de células alto; ambos parámetros establecen el número de NPC que pueden obtenerse en cada condición para inducir diferenciación.

En la figura 25, se muestran tres graficas: en la gráfica a se muestra el promedio del número total de células que se obtuvo en cada condición. La gráfica b muestra el

promedio del número de NPC en cada condición (número de NPC= número total de células x porcentaje de NPC/100).

En las gráficas a y b se observa que al emplear como substratos PDL/L ó PLO/L hay tendencia a obtener un número total mayor de células que al emplear gelatina con el procedimiento modificado para recubrir cajas. Sin embargo, el número de NPC es ligeramente menor en PDL/L y PLO/L que en gelatina (procedimiento modificado) en la densidad de 1.5×10^4 células/cm². Esto se debe a que se obtiene un porcentaje de NPC mayor en gelatina (densidad de 1.5×10^4 células/cm²) que en PDL/L y PLO/L.

No obstante la gráfica c muestra que el porcentaje de NPC obtenidos usando gelatina (procedimiento modificado) a la densidad de 1.5×10^4 células/cm², mantiene, como en todas las condiciones presentadas en la gráfica, un alto grado de variabilidad y el porcentaje en que se puede obtener NPC en esta condición fluctúa de 19.6% a 47.2%.

A partir de las observaciones anteriores, el siguiente paso sería obtener un número total mayor de células al emplear gelatina como substrato, en la densidad de 1.5×10^4 células/cm² y que el porcentaje de NPC sea menos variable. Analizando el procedimiento modificado para recubrir cajas con gelatina, pensamos que el dejar a las cajas recubiertas con gelatina una noche en la incubadora, dio un efecto como si la solución de gelatina hubiera recubierto la caja durante varias horas. Arbitrariamente decidimos dejar que la solución de gelatina recubriera una caja durante 27 horas (un periodo 12 veces mayor que el que normalmente se emplea). Los resultados de estos experimentos se encuentran con detalle en las figura 3 del anexo.

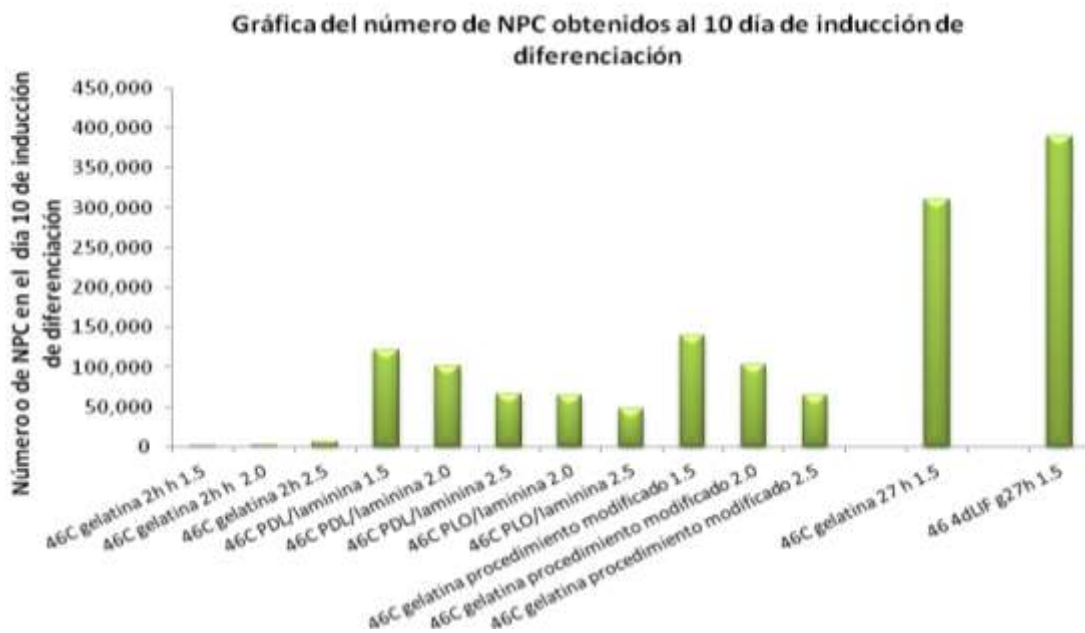
Si las mESC son inducidas a diferenciar siguiendo el protocolo modificado con un periodo de adaptación a medio sin suero (Anexo, figura 4), en las siguientes condiciones: medio N2B27+1%KSR, caja recubierta con solución de gelatina durante 27h, sembrar a las células en densidad de 1.5×10^4 células/cm², de manera reproducible se obtuvo un número total de células y de NPC mayor a cualquier otra condición anteriormente analizada (figura 25, graficas a y b). Respecto al porcentaje de obtención de NPC, a pesar de ser menor al anteriormente reportado por Ying, hasta el momento ha sido menos variable que en experimentos anteriores (figura 25, gráfica C). Sin

embargo será necesario realizar más experimentos para conocer el grado de variabilidad en la obtención de NPC, bajo este último conjunto de condiciones.

a)



b)



c) Gráfica con la dispersión de porcentajes de NPC obtenidos en el día 10 de inducción de diferenciación

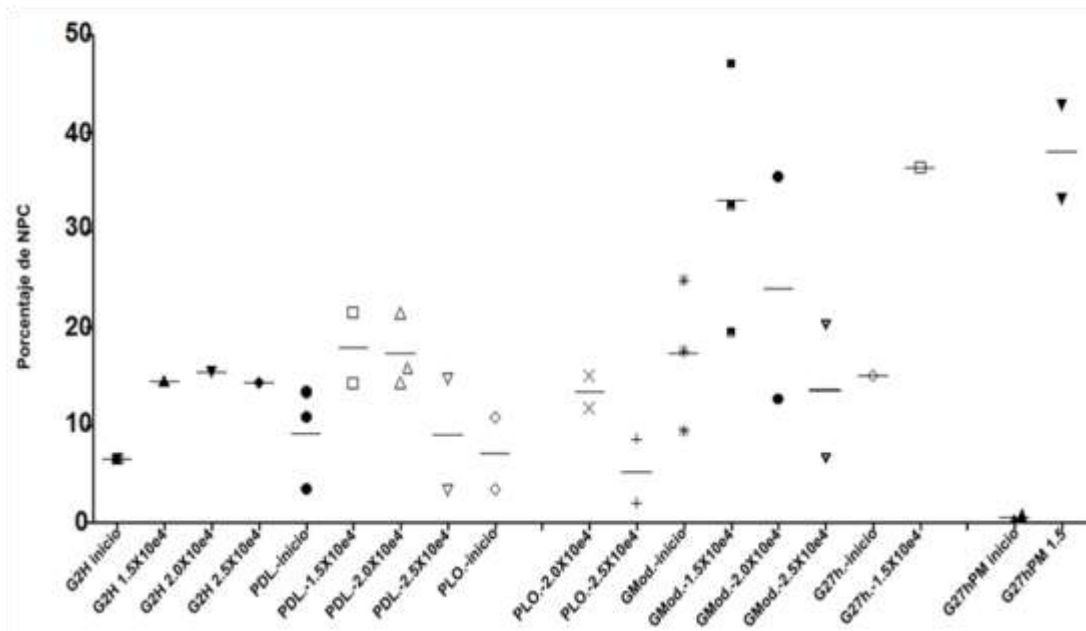


Fig. 25 a) Gráfica con que muestra la tendencia global del número total de células obtenidas al 10 día de inducción de diferenciación en cada condición., b) Gráfica del la tendencia global del número de NPC obtenidos al día 10 de diferenciación en cada condición., c) Gráfica que muestra la dispersión del porcentaje de NPC obtenidos en cada condición. G2H: Caja recubierta con gelatina por 2 h, PDL: caja recubierta con poli-d-lisina/laminina, PLO: caja recubierta con poli-l-ornitina/laminina, GMod: caja recubierta con gelatina con el procedimiento modificado, G27h: caja recubierta con gelatina durante 27 h. Todos los experimentos se hicieron siguiendo el protocolo “casi clásico” para inducir diferenciación, excepto en G27hPM: células 46C inducidas a diferenciación siguiendo el protocolo modificado con un periodo de adaptación de 4 días a medio sin suero, sobre una caja recubierta con gelatina durante 27 h, densidad de 1.5×10^4 células/cm².

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 El cambio de las condiciones de cultivo, en el protocolo “clásico” para inducir diferenciación en monocapa adherente y anormalidades cromosómicas, como posibles limitantes en la obtención de precursores neurales

En los primeros experimentos de inducción de diferenciación, fueron empleadas dos líneas celulares, la línea RFP y la línea R1B5 cultivadas rutinariamente sobre una capa de células alimentadoras. Esto implicó que las células deberían pasar por un período de adaptación a cultivo sin células alimentadoras. La línea RFP es sumamente sensible al cambio en las condiciones de cultivo, las células se desprenden de la caja de cultivo desde el primer día de inducción de diferenciación. Pensando que el desprendimiento de las células era debido a que estaban muertas, la primera estrategia fue incrementar la proporción de medio neurobasal-B27, que según lo descrito durante el desarrollo de este protocolo (Ying and Smith, 2003) mejora la supervivencia de las células. Sin embargo aun así hubo desprendimiento de todas las células en el cultivo. La línea RFP durante el período de adaptación sin células alimentadoras, tuvo cambios en la morfología colonial característica de mESC. Por esta razón pensamos en la posibilidad de que esta línea tenga anormalidades cromosómicas o mutaciones, como posibles causas asociadas a líneas celulares de mESC con resistencia a ser inducidas a diferenciarse a NPC en monocapa (Pollard et al., 2006).

La línea R1B5, en el período de adaptación sin células alimentadoras, tiene morfología característica de mESC (Figura 11b). Sin embargo en varios experimentos realizados, el desprendimiento de las células (Ying and Smith, 2003) alrededor del tercer día de inducción de diferenciación, provoca –en nuestras condiciones- que al cuarto día, todas las células se desprendan de la caja de cultivo.

El análisis de cariotipo de estas líneas celulares muestra que ambas, poseen un bajo porcentaje de células con una cuenta de cariotipo normal, información de experimentos realizados por el Dr. David Hernández, (Instituto de Biotecnología, UNAM) anexo figura

1. Es posible, que debido a esto la obtención de precursores neurales no fuera posible a partir de estas líneas celulares.

Por otra parte, el cambio en las condiciones de cultivo, de medio con suero y densidad alta, a medio sin suero y densidad baja, parece ser un factor limitante para la obtención de NPC en monocapa; ya que no obtuvimos precursores neurales de las líneas celulares RFP, R1B5 y 46C, realizando el método como está descrito. Posiblemente el hecho de sembrar a las células en densidad baja tenga efecto en el condicionamiento del medio, y al no haber suficiente concentración de factores autócrinos para permitir la diferenciación y supervivencia de las células durante la inducción de diferenciación, no sea posible la obtención de NPC. Respecto a lo anterior, se ha reportado que el medio condicionado de NPC cultivados como neuroesferas, sostiene la inducción de la diferenciación de ESC a NPC, este efecto es mediado por cistatina C. Además se ha reportado que la apolipoproteína E, otro factor identificado en el medio condicionado de neuroesferas, aumenta la cantidad de neuroesferas formadas de NPC obtenidos de mESC (Gan, et al., 2011).

7.2 Un período de adaptación a medio sin suero, empleando las líneas celulares 46C y Oct4GiP incrementa -en nuestras condiciones- las posibilidades de obtención de precursores neurales

A pesar de que en los reportes originales del desarrollo de este método, se describe que con éste, se obtuvieron precursores neurales de al menos 15 líneas de mESC, (Pollard et al., 2006; Ying and Smith, 2003), la mayoría de las publicaciones que consultamos donde este método se emplea, se utilizan las líneas celulares 46C y Oct4GiP (Abranches et al., 2009; Jaeger et al., 2011 ; Kunath et al., 2007; Parmar and Li, 2007; Pollard et al., 2006; Surmacz et al., 2012; Ying and Smith, 2003; Ying et al., 2003b; Zhang et al., 2010). Partiendo de esta observación, los siguientes experimentos se realizaron con estas líneas celulares.

La introducción de un período de adaptación de las células a medio sin suero, surgió con base del análisis del reporte de Ying et al., 2003a en el que se describe que el cultivo de mESC en medio N2B27 + LIF, no es capaz de soportar la auto-renovación de las ESC y llegan a ser Sox1 positivas. Por ende el cultivo en N2B27 + LIF es permisivo para la adquisición del destino neural.

Dado que con el protocolo “clásico” para inducir diferenciación no obtuvimos NPC, hasta esta fase del proyecto no era claro si durante la disociación de las células con tripsina, las células eran maltratadas a tal grado que después ya no podían pegarse a la gelatina ó si en nuestras condiciones de cultivo sin suero las células no podían ser cultivadas; incluso en cultivo rutinario a alta densidad.

Por las razones anteriores, las células se mantuvieron en medio N2B27+LIF, en alta densidad, durante 4 días. Período de tiempo en el que las células 46C no llegan a ser Sox1 positivas, mientras que las células Oct4GiP se mantienen Oct4 positivas (Figura 12b). En estas condiciones de cultivo obtuvimos por primera vez en nuestro laboratorio, precursores neurales, empleando el protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente (figura 13). Posteriormente, nos preguntamos si el período de adaptación a medio sin suero, es necesario para obtener precursores de estas líneas celulares ya que una de las estrategias propuestas, para favorecer la supervivencia de las células, es agregar LIF durante el primer día de cultivo a baja densidad (Ying and Smith, 2003).

En acuerdo con esta propuesta, otros grupos que han trabajado con este método, han recurrido estrategias similares, para favorecer la supervivencia y adherencia de las célula debido al cambio de condiciones de cultivo (Abranches et al., 2009; Andersson et al., 2006; Sternecker et al., 2010; Zeng et al.2011).

Nuestros resultados, además de las modificaciones que otros grupos han realizado, durante el cambio de medio de cultivo con suero a medio sin suero, sugieren que este paso es crítico y que el cultivo en medio sin suero+ LIF, previo a la diferenciación y/o durante las primeras horas a baja densidad, incrementa las posibilidades de obtención de NPC en monocapa.

7.3 Adherencia baja de las células 46C y Oct4GiP a la caja de cultivo, durante la inducción de la diferenciación, limita la obtención de precursores neurales en nuestras condiciones

Después de haber obtenido precursores neurales (con el protocolo modificado con período de adaptación a medio sin suero y con el protocolo casi clásico) el grado de desprendimiento de las células del plato de cultivo, a partir del tercer día de inducción de diferenciación continuaba limitando la obtención de NPC. Pensando que las células desprendidas estaban muertas, realizamos modificaciones, en componentes del medio de cultivo asociados a supervivencia.

Particularmente el uso del suplemento N2 en el medio N2B27, que es un medio libre de suero, ha sido empleado como un “suplemento mínimo de suero” (Suter and Krause, 2008). Sin embargo, el uso de soluciones frescas de insulina y transferina, dos de los elementos que componen el suplemento N2 que han sido asociados con proliferación y supervivencia de precursores neurales (Suter and Krause, 2008; Ying and Smith, 2003), no tuvo efecto en disminuir el desprendimiento de las células de las cajas de cultivo. Por otra parte, se ha mostrado que la adición de KSR al medio de cultivo N2B27, aumenta la supervivencia durante la diferenciación (Dr. Andras Nagy, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto Canadá). La adición de KSR al medio de cultivo tampoco disminuyó el grado con el que las células se desprendían. Finalmente, encontramos que no todas las células que se desprendían del plato están muertas. La tinción con azul tripano, reveló que las células desprendidas y que flotan como agregados esféricos están vivas. Lo anterior sugiere que el desprendimiento de las células, es un problema asociado al substrato, para comprobar lo anterior, realizamos experimentos empleando otros substratos.

Se ha reportado que el empleo de substratos como poli-d-lisina/laminina y poli-l-ornitina/laminina, promueve una mejor adherencia de las células durante la inducción de la diferenciación en monocapa, sin embargo, esos substratos también inducen la expresión de proteínas inhibitoras de la diferenciación y sesga la diferenciación a linajes no neurales (Ying et al., 2003a; Ying and Smith, 2003). En acuerdo con esto, en

nuestros experimentos de inducción de diferenciación empleando estos sustratos, no hubo agregados de células vivas flotando en la caja. Esto sugiere que, en nuestras condiciones, adicional a la *crisis* reportada por Ying donde muchas células mueren, existe una *crisis* de adherencia. Respecto a una baja adherencia en este sistema, los autores del método, han asociado este fenómeno a líneas de ESC aneuploides; sin embargo, sabemos que cuando las líneas celulares (Oct4GiP y 46C) llegaron a nuestro laboratorio, tenían un cariotipo normal (Información de experimentos del Dr. David Hernández, Instituto de Biotecnología, UNAM, Anexo Figura 1). Cabe la posibilidad de que a lo largo del cultivo las líneas hayan perdido esta característica y en consecuencia, modificado sus propiedades de adherencia.

Por otra parte, las modificaciones al procedimiento descrito para recubrir cajas de cultivo con gelatina (sección 5.2.2.3), mostraron reproduciblemente una mejora en la adherencia de las células en diferenciación, pero no mejoró el porcentaje de obtención de NPC (figuras 23-26). Nuestros resultados muestran una tendencia a obtener mayores porcentajes NPC al emplear gelatina como sustrato (figura 26). En todos los trabajos que hemos consultado y que utilizan este enfoque de diferenciación, este es el sustrato de elección (Abranches et al., 2009; Cambray et al., 2012; Diogo et al., 2008; Friling et al., 2009; Jaeger et al., 2011 ; Kunath et al., 2007; Parmar and Li, 2007; Pollard et al., 2006; Sternecker et al., 2010; Surmacz et al., 2012; Ying and Smith, 2003; Ying et al., 2003b; Zhang et al., 2010).

Respecto al procedimiento para recubrir cajas con gelatina, no existe un consenso sobre la mejor forma de realizarlo, el tiempo por el que se permite que la solución de gelatina cubra la caja, va desde 20 minutos (comunicación personal Dra. Meng Li, MRC Clinical Science Centre, Imperial College London, UK), 45 minutos (Ying and Smith, 2003) y hasta 1 hora (Pollard et al., 2006). Tampoco es claro si el permitir o no permitir que la gelatina seque antes de colocar las células, afecta su calidad de sustrato. En nuestra experiencia, permitir que la gelatina cubra el pozo por 27 horas y dejar secar el exceso, antes de colocar las células, muestra un reproducible incremento

en la adherencia, respecto a si se recubre por una hora (Anexo figura 3). Este tiempo de recubrimiento, puede reemplazar el procedimiento descrito en la sección 5.2.2.3. No obstante, es posible que cada laboratorio deba estandarizar las condiciones para el uso de gelatina.

7.4 La optimización del protocolo para inducir diferenciación en monocapa adherente podría depender de ajustes en la composición del medio de cultivo, un substrato óptimo y de las condiciones de cultivo previas a la diferenciación

Con base en nuestros resultados, tres factores principales, podrían ser determinantes para la obtención de precursores neurales en monocapa adherente:

- 1) Ajustes en la composición del medio de cultivo, fueron propuestos por los autores de este método y por otros grupos para incrementar la supervivencia de las células durante la diferenciación. De hecho existe comercialmente disponible, un medio N2B27 de segunda generación, cuya composición no conocemos en detalle. En nuestro caso, la adición de 1% de KSR al medio, incrementa el número de NPC obtenidos al final de la inducción de diferenciación. Células inducidas a diferenciar, sobre los tres substratos ensayados: Poli-d-lisina/laminina, poli-l-ornitina/laminina y gelatina, en medio sin KSR, en el protocolo para inducir diferenciación “casi clásico” se desprenden por completo de la caja de cultivo a diferencia de cuando se emplea KSR (figuras 19-26). Aunque no conocemos en detalle la proporción, sabemos los elementos que componen este suplemento. KSR es ampliamente usado en el cultivo de ESC humanas y de ratón. Se ha propuesto que su papel en el mantenimiento del estado pluripotente, es a través de un complejo de albúmina enriquecida con lípidos (Garcia-Gonzalo and Izpisua Belmonte, 2008). Dentro de los lípidos que este complejo contiene, se encuentra el ácido fosfatídico, lisofosfatidilcolina, fosfatidilcolina y esfingomiélin. Posiblemente el papel del KSR en mantener

mayor cantidad de células adheridas a la caja de cultivo, sea mediado también a través de alguno de estos lípidos o combinación de ellos, dado que se ha reportado la expresión de receptores de lisofosfolípidos, como ácido lisofosfatídico (LPA) en neuronas en diferenciación, por otra parte la adición de LPA en medio libre de suero, protege a las células de Schwann de apoptosis inducida por retirar suero del medio (Fukushima et al., 2001; Ishii et al., 2004) y dado que una porción de las células que se desprenden están muertas, es posible que el complejo de lípidos disminuya el desprendimiento de células por disminuir la cantidad de células que se desprenden debido a que están muertas.

2) El papel del sustrato, es otro factor crítico durante la diferenciación, aunque nuestros resultados y otros trabajos realizados con este enfoque, coinciden en que la gelatina es un sustrato ideal, está conocido que las moléculas de adhesión como E-cadherina, prominina-1, β -catenina y neurexinas, tienen un papel amplio en el desarrollo embrionario temprano y en el desarrollo del sistema nervioso. Papeles que van desde la compactación embrionaria y el establecimiento del trofoectodermo en el desarrollo embrionario temprano, proceso regulado por E-cadherina; el establecimiento de las capas germinales (β -catenina, p120-catenina), la formación del tubo neural (N-cadherina) y la expresión diferencial de cateninas en NPC y neuronas (Gotz and Huttner, 2005; Stepniak et al., 2009). A largo plazo una mayor comprensión del papel de moléculas de adhesión y de matriz extracelular durante la neurogénesis, podrían ser usados, para de manera racional; desarrollar o elegir un sustrato, que pueda proveer una mejor adhesión y la oportunidad de tener mayor cantidad de células diferenciadas.

3) Nuestros resultados con respecto a la de eficiencia de diferenciación, mantienen un alto grado de variabilidad de un experimento a otro. Es posible que, en las condiciones de cultivo previo a la diferenciación (medio con suero y LIF, sin células alimentadoras) al no ser la condición más estricta para el mantenimiento del estado pluripotente de las ESC de ratón, ellas puedan comenzar a sesgar su destino a linajes distintos al neural. En consecuencia, al colocarlas en

condiciones de diferenciación, la proporción de células que logre adquirir la identidad de precursor neural sea menor, que si las condiciones de cultivo previas a la diferenciación fueran estrictas. Lo que está de acuerdo con un reciente reporte (Marks et al., 2012), donde se describe que es posible obtener mayor porcentaje de NPC (hasta 50%), si la población de inicio ha sido cultivada en medio sin suero con los inhibidores de MEK y GSK-3 (condición estricta de pluripotencia; Ying, 2008); a diferencia de si la población de inicio es cultivada en medio con suero + LIF (20% de células Sox1 positivas). Sin embargo estos datos deben ser tomados con cautela, pues en este reporte solo muestra los resultados de un solo experimento, por lo que hace falta las repeticiones de estos experimentos y la confirmación de los datos.

Si bajo nuestras condiciones de cultivo, reactivos, medios, etc., la eficiencia de diferenciación puede aumentar por efecto del cultivo en condiciones estrictas de pluripotencia, son experimentos que se mantienen como perspectiva para la optimización del método para inducir diferenciación en monocapa.

8. CONCLUSIONES

- I. Introducir un período de cultivo en medio libre de suero adicionado con LIF, durante 4 días previos a la inducción de diferenciación ó la adición de LIF durante las primeras 24 horas de cultivo en densidad baja, es necesario para la obtención de NPC en nuestras condiciones, pero no tienen efecto en la reproducibilidad del porcentaje de NPC obtenidos.
- II. Modificar el tiempo para recubrir cajas de cultivo con gelatina incrementa la adherencia de las células a la caja de cultivo.
- III. Combinar los siguientes factores: 1) Adicionar KSR al 1 % en el medio de cultivo. 2) Recubrir las cajas de cultivo con gelatina por un periodo de tiempo prolongado. 3) Sembrar las células en una densidad de 1.5×10^4 células/cm² al inicio de la inducción de la diferenciación., permiten obtener NPC en un rango de eficiencia de 19.6 % hasta el 47.2%
- IV. Optimizar el protocolo para inducir diferenciación de mESC a NPC en monocapa adherente, depende principalmente de:
 - Realizar modificaciones en el medio de cultivo.
 - Realizar modificaciones en el procedimiento para recubrir cajas con gelatina.
 - Las condiciones de cultivo previas a la diferenciación.

9. PERSPECTIVAS

Realizar experimentos de diferenciación, con células previamente cultivadas en medio N2B27 + 2i.

Realizar experimentos de diferenciación en otras líneas celulares para explorar su adherencia y el porcentaje de NPC que pudieran obtenerse, con las condiciones que hemos establecido para las líneas 46C y Oct4-GiP.

Realizar mediciones del porcentaje de células Sox-1 positivas, en cada día de la diferenciación para conocer la cinética de diferenciación en nuestras condiciones.

Explorar la plasticidad de las células a través de la diferenciación, para adquirir el fenotipo de manera sitio-específica de distintos tipos neuronales, en el eje dorso-ventral, en explantes de mesencéfalo embrionario de ratón.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abranches, E., Silva, M., Pradier, L., Schulz, H., Hummel, O., Henrique, D., and Bekman, E. (2009). Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: a road map to neurogenesis in the embryo. *PLoS one* 4, e6286.

Aiba, K., Sharov, A.A., Carter, M.G., Feroni, C., Vescovi, A.L., and Ko, M.S. (2006). Defining a developmental path to neural fate by global expression profiling of mouse embryonic stem cells and adult neural stem/progenitor cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24, 889-895.

Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., and Ericson, J. (2006). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124, 393-405.

Baizabal, J.M., Furlan-Magaril, M., Santa-Olalla, J., and Covarrubias, L. (2003). Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Archives of medical research* 34, 572-588.

Burdon, T., Smith, A., and Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in cell biology* 12, 432-438.

Cai, C., and Grabel, L. (2007). Directing the differentiation of embryonic stem cells to neural stem cells. *Dev Dyn* 236, 3255-3266.

Cambray, S., Arber, C., Little, G., Dougalis, A.G., de Paola, V., Ungless, M.A., Li, M., and Rodriguez, T.A. (2012). Activin induces cortical interneuron identity and differentiation in embryonic stem cell-derived telencephalic neural precursors. *Nature communications* 3, 841.

Diogo, M.M., Henrique, D., and Cabral, J.M. (2008). Optimization and integration of expansion and neural commitment of mouse embryonic stem cells. *Biotechnology and applied biochemistry* 49, 105-112.

Friling, S., Andersson, E., Thompson, L.H., Jonsson, M.E., Hebsgaard, J.B., Nanou, E., Alekseenko, Z., Marklund, U., Kjellander, S., Volakakis, N., *et al.* (2009). Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 7613-7618.

Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J.J., Weiner, J.A., and Chun, J. (2001). Lysophospholipid receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 41, 507-534.

Gan, H.T., Tham, M., Hariharan, S., Ramasamy, S., Yu, Y.H., and Ahmed, S. (2011) Identification of ApoE as an autocrine/paracrine factor that stimulates neural stem cell survival via MAPK/ERK signaling pathway. *Journal of neurochemistry* 117, 565-578.

Garcia-Gonzalo, F.R., and Izpisua Belmonte, J.C. (2008). Albumin-associated lipids regulate human embryonic stem cell self-renewal. *PLoS one* 3, e1384.

Gotz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews* 6, 777-788.

Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X., and Chun, J. (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annual review of biochemistry* 73, 321-354.

Jaeger, I., Arber, C., Risner-Janiczek, J.R., Kuechler, J., Pritzsche, D., Chen, I.C., Naveenan, T., Ungless, M.A., and Li, M. (2011). Temporally controlled modulation of FGF/ERK signaling directs midbrain dopaminergic neural progenitor fate in mouse and human pluripotent stem cells. *Development (Cambridge, England)* 138, 4363-4374.

Kunath, T., Saba-EI-Leil, M.K., Almousaillekh, M., Wray, J., Meloche, S., and Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development (Cambridge, England)* 134, 2895-2902.

Marks, H., Kalkan, T., Menafra, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., Nichols, J., Kranz, A., Stewart, A.F., Smith, A., *et al.* (2012). The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* 149, 590-604.

Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development (Cambridge, England)* 134, 635-646.

Ormerod, B.K., Palmer, T.D., and Caldwell, M.A. (2008). Neurodegeneration and cell replacement. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 363, 153-170.

Parmar, M., and Li, M. (2007). Early specification of dopaminergic phenotype during ES cell differentiation. *BMC developmental biology* 7, 86.

Piccini, P., Brooks, D.J., Bjorklund, A., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehncrona, S., Widner, H., *et al.* (1999). Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nature neuroscience* 2, 1137-1140.

Pollard, S.M., Benchoua, A., and Lowell, S. (2006). Neural stem cells, neurons, and glia. *Methods in enzymology* 418, 151-169.

Ralston, A., and Rossant, J. (2008). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Developmental biology* 313, 614-629.

Rippon, H.J., and Bishop, A.E. (2004). Embryonic stem cells. *Cell proliferation* 37, 23-34.

Rossant, J. (2008). Stem cells and early lineage development. *Cell* 132, 527-531.

Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature medicine* 10, 55-63.

Stepniak, E., Radice, G.L., and Vasioukhin, V. (2009). Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a002949.

Sternecker, J., Stehling, M., Bernemann, C., Arauzo-Bravo, M.J., Greber, B., Gentile, L., Ortmeier, C., Sinn, M., Wu, G., Ruau, D., *et al.* (2010). Neural induction intermediates exhibit distinct roles of Fgf signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 28, 1772-1781.

Surmacz, B., Noisa, P., Risner-Janiczek, J.R., Hui, K., Ungless, M., Cui, W., and Li, M. (2012). DLK1 promotes neurogenesis of human and mouse pluripotent stem cell-derived neural progenitors via modulating Notch and BMP signalling. *Stem cell reviews* 8, 459-471.

Suter, D.M., and Krause, K.H. (2008). Neural commitment of embryonic stem cells: molecules, pathways and potential for cell therapy. *The Journal of pathology* 215, 355-368.

Vieira, C., Pombero, A., Garcia-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarria, D., and Martinez, S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *The International journal of developmental biology* 54, 7-20.

Vinals, F., Reiriz, J., Ambrosio, S., Bartrons, R., Rosa, J.L., and Ventura, F. (2004). BMP-2 decreases Mash1 stability by increasing Id1 expression. *The EMBO journal* 23, 3527-3537.

Watt, F.M., and Driskell, R.R. (2010). The therapeutic potential of stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 365, 155-163.

Winkler, C., Kirik, D., and Bjorklund, A. (2005). Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *Trends in neurosciences* 28, 86-92.

Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003a). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292.

Ying, Q.L., and Smith, A.G. (2003). Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods in enzymology* 365, 327-341.

Ying, Q.L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., and Smith, A. (2003b). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature biotechnology* 21, 183-186.

Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519-523.

Zeng, W.R., Fabb, S.R., Haynes, J.M., and Pouton, C.W. Extended periods of neural induction and propagation of embryonic stem cell-derived neural progenitors with EGF and FGF2 enhances Lmx1a expression and neurogenic potential. (2011). *Neurochemistry international* 59, 394-403.

Zhang, K., Li, L., Huang, C., Shen, C., Tan, F., Xia, C., Liu, P., Rossant, J., and Jing, N. (2010). Distinct functions of BMP4 during different stages of mouse ES cell neural commitment. *Development (Cambridge, England)* 137, 2095-2105.

ANEXO

LINEA	% de Kariotipos con 40 cromosomas	Mycoplasma
R1 p12+2	58.3	+
B5-EGFP pase X+1	38.4	+
RFP recup p14	11.1	+
G4 p9	78	+
zEG-2G p7	36.8	+
R1B5 p10	20	+
46C p27	86	-
E14 p16	56	-
Oct4-GFP p16	75	-
HRS p35	50	-

Datos del Dr. David Hernández

Fig. 1| a) Tabla con el porcentaje de cariotipos con cuentas normales de varias líneas de ESC en el laboratorio, en la línea R1B5 solo el 20% de los conteos son normales. Las líneas 46C y Oct4GiP presentan un alto porcentaje de conteos con el número correcto de cromosomas, cuando llegaron al laboratorio.

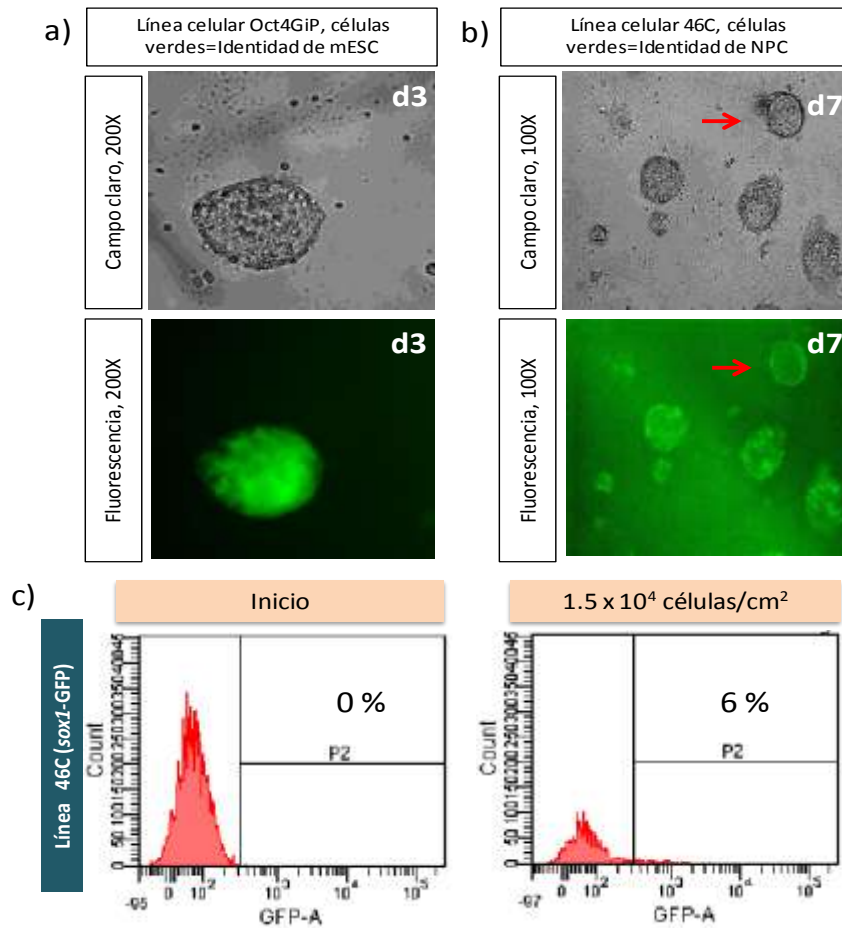


Fig. 2 | a) Fotografía en campo claro (arriba) de un agregado de células Oct4GiP flotando en suspensión al día 3 de inducción de diferenciación, la imagen en fluorescencia (abajo) muestra que las células retienen expresión de GFP (GFP=identidad de mESC) en los agregados)., b) Fotografía en campo claro (arriba) de un agregado de células 46C (flecha roja) flotando en suspensión al día 7 de inducción de diferenciación, la imagen en fluorescencia (abajo) muestra que en el agregado hay poca intensidad de GFP (GFP=identidad de NPC); c) Medición del porcentaje de células GFP positivas en la línea 46C (GFP=identidad de NPC), al inicio de la inducción de diferenciación (izquierda) y al día 7 de inducción de diferenciación (derecha). Al día 7 de inducción de diferenciación solo un 6 % de las células adquieren identidad de NPC dentro de los agregados, Estos resultados sugieren que dentro de los agregados las células no adquieren identidad de NPC de manera eficiente.

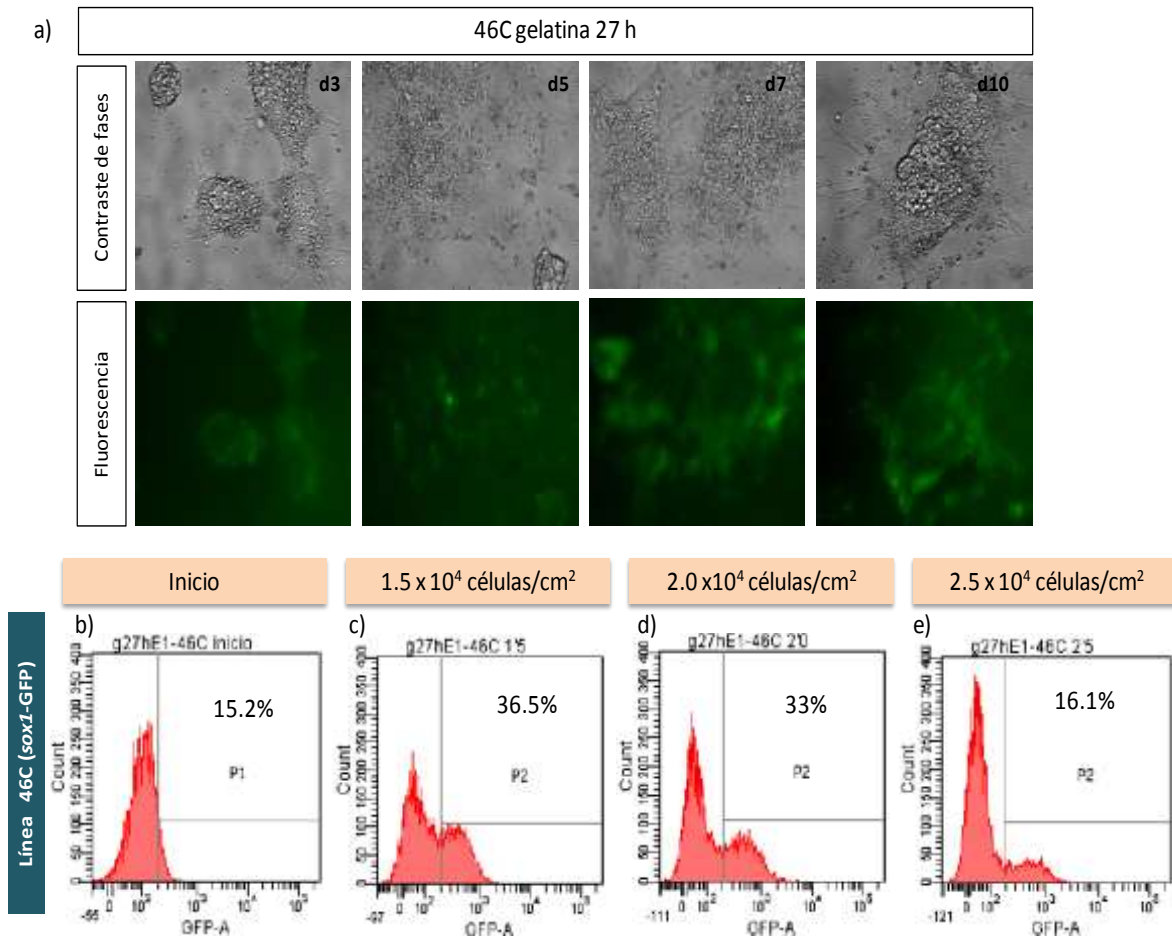


Fig. 3| a) Morfología y aumento en la expresión de GFP de las colonias de células 46C (sox1-GFP) en los días indicados de inducción de diferenciación; siguiendo el protocolo “casi clásico”, se muestran campos tomados al azar, las células se encuentran sobre una caja recubierta con gelatina durante 27h, en medio N2B27 + 1% KSR; b-e) medición por citometría de flujo de porcentaje de células que expresan sox1: b) al inicio de la diferenciación; c-e) a los diez días de inducción de diferenciación en las densidades indicadas sobre la gráfica .

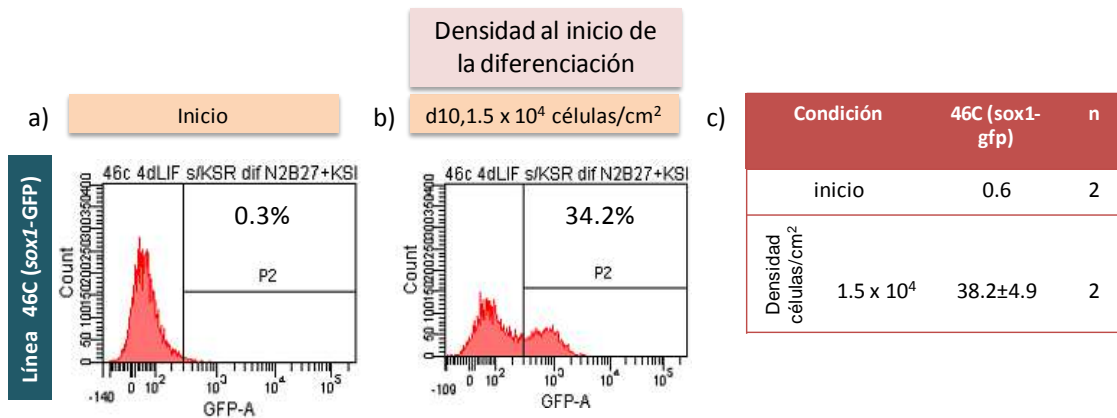
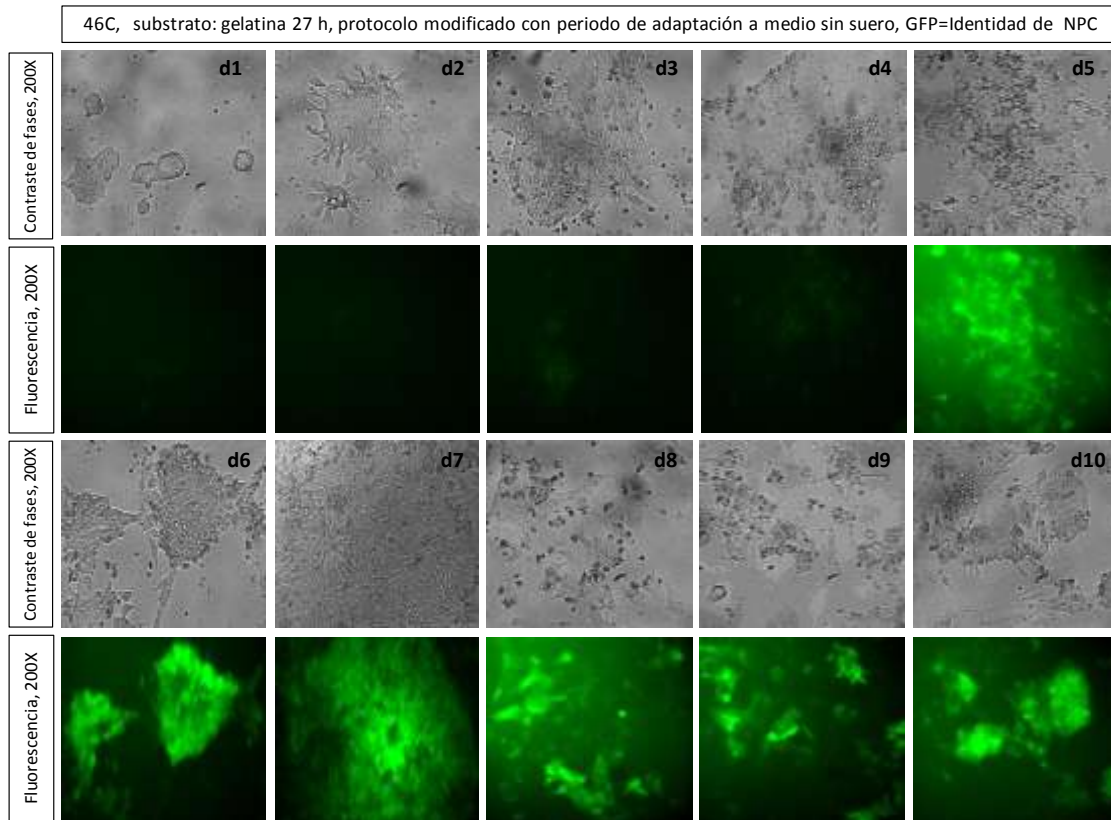


Fig. 4 | a) Morfología y aumento en la expresión de GFP de las colonias de células 46C en los días (d) indicados de inducción de diferenciación; se siguió el protocolo para inducir diferenciación modificado con un periodo de adaptación a medio sin suero. Se muestran campos tomados al azar, las células fueron sembradas sobre cajas recubiertas con gelatina durante 27 h, en medio N2B27 + 1% KSR., b) Porcentaje de células GFP positivas al inicio de la inducción de diferenciación de células previamente cultivadas en N2B27+LIF1000U/ml., b) Adquisición de la expresión de GFP en la línea celular 46C (GFP=Identidad de NPC), i) Tabla con el promedio de células GFP positivas (en porcentaje \pm error estándar) en la línea 46C (GFP=Identidad NPC) en día 10 de inducción de diferenciación, n = número de experimentos independientes.