



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Biología Celular y Fisiología

La expresión de p16, p19 y Bmi1 asociada
a la pérdida del potencial neurogénico de
las células troncales neurales en la
médula espinal del embrión murino.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

Giselle Pacheco Tapia

Director: Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

México, D.F. Marzo de 2013.



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.

Agradecimientos

El presente proyecto fue realizado en las instalaciones del laboratorio B220, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para la realización de este trabajo, la colaboración y apoyo del Dr. Jesús Ramírez Santos fueron imprescindibles por lo que doy mi más sincero agradecimiento y reconocimiento. Así mismo, agradezco a la Dra. Georgina Díaz por el apoyo técnico brindado en la calendarización de las cruzas y partos.

Los recursos e infraestructura que apoyaron el desarrollo del proyecto fueron proporcionados con fondos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No.82879) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT No. IN203912-3).

Dedicatorias

A mis padres, mis primeros maestros, que siempre me han dado todo su apoyo y amor. Gracias a ellos he llegado hasta donde estoy.

A Violeta, mi hermana, por ser la mejor compañera y amiga siempre.

A mis mejores amigas, personas inteligentes y maravillosas, por todo lo que aportan a mi vida.

A mis amigos, por su apoyo incondicional.

A mis amigas y compañeras de generación, Dianita, Karen y Alice, de las cuales aprendí mucho y que hicieron de la carrera algo más genial.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, por las enseñanzas, por los consejos, por infundir confianza en sus estudiantes y por darnos la oportunidad de acudir a él en cualquier momento.

A Leonora, compañera y amiga en la realización de esta tesis, por iniciarme en el proyecto y compartirme valiosos conocimientos.

Al Dr. Jesús Ramírez por el apoyo, por toda la ayuda en la realización del trabajo experimental y, más que nada, por la amistad.

A mis queridos profesores y tutores a lo largo de la carrera: la Dra. Victoria Chagoya, el Dr. Alejandro Zentella y el Dr. Wilhelm Hansberg, por su invaluable contribución en mi formación académica.

A mis compañeros de laboratorio, actuales y pasados.

A mis sinodales, por la revisión de esta tesis y por sus comentarios.

Al personal del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por todo el apoyo en la obtención y el cuidado de los animales.

Al personal de la Biblioteca del instituto de Investigaciones Biomédicas.

Índice

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes:	3
a) Generalidades sobre las células troncales neurales	
b) Modelos sobre la regulación del potencial neurogénico	
c) Reguladores del ciclo celular: Generalidades y Participación en las CTNs	
IV. Planteamiento del Problema	10
V. Hipótesis	10
VI. Objetivo General	10
VII. Objetivos Particulares	10
VIII. Metodología	11
IX. Resultados	17
X. Discusión	21
XI. Perspectivas	22
XII. Bibliografía	23

Resumen

La creación de los distintos linajes celulares que constituyen al sistema nervioso durante el desarrollo en los mamíferos es un proceso finamente regulado en tiempo. Así, durante las etapas tempranas de la ontogenia, las células troncales neurales (CTNs) esencialmente originan neuronas. Sin embargo, al transcurrir del tiempo, el potencial neurogénico de éstas decae dando paso a una etapa gliogénica que se conserva a lo largo de la vida postnatal en la mayor parte de las regiones del sistema nervioso. Actualmente, el modelo sobre la transición de neurogénesis a gliogénesis durante el desarrollo considera: cambios en el nicho de las CTNs y diferencias en la remodelación de la cromatina y en la afinidad por los factores de transcripción neurogénicos versus los gliogénicos, como los responsables de la pérdida del potencial neurogénico. Sin embargo, este modelo no contempla numerosos estudios de la zona subventricular, una zona en que las CTN no pierden la capacidad de generar neuronas hasta etapas adultas. Tales estudios han enfocado su atención a moléculas reguladoras del ciclo celular que al ser expresadas o inhibidas cambian el patrón del potencial de auto-renovación y diferenciación de las CTNs.

De esta manera, nuestra propuesta es que moléculas que hasta ahora se consideran como reguladoras del ciclo celular (p16, p19^{ARF} y Bmi1) pudiesen también participar en la modulación del potencial de diferenciación de las CTNs. Incorporar al modelo la participación de estas moléculas reguladoras del ciclo celular contribuirá a que se explique el por qué de la irreversibilidad en el potencial de diferenciación de las células troncales neurales a lo largo del tiempo.

Con el propósito de analizar esa hipótesis en nuestro estudio evaluamos la expresión de p19^{ARF} y p16, inhibidores del ciclo celular, en la transición neuro-gliogénesis así como, la expresión de Bmi1, que promueve la progresión del ciclo celular. Nuestros resultados demuestran que al tiempo en que la etapa neurogénica llega a su fin la expresión de Bmi1 disminuye. Por otra parte, no encontramos expresión de los inhibidores del ciclo celular p16 y p19^{ARF} en las etapas estudiadas. Es por esto, que en nuestro trabajo concluimos que la restricción del potencial neurogénico del las CTN medulares se asocia con un decremento de la expresión y disponibilidad de Bmi1 de la etapa neurogénica a la gliogénica.

Introducción

Durante la ontogenia, las células troncales neurales (CTNs) dan origen a una progenie capaz de diferenciarse en neuronas. El potencial de diferenciación neuronal, sin embargo, no es permanente sino que se restringe a etapas del desarrollo embrio-fetal en la mayor parte de las regiones del sistema nervioso central. Los mecanismos que conducen a esta pérdida rápida y progresiva del potencial neurogénico de las CTNs embrio-fetales son poco claros. Sin embargo, la concepción dominante sugiere que la interacción de factores epigenéticos, microambientales y genéticos, con el paso del tiempo, favorece la expresión de fenotipos gliales, situación que restringe el potencial neurogénico de las CTNs. Recientemente, se ha mostrado que las CTNs adultas producen Bmi1 y HMGA2, moléculas que promueven la progresión del ciclo celular, durante la fase neurogénica (Nishino et al. 2008; Molofsky et al. 2003) y p16 y p19^{ARF}, inhibidores del ciclo celular, cuando su potencial neurogénico decae con el tiempo (Molofsky et al. 2005; Nagao et al. 2008). Esta observación sugiere que además de la regulación epigenética de genes proneuronales y/o progliales, moléculas que hasta ahora se consideran como reguladoras del ciclo celular, pudiesen también participar en la modulación del potencial de diferenciación de las CTNs. Con base en estas observaciones, en el presente trabajo evaluamos los cambios en la disponibilidad de p16, p19^{ARF} y Bmi1 durante la transición neuro-glial del potencial de diferenciación de las CTNs en la médula espinal del ratón.

Antecedentes

Generalidades sobre las CTNs

Las células consideradas troncales poseen capacidades para renovarse y dar origen a múltiples linajes celulares. En términos generales, existen dos categorías. Por una parte están las células troncales embrionarias que provienen de la masa interna del blastocisto y son capaces de producir cualquier célula del embrión, es decir son totipotenciales. Por la otra, se ubican las células troncales adultas que se encuentran en los tejidos de los órganos maduros y tienen como función la de proveer de precursores destinados a generar células de reemplazo al órgano del cuál forman parte. Si bien, anteriormente se asumía que éstas sólo podían generar células de linajes específicos relacionadas con el órgano correspondiente (Gilbert 2010a), evidencia reciente sugiere que las células troncales adultas son más plásticas de lo previamente pensado por lo que ahora se les considera multipotentes (Rao 2005; Pelayo et al. 2011).

En los mamíferos, las CTNs son multipotentes. Éstas son capaces de dar origen a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos cuando se ubican en los nichos correspondientes a lo largo de las paredes ventriculares del sistema nervioso central durante la vida prenatal (neuroepitelio ventricular; Wesselschmidt & McDonald 1999), o en la región subventricular de las paredes medial y laterales de los ventrículos homónimos durante la vida postnatal (Lim & Alvarez-Buylla 1999). Su proporción varía de acuerdo a la zona y a la etapa del desarrollo en la que se encuentre el individuo (Temple 2001). Mientras que durante la vida embrionaria y fetal las CTNs son abundantes a lo largo del sistema ventricular y ductal, en el animal adulto los nichos neurogénicos altamente activos se restringen a las capas subependimarias del bulbo olfatorio, telencéfalo e hipocampo (Lim & Alvarez-Buylla 1999). No obstante el hecho de que existen otras regiones que poseen células troncales remanentes, como la médula espinal (Weiss et al. 1996).

La población de CTNs presentes a lo largo de la vida se origina a partir de procesos de inducción, competencia y especificación progresivos de precursores celulares que aparecen en el neuroectodermo embrionario durante la gastrulación tardía (Gilbert 2010b). Ahora sabemos que Noggin, Cordinina, Folistatina y Cerberus son proteínas que participan de manera activa en el mantenimiento del linaje troncal neural, a través de antagonizar el efecto de aquellas pertenecientes a la familia de las proteínas morfogénicas de hueso (Figura 1; ver Pelayo et al. 2011). Una vez especificadas, las CTNs incrementan su número a través de divisiones simétricas. Posteriormente, la mayor parte de las CTNs así originadas inician rondas de divisiones asimétricas que conducen a la formación de CTNs amplificadoras; y estas a su vez, a la de células blásticas que se diferenciarán en los principales linajes celulares que constituyen al sistema nervioso. Algunas de las CTNs que resultan de las primeras rondas de divisiones simétricas pueden

entrar en un estado quiescente quedando de reservorios celulares a partir de los cuales la población de CTNs amplificadoras puede ser, en algunos sitios, restituida con el paso del tiempo

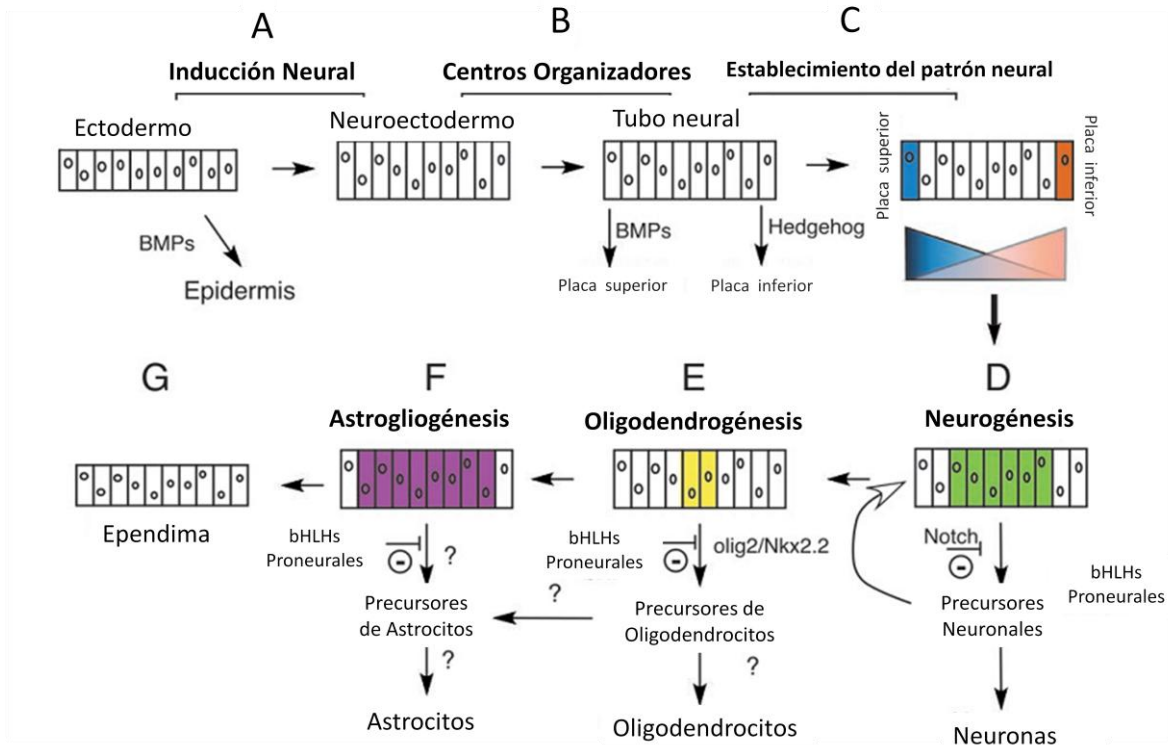


Fig. 1 Esquemas que ilustran la secuencia de los eventos de la ontogenia neural que le dan origen las CTNs y los factores que promueven la diferenciación de su progenie hacia los linajes terminales (Modificado de Kintner 2002).

A lo largo de la vida de un individuo, incluyendo su desarrollo embrionario, las CTNs pueden ser de tres tipos: precursores neurales, células progenitoras intermedias y glía radial (Gilbert 2010b). Como se mencionó, estas células se dividen simétricamente, situación que permite la auto-renovación y amplificación de las poblaciones troncales de base, al tiempo que se generan células progenitoras intermedias o amplificadoras (Pelayo et al. 2011) que poseen un mayor potencial proliferativo y un cierto compromiso para dar origen a las precursoras de los linajes terminales. Las CTNs de base o precursores neurales primitivos se caracterizan por expresar Nestina, Sox1 y Oct4 independientemente de la edad gestacional o postnatal.

Las células progenitoras intermedias generan, mediante divisiones asimétricas, otro progenitor y una célula blástica. En fases definidas del desarrollo, su potencial de diferenciación muestra una preferencia para dar origen a neuronas (Temple 2001). En etapas avanzadas del desarrollo posterior al periodo neurogénico, es posible detectar a otra población celular con características de célula troncal. Esta población de progenitores

se genera de la anterior y tiene diferencias con las células progenitoras intermedias, pues conduce a la diferenciación glial (Gilbert 2010b). Si bien las células progenitoras intermedias requieren del factor de crecimiento de fibroblastos para proliferar, los progenitores gliales muestran una dependencia exclusiva por el factor de crecimiento epidérmico para su propagación al menos bajo condiciones *in vitro* (Winkler et al. 1998).

La tercera población de CTN es la glía radial. En el embrión, ésta aparece en etapas previas a la neurogénesis. La glía radial posee prolongaciones que alcanzan la superficie pial desde la base del neuroepitelio germinal en donde tienen su cuerpo. Si bien se ha documentado extensamente que este tipo celular brinda guías que facilitan la migración de los neuroblastos (Gilbert 2010b), los astrocitos radiales también parecen capaces de proliferar asimétricamente y dar lugar a precursores neuronales y gliales al menos a nivel de la corteza cerebral (Götz et al. 2002).

Modelos sobre la regulación del potencial neurogénico.

Como se comentó previamente, aunque se desconoce con precisión el (los) mecanismo(s) que conduce a la pérdida del potencial neurogénico, se ha propuesto que esta circunstancia se relaciona con eventos genéticos intrínsecos programados que conllevan a la expresión de genes progiales que interrumpen la expresión de aquellos relacionados con la neurogénesis (Figura 2). En apoyo a esta posibilidad, se ha observado que las CTNs incrementan, en determinada ventana de tiempo, la expresión de factores de transcripción que desfavorecen el mantenimiento del potencial neurogénico (e.g., proteínas de unión a CRE) cuando adquieren el potencial de diferenciación gliogénico (Kintner 2002). Además de lo anterior, se ha documentado que las variaciones en la disponibilidad de factores micro-ambientales (Figura 2; Jalali et al. 2001) promueven, a través de mecanismos epigenéticos, por ejemplo la desmetilación de la histona 4, la diferenciación glial (Juliandi et al. 2010; Pelayo et al. 2011). Observaciones recientes, sin embargo, apoyan la idea de que moléculas inicialmente consideradas como reguladoras del ciclo celular pudiesen participar en la modulación del potencial de diferenciación de las CTNs. En particular, se observó que las CTNs adultas incrementan la disponibilidad de p16 y p19^{ARF} y p21 tan pronto como empiezan a perder su potencial neurogénico en edades avanzadas de la vida (Molofsky et al. 2005; Nishino et al. 2008; Fasano et al. 2007). De esta forma, es posible que los cambios en la disponibilidad de estas proteínas también pudiesen participar en el control de la etapa de transición neuro-glial de las CTNs embrio-fetales (Figura 2), con la consecuente pérdida del potencial neurogénico troncal en etapas tempranas de la ontogenia.

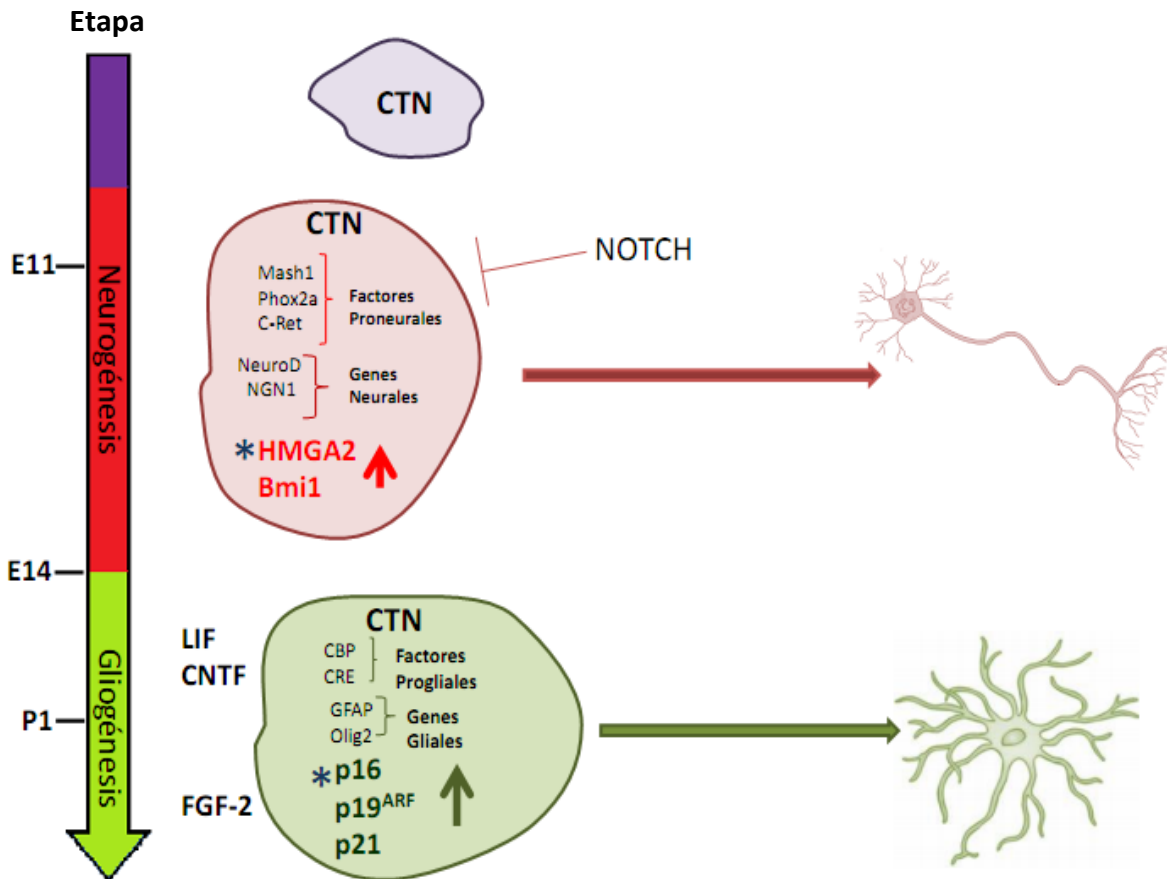


Fig. 2 Modelos sobre la pérdida del potencial neurogénico. Representación gráfica de los mecanismos por medio de los cuáles la CTNs adquieren un compromiso neuronal o glial. En etapas tempranas del desarrollo las CTNs favorecen la generación de neuroblastos y bloquean la diferenciación glial al expresar preferencialmente una serie de factores de transcripción proneurales, miembros de la familia bHLH (hélice asa hélice básica) como Mash I, Phox2a, c-Ret. Además genes como NGN1 y NeuroD son importantes para el compromiso neurogénico. Conforme pasa el tiempo factores de transcripción como CBP (proteína de unión a CRE) y CRE (elemento de respuesta a AMP cíclico) se expresan mayormente y la CTN pierde su potencial de diferenciación neurogénico. Así mismo, cambios en los factores micro ambientales influyen en el potencial de diferenciación al activar o inhibir factores de transcripción. Por ejemplo, la vía de Notch inhibe la actividad de las proteínas proneurales. También, se ha visto que la pérdida del potencial neurogénico en las CTN es estimulada por el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) y que la gliogénesis es estimulada por el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y factor neurotrófico ciliar (CNTF). *La expresión de estas moléculas reguladoras del ciclo celular pudiese participar como un nuevo elemento en la diferenciación neuronal y/o en la restricción del potencial neurogénico de las CTNs.

Reguladores del ciclo celular: Generalidades y Participación en las CTNs

El presente trabajo se enfoca en las moléculas reguladoras del ciclo celular en el punto de control inicial para la progresión del ciclo. Éste está entre la fase G1 y la fase S, donde la formación del complejo ciclina D–Cdk4/6 es necesaria para que hiperfosforile a la proteína Rb. Que a su vez, liberará al factor de transcripción E2F. E2F recluta complejos que ayudan a relajar la estructura de la cromatina, como las acetilasas de histonas (HATs); las cuales, contribuyen a activar genes en la fase S, y permiten que el ciclo continúe. En éste punto dos de las proteínas inhibidoras de Cdk (CKI) que impiden que el ciclo celular continúe son p16 y p19^{ARF}. p16 compite con la ciclina D por la unión a la Cdk 4/6 y por lo tanto, impide la formación del complejo ciclina D–Cdk4/6 (Jacobs et al. 1999; Lowe and Sherr 2003). Por su parte p19^{ARF} promueve la actividad de p53 al inhibir a la proteína MDM2, inhibidora de p53. La función de p53 es promover la transcripción de p21Cip, mediante la unión de p53 fosforilado a la región regulatoria del gen que lo codifica. La proteína p21 es un CKI que actúa dejando inactivo el complejo ciclina-Cdk de los puntos de control G1/S y S (Ciclina E/A–Cdk2). De tal manera que indirectamente p19^{ARF} también retrasa la progresión del ciclo celular o induce a senescencia celular. A su vez, el locus INK4a está reprimido por Bmi-1 y Hmga2 (Figura 3).

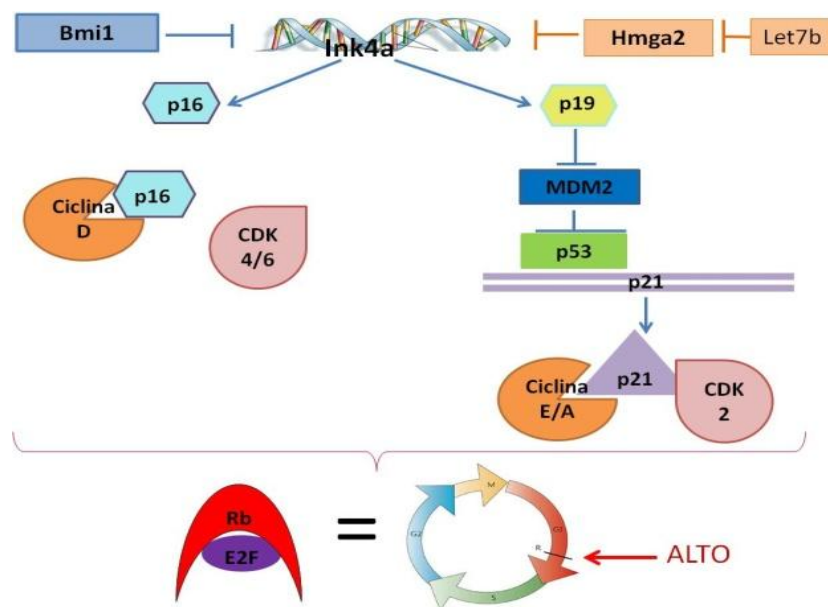


Fig 3. Participación de los inhibidores p16 y p19 ARF en la regulación de la progresión del ciclo celular a través de Rb y E2F en el punto de inicio G1/S.

Bmi1 es parte del grupo de genes polycomb, que comprende alrededor de 20 proteínas; las cuales mantienen estable la represión transcripcional al formar distintos complejos multiprotéicos (PRC) en sitios cromosomales específicos llamados elementos de respuesta

a polycomb (PRE). Por su parte, los PRC reprimen la transcripción ya que favorecen en la compactación de la cromatina. Entre los principales blancos del grupo de proteínas polycomb están los genes homeóticos, que regulan procesos durante el desarrollo como la formación de patrones y la diferenciación. (Sustáčková et al. 2012)

Bmi1 fue identificado como el primer miembro funcional del grupo de genes polycomb y codifica para una proteína nuclear de 45-kDa ampliamente expresada. Por ejemplo, se ha encontrado expresión de Bmi1 en: células troncales embrionarias, placenta, timo, corazón, testículo y cerebro. Además, ha sido descrito ampliamente en las CTN durante el desarrollo y su expresión se restringe conforme el desarrollo progresa. De hecho, ratones deficientes de Bmi1, además de tener anomalías hematopoyéticas y en huesos; desarrollan síntomas neurológicos incluyendo ataxia, convulsiones y temblores de tres a cuatro semanas después de nacer (Zencak et al. 2005). Los análisis histopatológicos revelaron una arquitectura cerebral normal pero, con una reducción significativa de tamaño, particularmente en el cerebelo en sus capas granular y molecular. Un análisis de Bmi1 durante el desarrollo mostró su amplia expresión en las células troncales neurales del cerebelo, especialmente en las células progenitoras amplificadoras. El ratón recién nacido depletado de Bmi1 tiene un número reducido de precursores neuronales inmaduros, mientras que tiene en abundancia células postmitóticas que expresan el CKI p27. Así, se ha observado que Bmi1 está relacionado con el control de la proliferación y la senescencia a través de varios mecanismos (Jacobs et al. 1999; Bruggeman et al. 2005). Uno de tales mecanismos es la represión del locus INK4a. De tal forma, que un incremento en p16 contribuye en parte a la reducción de la autorenovación de CTN del telencéfalo de ratones deficientes de Bmi1.

El otro regulador del sitio INK4a es Hmga2. Éste es un miembro de la familia de proteínas del grupo de alta movilidad, que corresponde a proteínas asociadas a la cromatina (Nishino et al. 2008). Éstas pueden modular la transcripción al alterar la estructura de la cromatina, aunque no tienen una actividad transcripcional intrínseca (Reeves 2001). Se ha observado que Hmga2 está expresado en células indiferenciadas durante el desarrollo y su expresión decrece conforme el desarrollo fetal progresa; además su expresión incrementa la autorenovación de células troncales fetales y posnatales jóvenes en comparación con las células troncales adultas, al regular negativamente a p16Ink4a y p19Arf.

Por otro lado, se ha observado que la vía p19^{ARF}-p53 regula la autorenovación y la diferenciación dependiendo de la edad. Así, CTN de etapas tempranas del desarrollo tienen un bajo nivel de p19 y retienen el potencial de autorenovación y neurogénico. Mientras que CTN de etapas tardías, con niveles de expresión de p19 más elevados

poseen baja capacidad de autorenovación y generan predominantemente glía. La sobreexpresión de Myc o inactivación de p19 revierte las características de las CTN tardías y les da fenotipo de CTN de etapas jóvenes. Contrariamente la inactivación de Myc o la expresión inducida de p19 atenúa la autorenovación e induce a una gliogénesis precoz, a través de la modulación de respuesta a señales gliogénicas (Nagao et al. 2008).

Planteamiento del Problema

El modelo actual que pretende explicar los mecanismos que conducen a la pérdida del potencial neurogénico en CTNs embrio-fetales enfatiza la participación de genes progiales y de su regulación en este proceso. Estudios realizados en CTNs adultas, sin embargo, sugieren que proteínas primeramente definidas como reguladoras de la progresión del ciclo celular pudiesen también participar en la restricción del potencial neurogénico troncal. El presente trabajo evaluó la validez de este último postulado en periodos del desarrollo prenatal con el objeto de establecer si constituye un principio general de organización.

Hipótesis

P16 y p19^{ARF} incrementarán su disponibilidad, al tiempo que Bmi1 disminuirá durante la fase de transición neuro-glial en la médula espinal embrionaria del ratón.

Objetivo General

Analizar la expresión de p16, p19^{ARF} y Bmi1 durante la transición neuro-glial en la médula espinal embrionaria del ratón.

Objetivos Particulares

- ✓ Caracterizar los perfiles de disponibilidad y la localización de marcadores neuronales (doblecortina; DCX por sus siglas en inglés) y gliales (proteína ácida fibrilar; GFAP por sus siglas en inglés) durante las etapas neurogénica, de transición neuro-glial y gliogénica en la médula espinal del ratón *in situ*, mediante técnicas de inmunocitoquímica.
- ✓ Caracterizar los perfiles de expresión de los genes que codifican para p16, p19^{ARF} y Bmi1 durante las etapas neurogénica, de transición neuro-glial y gliogénica en la médula espinal del ratón, mediante técnicas de PCR tiempo real.
- ✓ Caracterizar los perfiles de disponibilidad y la localización de p16, p19^{ARF} y Bmi1 durante las etapas neurogénica, de transición neuro-glial y gliogénica en la médula espinal del ratón *in situ*, mediante técnicas de inmunocitoquímica.

Metodología

Animales

Los experimentos que se describirán a continuación fueron realizados en embriones (n=16) obtenidos de ratonas de la cepa CD1 (n=12) sacrificadas por dislocación cervical a los 11 (etapa neurogénica; Nornes & Carry 1978) o 14 (etapa de transición neuro-glial; Nornes & Carry 1978) días de gestación, siguiendo los protocolos en Hendrich & Bullock del 2004. En el caso de los ratones con un día de edad (etapa gliogénica; Nornes & Carry 1978), se anestesiaron por hipotermia para después ser sacrificados por decapitación. Durante la gestación las ratonas fueron mantenidas en condiciones estándar de bioterio, bajo ciclos de oscuridad/iluminación de 12 h y teniendo libre acceso a agua y alimento. Los protocolos empleados fueron aprobados por la comisión de ética para la experimentación con animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Obtención, procesamiento y análisis de las muestras de la médula espinal para la valoración de la expresión de Bmi1, p16 y p19 por medio de PCR.

Los animales se sacrificaron de acuerdo a lo descrito en el párrafo precedente. Una vez sacrificados los ejemplares, las médulas espinales cervicales fueron disecadas bajo el microscopio estereoscópico. Para cada ensayo (n=4), se colectaron muestras de tres animales por edad, las cuales se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Con el objeto de extraer RNA mensajero, para los experimentos de PCR de punto final se utilizó el estuche RNeasy Mini Kit de Qiagen (No. Cat. 74104). Siguiendo sus instrucciones el tejido (20-30 mg) fue homogenizado en amortiguador comercial RTI y centrifugado por 3 min a 8000 g a temperatura ambiente. El sobrenadante colectado se diluyó vol/vol con etanol al 70% y se pasó a través de una columna RNeasy Mini centrifugada a 8000 g por 15 seg a temperatura ambiente. El volumen decantado se descartó y la columna volvió a centrifugarse pero ahora añadiéndose 700 µl de amortiguador RW1. Nuevamente, después de descartar el volumen decantado, la columna se centrifugó por dos minutos, pero ahora agregando 500 µl de amortiguador RPE. Finalmente, la columna se colocó en un tubo limpio de 1.5 mL y se le agregó 30µl de agua libre de RNAsas, ejecutándose una centrifugación final a 8000 g por un minuto.

En la extracción de RNA para las reacciones de PCR cuantitativo se utilizó Trizol grado biología molecular. Se agregó 1 mL de Trizol por cada 50 mg de tejido, y en éste se maceró el tejido. Se dejó incubar las muestras por 5 min y se le agregó 200 µl de cloroformo. Se agitaron los tubos y se incubaron por 3 min a temperatura ambiente. Al homogenado resultante se le centrifugó por 15 min a 12000 rpm a 4°C. En este punto el homogenado se separó en tres fases. Se transfirió la fase acuosa e incolora a un tubo

limpio y el resto se desechó de acuerdo a lo establecido para desechos de Trizol. A este sobrenadante se agregó 500 μ l de isopropanol y se dejó reposar por 8 h. Posteriormente, la mezcla se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm a 4°C y descartó el sobrenadante. El pellet resultante se lavó por lo menos 3 veces con etanol al 75% y finalmente, se dejó secar. El RNA fue disuelto en 30 μ l agua estéril libre de RNAsas.

La calidad del RNA mensajero aislado, mediante ambas técnicas, fue verificada en un gel de agarosa (1%) y su concentración se estimó mediante nano-espectrofotometría. Posteriormente las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

Para producir DNA complementario (cDNA) a partir del RNA mensajero purificado se tomaron 2 μ g de RNA pre-tratado con DNAsa I durante 15 min a 37°C, seguido de la adición de 0.5 μ l de EDTA (60 μ M) para evitar su degradación. Posteriormente, la retrotranscripción del RNA se llevó a cabo utilizando el estuche de transcripción reversa de alta eficiencia siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems; Cat. 4368814). En breve, el RNA mensajero se mezcló con 10 μ l de la solución de retrotranscripción constituida por 2 μ l de amortiguador RT 10 x, 0.8 μ l de mezcla de dNTP 25 x (100 mM), 1 μ l de oligonucleótido de T, 2 μ l de RT Random Primers 10 x, 1 μ l de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe y 3.2 μ l de agua libre de RNAsas. Esta mezcla se colocó en el termociclador programado para desarrollar ciclos de retrotranscripción de 10 minutos a 25°C, 120 min a 37°C y 5 min a 85°C. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para amplificar los transcritos de p16, p19^{ARF} y Bmi1 utilizamos el estuche de amplificación diseñado por Promega (Cat. M7502) de acuerdo a sus recomendaciones. Las características de los protocolos empleados y las sondas utilizadas para la amplificación de los transcritos referidos se presentan en el Tabla1. Como controles positivos de p16 se empleó pulmón adulto y para p19^{ARF} bazo adulto (10 semanas en el caso de los adultos).

Gen	Protocolo			Oligonucleótidos	
	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Sentido	Antisentido
p16	95°C 2 min	52°C 1min	72°C 1min	CCCAACGCC GAACT	GCAGAAGA GCTGCTACG TGAA
p19^{ARF}	95°C 2 min	52°C 1min	72°C 1min	TGAGGCTAG AGAGGATCT TGAGA	CAGAAGAG CTGCTACGT GAA
Bmi1	95°C 2 min	53°C 1min	72°C 1min	AGAAGAGAT TTTTATGCAG CTCA	CAACTTCTC CTCGGTCTT CA

Tabla1. Protocolos y oligonucleótidos empleados para la amplificación de los transcritos de p16, p19^{ARF} y Bmi1.

Se realizaron ensayos de PCR cuantitativo para p19^{ARF}. En estos utilizó el equipo Rotor Gene según las especificaciones del proveedor con un protocolo de 2 pasos (30 seg a 95°C y 60 seg a 60°C) con 20, 50 y 100 ng de cDNA; y posteriormente, con un protocolo de tres pasos (30 seg a 95°C, 30 seg a 52°C y 60 seg a 72°C). Sin embargo, los ciclos que se presentaron fueron demasiado tardíos por lo que fue imposible obtener un dato que permita calcular la expresión relativa.

En el caso del PCR en tiempo real de Bmi1, también se utilizó el equipo Rotor Gene con un protocolo de 2 pasos (30s a 95°C y 60s a 52°C) en el que se agregó 20 ng de cDNA a cada reacción. Para la reacción utilizamos el reactivo SYBER GreenER de la marca Invitrogen con No. de Cat. 11762-500 y los mismos oligonucleótidos que para el PCR de punto final. Cada reacción se puso por triplicado y los resultados se normalizaron con el gen de mantenimiento GAPDH (Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa) que forma parte del juego de normalizadores Primer Design (No. De Catalogo ge-PP-6). Se escogió este gen de mantenimiento debido a que un análisis con el software GeNorm, del juego de normalizadores Primer Design, lo identificó como un gen de mantenimiento estable a lo largo de las tres edades estudiadas (E11, E14 y P1). El gen de mantenimiento se amplificó en las mismas condiciones. Se realizó una curva de disociación de 52° a 95° C para verificar, entre otras cosas, que amplificara un solo producto.

Se analizaron 6 grupos de 3 médulas de cada edad. Debido a que nuestro interés era realizar una cuantificación relativa de la expresión, la cuantificación del RNAm fue mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para que el método de $\Delta\Delta CT$ sea válido es necesario que las eficiencias del gen blanco y el gen normalizador sean aproximadamente iguales (Livak and Schmittgen 2001). Para comprobar lo anterior, se realizó un ensayo en el que se

amplificó Bmi1 y GAPDH en 5 diluciones de cDNA base 10 iniciando en una concentración de 100 ng hasta 0.01 ng. Estas reacciones de amplificación se realizaron por triplicado de modo que se obtuvo el Ct promedio tanto del gen problema Bmi1 como del gen constitutivo GAPDH. Después, estos valores se graficaron contra el logaritmo de la concentración de cDNA y se obtuvo los valores de pendiente, R^2 y eficiencia de reacción. La eficiencia se calculó mediante la fórmula $E = 10^{(-1/S)} - 1$ donde la letra S corresponde a la pendiente de la curva estándar y la letra E a la eficiencia. En nuestro caso la eficiencia de Bmi1 fue de 1.1397 mientras que la eficiencia de GAPDH fue de 1.1333 por lo que consideramos que sí son similares para poder aplicar el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

El método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ consiste en fijar un umbral de amplificación en la fase lineal de la reacción que todas las curvas de amplificación pasen. Lo anterior, permite obtener un número de ciclo en el cual la curva de reacción pasa el umbral, y es este valor el que se conoce como Ct. De esta manera se obtienen valores de Ct para el gen a cuantificar y para un gen de mantenimiento, cuya expresión no cambia entre las condiciones experimentales (en nuestro caso GAPDH). Así, el valor de Ct del gen de mantenimiento se resta al valor de Ct del gen problema como una forma de normalizar nuestros resultados. Al resultado de esa diferencia se le llama ΔCt (Guénin et al. 2009). Debido a que esta es una cuantificación relativa, una de las edades se toma como calibrador para ver el aumento o disminución de la expresión en las otras dos edades. En nuestro caso tomamos a la edad neurogénica E11 como calibrador, debido a que en esta edad las CTN tienen potencial neurogénico y nuestro interés es saber qué ocurre cuando el potencial neurogénico se pierde. Así, al valor de ΔCt de E14 y P1 se le restó el valor de ΔCt de E11 y el valor resultante es el $\Delta\Delta Ct$. Finalmente, al valor de $\Delta\Delta Ct$ se le eleva como potencia base 2. De esta manera se obtiene un valor normalizado de la expresión de Bmi1 en donde E11 siempre será igual a 1 y las otras edades pueden subir o bajar su expresión con respecto a 1.

Para saber si el cambio entre una edad y otra es estadísticamente significativo se aplicaron dos pruebas por separado. El valor de significancia para ambas pruebas fue definido en un valor de $p < 0.05$. Una prueba ANOVA de una vía donde mediante una prueba de comparaciones múltiples de Tukey solo se observaron diferencias significativas entre E14 y P1; y la prueba T de Student donde se observó diferencia significativa entre E11 vs P1 y E14 vs P1.

Obtención, procesamiento e inmunotinción de la médula espinal cervical.

Los embriones obtenidos se fijaron por inmersión en paraformaldehído amortiguado diluido al 4% durante 24 h, a una temperatura de 4°C. Posteriormente, los embriones se deshidrataron a través de un gradiente de soluciones de sacarosa al 10%, 20% y 30%. Finalmente, los embriones se incluyeron en el compuesto OCT (marca NEG 50 Thermo

Scientific No. Cat. 6502) y se congelaron con 4-metilbutano pre-enfriado con hielo seco. Para el caso de las muestras obtenidas a partir de crías de un día de vida postnatal, se disecaron las médulas espinales en fresco y se fijaron y crio-protegieron siguiendo el mismo procedimiento descrito para los embriones.

Para la ejecución de los ensayos de inmunocitoquímica, primero se obtuvieron cortes coronales (20 μm) de los embriones y de las médulas espinales a nivel del segmento cervical utilizando un criostato (-19°C). Los cortes se colocaron directamente sobre laminillas cubiertas previamente con gelatina. Posteriormente, éstas se secaron al vacío por 20 min. A continuación, las muestras se incubaron con una solución que permite desenmascarar antígenos (BioSB) diluida 1:20 a una temperatura de 65°C durante 1 h, seguida de un periodo adicional de 15 min a temperatura ambiente. El tejido se lavó cuidadosamente con solución salina (0.15 M) amortiguada con fosfatos (PBS; 0.1 M, pH 7.4) adicionada con tritón al 0.5% (PBS-T) en tres ocasiones, siendo cada lavado de 6 min. En seguida, las muestras se incubaron con una solución amortiguada de suero de caballo (8%) diluido en PBS por 30 min a temperatura ambiente, para luego ser incubadas con los anticuerpos primarios policlonales obtenidos en cabra y dirigidos contra Sox2 (1:500 en PBS-T; Santa Cruz; Cat. Sc-17320) u obtenidos en conejo y dirigidos contra Bmi1 (1.250 en PBS-T; ABCam Cat. ab38462), toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS-T y las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios policlonales correspondientes obtenidos en burro y dirigidos contra cabra acoplados a Alexa 555 (1:1000 en PBS-T; Molecular Probes; Cat. A21432) o contra conejo (1:500 en PBS-T; Millipore; Cat. AP182B) por dos horas a temperatura ambiente. Las muestras destinadas a la identificación de Sox2 fueron lavadas con PBS-T, incubadas con suero de cabra diluido en PBS-T y subsecuentemente destinadas para la co-identificación de la proteína doble cortina y de la proteína ácida fibrilar glial (ver párrafo siguiente). Por otro lado, las muestras destinadas para la identificación de Bmi1 fueron lavadas e incubadas con el complejo avidina-peroxidasa preparado de acuerdo a las instrucciones del proveedor (VectaStain; Vector Laboratories; Cat. Pk-6100) durante 90 min a temperatura ambiente. Estas muestras se lavaron con PBS y se incubaron por 8 min a temperatura ambiente con 3,3-diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno (Vector Laboratories; Cat. SK-4100) para revelar la actividad de la enzima peroxidasa. La reacción de revelado fue detenida mediante el lavado generoso de las muestras con PBS, para luego ser secadas al aire e inmediatamente montadas con cyto seal (Fisher Cat.8310-4).

Como fue referido arriba, las muestras inmunoteñidas para Sox2 fueron subsecuentemente incubadas con anticuerpos primarios obtenidos en cabra y dirigidos contra DCX (1:500 en PBS-T; Santa Cruz; Cat. Sc-8066) o en pollo y dirigidos contra GFAP (1:1000 en PBS-T; Chemicon; Cat. AB5541). Después de 20 h, se realizaron 3 lavados de 10

min cada uno con PBS-T y las muestras se incubaron con anticuerpo secundarios biotinilados obtenidos en burro y dirigidos contra cabra (1:1000; Millipore; Cat. AP180B) o dirigidos contra pollo (1:500; Millipore; Cat. AP194B), respectivamente, durante dos horas a temperatura ambiente. El tejido se lavó en tres ocasiones durante 10 min con PBS y se incubó con el complejo avidina-fluoresceína (1:200 en PBS; Vector Flourescent; Vector Laboratories; Cat. A-1100) durante 90 min a temperatura ambiente. Acto seguido, y después de varios lavados con PBS, las muestras se contra-tiñeron con DAPI (1 mg/μl en PBS; Boehringer; Cat. 236276) por un minuto a temperatura ambiente. Finalmente, después de dos lavados con PBS, las muestras fueron montadas empleando un agente anti-decaimiento (Anti-fading mountig medium; Dako-Thermo Scientific; Cat. 8310-4).

Las observaciones tanto de las muestras inmunoteñidas con fluoróforos, como de aquellas inmunocitoquímicamente marcadas, fueron llevadas a cabo a través de un microscopio de campo claro/fluorescencia DSU Olympus BX51WI.

Resultados

La médula espinal cervical es un modelo adecuado para evaluar la pérdida del potencial neurogénico.

Los estudios de inmunocitoquímica mostraron que la localización de la población de CTNs positivas para Sox2 se restringe a la pared del canal medular (Figura 2A). Estas células, abundantes durante la etapa neurogénica (E11), decaen en cantidad en las fases de la transición neuro-gliogénica (E14) y aún más en la fase gliogénica (P1). Si bien esto puede deberse a la disminución del diámetro del conducto central medular, también podría reflejar un proceso de senescencia replicativa. Por otro lado, se confirmó la fase neurogénica de las CTNs en la médula espinal cervical corresponde a los días embrionarios previos a E14 mientras que la gliogénica discurre posterior a esta edad. Las células positivas a DCX, un marcador de neuroblastos, predominaron en E11 mientras que sólo se apreciaron aquellas positivas a GFAP hasta P1 (Figura 4B). Estos datos validan el modelo anatómico elegido para abordar el fenómeno estudiado.

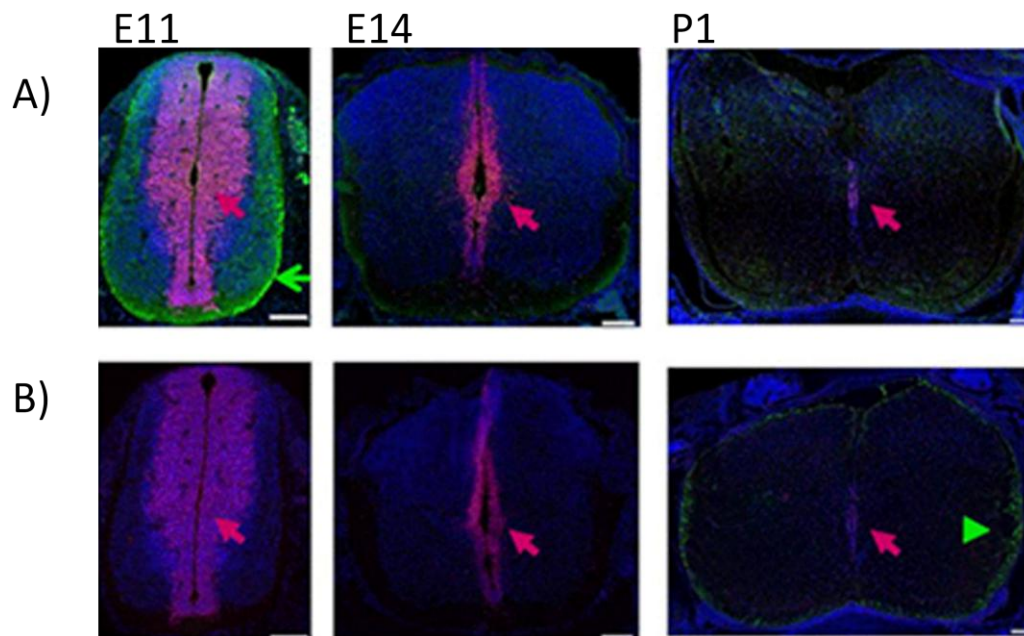





Fig.4 Cortes coronales de la médula espinal cervical inmunoteñidos para Sox2 (), DCX () y GFAP () obtenidos de embriones de ratón de edad gestacional E11 y E14 días, y a partir de crías recién nacidas (P1). Los cortes fueron contra-teñidos con DAPI. Note la disminución de DCX y la aparición de GFAP conforme avanza el desarrollo. Escala=100 μ m .

Elementos celulares de la médula espinal del ratón no expresa P16, ni modifican la expresión correspondiente a p19^{ARF} en E11, E14 y P1.

Los estudios de amplificación de punto final de p16 mostraron que (Figura 5A) no se expresa en la médula espinal en las edades evaluadas.

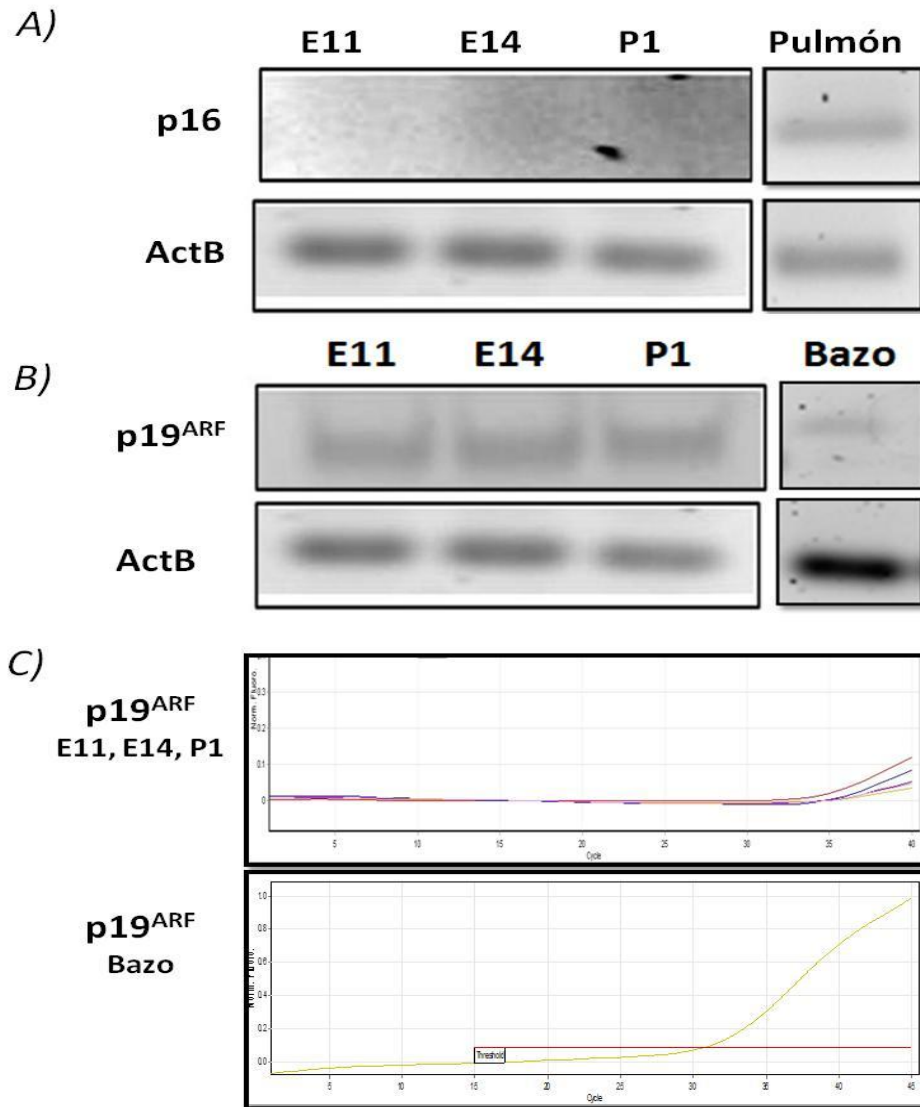


Fig. 5 Imágenes representativas de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos a través de la técnica de PCR de punto final con las que se documenta la ausencia del transcrito para p16 (**A**) y la ausencia de cambios para el transcrito de p19 (**B**) en la médula espinal cervical a las edades E11, E14 y P1. Muestras de tejido de pulmón y bazo adultos de 10 semanas, se utilizaron como controles positivos. **C**) Gráficos que ilustran los resultados del PCR cuantitativo que muestra la amplificación tardía de E11, E14 y P1 en comparación con el bazo como control positivo. Eje de las X ciclos de amplificación, eje de las Y fluorescencia que emite el amplificado. A menor número de ciclos de amplificación, mayor es la abundancia del transcrito.

Por su parte, el análisis de los transcritos p19^{ARF} de punto final muestra que se expresa poco, si bien esta técnica no nos permite discernir si hay cambios en la expresión de p19^{ARF} (Figura 5B). Con respecto al PCR de tiempo real, éste muestra que la expresión en el tejido de las tres etapas es tan baja que la curva de amplificación no alcanza el umbral para ser detectada y cuantificada (Ver Fig. 5C). Por lo anterior, podemos decir que la expresión de p19^{ARF} es muy baja y no varía con el transcurrir del desarrollo.

La transcripción y la traducción de la proteína Bmi1 por los elementos celulares de la médula espinal del ratón disminuyen en P1.

Los estudios de amplificación de punto final y de tiempo real del transcrito de Bmi1 mostraron que la disponibilidad de éste tiende a elevarse en E14 con relación a E11, para luego descender en P1 con relación a ambas edades (Figura 6 A). Además, nótese que Bmi1 está altamente expresado en E11, tiene amplia variabilidad en E14 y desciende significativamente en P1 (Figura 6B). Estos datos se corroboraron cualitativamente por estudios de inmunocitoquímica. Las células del neuroepitelio germinal ependimario mostraron una intensidad de la inmunotinción mayor a E11, variable en los individuos a E14 y reducida a P1 (Figura 6C).

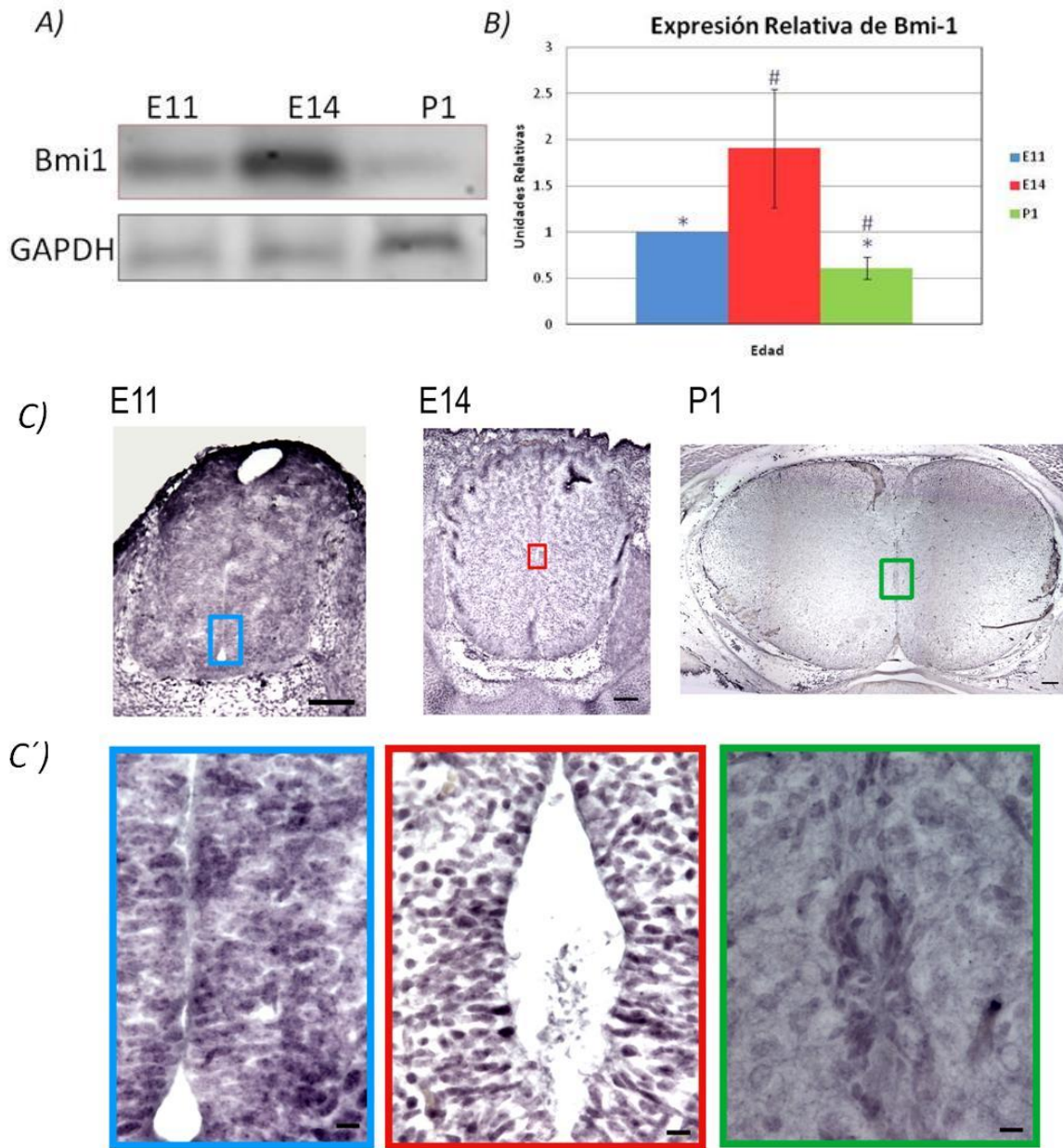


Fig. 6 Expresión y disponibilidad de Bmi1 en la médula espinal cervical del embrión murino. **A)** Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de punto final en el que se observa la expresión de Bmi1 en E11, E14 y P1. Se amplificó el gen GAPDH como control de la reacción. **B)** Cuantificación relativa del RNAm de Bmi1 en las tres edades estudiadas. * Diferencia significativa mediante prueba T entre E11 y P1. # Diferencia significativa entre E14 y P1 mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey y mediante la prueba T. $p < 0.05$ en ambas pruebas. **C)** Imágenes representativas de la disponibilidad de Bmi1 en la medula espinal cervical de embriones murinos de 11 y 14 días embrionarios y el primer día posnatal. Las CTNs se encuentran alrededor del canal central. Imágenes a 10x, barra representa 100 μ m. **C')** Insertos de un acercamiento a las CTNs del canal central en las que se observa la disponibilidad de Bmi1. Imágenes a 60x, barra de escala son 10 μ m.

Discusión

Durante la ontogenia del sistema nervioso, la mayor parte de las CTNs pierden su capacidad para dar origen a neuronas. Los mecanismos que conducen a esta pérdida rápida y progresiva del potencial neurogénico de las CTNs son poco claros. No obstante, la concepción dominante sugiere que la interacción de factores epigenéticos microambientales con genéticos intrínsecos favorece la expresión de fenotipos gliales, situación que conduce a la restricción de potencial neurogénico troncal. Recientemente, se ha mostrado que las CTNs adultas producen Bmi 1 y HMGA2 durante la fase neurogénica (Nishino et al. 2008; Molofsky et al. 2003) y p16 y p19 cuando su potencial neurogénico decae con el tiempo (Molofsky et al. 2005; Nagao et al. 2008). Estos datos apoyan la idea de que moléculas que hasta ahora se consideran como reguladoras del ciclo celular pudiesen también participar en la modulación del potencial de diferenciación de las CTNs (Bruggeman and Van Lohuizen 2006; Molofsky et al. 2005). Con base en esta idea y siguiendo el modelo derivado de las observaciones hechas en las CTNs adultas, evaluamos si existían cambios en la disponibilidad de p16, p19 y Bmi1 durante la transición neuro-glial en la médula espinal fetal del ratón. En contra de la hipótesis planteada, nuestros resultados mostraron que la expresión de p16 es virtualmente nula, que la de p19^{ARF} no se modifica en función de la etapa ontogenética y que sólo la de Bmi1 disminuye durante la fase gliogénica. En conjunto los resultados sugieren que el control del proceso de diferenciación de las CTNs en etapas tempranas y tardías del desarrollo involucra distintas vías de regulación que en el presente trabajo no abordamos.

Es importante mencionar que los hallazgos negativos reportados en este trabajo son compatibles con estudios previos que ilustran una expresión baja de p16 en neuroesferas obtenidas del telencéfalo embrionario (Nagao et al. 2008; Molofsky et al. 2005) y de p19^{ARF} durante el desarrollo prenatal del cerebro (Molofsky et al. 2005; aunque ver Nagao et al., 2008). Si bien estudios previos no han dado una explicación clara de estos resultados pues uno esperaría que ambas proteínas estuviesen presentes durante la formación del sistema nervioso dada su participación en el control de la progresión del ciclo celular, el hecho de que Bmi1 esté presente en las tres etapas estudiadas podría explicar la ausencia y la baja disponibilidad de los transcritos de p16 y p19^{ARF}. Bmi1 reprime la expresión del *locus* Ink4 a partir del cual se transcriben p16 y p19^{ARF}. Si la caída de Bmi1 está relacionada con la pérdida del potencial neurogénico y/o la adquisición del gliogénico no se puede concluir a partir de nuestros resultados. No obstante, estudios previos indican que Bmi1 es fundamental para mantener el fenotipo troncal de las CTNs (Molofsky et al. 2005).

Un dato que consideramos de particular importancia fue la magnitud de la dispersión de la expresión de Bmi1 durante la etapa neuro-gliogénica (E14). Nosotros

interpretamos esta variabilidad como el resultado de un proceso asincrónico en el cual las distintas CTNs alcanzan el punto de transición en momentos diferentes del desarrollo. Aunque el significado de este fenómeno es desconocido, Miyama y colaboradores (1997) mostraron que las CTNs que despliegan distinta duración del ciclo celular dan origen a neuroblastos que se diferencian en distintas clases de neuronas. De esta forma, quizás un cambio en la duración del ciclo (representada en nuestros experimentos por la variabilidad de la expresión de Bmi1) podría conducir a que las CTNs en la médula espinal cervical de ratón perdieran su potencial neurogénico y adquirieran el gliogénico (datos de Edel & Belmonte 2010; Caviness et al. 2003 apoyan esta hipótesis). Al respecto, es importante mencionar que Bmi1 ha sido involucrado como regulador de la senescencia replicativa (Jacobs et al. 1999; Bruggeman et al. 2005), un fenómeno asociado a la prolongación del ciclo celular. Finalmente, y dado que Bmi1 es un regulador polycomb que forma estructuras multiméricas, esta proteína pudiera promover cambios epigenómicos durante la transición neuro-gliogénica, a través de facilitar la metilación (i.e., represión) de genes pro-neurales y/o la acetilación (i.e., expresión) de aquellos pro-gliales.

Perspectivas

Las perspectivas de este trabajo incluyen evaluar la hipótesis de que existe un cambio en la duración del ciclo celular de las CTNs conforme avanza el desarrollo. La cual, será evaluada en un estudio próximo mediante la medición del ciclo celular de CTNs de etapas neurogénicas en comparación con aquellas de etapas gliogénicas. Así mismo se plantea la posibilidad de que cambios epigenómicos durante la transición neuro-gliogénica, promovidos por Bmi1, sean un elemento importante en el modelo de pérdida del potencial neurogénico de las CTNs. Estas posibilidades deberán ser evaluadas en el futuro.

Bibliografía

- Bruggeman, Sophia W M, and Maarten Van Lohuizen. 2006. "Controlling Stem Cell Proliferation: CKI at Work." *Cell Cycle* 5:12 (June): 1281–1285.
- Bruggeman, Sophia W M, Merel E Valk-Lingbeek, Petra P M van der Stoop, Jacqueline J L Jacobs, Karin Kieboom, Ellen Tanger, Danielle Hulsman, et al. 2005. "Ink4a and Arf Differentially Affect Cell Proliferation and Neural Stem Cell Self-renewal in Bmi1-deficient Mice." *Genes & Development* 19 (12) (June 15): 1438–43. doi:10.1101/gad.1299305.
- Caviness, V S, T Goto, T Tarui, T Takahashi, P G Bhide, and R S Nowakowski. 2003. "Cell Output, Cell Cycle Duration and Neuronal Specification: a Model of Integrated Mechanisms of the Neocortical Proliferative Process." *Cerebral Cortex* 13 (6) (June): 592–8.
- Edel, Michael J., and Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2010. "The Cell Cycle and Pluripotency: Is There a Direct Link?" *Cell Cycle* 9 (14) (July 15): 2694–2695.
- Fasano, Christopher A, John T Dimos, Natalia B Ivanova, Natalia Lowry, Ihor R Lemischka, and Sally Temple. 2007. "Article shRNA Knockdown of Bmi-1 Reveals a Critical Role for p21-Rb Pathway in NSC Self-Renewal During Development." *Cell* (July): 87–99. doi:10.1016/j.stem.2007.04.001.
- Gilbert, Scott F. 2010a. "The Stem Cell Concept." In *Developmental Biology*, 323–332.
- Gilbert. 2010b. "The Emergence of the Ectoderm. Central Nervous System and Epidermis." In *Developmental Biology*, 333–372. 9th ed. Sinauer Associates, Inc.
- Guénin, Stéphanie, Mélanie Mauriat, Jérôme Pelloux, Olivier Van Wuytswinkel, Catherine Bellini, and Laurent Gutierrez. 2009. "Normalization of qRT-PCR Data: The Necessity of Adopting a Systematic, Experimental Conditions-specific, Validation of References." *Journal of Experimental Botany* 60 (2) (January): 487–93.
- Götz, Magdalena, Eva Hartfuss, and Paolo Malatesta. 2002. "Radial Glial Cells as Neuronal Precursors: a New Perspective on the Correlation of Morphology and Lineage Restriction in the Developing Cerebral Cortex of Mice." *Brain Research Bulletin* 57 (6) (April): 777–788.
- Hendrich, Hans J, and Gilian Bullock. 2004. *The Laboratory Mouse*.
- Jacobs, J J, K Kieboom, S Marino, R a DePinho, and M van Lohuizen. 1999. "The Oncogene and Polycomb-group Gene Bmi-1 Regulates Cell Proliferation and Senescence

Through the Ink4a Locus." *Nature* 397 (6715) (January 14): 164–8.
doi:10.1038/16476.

Jalali, Ali, Michael Bonaguidi, Caitilin Hamill, and JA Kessler. 2001. "Multipotent Stem Cells in the Embryonic Nervous System." In *Stem Cells and CNS Development*, 67–95.

Juliandi, Berry, Masahiko Abematsu, and Kinichi Nakashima. 2010. "Epigenetic Regulation in Neural Stem Cell Differentiation." *Development, Growth & Differentiation* 52 (6) (August): 493–504.

Kintner, Chris. 2002. "Neurogenesis in Embryos and in Adult Neural Stem Cells." *The Journal of Neuroscience* 22 (3) (February 1): 639–43.

Lim, A. Daniel, and Arturo Alvarez-Buylla. 1999. "Neural Stem Cells in the Adult Brain." In *Neural Development and Stem Cells*, 29–47.

Livak, K J, and T D Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method." *Methods* 25 (4) (December): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Lowe, Scott W, and Charles J Sherr. 2003. "Tumor Suppression by Ink4a–Arf: Progress and Puzzles." *Current Opinion in Genetics & Development* 13 (1) (February): 77–83.

Molofsky, Anna V, Shenghui He, Mohammad Bydon, Sean J Morrison, and Ricardo Pardal. 2005. "Bmi-1 Promotes Neural Stem Cell Self-renewal and Neural Development but Not Mouse Growth and Survival by Repressing the p16Ink4a and p19Arf Senescence Pathways." *Genes & Development* 19 (12) (June 15): 1432–7.

Molofsky, Anna V, Ricardo Pardal, Toshihide Iwashita, In-kyung Park, Michael F Clarke, and Sean J Morrison. 2003. "Bmi-1 Dependence Distinguishes Neural Stem Cell Self-renewal from Progenitor Proliferation." *Nature* 425 (October): 962–967.
doi:10.1038/nature02072.Published.

Nagao, Motoshi, Kenneth Campbell, Kevin Burns, Chia-Yi Kuan, Andreas Trumpp, and Masato Nakafuku. 2008. "Coordinated Control of Self-renewal and Differentiation of Neural Stem Cells by Myc and the p19ARF-p53 Pathway." *The Journal of Cell Biology* 183 (7) (December 29): 1243–57.

Nishino, Jinsuke, Injune Kim, Kiran Chada, and Sean J Morrison. 2008. "Hmga2 Promotes Neural Stem Cell Self-Renewal in Young but Not Old Mice by Reducing P16 Ink4a and P19 Arf Expression." *Cell* 135 (2): 227–239.

Pelayo, Rosana, Jesús Santa-Olalla, and Iván Velasco. 2011. "Células Troncales Neurales." In *Células Troncales y Medicina Regenerativa*, 89–114.

- Reeves, Raymond. 2001. "Molecular Biology of HMGA Proteins: Hubs of Nuclear Function." *Gene* 277 (1-2) (October): 63–81.
- Shakhova, Olga, Carly Leung, and Silvia Marino. 2005. "Bmi1 in Development and Tumorigenesis of the Central Nervous System." *Journal of Molecular Medicine* 83 (8) (August): 596–600.
- Sustáčková, Gabriela, Stanislav Kozubek, Lenka Stixová, Soňa Legartová, Pavel Matula, Darya Orlova, and Eva Bártová. 2012. "Acetylation-dependent Nuclear Arrangement and Recruitment of BMI1 Protein to UV-damaged Chromatin." *Journal of Cellular Physiology* 227 (5) (May): 1838–50.
- Temple, Sally. 2001. "The Development of Neural Stem Cells." *Nature* 414 (6859) (November 1): 112–7.
- Wesselschmidt, Robin L, and John W McDonald. 1999. "Embryonic Stem Cells and Neurogenesis." In *Neural Development and Stem Cells*, 299–341.
- Winkler, C, R A Fricker, M A Gates, M Olsson, J P Hammang, M K Carpenter, and A Björklund. 1998. "Incorporation and Glial Differentiation of Mouse EGF-responsive Neural Progenitor Cells After Transplantation into the Embryonic Rat Brain." *Molecular and Cellular Neurosciences* 11 (3) (June): 99–116.
- Zencak, Dusan, Merel Lingbeek, Corinne Kostic, Meriem Tekaya, Ellen Tanger, Dana Hornfeld, Muriel Jaquet, et al. 2005. "Bmi1 Loss Produces an Increase in Astroglial Cells and a Decrease in Neural Stem Cell Population and Proliferation." *The Journal of Neuroscience* 25 (24) (June 15): 5774–83.