



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Papel de Dll1 en el mantenimiento de las células troncales
neurales del nicho dopaminérgico embrionario

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
LCG Ana Karen Mojica Avila

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles - IBT

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Héctor Mayani Viveros – Fac. de Medicina
Dr. Jesús Santa Olalla Tapia - UAEM

Cuernavaca, Mor. Junio, 2018



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 11 del departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. La dirección estuvo a cargo del Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles. El proyecto contó con el apoyo de los donativos de CB131031 y FOINS1723 por parte de CONACyT. Para realizar este trabajo recibí una beca CONACyT de maestría (705979).

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Luis Covarrubias por asesorar este proyecto y abrirme las puertas de su laboratorio. Por hacerme parte de su equipo y darme la oportunidad de aprender cosas nuevas.

Gracias a la Dra. Celina García por asesorarme en el camino y escuchar mis quejas.

Gracias a la M.C. Concepción Valencia por su excelente asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Gracias a los doctores Héctor Mayani y Jesús Santa-Olalla por formar parte del comité que forjó este trabajo.

Muchas gracias a los miembros del comité sinodal: Dr. Arturo, Dra. Lorraine, Dra. Viviana, Dra. Magda, Dra. Verónica. Muchas gracias a cada uno de ustedes por tomarse el tiempo de leer y de discutir conmigo este trabajo.

Gracias especiales a mis creadores; gracias papá por creer en mí, gracias mamá por no dejarme caer. Gracias a los dos por su apoyo incondicional, por tener más fe en mí de la que yo me tengo.

Gracias a Hamburgue y Charmín por su cariño en los buenos y malos momentos. Saben que los quiero mucho aunque jamás lo diga en voz alta y no me gusten los abrazos.

Gracias Ma. Elena por hacerme parte de tu familia, el cariño es mutuo.

Gracias a los nuevos y viejos amigos, por su paciencia, cariño y palabras de aliento. Gracias Juan, Erika, Mez, Marie. Gracias Pavel y Marco por los memes depresivos.

Gracias Diego por recordarme cada día lo valiosa que es la vida a pesar de mis esfuerzos por olvidarlo, gracias por tanto cariño.

Gracias a la Dra. Gilda Guerrero Flores por ser la guía espiritual de este proyecto, por tontearme toda vez que perdí el camino y por ser tan buena amiga. Gracias por toda tu ayuda.

Gracias a todos por tanto, lamento poder darles tan poco.

Karen

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Aldh1a1	Del inglés <i>Aldehyde dehydrogenase 1a1</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Ascl1	Del inglés <i>Achaete-scute homolog 1</i>
AVT	Área Ventral Tegmental
bHLH	Del inglés <i>basic Helix-Loop-Helix</i>
BMP	Del inglés <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BrdU	Bromodeoxiuridina
CE	Cuerpos Embrioides
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DAPT	N-[(3,5-Difluorofenil) acetil]-L-alanil-2-fenil] glicina-1, 1-dimetiletil éster
Dat	Del inglés <i>Dopamine transporter</i>
Ddc	Dopa descarboxilasa
DIV	Días <i>in vitro</i>
Dll1	Del inglés <i>Delta-like 1</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	desoxirribonuclótidos trifosfato
E	Día embrionario
ESCs	Del inglés <i>embryonic stem cell</i>
Fgf	Del inglés <i>Fibroblast Growth Factor</i>
Foxa1/2	Del inglés <i>Forkhead box A2</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
Gbx2	Del inglés <i>Gastrulation brain homeobox 2</i>
Gfap	Del inglés <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
Hes	Del inglés <i>Hairy and enhancer of Split</i>
LIF	Del inglés <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
Lmx1a/b	Del inglés <i>LIM homeobox transcription factor 1 alpha/beta</i>
Msx1/2	Del inglés <i>Msh homeobox 1/2</i>

Ngn2	Neurogenina2
Otx2	Del inglés <i>Orthodenticle homeobox 2</i>
Ptch1	Del inglés <i>Patched 1</i>
Pax	Del inglés <i>Paired box containing homeodomain</i>
PBS	Del inglés <i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	Del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehído
Pitx3	Del inglés <i>Paired like homeodomain 3</i>
Shh	Sonic Hedgehog
Sox	Del inglés <i>Sex determining region Y-box</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
Tnc	Del inglés <i>Tenascin C</i>
Th	Tirosina Hidroxilasa
Vmat	Del inglés <i>Vesicular monoamine transporter</i>
Wnt1	Del inglés <i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 1</i>

INDICE

ABREVIATURAS	4
INDICE	6
ROLE OF DLL1 IN THE MAINTENANCE OF NEURAL STEM CELLS FROM THE DOPAMINERGIC NICHE	8
<i>Abstract</i>	8
PAPEL DE DLL1 EN EL MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS TRONCALES NEURALES DEL NICHOPAMINÉRGICO EMBRIONARIO	9
<i>Resumen</i>	9
INTRODUCCIÓN	10
<i>Generalidades de las células troncales</i>	10
<i>Generalidades del desarrollo del sistema nervioso central y las células troncales neurales</i>	11
<i>Vía de señalización de Notch en la neurogénesis</i>	17
ANTECEDENTES	21
<i>Células troncales neurales y su manipulación in vitro</i>	21
<i>Neurogénesis dopaminérgica</i>	24
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	32
<i>Objetivo general</i>	32
<i>Objetivos particulares</i>	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
<i>Soluciones y reactivos</i>	33
<i>Cepas bacterianas y líneas celulares</i>	37
<i>Oligonucleótidos</i>	38
<i>Métodos de cultivo celular</i>	39
<i>Animales</i>	42
<i>Cultivos primarios</i>	42
<i>Cuantificación de la tasa de proliferación</i>	44
<i>Estadística</i>	44
<i>Inmunocitoquímica para precursores neurales de ratón en monocapa</i>	45
<i>Microscopía de fluorescencia y adquisición de imágenes</i>	47
<i>Análisis de imágenes</i>	48
<i>Diferenciación de ESCs a precursores neurales en monocapa</i>	48
<i>Extracción ARN y generación de cDNA</i>	49
<i>PCR cuantitativo en tiempo real</i>	52
<i>Manipulación de DNA</i>	53
RESULTADOS	60
<i>Cinética de disminución del potencial neurogénico in vitro de CTNs de mesencéfalo de E10.5</i>	60

Análisis de las divisiones celulares y morfología celular	60
<i>Análisis de inmunorreactividad de marcadores neurales en cultivos de CTNs del mesencéfalo embrionario.</i>	65
<i>Análisis de expresión de marcadores en cultivos de CTNs por PCR cuantitativo en tiempo real.</i>	71
<i>Construcción del vector PB-DII1</i>	77
<i>Generación de la línea celular STO-DII1</i>	81
<i>Cocultivos con las células STO-DII1</i>	84
<i>Cocultivos con las células OP9-DI1</i>	88
<i>Generación de la línea W9.5-DI1</i>	93
<i>Diferenciación de la línea de ESCs W9.5-DI1 a CTNs</i>	94
DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	107
BIBLIOGRAFÍA	114
Anexo I	125
<i>Controles negativos de fluoróforos</i>	125

ROLE OF DLL1 IN THE MAINTENANCE OF NEURAL STEM CELLS FROM THE DOPAMINERGIC NICHE

By
Ana Karen Mojica-Avila

Abstract

Neural stem cells (NSCs) are capable of extensive proliferation, self-renewal, and can give rise to neurons and glia. *In vitro* experiments show these cells tend to lose their neurogenic capacity and gain gliogenic potential over time. In addition, some studies suggest mitogens such as Fgf2, commonly used to grow NSCs, might contribute to switch the differentiation potential from neurogenic to gliogenic in these cells.

We propose that inducing the ectopic expression of Dll1 on NSCs from the midbrain floor plate might help to preserve their neurogenic potential for longer culture periods. For this purpose, we used precursor cells from the embryonic stage 10.5 and 12.5 (E10.5 and E12.5). Cells from both stages changed their morphology over time, getting bigger with every cellular passage. In E10.5 cultures, cells also declined their division rate from the very first cellular passage to the point the culture is no longer viable. Regardless of this, E10.5 cells preserve Nestin and Sox2 expression on late cellular passages, but gain expression of Gfap, Tnc and Aldh1l1 from P3 onwards. Cells in these cultures also lose the expression of β III-Tubulin over time. Together, these observations indicate E10.5 cells lose neurogenic potential and instead become astrogenic.

We design a transposon that allows the inducible expression of Dll1 and transfected Embryonic Stem Cells (ESCs) with it. Transfected cells (W9.5 Dll1) were induced to differentiate into NSCs and then we induced Dll1 expression, as a consequence of this, the differentiation process is more effective and cells preserved NSCs markers and their capacity to produce neurons.

In conclusion, the activation of the Notch signaling pathway, as a consequence of inducing Dll1 expression, promotes a more effective differentiation process as well as it aids to preserve a population of NSCs with high neurogenic potential for longer culture periods.

PAPEL DE DLL1 EN EL MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS TRONCALES NEURALES DEL NICHOPAMINÉRGICO EMBRIONARIO

Por

Ana Karen Mojica Avila

Resumen

Las células troncales neurales (CTNs) son capaces de autorrenovarse y de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Algunos estudios muestran que *in vitro* estas células pierden capacidad neurogénica y ganan potencial gliogénico con el tiempo. Una manera de preservar el potencial neurogénico en cultivo es inducir la expresión ectópica de Dll1 para activar la vía de señalización de Notch. Esta vía impide la expresión de señales panneurales inhibiendo así la neurogénesis. Este proceso ayuda a conservar una poza de CTNs indiferenciadas.

En este trabajo caracterizamos CTNs del mesencéfalo ventral de las etapas embrionarias 10.5 y 12.5. A lo largo del tiempo las células cambian su morfología, empiezan compactas y formando rosetas neurales y terminan por incrementar su tamaño. En cultivos de E10.5 la tasa de división celular disminuye al punto que el cultivo no es viable. Por análisis de PCR cuantitativa e inmunocitoquímica observamos que estas células conservan la expresión de marcadores neurales incluso en pases tardíos pero ganan la expresión de los marcadores astrogénicos. Además, estas células dejan de producir neuronas con el tiempo. Estos resultados muestran que las CTNs pierden potencial neurogénico y ganan capacidad astrogénica.

Paralelamente, diseñamos un transposón que permite la expresión inducible de Dll1 y lo transfectamos en células troncales embrionarias. Al diferenciar esta línea hacia CTNs, la expresión de Dll1 hizo más efectiva la diferenciación. Además, las células logran mantener la expresión de marcadores neurales y conservar la generación de neuronas a pesar del tiempo. En conclusión, activar la vía de Notch -como consecuencia de inducir la expresión de Dll1- promueve una diferenciación eficiente hacia CTNs y ayuda a preservar estas células por periodos de tiempo más largos.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de las células troncales

Las células troncales se encuentran en todos los organismos pluricelulares y se distinguen por dos características importantes: en primer lugar, son células no especializadas capaces de formar fenocopias completas, es decir pueden autorrenovarse, a veces incluso después de largos períodos de inactividad. En segundo lugar, bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, las células troncales pueden diferenciarse en células específicas de tejidos u órganos con funciones especializadas. El equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación permite el desarrollo apropiado de un organismo, la renovación y el mantenimiento de los tejidos, asegurando así su integridad y funcionamiento correcto en la edad adulta. En algunos órganos, como el intestino y la médula ósea, las células troncales se dividen regularmente para reparar y reemplazar tejidos desgastados o dañados. Sin embargo, en otros órganos, como el páncreas y el corazón, las células troncales sólo se dividen en condiciones especiales (Stern 2002). De acuerdo al potencial para engendrar diferentes tipos celulares, las células troncales pueden dividirse en tres categorías principales:

- Totipotentes: aquellas células que pueden dar origen a un organismo completo, es decir pueden formar todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios, como las células de la mórula temprana de mamíferos.
- Pluripotentes: No pueden formar tejidos extraembrionarios, únicamente originan células de las tres capas germinales. Un ejemplo son las células de la masa interna del blastocisto.
- Multipotentes: Sólo pueden producir células de una misma capa germinal, por ejemplo, las células troncales hematopoyéticas.

Las células troncales son importantes por varios motivos. En el desarrollo del embrión, las células internas del blastocito dan lugar a todo el cuerpo del organismo, incluyendo todos los tipos de células especializadas y órganos. En

algunos tejidos adultos, como la médula ósea, el músculo y la piel, las poblaciones discretas de células troncales adultas generan reemplazos para las células que se pierden por desgaste normal, lesión o una enfermedad.

Las células troncales habitan en un microambiente específico que les permite persistir y crecer; cuando estas células son retiradas de su nicho troncal dejan de expandirse (Scadden 2006). Durante la vida de un organismo, distintos factores del nicho actúan sobre las células troncales alterando la expresión génica, lo que induce su proliferación o diferenciación. Los factores y las condiciones que permiten que las células troncales permanezcan no especializadas son de gran interés científico. Es importante comprender cómo actúan las señales que permiten que una población de células troncales prolifere y permanezca sin especializar; el prendido y apagado de genes específicos es fundamental para este proceso. Algunas de las condiciones médicas más graves, como el cáncer y defectos de nacimiento, se deben a la división y diferenciación anormal. Comprender a fondo los controles genéticos y moleculares de estos procesos puede proporcionar información sobre cómo surgen tales enfermedades y sugerir nuevas estrategias para combatirlas. El control predecible de la proliferación y diferenciación celular requiere investigación básica adicional sobre las señales moleculares y genéticas que regulan la división celular y la especialización.

Generalidades del desarrollo del sistema nervioso central y las células troncales neurales

El sistema nervioso central (SNC) es el órgano más complejo en cuanto a su desarrollo, estructura, mantenimiento, composición química y función. El sistema nervioso contiene varios tipos de neuronas definidos por su morfología, conectividad, neurotransmisor y propiedades electrofisiológicas; esta diversidad celular va acompañada de una gran variedad de funciones que incluyen la coordinación del movimiento, el pensamiento, la memoria y la sensación. Lograr tal hazaña, requiere que la neurogénesis (la generación de nuevas neuronas) durante el desarrollo esté altamente regulada. Diferentes regiones del tubo neural generan diferentes tipos neuronales en un orden temporal y espacial que

generalmente está conservado entre especies (Shimazaki 2015). La progenie posmitótica de los precursores neurales adquiere fenotipos distintos que se definen en el progenitor mitótico antes de la división celular final (Desai & McConnell 2000). Los progenitores integran las señales extrínsecas e intrínsecas para decidir en última instancia el destino de sus células hijas. La organización compleja e integración de señales son responsables de la armonía del desarrollo del sistema nervioso.

La embriogénesis de los vertebrados comprende cuatro fases principales: la segmentación, la gastrulación, la neurulación y la organogénesis. Durante la segmentación, el cigoto sufre varias divisiones consecutivas hasta formar el blastocito. En la gastrulación se crea la invaginación que da origen al ano, y el embrión se diferencia en tres capas germinales, el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. Cada una de estas capas germinales dará origen a diferentes estructuras y órganos del organismo. El SNC se deriva del ectodermo, la capa más externa del embrión que da origen a la epidermis y a la placa neural. El ectodermo no especificado requiere de señales mesodermales para convertirse en neuroectodermo y es el nodo quien promueve esta conversión. El nodo se forma de células del mesodermo que migran hacia la línea media dorsal, definiendo la línea media del embrión y, secretando las señales que inducen la neuralización y los dominios ventrales del tubo neural. Desde el punto de vista molecular, la inducción neural resulta de inhibir a las señales que inhiben la diferenciación neural. El ectodermo expresa proteínas BMP (*Bone Morphogenic Proteins* por sus siglas en inglés). Aquellas células que se encuentren bajo la señalización de BMPs se desarrollarán como epidermis. El nodo secreta proteínas como Cordina, Nogina y Folistatina, que inhiben a las BMPs, provocando que las células dejen de estar bajo la señalización de BMPs evitando así que se diferencien a epidermis para que se conviertan entonces en placa neural (Stern 2002) (figura 1).

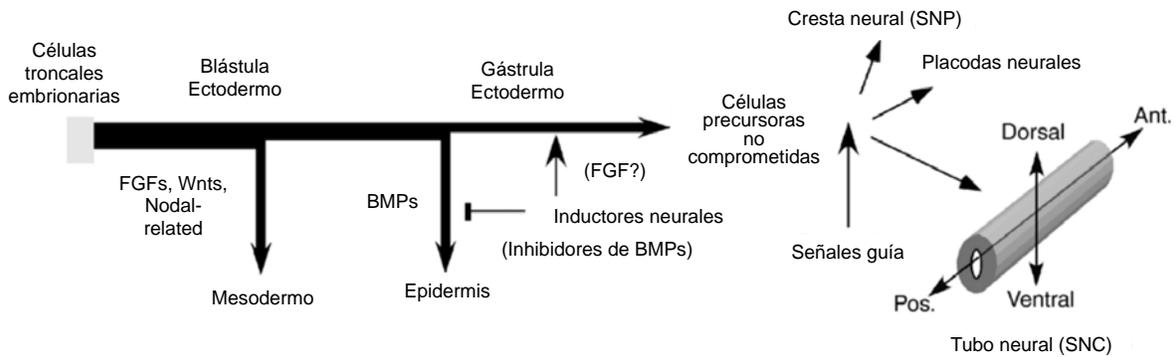


Figura 1: Desarrollo del sistema nervioso central. Las células troncales embrionarias se dividen hasta formar la blástula y posteriormente formar las tres capas germinales. La notocorda secreta inhibidores de BMPs permitiendo la especificación del neuroectodermo. Posteriormente se forma el tubo neural que dará origen al SNC.

Ya formada la placa neural, el tejido se engrosa y extiende por acción de la proliferación y el alargamiento apico-basal de las células, formando un surco en el centro de la placa. La neurulación consiste en la elevación de los pliegues de la placa neural para finalmente fusionarse y formar así el tubo neural, estructura de la cual se originará el SNC (Stern 2002) (figura 2). Después de la inducción neural, el tubo neural se regionaliza a lo largo de un eje rostral-caudal. En el ratón el cierre del tubo neural inicia en la unión cerebro posterior-columna vertebral alrededor del día embrionario 8.5 (E8.5), culminando cuando los neuroporos (aperturas anteriores y posteriores del tubo neural) cierran en E9. El cerebro y las regiones anteriores de la médula espinal surgen de neurulación primaria. Durante este proceso, la región anterior del tubo presenta diferentes patrones de expansión y constricción estableciendo las 3 vesículas encefálicas primarias: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo. El romboencéfalo se divide además en metencéfalo anterior y mielencéfalo posterior, y el prosencéfalo en telencéfalo anterior y diencéfalo caudal. Estas estructuras darán lugar a las estructuras cerebrales adultas, incluyendo la corteza, los ganglios basales, el tálamo, el tronco encefálico y el cerebelo. Las regiones más caudales del tubo neural formarán la médula espinal. La parte más caudal de la médula espinal se forma mediante la neurulación secundaria, caracterizada por la formación de un cúmulo de células llamado cordón medular de la yema de la cola. Dentro del cúmulo se forman varios lúmenes que luego se fusionan. Esta organización

segmentada del tubo neural se logra mediante la expresión de una combinación de señales solubles y factores de transcripción (Sadler 2005).

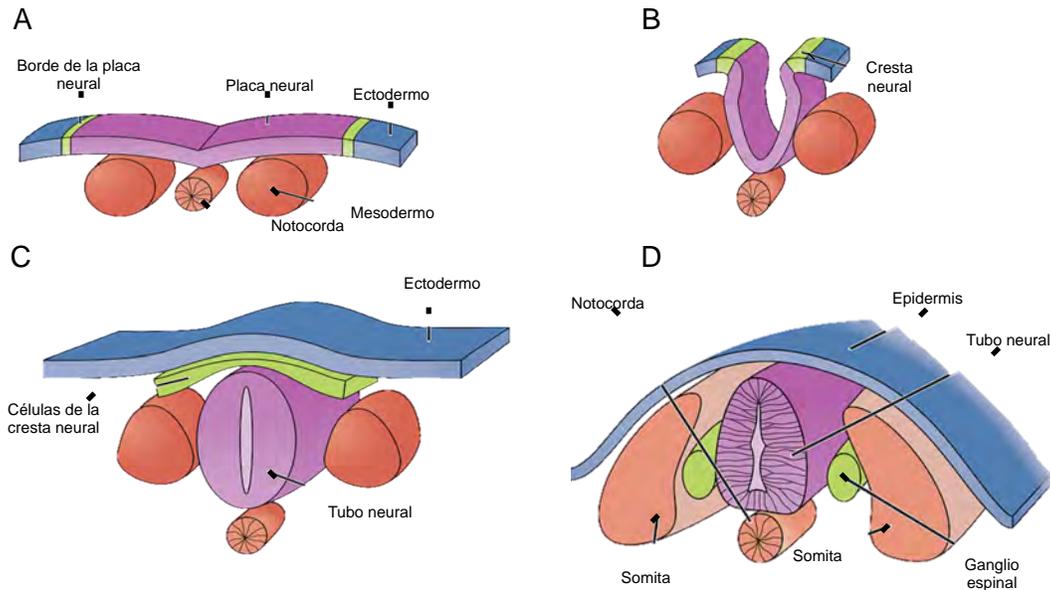


Figura 2: Neurulación: **A)** El neuroectodermo se diferencia del ectodermo y se engrosa formando la placa neural. El borde de la placa neural la separa del ectodermo. **B)** La placa neural se dobla dorsalmente, con los dos extremos uniéndose en los bordes, ahora referidos como la cresta neural. **C)** El cierre del tubo neural desconecta la placa neural de la epidermis. Las células de la cresta neural se diferencian para formar la mayor parte del sistema nervioso periférico. **D)** La notocorda degenera y sólo persiste como el núcleo pulposos de los discos intervertebrales. Las células del mesodermo se diferencian en los somitas, los precursores del esqueleto axial y del músculo esquelético. Modificada de: <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>.

Después del cierre del tubo neural, el futuro cerebro consiste en una sola capa de células llamada neuroepitelio que recubre los futuros ventrículos cerebrales. Con el fin de formar la compleja red de neuronas en el cerebro adulto, estas células proliferan ampliamente para producir el número necesario de cada tipo neuronal de una manera coordinada. Las células neuroepiteliales son capaces de autorrenovarse y, de acuerdo a su posición en el tubo neural, producen todas las neuronas específicas y células gliales del cerebro adulto por lo que se asume son multipotentes. No obstante lo anterior, todo indica que las células del neuroepitelio temprano son plásticas, tal que un cambio de posición dentro de la placa neural es suficiente para que produzcan distintos tipos neuronales (Guillemot 2007). Para generar un SNC completo, las células neuroepiteliales se someten a divisiones simétricas y asimétricas, lo que permite la generación de

nuevas células neuroepiteliales y la producción de células progenitoras restringidas al linaje neuronal o glial. Estos dos criterios, multipotencia y autorrenovación, cumplen con la definición mínima de célula troncal, por lo tanto, estas células se denominan frecuentemente células troncales neurales (CTNs).

Dentro del tubo neural existe una población compleja y heterogénea de células troncales neuroepiteliales. Al inicio de la etapa neurogénica se forman también tipos de células comprometidas con el linaje neuronal con capacidad de proliferar, por ejemplo las glías radiales. A medida que avanza el desarrollo del SNC, surgen poblaciones progenitoras neurales temporal y espacialmente distintas, esto gracias a la interpretación de las señales apico-basales y rostro-caudales del tubo neural. Después de la fase de expansión inicial sigue el periodo neurogénico. Algunas divisiones de los precursores neurales producen células hijas que salen del ciclo celular y se convierten en progenitores neuronales posmitóticos (Hirabayashi & Gotoh 2005; Temple 2001). En el ratón, el periodo neurogénico comienza alrededor de E9 (Finlay & Darlington 1995). Durante la neurogénesis, los precursores salen del ciclo celular, forman neuroblastos (i.e. progenitores neuronales) y empiezan a expresar marcadores típicos de neuronas diferenciadas, como Tuj1 (β III-Tubulina) y HuC/D. Los progenitores posmitóticos se separan de la capa neuroepitelial y migran lejos de ella. De esta manera, el neuroepitelio pasa de tener una sola capa de células a ser una estructura multicapa. La capa que contiene a las CTNs se conoce como zona ventricular, las células recién salidas del ciclo celular, principalmente neuroblastos en diferentes etapas de diferenciación, se encuentran en la zona intermedia, y hacia la zona del manto encontramos a las células posmitóticas diferenciadas. Una vez finalizada la fase neurogénica comienza la fase gliogénica. Durante este tiempo, distintas células precursoras dan lugar a oligodendrocitos, astrocitos y células endoteliales (Rowitch & Kriegstein 2010). En la figura 3 vemos como las CTNs definen su destino celular gracias a las señales a las que se encuentran expuestas.

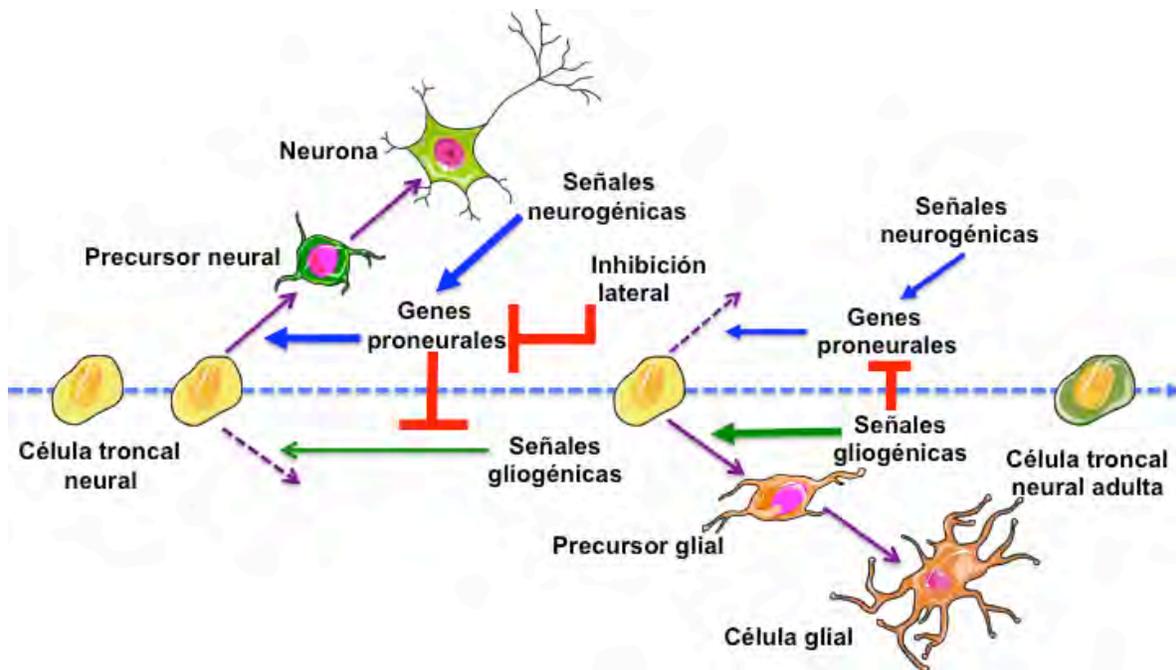


Figura 3: Neurogénesis vs gliogénesis. Las CTNs dan origen primero a neuronas y posteriormente a células gliales. El cambio de neurogénesis a gliogénesis es el resultado de los cambios de las propiedades de las CTNs controlados por señales tanto internas como externas (Figura adaptada de Bertrand et al. 2002).

Con el fin de producir todos los tipos de células neuronales y gliales en las cantidades correctas, la diferenciación debe regularse estrictamente. Se cree que el proceso de generar distintos tipos de neuronas y glías a partir de CTNs en momentos específicos, implica una secuencia de estadios de células progenitoras que están controladas por moléculas reguladoras. La adquisición de destinos diferenciados dentro de un dominio requiere que haya herencia desigual de las determinantes de la diferenciación y la expresión diferencial de los factores que promueven autorrenovación. La segregación asimétrica es crítica no sólo para mantener a la población de CTNs, si no también, para evitar aberraciones que lleven a deficiencias en el desarrollo. Si la neurogénesis es demasiado acelerada agotará la reserva de precursores, mientras que la proliferación exacerbada puede dar lugar a tumores. En ambos casos, el desequilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación resulta en anomalías funcionales y estructurales del cerebro. La última etapa del desarrollo del SNC implica un período de poda axonal y apoptosis neuronal que sintoniza los circuitos del SNC.

Vía de señalización de Notch en la neurogénesis

El desarrollo de organismos multicelulares depende de una red de señalización altamente conservada, de la cual uno de los componentes clave es la vía de señalización Notch. Esta vía es fundamental para los metazoarios; desempeña un papel crucial en numerosos procesos biológicos, como la proliferación celular, la diferenciación, el mantenimiento de las células troncales y la apoptosis durante el desarrollo y la renovación de los tejidos adultos (Bianchi et al. 2006; Siebel & Lendahl 2017). Los miembros de la familia Notch (receptores, ligando e intermediarios intracelulares) son reconocidos como moléculas de señalización esenciales pues controlan una diversidad de respuestas celulares que van desde el desarrollo normal hasta el mantenimiento de la homeostasis. Los componentes de esta vía están conservados evolutivamente en todos los metazoarios; *Drosophila* cuenta con un receptor, *C. elegans* posee dos y los mamíferos cuatro (Kopan & Ilagan 2009). Esta vía de señalización depende de contacto célula-célula y es contexto/tejido dependiente. En el contexto de las CTNs, la vía ha sido implicada en el mantenimiento del estado indiferenciado multipotente, la inhibición de la neurogénesis y la diferenciación terminal al linaje astrocítico (Zhang et al. 2017). La vía de señalización es activada por contacto entre los receptores Notch y sus ligandos. Los mamíferos poseen 4 receptores Notch1-Notch4 y existen 5 ligandos; Jagged1, Jagged2, Delta-like 1 (Dll1), Dll3 y Dll4. Cada uno de estos ligandos canónicos posee un dominio DSL (Delta/Serrate/LAG-2) que media la interacción con el receptor Notch. El contacto receptor-ligando activa una serie de cortes proteolíticos que liberan al dominio intracelular de Notch y este viaja al núcleo donde modifica la expresión génica de sus blancos (Bray 2006). La vía de señalización de Notch participa en varias decisiones binarias de la célula durante el desarrollo, y vincula las decisiones del destino celular de una célula a la de sus vecinos.

En el desarrollo temprano del SNC, Dll1 actúa como el ligando del receptor Notch1. La unión Dll1-Notch provoca que una metaloproteasa de la familia ADAM, llamada ADAM10, escinda a la proteína Notch a las afueras de la membrana, y posteriormente, la γ -secretasa corta a la proteína Notch desde el citoplasma en el

sitio S3, liberando el dominio citoplasmático (NICD, por sus siglas en inglés) que ahora puede translocarse al núcleo. Una vez en el núcleo, NICD forma un complejo con la proteína RBPJk a través del dominio RAM de Notch; este complejo es necesario para activar la transcripción de los genes blanco de la familia *Hes* (homólogos de *hairy and Enhancer of split* de *Drosophila*). Los genes *Hes* codifican factores de transcripción de la familia bHLH (*basic helix-loop-helix*) del tipo represor. Estos genes inhiben la expresión génica uniéndose a las secuencias blanco de ADN y reclutando correpresores, de esta manera, los genes *Hes* son capaces de impedir la expresión de genes proneurales. Los genes proneurales mejor estudiados son *Ascl1* (también conocido como *Mash1*) y *Neurogenina1/2*. Estos genes son factores de transcripción de la familia bHLH del tipo activador, que además de activar la diferenciación neuronal de la célula que los expresa, promueven la expresión de *Dll1* e influyen en el mantenimiento de algunos tipos de células troncales y progenitoras (figura 4). Inhibir la expresión de *Hes1*, *Hes3* y *Hes5* provoca que los genes proneurales aumenten su expresión ocasionando que la neurogénesis se acelere y como consecuencia que la población de precursores neurales se agote (Kageyama et al. 2005). Por el contrario, al sobreexpresar estos genes, se inhibe la neurogénesis (Ishibashi et al. 1994). Así, los genes *Hes* (activados por la vía de señalización de Notch) realizan tareas de mantenimiento CTNs por inhibición del fenotipo neuronal.

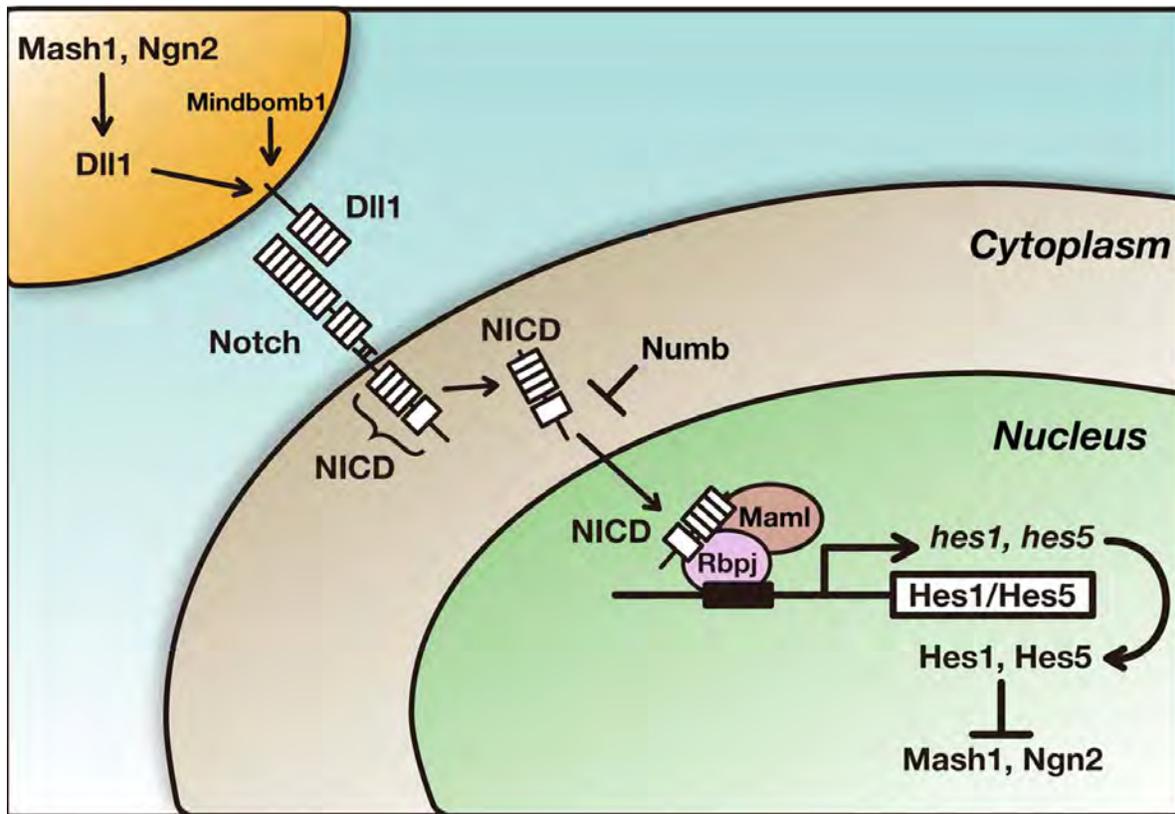


Figura 4: Vía de señalización de Notch. La vía de señalización de Notch inhibe la neurogénesis al promover la expresión de factores de transcripción como Hes1 y Hes5 que impiden la transcripción de genes panneurales (Kageyama, Ohtsuka, Shimojo, et al. 2008).

La vía de señalización de Notch tiene un papel crucial en el desarrollo del sistema nervioso como sabemos por diferentes ensayos de pérdida de función tanto en embrión como en adulto. La pérdida condicional de la señalización por Notch en el embrión resulta en diferenciación neuronal precoz, defectos en la supervivencia y la migración de las células precursoras. En el adulto la pérdida de Notch1 o RBPJk resulta en diferenciación neural prematura y en la reducción de la poza de CTNs (Imayoshi et al. 2010). Por otra parte, se ha mostrado que en el telencéfalo embrionario la vía de Notch tiene actividad diferencial dependiendo del estadio de diferenciación en el que se encuentran las células, es decir, las CTNs tiene alta actividad de la vía, mientras que los progenitores intermedarios tienen baja actividad, lo que además permite utilizar los niveles de expresión del cofactor Rbpjk para distinguir entre estas dos poblaciones (Mizutani et al. 2007). Varios trabajos concuerdan en que esta vía tiene como consecuencia la

conservación de la poza de células troncales y precursoras, incluyendo las del sistema nervioso embrionario, las células músculo-satelitales, del epitelio intestinal y de la epidermis interfolicular (Chiba 2006). En el 2008 Kawaguchi y colaboradores hicieron una delección condicional de *Dll1* en células precursoras neurales, y al analizar la expresión de Tuj-1 (marcador neuronal), observaron que en ausencia de *Dll1* el número de células Tuj-1⁺ aumenta, esto como consecuencia de la neurogénesis prematura por la ausencia de la activación de la vía de señalización de Notch (Kawaguchi et al. 2008) (figura 5).

En el campo de las CTNs de adulto de ratón, recientemente se demostró que es necesaria la señalización por *Dll1* para mantener en estado quiescente a las CTNs adultas (que pueden permanecer en este estado por varios años hasta que el sistema las requiera). Cuando las células son “activadas”, por ejemplo, por una lesión, las células expresan *Dll1* y al dividirse segregan *Dll1* asimétricamente. Aquellas células que retengan *Dll1* continúan la diferenciación y activan la vía de señalización de Notch en aquellas células vecinas que no tienen *Dll1*, contribuyendo a que estas últimas mantengan su estado inactivo. Este proceso ayuda a mantener la poza de precursores neurales y las propiedades neurogénicas del nicho (Kawaguchi et al. 2013).

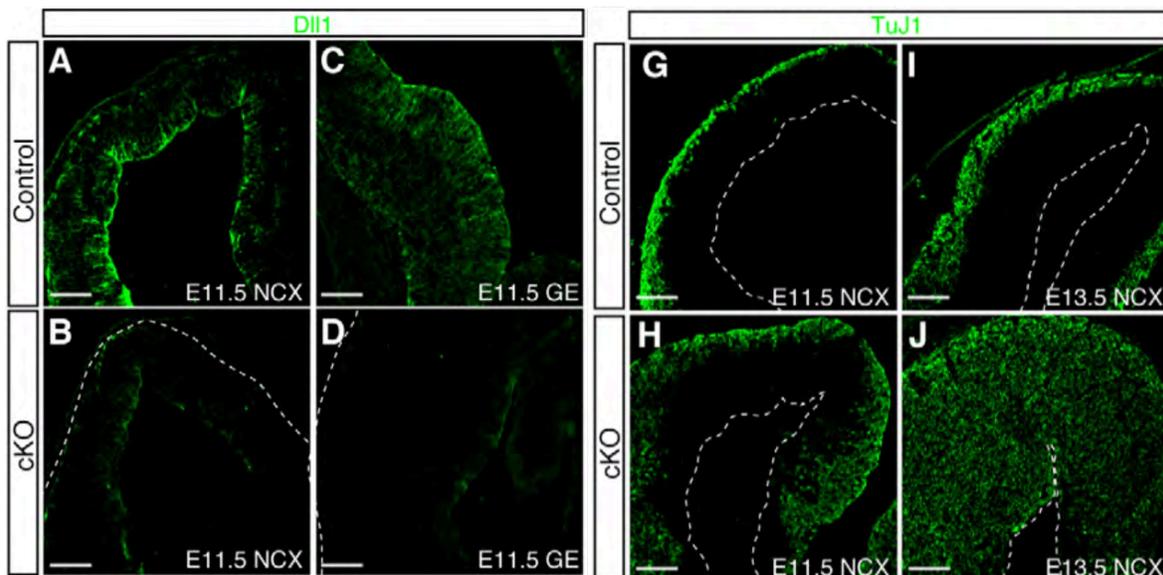


Figura 5: Neurogénesis prematura en ausencia de *Dll1*. Abatimiento condicional de la expresión de *Dll1* en telencéfalo de ratón provoca neurogénesis prematura. A-D Inmunodetección contra *Dll1* en el neocórtex (NCX) y eminencia gangliónica (GE) de ratón en el control y el *knockout* condicional. G-J Inmunodetección contra Tuj-1, marcador de neuronas, en el control y *knockout* condicional, mostrando que hay un mayor número de células Tuj-1+ en ausencia de *Dll1*.

ANTECEDENTES

Células troncales neurales y su manipulación *in vitro*

Existen diversas metodologías *in vitro* diseñadas para aislar, expandir y caracterizar funcionalmente a las poblaciones de CTNs. Estas han revolucionado nuestra comprensión de la biología de las CTNs y han aumentado nuestro conocimiento sobre la regulación genética y epigenética de las mismas. En un intento de recapitular las distintas etapas de desarrollo *in vivo* del sistema nervioso, se han diseñado estrategias que permiten aislar y expandir diferentes poblaciones de CTNs originarias de diferentes etapas del desarrollo embrionario o distintas regiones del cerebro adulto. Debido a que *in vitro* estas células se dividen durante mucho tiempo (aunque tal vez no de forma ilimitada), generalmente se les denomina CTNs aunque en muchos casos podrían tratarse más bien de precursores neurales (PNs) (Furlan-Magaril & Covarrubias 2004). Las metodologías usadas para cultivarlas implican hacer microdisecciones de regiones que contengan a estas células en división, o derivarlas a partir de células troncales embrionarias (ESCs por sus siglas en inglés) o células pluripotentes inducidas (iPSCs por sus siglas en inglés). Cada método posee ventajas y desventajas como a continuación se ilustra.

Los cultivos en neuroesferas permiten cultivar a las células como agregados celulares en suspensión. Las células son cultivadas a baja densidad en medio sin suero con la adición de mitógenos como EGF o Fgf2 (del inglés *epidermal growth factor* y *fibroblast growth factor 2* respectivamente). Las CTNs responden a estos mitógenos y empiezan a proliferar y aparentemente cada agregado se origina a partir de una sola célula, por lo que este método permite identificar a las células troncales como reflejo de su capacidad para generar neuroesferas. Se cree que las neuroesferas proveen un ambiente tridimensional semejante al nicho neurogénico, pero mantener estos cultivos a largo plazo provoca cambios en la capacidad de proliferar y diferenciar, e induce inestabilidad cromosómica (Vukicevic et al. 2010).

Alternativamente, las CTNs pueden cultivarse en una monocapa adherente. Esta metodología utiliza recubrimientos de laminina o fibronectina, proteínas de matriz extracelular usuales en los nichos neurogénicos *in vivo*, lo que permite mantener a las células en un estado indiferenciado por más tiempo. Al igual que en los cultivos en neuroesfera, las células pueden subcultivarse varias veces y es posible diferenciar las células a los tres linajes (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) al remover los mitógenos o exponer las células a dosis bajas de suero. Una diferencia importante en ambos métodos es que los cultivos adherentes tienen mayor capacidad proliferativa durante los primeros pases en comparación a las neuroesferas, lo que permite obtener un mayor número de células en un tiempo menor. Así mismo, las células cultivadas de esta manera parecen conservar mejor su capacidad neurogénica (Sun et al. 2011).

Las CTNs pueden obtenerse también por diferenciación de ESCs o iPCS. Existen varios protocolos para inducir este tipo de diferenciación y en general se utilizan estrategias que imiten el entorno del neuroectodermo en el embrión. Por ejemplo, con la formación de cuerpos embrioides (agregados de ESCs que permiten recapitular las etapas tempranas del desarrollo embrionario) se promueve la formación del epiblasto que antecede a la formación de la placa neural, mientras que al sembrar las células en un a baja densidad en medio libre de suero, se restringen las interacciones y señales celulares evocando así un mecanismo por defecto para la diferenciación neural. Algunos protocolos combinan aspectos de estos dos enfoques, promoviendo las interacciones célula-célula para facilitar la formación de las tres capas germinales primarias seguidas de una selección específica del linaje neural bajo condiciones definidas (Cai & Grabel 2007). En muchos casos, aun cuando se agreguen las señales necesarias para generar un tipo neuronal específico, en general se observa que la diferenciación se desvía principalmente hacia el linaje GABAérgico (Arenas et al. 2015).

En todas las metodologías presentadas es necesario usar mitógenos como Fgf2 o EGF pues la adición de estos al medio de cultivo permite mantener a las células por varios pases celulares (Temple 2001).

Una de las mayores dificultades al trabajar con CNTs en cultivo es

encontrar las condiciones que permitan expandirlas y mantener las propiedades de diferenciación similares a las que tenían en su lugar de origen. Es decir, las CTNs en cultivo deberían mantener la capacidad de dar origen a células gliales y neuronas, además de incluir al tipo neuronal específico de la región de la cual provienen. La escasa información sobre los componentes del nicho natural donde se encuentran ha dificultado esta tarea. Durante la expansión de CTNs *in vitro*, el potencial neurogénico se va perdiendo con el tiempo desviándose hacia el destino astrocítico; probablemente no como una propiedad intrínseca sino como resultado de las condiciones usadas para su cultivo. Mantener en cultivo a las CTNs por mucho tiempo disminuye el potencial neurogénico de las células (Anderson et al. 2007). Qian y colaboradores en 2000, reportaron que en presencia de Fgf2 el número de células gliales aumenta de manera dependiente a la concentración de Fgf2 (Qian et al. 2000) (figura 6). En el 2004, se demostró que la adición de Fgf2 al medio promueve la remodelación de cromatina necesario para permitir la expresión de la proteína Gfap (*glial fibrillary acidic protein* por sus siglas en inglés), que es un marcador de astrocitos ampliamente utilizado para identificar a estas células. En otras palabras, Fgf2 regula la competencia de las CTNs para responder a las señales astrocíticas (Song & Ghosh 2004). En este sentido, los mitógenos sin los cuales las CTNs son casi incultivables promueven el cambio de potencial neurogénico a astrogénico (figura 7).

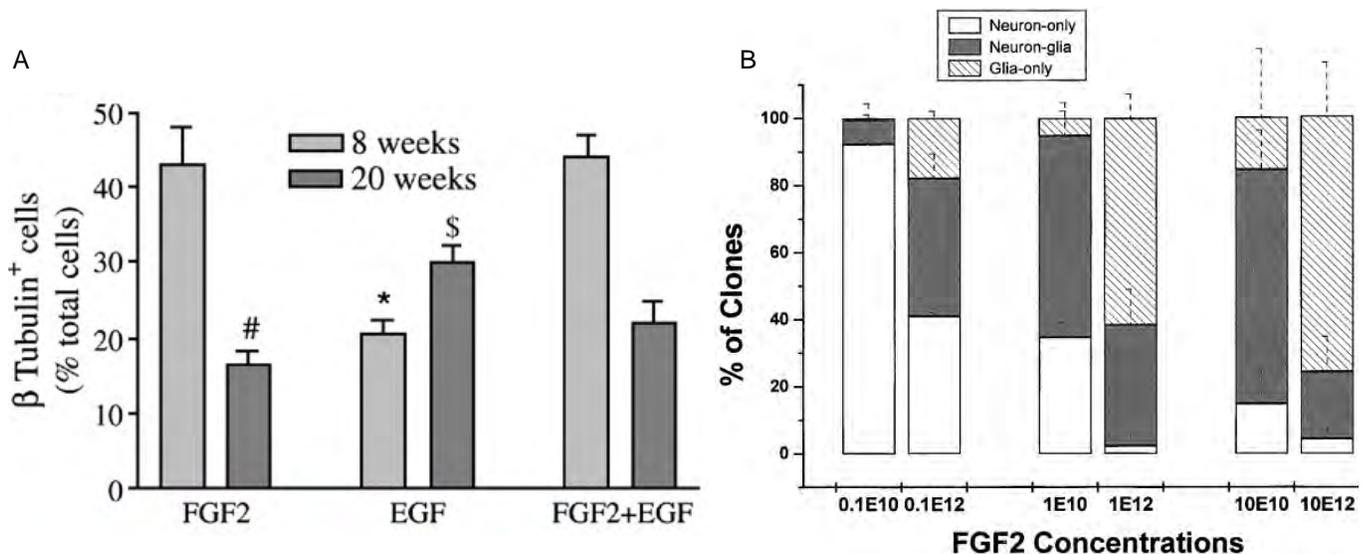


Figura 6: Pérdida de potencial neurogénico y el efecto de Fgf2. Las CTNs humanas producen menos neuronas en cultivos que llevan más tiempo versus cultivos mantenidos por menos tiempo

(Anderson et al. 2007). En ensayos clonales, concentraciones crecientes de Fgf2 promueven la generación de destinos gliales. Esto también es dependiente de la etapa del desarrollo en la que se toman las células, pues a etapas más tempranas las células son menos responsivas a las señales astrocíticas (Qian et al. 2000).

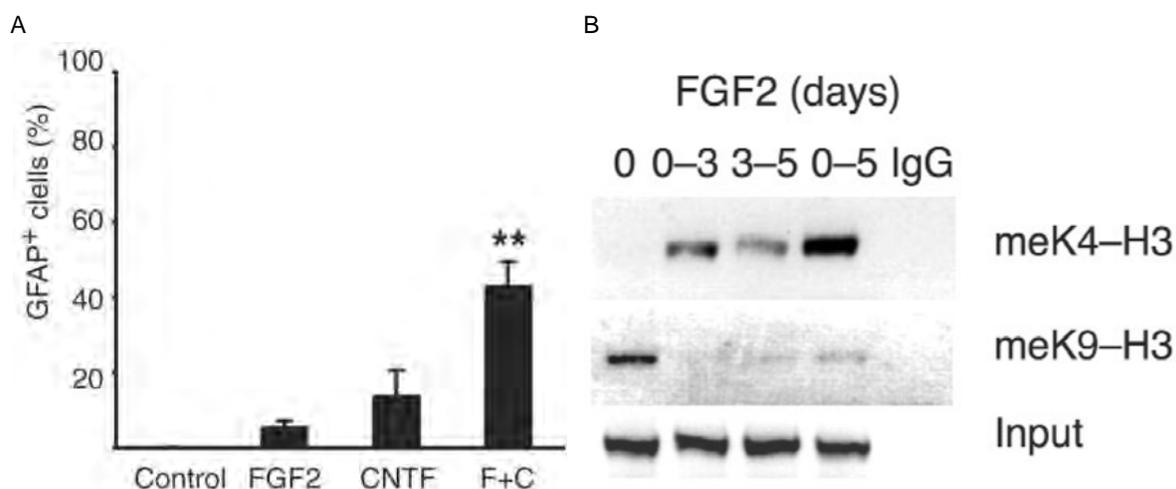


Figura 7: Fgf2 modula la respuesta a señales astrogénicas. A) Cuantificación de células que expresan Gfap en cultivo cortical, en presencia de Fgf2 y/o CNTF. Fgf2 promueve la formación de células Gfap⁺ y su efecto es aditivo al de CNTF. B) Por ChIP, los autores mostraron el estado de metilación de la histona H3 asociada al promotor de Gfap (Song & Ghosh 2004).

Para estudiar a las CTNs, tenemos que aislarlas, purificarlas y expandirlas *in vitro*, por lo que es necesario sacarlas de su nicho natural. Encontrar métodos que permitan expandir la población troncal conservando su potencial neurogénico es de suma importancia, no solo con el fin de obtener grandes cantidades de un tipo neuronal específico, sino que contribuiría a entender las señales que controlan la estabilidad epigenética de las CTNs.

Neurogénesis dopaminérgica

Las neuronas dopaminérgicas son capaces de liberar dopamina, neurotransmisor catecolaminérgico, y se caracterizan por la presencia de la enzima Th (tirosina hidroxilasa), la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas. Estas neuronas han sido posible clasificadas en 11 grupos discretos de células. Aproximadamente el 75% de todas las neuronas dopaminérgicas en el cerebro adulto derivan del cerebro medio (mDA) (Wallén & Perlmann 2003). Estas se localizan en tres regiones principales denominadas A8-A10, que corresponden al campo retrorubral (RRF), la sustancia nigra pars

compacta (SNpc), y el área ventral tegmental (VTA), respectivamente. Las neuronas de la SNpc proyectan al estriado dorsal, formando la vía nigroestriatal implicada en el control de los movimientos voluntarios, y la degeneración de este grupo de neuronas provoca los síntomas motores característicos de la enfermedad de Parkinson (Davie 2008). Las neuronas del VTA proyectan al estriado ventromedial y a las áreas subcorticales y corticales, formando el sistema límbico mesocortical, que está involucrado en comportamientos emocionales y mecanismos de motivación y recompensa. La mala regulación del sistema límbico mesocortical contribuye al desarrollo de la adicción a las drogas y la depresión (Kelley & Berridge 2002), además de participar en algunos síntomas de la esquizofrenia (Laruelle 2013). Las neuronas RRF, aunque poco estudiadas respecto a los dos grupos anteriores, se sabe que proyectan al estriado dorsal y presentan conexiones con las neuronas de la SNc y VTA (Hegarty et al. 2013). Entender cómo se originan estas neuronas es de gran importancia pues, como ya se mencionó, participan en la regulación del comportamiento emocional, motivacional, cognitivo y la recompensa, así mismo, el daño de estas genera un amplio espectro de desórdenes psiquiátricos como las adicciones y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson.

Estudios de mapeo de destino celular han determinado que las neuronas mDA provienen de células que expresan Shh (*Sonic Hedgehog*) en la placa del piso del mesencéfalo ventral (Joksimovic et al. 2009). Este nicho troncal tiene la peculiaridad de ser la única región de la placa del piso de todo el tubo neural con capacidad neurogénica (Ono et al. 2007).

Para formar el cerebro medio y especificar a los progenitores dopaminérgicos, es necesario que las señales anteroposteriores y dorsoventrales se integren correctamente. Durante el desarrollo del tubo neural se forman dos centros de señalización: i) el istmo, que define la frontera entre el mesencéfalo y el romboencéfalo y, ii) la placa del piso, que controla las identidades ventrales. Los eventos de modelado inicial de la placa neural conducen a la expresión del factor de transcripción *Otx2* en el epiblasto anterior, mientras que *Gbx2* se expresa en la región posterior. Su represión mutua conduce a la formación de un límite agudo en la región mesencéfalo-metencéfalo, donde *Otx2* se expresa en el futuro

mesencéfalo y telencéfalo, mientras que *Gbx2* se expresa en el lado posterior del cerebro. En el punto de encuentro de estos dominios de expresión génica, se forma el istmo organizador alrededor del E7.5 de ratón (figura 8A). Estudios de pérdida de función parcial han demostrado que *Fgf8* es la principal señal inductora secretada por el istmo (Martínez 2001). *Wnt1* se empieza a expresar en la región *Otx2+* y *Fgf8* en la región *Gbx2+* produciendo una imagen de espejo. *Fgf8* y *Wnt1* no sólo participan en la formación del cerebro medio sino que además tienen una función directa en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, estableciendo la identidad y comprometiendo a los precursores a diferenciar a neuronas mDA.

A la par de la inducción por el istmo, la notocorda secreta Shh, esto induce la formación de la placa del piso a lo largo del tubo neural gracias a la activación de *Foxa2* y proporciona información de posición a lo largo del eje dorso-ventral (Placzek & Briscoe 2005). Después de la formación adecuada del istmo, las señales solubles de la placa del piso y la placa del techo dividen el mesencéfalo en regiones dorsal y ventral. Como tal, cada región posee su propia "competencia" temporal y de desarrollo, y la eliminación o expresión ectópica de tales moléculas puede inducir tipos de células ventrales en regiones dorsales o viceversa. La generación de neuronas mDA debe coordinarse con la conversión de células de la placa del piso en progenitores neuronales. Esta transición podría deberse a la activación de la vía de señalización canónica de Wnt, activada por *Otx2* en el mesencéfalo (Ono et al. 2007). Alrededor de E10.5, *Wnt1* suprime los niveles de expresión de *Shh*, posiblemente a través de un mecanismo mediado por *Msx1* (Joksimovic et al. 2009), esto induce la expresión de *Neurog2* (gen panneural del tipo bHLH). La inducción de la expresión de *Neurog2* junto con la de *Mash1* (otro gen panneural bHLH) marca el inicio de la neurogénesis (Kele et al. 2006).

La neurogénesis dopaminérgica toma lugar en la región ventricular de la placa del piso, y conforme estas células avanzan en la diferenciación, migran hacia la región intermedia donde encontramos a las células que ya adquirieron un compromiso neuronal y son posmitóticas (figura 8C). Cerca de E12.5 las células expresan *Nurr1* y *Pitx3*, genes que codifican factores de transcripción que definen las características del fenotipo DA: la presencia de Tirosina Hidroxilasa (enzima

limitante en la síntesis de dopamina; Th), el transportador vesicular de monoaminas 2 (Vmat2) y el transportador de dopamina (DAT). Todas estas señales convergen en la placa del piso mesencefálica que definen al nicho dopaminérgico. En la figura 8 pueden observarse a las células precursoras neurales del nicho dopaminérgico en sus diferentes etapas de diferenciación, así como los genes expresados en cada una de ellas.

Finalmente las neuronas posmitóticas migran hacia la región del manto y de ahí las neuronas mDA migran radialmente a lo largo de los procesos de glias radiales Vimentina⁺ (Shults et al. 1990) y luego tangencialmente, para alcanzar su posición final en la SNpc, VTA y RRF, donde desempeñarán las funciones que ya se mencionaron antes.

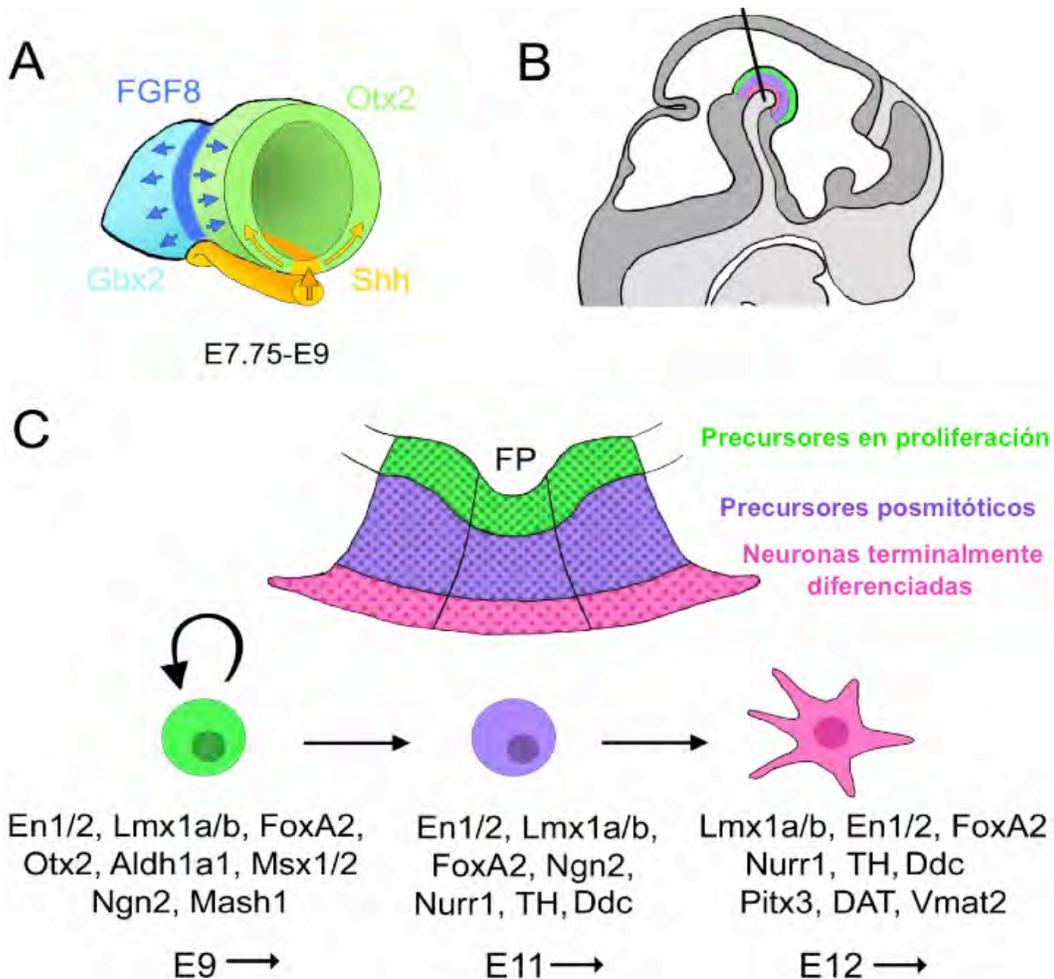


Figura 8: Desarrollo del cerebro medio y diferenciación dopaminérgica. A) Sección transversal de un tubo neural representando la región mesencefálica-metencefálica. Los eventos de especificación temprana determinan el dominio dopaminérgico en el mesencéfalo ventral. Otx2 especifica el territorio del cerebro medio y le da competencia para responder al Fgf8 secretado por

el organizador ístmico y Shh desde la notocorda y la placa de piso. B) Esquema del cerebro sagital de E12.5 mostrando la localización del dominio dopaminérgico meso-diencefálico. C) Vista coronal del dominio dopaminérgico representado en B. En la dirección medio-lateral, el dominio se divide en la placa del piso y regiones laterales. Modelo de codificación en color del desarrollo de neuronas dopaminérgicas, mostrando algunos de los factores expresados en precursores proliferantes (verde), progenitores posmitóticos pero inmaduros (púrpura) y neuronas diferenciadas (rosa). Figura traducida de Lahti 2012.

A diferencia de otras regiones de la placa del piso, la del cerebro medio expresa Dll1 (Ono et al. 2007) y se piensa que la presencia de Dll1 en esta región está ligada a la capacidad neurogénica del nicho (figura 9A). Dll1 podría jugar un papel importante en la posición y mantenimiento de las CTNs del nicho dopaminérgico. En ratones mutantes para *Dll1* se observa que, en el mesencéfalo ventral de embriones en la etapa E11.5, hay más células Th^+ comparado con embriones silvestres, esto como resultado de un proceso de diferenciación prematura y agotamiento de la poza de precursores neurales causado por la ausencia de Dll1 en el nicho dopaminérgico (Trujillo-Paredes et al. 2016) (figura 9B).

Los cultivos de precursores neurales provenientes del mesencéfalo ventral embrionario también están sujetos a la pérdida de potencial neurogénico con el tiempo. Chung y colaboradores observaron que estos cultivos de ratón pierden la capacidad de generar neuronas cuando han sido mantenidos por un periodo de 4 semanas, pues la inmunorreactividad contra β III-tubulina (marcador de neuronas inmaduras) casi desaparece para entonces (Chung et al. 2006) (figura 9C).

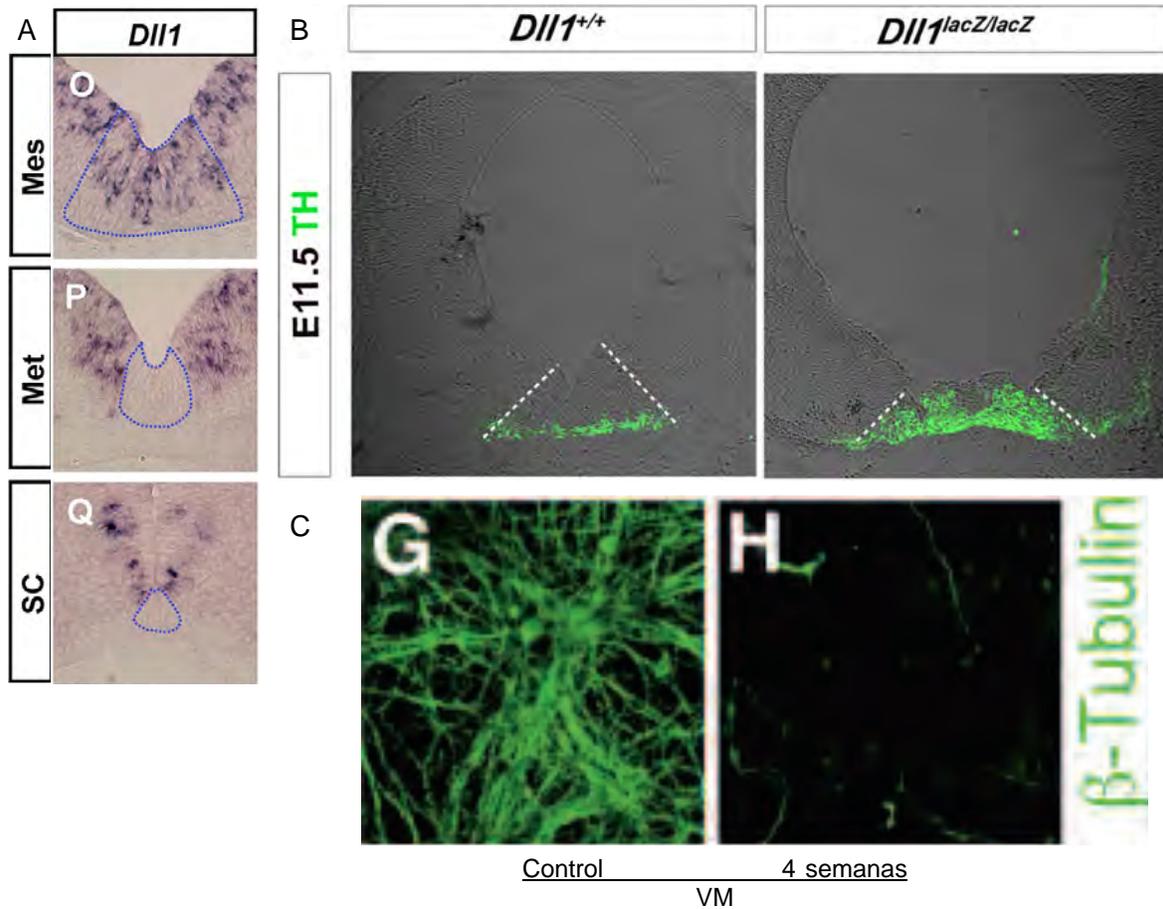


Figura 9: Dll1 en el nicho dopaminérgico. A) Dll1 se expresa en la placa del piso del cerebro medio (panel superior), esto contrasta con que en otras zonas del tubo neural la placa del piso no expresa Dll1, pero sí las zonas aledañas que son consideradas neurogénicas (Ono et al. 2007) Met es metencéfalo y SC es médula espinal (del inglés *spinal cord*). B) La Tirosina hidroxilasa (Th) es un marcador de diferenciación dopaminérgica. En ausencia de Dll1 en la región dopaminérgica se observan más células Th+ en comparación con células WT, esto como resultado de la neurogénesis prematura (Trujillo-Paredes et al. 2016). C) La CTN del mesencéfalo también pierden potencial neurogénico con el tiempo. A las 4 semanas en cultivo la inmunorreactividad a β -Tubulina disminuye dramáticamente (Chung et al. 2006).

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Es importante entender a fondo los mecanismos que permiten el equilibrio entre autorrenovación y diferenciación para entender mejor la biología de las células troncales. La vía de señalización de Notch juega un papel muy importante en el balance entre proliferación y diferenciación de las CTNs; está implicada en la inhibición de la neurogénesis, y la autorrenovación de las células troncales neurales. Por lo tanto estudiar la vía de Notch no sólo nos dará mayor comprensión de la biología de la células troncales sino que además puede facilitar el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a una gran cantidad de trastornos neurológicos, incluyendo lesiones cerebrales, tumores cerebrales y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, Alzheimer y Parkinson.

Con lo anterior y tomando en cuenta que:

- a) La pérdida de la señalización de Notch provoca que las CTNs diferencien prematuramente.
- b) La expresión sostenida de efectores de la vía de señalización de Notch provoca que la poza de precursores se mantenga por más tiempo como resultado de inhibir la neurogénesis.
- c) En el adulto, ayuda a conservar la poza de CTNs, pues aquellas células que tienen la vía activa no diferencian.

Además, sabemos que las CTNs pierden su potencial neurogénico con el tiempo en cultivo, esto es cierto para diferentes especies que incluyen humano, ratón, rata y para células provenientes de distintas regiones; telencéfalo, mesencéfalo.

Así mismo, el modelo de precursores mDA es interesante e importante porque:

- i) Las neuronas dopaminérgicas participan en muchos procesos, incluyendo, motivación y movimiento.
- ii) Los defectos en este tipo neuronal ocasionan problemas que van desde adicciones hasta enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson.
- iii) Los precursores dopaminérgicos surgen de la placa del piso del cerebro medio, que es la única región neurogénica de toda la placa del piso.

- iv) La placa del piso del cerebro medio expresa *Dll1*, ligando de Notch, hecho que se ha asociado a la capacidad neurogénica de la región.
- v) Los precursores del nicho dopaminérgico pierden capacidad neurogénica con el tiempo en cultivo.

Proponemos la siguiente hipótesis:

Dll1 es capaz de mantener el potencial troncal de las CTN provenientes del nicho dopaminérgico en cultivo, como consecuencia de activar la vía de señalización de Notch.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el potencial de diferenciación de las CTN provenientes del mesencéfalo embrionario en presencia de Dll1.

Objetivos particulares

- Valorar la cinética de potencial neurogénico de CTNs provenientes del nicho dopaminérgico en cultivo celular.
- Construir de un vector que permita expresar Dll1 de forma inducible.
- Cultivar CTNs primarias y valorar su potencial de diferenciación en presencia de Dll1.
- Cultivar CTNs derivadas de ESCs que expresen Dll1 de forma inducible y valorar su potencial de diferenciación al inducir la expresión de Dll1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Soluciones y reactivos

Medio DMEM, pH 6.9

(Dubelcco's Modified Eagle Medium, GIBCO)

- Disolver el contenido de un sobre en 900 ml de agua bidestilada estéril.
- Adicionar 3.7 gr de NaHCO₃ y ajustar el pH a 6.9 con HCl 1N.
- Aforar a 1L con agua bidestilada y esterilizar por filtración con una membrana de acetatos con poro de 0.22 µm.

Medio M15/M10

- 15% ó 10% de suero fetal bovino (suero fetal bovino para mESCs sólo para hacer quimeras)
- 1X GPS
- 1X aminoácidos no esenciales (GIBCO)
- 1X piruvato de sodio (GIBCO)
- 182 µl de β-mercaptoetanol por cada 100ml de medio.
- Aforar con DMEM pH 6.9

Medio OP9

- 10% de suero fetal bovino
- 1X GPS
- Aforar con MEM (GIBCO)

Medio STO

- 7% de suero fetal bovino
- 1X GPS
- Aforar con DMEM pH 6.9

Medio DMEM-F12 con HEPES

- (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)
- Disolver el contenido de un sobre en 900 ml de agua bidestilada estéril.

- Adicionar 1.2 gr de NaHCO₃ y ajustar el pH a 6.9 con HCl 1N.
- Aforar a 1 L con agua bidestilada y esterilizar por filtración con una membrana de acetatos con poro de 0.22 µm.

Medio de cultivo de precursores neurales, N2B27

Para 100ml:

- DMEM F-12 con HEPES 49 ml
- Neurobasal 49 ml
- B27 1 ml
- N2 0.5 ml
- β-Mercaptoetanol 183 µl
- Insulina (25mg/ml) 40 µl
- GPS 100X 1 ml
- Agregar Fgf2 a 10 ng/ml concentración final. (Stock está a 20 ng/µl, adicionar sólo al medio que se va a utilizar)

LIF (millipore)

- Redisolver en 1 ml de BSA1% (en PBS 1X), concentración final es 10 ng/µl.
- Utilizar a 10 ng/ml de medio.

GPS 100X

- De un frasco de 100 ml de Gluta-Max (200 mM, marca GIBCO), transferir 10 ml de solución a un tubo falcón de 15 ml; agregar penicilina (300 mg, marca Sigma) y la estreptomycin (500 mg, marca Sigma) y disolver. Esterilizar la solución de GPS por filtración con membrana de 0.22 µm y agregar al restante del contenido del Gluta-Max y mezclar homogéneamente. Alicuotar en tubos de 15 ml y guardar a -20°C. Descongelar para utilizar y mantener a 4°C por hasta 1 mes.

Tripsina 0.05% (Gibco)

- Tomar una alícuota de tripsina 2.5% (1 ml) y diluir en verseno (PBS 1X, EDTA 0.02%) estéril.

- **Nota:** NUNCA usar una concentración más alta de tripsina para trabajar con precursores neurales.

Suplemento N2

Preparación de stocks:

- Albúmina sérica fracción V (Sigma) al 7.5%, disolver en agua y filtrar.
- Progesterona (Sigma) (6 mg/ml): 100 mg en 16.6ml de etanol. Guardar a -20 °C hasta 6 meses.
- Putrescina (Sigma)(160 mg/ml): Diluir en agua estéril . Guardar a -20 °C, no filtrar.
- Selenita de sodio (Sigma) (30 mM; 5.18 mg/ml): Diluir en agua. No esterilizar. Guardar a -20 °C.
- Insulina (Sigma) (25 mg/ml): Diluir en HCl 0.01 M estéril.
- Apo-transferrina (Sigma) (100 mg/ml): Diluir en agua estéril en campana. Vortex y mezclar toda la noche a 4 °C.

Para 10 ml de N2:

- DMEM-F12 8.25 ml
- Putrescina 120 µl
- Progesterona 3.96 µl
- Na₂SeO₃ 1.2 µl

-Esterilizar por filtración, tomar 7 ml y agregar:

- Insulina 1 ml
- Transferrina 1 ml
- BSA 1 ml
- Agregar lentamente 45 µl de NaOH (J. T. Baker) 1 M estéril, luego otros 30 µl.

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

Poli L-Ornitina 0.0025% (Sigma)

- Para 50 ml, tomar 12.5 ml de ornitina (0.01%) y diluir en H₂O estéril. Reutilizar 10 veces antes de desechar. Separar la solución usada de la nueva.

Gelatina 0.1%

- Pesar 0.1 gr de gelatina porcina tipo A por cada 100 ml de H₂O grado cultivo. Calentar un poco para facilitar que se disuelva. Esterilizar por filtración.

PFA 4%, pH 7.4

Alta toxicidad, usar guantes.

- Pesar 4 gr de PFA y disolver en agua bidestilada.
- Agitar y calentar para que se disuelva.
- Agregar 10 µl de NaOH 5 N para aclarar la solución. Una vez aclarada agregar 50 ml de PBS 2X sin esterilizar.
- Ajustar el pH a 7.4 y esterilizar por filtración.
- Alicuotar y guardar a -20 °C.
- Al descongelar, usar vortex hasta que los grumos desaparezcan.

Mitomicina C (Teva)

- Utilizar guantes al manipular
- Disolver el contenido de un vial (2 mg) en 4 ml de PBS 1X estéril. Hacer alícuotas de 500 µl y proteger de la luz. Almacenar a -70 °C.

Luria Bertani

- 10 g de Bactotripton
- 5 g de Extracto de levadura
- 5 g de Cloruro de sodio
- 10 mL de solución timina-tiamina.
- Llevar a 1 L, si se hacen placas de agar, agregar 15 g de Bactoagar

Soluciones miniprep casero

Solución I

- Tris-HCL 25mM, pH 8

- EDTA 10mM, pH 8

Solución II, preparar al momento, usar a temperatura ambiente:

- NaOH 0.2, stock a 10 N
- 1% p/v SDS

Solución III, almacenar a 4 °C, usar fría:

- Acetato de potasio 5 M, 6 ml
- Ácido acético glacial, 1.15 ml
- H₂O, 2.85 ml

TAE (Tris Acetato EDTA) 10X

- 48.5 gr de Tris base
- 11.42 ml de ácido acético glacial
- 20 ml de EDTA 0.5M pH 8
- Llevar a un 1 litro con agua bidestilada

Buffer de carga ARN

- 10 M de urea + 2% de azul de bromofenol

Cepas bacterianas y líneas celulares

Nombre	Características	Referencia
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <u>mcrA</u> Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ ⁻	Grant 1990
STO	Línea de fibroblastos embrionarios de ratón SIM (Sandos Inbred Mice) resistente a tioguanina/guabaina.	Alan Bernstein, Canadian Institute for Advanced Research.
STO-DII1	Línea celular STO, lleva el vector PB-DII1.	Este trabajo
OP9	Línea de células provenientes del estroma de médula ósea de embriones de ratón de	Nakano 1994. Donadas por el Dr. Hector Mayani

	la cepa (C57BL6 x C3H)F2 –op/op.	
OP9-DL1	Línea OP9 que lleva el vector MIGR1-DLL1. Permite la expresión de la proteína Dll1 y GFP.	Schmitt & Zúñiga-Pflücker 2002. Donación del Dr. Hector Mayani
W9.5	Células troncales embrionarias de ratón, derivadas de la cepa 129.	
W9.5Dll1	Células W9.5 transfectadas con el vector PB-Dll1.	Este trabajo

Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'-3'	Referencia
Oligos para RT-QPCR		
Rplp0-Fw	CACTGGTCTAGGACCCGAGAA	(Wong et al. 2009)
Rplp0-Rv	AGGGGGAGATGTTTCAGCATGT	(Wong et al. 2009)
Ciclofilina-Fw	GGCAAATGCTGGACCAAACAC	(Scherer et al. 2011)
Ciclofilina-Rv	TTCCTGGACCCAAAACGCTC	(Scherer et al. 2011)
GADPH-Fw	ACACAGCCGCATCTTCTTGT	(Scherer et al. 2011)
GADPH-Rv	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	(Scherer et al. 2011)
Lmx1A-Fw	GGACCATAAGCGACCCAAAC	(Jaeger et al. 2011)
Lmx1A-Rv	CCTGAACCACACGGACACTC	(Jaeger et al. 2011)
TH-Fw	TACGCCACGCTGAAGGGCCTCTAT	Primer BLAST
TH-Rv	AGGTGAGGAGGCATGACGGATGTA	Primer BLAST
Msx2-Fw	CTCGGTCAAGTCGGAAAATTC	(Singh et al. 2013)
Msx2-Rv	GTTGGTCTTGTGTTTCCTCAG	(Singh et al. 2013)
Nestina-Fw	TGAGAACTCTCGCTTGACAGACAC	(Jaeger et al. 2011)
Nestina-Rv	GGTCCTCTGGTATCCCAAGGAAATG	(Jaeger et al. 2011)
βIII Tubulina-Fw	ATCAGCAAGGTGCGTGAGGAG	(Jaeger et al. 2011)
βIII Tubulina Rv	ATGGACAGGGTGGCGTTGTAG	(Jaeger et al. 2011)
Ngn2-Fw	GCTGTGGGAATTTACCTGT	(Jaeger et al. 2011)
Ngn2-Rv	AAATTTCCACGCTTGCAATC	(Jaeger et al. 2011)
Sox2-Fw	CATGAGAGCAAGTACTGGCAAG	(Kobayashi et al. 2009)
Sox2-Rv	CCAACGATATCAACCTGCATGG	(Kobayashi et al. 2009)
Hes1-Fw	TGAAGGATTCCAAAAATAAAATTCTCTGGG	(Kobayashi et al. 2009)
Hes1-Rv	CGCCTCTTCTCCATGATAGGCTTTGATGAC	(Kobayashi et al. 2009)

DII1-Fw	TCAGATAACCCTGACGGAGGC	(Kobayashi et al. 2009)
DII1-Rv	AGGTAAGAGTTGCCGAGGTCC	(Kobayashi et al. 2009)
Hes5-Fw	AGATGCTCAGTCCCAAGGAG	(Kobayashi et al. 2009)
Hes5-Rv	TAGCCCTCGCTGTAGTCTG	(Kobayashi et al. 2009)
Notch1-Fw	CCCTTGCTCTGCCTAACGC	(Zhao et al. 2009)
Notch1-Rv	GGAGTCCTGGCATCGTTGG	(Zhao et al. 2009)
Adh111-Fw	GCCATCAACTGGACCCTCAT	Mouse Atlas
Aldh111-Rv	TCTGGAAGCACGTCACTC	Mouse Atlas
Tnc-Fw	ACCGCAGAGAAGAATTTTGG	(Saga et al. 1991)
Tnc-Rv	TCCCCATGGTCTTGTAGGTC	(Saga et al. 1991)
Gfap-Fw	AGAACAACCTGGCTGCGTATAG	(Seaberg et al. 2004)
Gfap-Rv	TCTGCAAACCTAGACCGATACCA	(Seaberg et al. 2004)
Oligos para clonación y secuenciación		
DII1-Fw	GAGCAAGGGGATCCAGCGGTAC CATGGGCCGTCGGAGCG	Este trabajo
DII1-Rv	GAATTTTCTCGAGTCGCTTCCATC TTACACCTCAGTCGC	Este trabajo
Fw-midDII1	GTGATGACCAACATGGATACTGTG	Este trabajo
Rv-midDII1	GAGTAGACAGACTCTGGCCTTTTTC	Este trabajo
Fw-mid2DII1	GGAGAAGAATGGTCTCAGGACCTTC	Este trabajo
RV-mid2DII1	CTCAGGGAGCAGAACTGGCAGTTG	Este trabajo
pPGK-Rv	GCGCCTACCGGTGGATGTGGAATG	Martínez-Sarmiento 2016

Métodos de cultivo celular

Recubrimiento de cajas con gelatina

- Tomar un volumen suficiente de gelatina 0.1% estéril para cubrir la superficie del plato. Incubar en campana de flujo laminar por al menos 15 minutos.

Recubrimiento de cajas con poli-ornitina/ Laminina

- Usar Poli-L-Ornitina al 0.0025% diluida en agua. Tomar un volumen a penas suficiente para cubrir el fondo del plato a utilizar. Dejar reposar dentro de campana por al menos 2 horas.

- Remover la ornitina con una pipeta y guardar en un tubo estéril para reutilizar. Se puede reusar hasta 10 veces. No mezclar ornitina nueva con usada.
- Dejar secar las cajas un par de minutos y agregar 1 μ l de laminina por cada ml DMEM F12 con hepes a utilizar. Agregar un volumen suficiente para cubrir el fondo del plato. Dejar en la incubadora a 37 °C al menos una noche.
- Antes de usar la caja aspirar muy bien el medio.

Conteo en cámara de Neubauer

- Limpiar la cámara y el cubreobjetos con un papel con etanol al 70% con cuidado de no rayar la región semiplateada en donde se ubica la cuadrícula.
- Colocar la cámara en el microscopio y el cubreobjetos sobre ella de manera que cubra homogéneamente la superficie semiplateada.
- Tomar 10 μ l de una suspensión celular homogénea y agregar 10 μ l de azul de tripano (GIBCO 15250-061) en un microtubo.
- Mezclar subiendo y bajando la suspensión un par de veces.
- Colocar 10 μ l de mezcla en el receptáculo de la cámara permitiendo que la suspensión se deslice hacia el interior de la cámara por capilaridad.
- Seleccionar el objetivo de 10X y contar las células en las cuadrículas de las esquinas. 4 cuadrículas con 16 divisiones cada una. El número obtenido dividirlo entre 4 (número de cuadrículas) y el resultado multiplicarlo por 20,000. Para obtener el número total de células en la suspensión, debemos multiplicar el valor obtenido por el número de ml que conforman la suspensión celular de interés.

Subcultivo celular

- Aspirar medio y lavar el plato con PBS 1X estéril.

- Agregar tripsina 0.05% e incubar máximo 5 minutos a 37 °C. Agregar un volumen de medio con suero para inactivar la tripsina. Disgregar por suspensión.
- Añadir medio basal (sin suplementar) para llevar a un volumen que permita contar las células sin dificultad, por ejemplo, un plato de 35 mm se puede contar fácilmente con 5 ml de volumen.
- Centrifugar durante 5 minutos a 1000-1200 RPM. Mientras tanto contar células.
- Retirar sobrenadante y resuspender en un volumen definido. Tomar el volumen apropiado de medio y número de células de acuerdo al plato en el que se van a sembrar.

Congelar células

- Tripsinizar a las células y contar en la cámara de Neubauer.
- Centrifugar a 1000 RPM por 5 min.
- Resuspender el volumen requerido para obtener una densidad de 5-10 X10⁶ cel /ml.
- Agregar lentamente por la pared o por goteo, 10% de DMSO
- Alicuotar rápidamente en viales de congelación. Agregar 0.5 ml - 1 ml de la suspensión celular por vial. Etiquetar con el nombre de la línea, número de pase, cantidad de células y fecha.
- Transferir los viales de congelación a -70 °C por 24horas y posteriormente almacenar en el tanque de nitrógeno líquido. Nota: Los viales pueden quedarse a -70 °C pero morirán más células con el tiempo en comparación del almacenado en tanque de nitrógeno.

Descongelar células

- Tomar el vial de células requeridas del tanque de nitrógeno líquido o ultracongelador y transferir inmediatamente a un baño de agua de cultivo a 37 °C.

- Esperar a que el vial se descongele (de 1 a 2 minutos) y transferir la suspensión celular a un tubo estéril de 15 ml.
- Agregar 5 ml del medio temperado que lentamente por la pared del tubo. Mezclar por inversión.
- Centrifugar 1000 RPM por 4 minutos.
- Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en el medio y volumen apropiado para contar o sembrar directamente.

Animales

Este estudio usó ratones de las cepas CD1, C57R26, R1B15-GFP (Donada por el Dr. Andras Nagy). Las cruces se pusieron por 12 horas para controlar la fecha de tapón y días de gestación. Las hembras preñadas se sacrificaron por dislocación cervical a los 10.5 ó 12.5 días de gestación según sea el caso. Los animales fueron mantenidos en el bioterio del IBT con libre acceso a comida y agua.

Cultivos primarios

Para hacer las disecciones utilizamos:

- Medio DMEM F12 con HEPES, frío
- Platos de cultivo de distintos tamaños, reciclados (lavar con jabón y esterilizar con etanol 70% y luz UV).
- Hielera grande con mucho hielo
- Material quirúrgico (pinzas, tijeras) previamente esterilizados en etanol al 75% por al menos 30 minutos.

Limpiar muy bien con etanol 75% el área en la que se llevará a cabo el sacrificio. Sacrificar a las hembras preñadas por dislocación cervical. Antes de abrir el vientre hay que rociar muy bien con etanol 75% para evitar contaminaciones.

Sacar el útero con los embriones y colocar en un plato de cultivo de 10 cm. Colocar inmediatamente sobre el hielo. Desechar el cadáver en el lugar correspondiente.

Hay que separar cada embrión y sacarlo cuidadosamente de la placenta. Los embriones de E12.5 en adelante salen por sí mismos. Para los embriones de E10.5 es necesario manipular todo cuidadosamente para que al salir el embrión no se dañe. Colocar los embriones en cajas con medio DMEM-F12 con HEPEs y remover todo el tejido extraembrionario. Pasar el embrión limpio a una caja con medio nuevo para ir lavándolo y no afectar la visibilidad en el microscopio.

Para aislar el mesencéfalo hay que cortar justo por encima de los ojos (flexura cefálica) hasta el istmo y desechar el resto del cuerpo. El mesencéfalo está en medio un poco hacia la región caudal. Remover los restos de telencéfalo y romboencéfalo, nos quedaremos con un pequeño tubo. Abrir el tubo por la región dorsal, quedará en forma de libro abierto. Cortar las regiones dorsales (que ahora son los extremos de nuestro libro) hasta reducir a la mitad de tamaño aproximadamente. Lo que ha quedado es la región ventral del cerebro medio. En embriones de E12.5 días además hay que remover las meninges jalando con cuidado, el tejido que obtenemos debe ser blanquecino ya libre de meninges que tienen tonos más rosados. Este fragmento de tejido hay que pasarlo a un microtubo y mantenerlo en hielo. Cuando terminemos con todos los embriones disgregamos el tejido mecánicamente subiendo y bajando con una micropipeta, primero de 1ml, luego de 200µl. Agregamos medio suficiente para tener un volumen que nos permita contar a las células con facilidad.

Una vez contadas hay que sembrar de la siguiente manera:

- E10.5, sembrar 6×10^5 en platos de 35mm y 1.2×10^6 en platos de 6cm
- E12.5, sembrar 1.5×10^6 en platos de 35mm y 3×10^6 en platos de 6cm

Notas:

- Todos los tejidos y embriones que no estén siendo manipulados deben conservarse en hielo.

- Para mantener una temperatura baja al manipular utilizamos un plato de cultivo más grande con hielo y en este plato colocamos el plato en el que estamos trabajando. Reemplazar por hielo nuevo constantemente.
- Al subcultivar estas células NO utilizar medio con suero para inactivar la tripsina, en su lugar usar al menos 10 volúmenes de DMEM F12 con HEPES para diluir la tripsina (por ejemplo, si se usaron 500µl de tripsina agregar 5ml de medio), centrifugar 5 minutos a 1,000 RPM y aspirar el medio con tripsina diluida.
- No dejar en contacto directo con tripsina más de 5 minutos.

Cuantificación de la tasa de proliferación

Para calcular el número de divisiones celulares por unidad de tiempo utilizamos la siguiente fórmula:

$$N_t = N_0 2^{ft}$$

Donde:

N_t = Número de células en el tiempo t

N_0 = Número de células iniciales

t = tiempo en días

f = frecuencia de ciclos celulares por unidad de tiempo (1/día)

De esta ecuación despejamos f para obtener el número de divisiones por unidad de tiempo

$$f = \frac{\log_2(N_t/N_0)}{t}$$

Estadística

Todas las pruebas estadísticas se hicieron en R. Para las gráficas usamos ggplot2.

Utilizamos la prueba de t de Student no pareada para los datos de división celular.

Consideramos $P < 0.05$ como significativo.

Utilizamos la prueba de Kruskal-Wallis y la de Tukey para analizar los datos de PCR en tiempo real. Consideramos $P < 0.05$ como significativo.

Inmunocitoquímica para precursores neurales de ratón en monocapa

Soluciones para inmunodetección:

PBS (Phosphate buffered saline) 10X:

- Disolver en 800 ml de agua bidestilada:
- 80 gr de NaCl
- 2.4 gr de KCl
- 14.4 gr de Na₂HPO₄
- 2.4 gr de KH₂PO₄
- Ajustar el volumen a 1 L y esterilizar por autoclaveo.
- Tomar el volumen apropiado para preparar la solución 1X con agua bidestilada y autoclavar.

PBT 0.1%:

- 0.1% Tritón X-100 en PBS 1X estéril.

Solución de bloqueo:

- 10% de suero de burro, bovino fetal o cabra en PBT 0.1%

Solución de montaje:

50% v/v: NaHCO₃ 0.1 M pH9, glicerol.

- Sembrar las células en cajas de 24 pozos de la siguiente manera
 - 1X10⁵ células del pase 0 al pase 2. Si son precursores de E12.5 sembrar 2X10⁵ células en el pase 0.
 - 8 X10⁴ células en el pase 3 y 4.
 - 6 X10⁴ células del pase 5 en adelante.
- Cuando el cultivo llegue a confluencia, lavar los pozos con PBS 1X estéril una vez. Agregar PFA 4% suficiente para cubrir el pozo y dejarlo incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Hacer tres lavados de 10 minutos con PBS 1X estéril. Nota: Las células ya fijadas pueden guardarse a 4°C si no se continuará con la inmunodetección en ese momento.

- Lavar 3 veces por 10 minutos con PBT 0.1%. Este paso es para permeabilizar las células.
- **Pasos extra para Sox 2, Sox1:** Incubar con retrieveer a 65°C durante 10 minutos. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos para que se enfrie. Los pozos que no llevan retrieveer ponerles PBS 1X estéril. Nunca colocar pozos secos a 65 °C
- Incubar en solución de bloqueo 20 minutos.
- Incubar a 4 °C con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, dejar al menos 30 minutos a temperatura ambiente:
 - Nestina 1:500 (Millipore, ratón), 48 horas. Reciclar 1 vez. En inmunos de pase 4 en adelante usar anticuerpo nuevo.
 - Tubulina 1:2000 (Covance, conejo), 24 horas. Reciclar 2 veces. 3 horas de incubación son suficientes.
 - Gfap 1:5000 (Dako, conejo), 24 horas. Reciclar 2 veces. 3 horas de incubación son suficientes.
 - Sox2/1 1:100 (Santa Cruz, cabra), 24 horas. Reciclar 1 vez. NO usar suero de cabra para bloquear ni preparar el anticuerpo. Hacer Sox2/1 primero SIEMPRE.
 - Ki67 1:250 (Invitrogen, conejo), 24 horas. Reciclar hasta 5 veces.
- Lavar 3 veces con PBS 1X estéril, 10 minutos cada vez.
- Incubar 1 hora a TA con el anticuerpo secundario diluido en PBS 1X estéril, proteger de la luz con papel aluminio:
 - Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific) 488 anti-ratón, 1:1000.
 - Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific) 488 anti-conejo, 1:1000.
 - Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific) 488 anti-cabra, 1:1000.
 - Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific) 594 anti-ratón, 1:1000.
 - Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific) 594 anti-conejo, 1:1000.
 - Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific) 594 anti-cabra, 1:1000.
 - Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific) 647 anti-ratón, 1:500.
 - Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific) 647 anti-conejo, 1:1000.
 - Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific) 647 anti-cabra, 1:500.

- Lavar 1 vez con PBS 1X, 10 minutos. En el segundo lavado agregar una gota por pozo de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; Invitrogen) 1:5000, 10 minutos. Lavar una última vez con PBS 1X estéril.
- Verificar inmunodetección usando el microscopio de epifluorescencia.
- Tomar fotos o continuar la inmunodetección para analizar dos marcadores. Cuando se hacen dos marcadores verificar que los anticuerpos estén hechos en especies distintas. En caso contrario usar ambos marcadores es posible sólo si pertenecen a diferentes compartimentos celulares, por ejemplo, núcleo y citoplasma.
- Terminada la inmunodetección hay que tomar fotografías, al menos tres fotografías de cada pozo. De preferencia tomar las fotos el mismo día que concluye la inmunodetección. En caso contrario, remover lo mejor posible el PBS de los pozos y adicionar solución de montaje suficiente para cubrir el pozo.

Microscopía de fluorescencia y adquisición de imágenes

Las imágenes fueron capturadas en un microscopio Zeiss Axio Observer.Z1 usando la cámara AxioCamMR3. Usamos el objetivo EC Plan-Neofluar 10X/0.30 y el software AxioVision LE.

Utilizamos los siguiente reflectores:

- 02 Dapi: Excitación G 365 nm; divisor óptico FT 395 nm; emisión LP 420 nm.
- 10 AF 488: Excitación BP 450-490 nm; divisor óptico FT 510 nm; emisión BP 515-565 nm.
- 20 Rhodamine: Excitación BP 546/12 nm; divisor óptico FT 560 nm; emisión BP 575-640 nm.
- 46 Yellow Fluorescent Protein: Excitación BP 500/20 nm; divisor óptico 515 nm; emisión 535-30 nm.
- 50 Cy5: Excitación BP 640/30 nm; divisor óptico FT 660 nm; BP 690/50 nm.

Análisis de imágenes

Para las inmunodetecciones hicimos 3 repeticiones de cada experimento cada uno con un duplicado. Tomamos al menos 4 fotografías por pozo para después contar. Todos los conteos los hicimos en el programa ImageJ. Para cuantificar los núcleos usamos la función Threshold para crear un archivo binario. Ajustamos hasta que la mayoría de los núcleos estén representados. Posteriormente usamos Watershed para crear límites entre los núcleos que están muy juntos.

Para el conteo automático de núcleos usamos la función Analyse Particles, los parámetros usados fueron Size (micron²) = 50-infinity y Show = Outlines. Escogimos estos parámetros para no incluir nada más pequeño que un núcleo y para poder visualizar exactamente que partículas está contando el software. En el caso de campos con núcleos muy aglomerados contamos a mano.

El método anterior se utilizó para todos los marcadores nucleares, Dapi, Sox2 y Sox1.

Para contar el porcentaje de células positivas para el resto de los marcadores contamos a mano, pues dado que son marcadores citoplasmáticos es muy difícil automatizar el proceso. Nestina, Tubulina y Gfap son marcadores muy bien caracterizados, por lo que es sencillo identificar a las células como verdaderas positivas gracias a su morfología.

Para facilitar la tarea de contar usamos el pug-in Cell counter, cuya función es ir marcando a las células que ya contaste y llevar la cuenta por ti. A su vez, permite contar diferentes marcadores pues tiene 8 marcadores distintos. Esto permite contar cada célula una sola vez. Únicamente tomamos como células positivas aquellos núcleos Dapi⁺ rodeados del marcador de interés. Para facilitar el proceso siempre contamos las células en menor proporción, por ejemplo, para contar a las células Nestina⁺ contábamos los núcleos negativos y hacíamos una resta del total para obtener la proporción real. Los datos se almacenaron en tablas para su posterior tabulación.

Diferenciación de ESCs a precursores neurales en monocapa

Para preparar la monocapa de células *feeders* (células alimentadoras mitomizadas):

- Cultivar fibroblastos embrionarios de ratón, si son primarios esperar al menos al pase 2 antes de usar para feeders, llevar a confluencia en cajas de 6 a 10 cm recubiertas con gelatina 0.1%.
- Agregar 80 μ l de mitomicina a 0.5 mg/mL por cada 10 ml de medio. Dejar en la incubadora al menos por 4 horas. Se puede dejar incluso toda la noche.
- Tripsinizar y congelar o sembrar según sea el caso.
- Para cajas de 6 cm utilizar 3×10^5 feeders, sembrar al menos 2 días antes de usar para permitir que los feeders se extiendan sobre la caja.
- Cultivar a las ESCs sobre feeders en medio M10+LIF.
- Una vez alcanzada la confluencia, subcultivar en cajas recubiertas con gelatina y sin feeders con M10+LIF. Las colonias formadas aquí no son tan regulares ni compactas pero las células están bien. Subcultivar sin feeders por al menos 3 pases celulares para que las células se acostumbren a no estar en presencia de feeders.
- Subcultivar en cajas de 6 cm recubiertas con gelatina (al menos 24 horas de recubrimiento en este caso). Dejar secar muy bien la gelatina antes de sembrar. Sembrar 3×10^5 células en medio N2B27 sin factores de crecimiento.
- Cambiar el medio cada dos días. Muchas células mueren, es normal. En el día 4 es posible ver grupos de células creciendo y en el día 6 se hace evidente la presencia de grupos con características de precursores neurales. En el día 6 de la diferenciación empezamos a adicionar Fgf2 al medio de cultivo.
- Subcultivar las células en el día 8 o 10 a cajas recubiertas con ornitina y laminina, usar medio N2B27+Fgf2. De aquí en adelante manipular como precursores neurales.

Extracción ARN y generación de cDNA

Notas: Es muy importante limpiar a profundidad la zona de trabajo, las pipetas, las botellas con los reactivos, las manos y los guantes. De ser posible trabajar en la

campana de PCRs, en caso contrario, es muy importante que el aire acondicionado esté apagado para trabajar en la mesa. De preferencia utilizar puntas nuevas si no se trabaja en la campana. Todos los reactivos a usar deben ser de uso exclusivo para extracciones de ARN.

A. Homogenización

Tejido: Congelar el tejido en hielo seco o nitrógeno líquido. Triturar con mortero y homogenizar con 500 ul de trizol.

Células en monocapa: Remover medio y añadir 500 ul de trizol (caja de 60 mm), usar un *scraper* para despegar células. Transferir a un tubo y congelar en nitrógeno líquido y almacenar a -70 °C si no se va a utilizar en ese momento.

B. Separación de fases

1. Incubar muestras homogenizadas a TA durante 5min para disociar ácidos nucleicos
2. Añadir 100 ul de cloroformo por cada 500 ul de trizol.
3. Agitar por inversión o vortex suave 10-15 s, incubar 3-5min a TA.
4. Centrifugar a 4 °C a 10,000 RPM (8,000-11,000 G), 30 min. Se formarán 3 fases: acuosa, interface y rojiza (trizol). Tomar la fase acuosa sin tomar las demás y transferir a un tubo limpio.

C. Precipitación del ARN

1. Añadir 250 ul de isopropanol a la fase acuosa, mezclar por inversión 15 s. Reposar 2-48 horas a -20 °C (generalmente 24 horas).
2. Centrifugar a 10,000 RPM a 4 °C por 30 min. Se forma pellet.

D. Lavado del ARN

1. Quitar sobrenadante y añadir 500 ul de etanol 75% (con H₂O autoclaveada y filtrada) y vortexear por 5-10 s.
2. Centrifugar a 14,000 RPM a 4 °C por 15 min. No dejar mucho tiempo en etanol pues el ARN se disuelve.

E. Redisolver ARN

1. Remover sobrenadante y dejar secar en campana a TA, no dejar mucho tiempo secando pues se corre el riesgo de que el ARN ya no se disuelva.
2. Redisolver en agua para ARN, usar 5-10 ul dependiendo del tamaño del pellet.

3. A partir de este momento es crucial mantener el ARN en frío, siempre que lo estemos manipulando hay que mantenerlo en hielo. Almacenar a -20 °C para su uso a corto plazo o a -70 °C para largo plazo.

F. Tratamiento con DNAsa

- 5 µl de ARN
- 1 µl de buffer DNAsa 10X
- 0.2 µl DNAsa (Invitrogen, 2 unidades)
- Llevar a 10 µl con H₂O para ARN
- Incubar a 37 °C por 15 min

G. Cuantificación

1. Usar 1µl de ARN para cuantificar en nanodrop. Ajustar concentración a 1 ug/µl.

H. Integridad

- Mezclar 1 vol de muestra (0.5-1 ul) con 3 vols de buffer de urea
- Calentar a 55 °C por 5 min, poner en hielo.
- Correr en gel de agarosa al 2%, 100 volts por 25 min.

I. Verificar ausencia de DNA genómico

1. PCR contra *Th* para distinguir entre mRNA y DNA genómico (genómico 325pb/transcrito 255pb). Usar 0.5-1 ug de ARN y un control con DNA genómico.
2. Correr en gel de agarosa 2%. 100volts, 25 min.

J. Generación de cDNA.

Nota: Es muy importante hacer el gel de integridad poco antes de generar el cDNA para evitar trabajar con ARN degradado. El programa randomp en el termociclador ya incluye todos los pasos para el cDNA.

Para 20 µl:

1. Mezclar:
 - 0.5 ug/1 ug
 - 1 µl Random primer (50 ng/µl) (GeneAIIa)
 - 1 µl DNTPs (10 mM)
 - Ajustar con agua a 15.5 µl
2. Incubar a 65 °C por 5 min
3. Agregar:

- 2 µl de buffer 10X
- 2 µl de DTT 0.1M
- 0.5 µl de HyperScript (GeneAll)

4. Incubar 5 min a 25 °C. Incubar a 60 min a 55 °C. Incubar a 85 °C durante 5 min.

K. Verificar cDNA.

-Hacer un PCR contra *ciclofilina*, *Rplp0* o algún gene constitutivo para verificar que el cDNA se generó correctamente. Hacer también un PCR contra *TH* para verificar que no haya DNA genómico.

PCR cuantitativo en tiempo real

Curva estándar para gene de referencia

Una vez verificado que el cDNA se generó correctamente (PCR contra *Rplp0* u otro *house keeping*) y que no tiene DNA genómico (PCR contra *TH*), al cDNA restante agregar 3 volúmenes de agua, por ejemplo, a 18 µl de cDNA agregar 54 µl de H₂O miliQ estéril.

Con el cDNA ya diluido se hacen dos nuevas diluciones,

- 1:10 , se toma 1 µl del cDNA total y se lleva a 10 µl de H₂O, vortexear muy bien
- 1:100, tomando 1 µl de la dilución anterior se lleva a 10 µl de H₂O, vortexear muy bien

Reacciones de PCR para la curva estándar 10 µl en tubos pequeños (los que vienen de 4 en 4). Hacer cada muestra por duplicado.

- 0.8 µl mix oligonucleótidos (2.5 µM)
- 2.2 µl H₂O
- 5 µl MasterMix Kappa
- 2 µl cDNA o dilución

Para las reacciones de PCR utilizamos el sistema Rotor-Gene Q 2plex HRM Platform. Los parámetros utilizados en el PCR fueron
Activación inicial a 95 °C

- 40 ciclos de:
- 95 °C 15 segundos
- 60 °C 20 segundo
- 72 °C 20 segundos

Dejar correr el PCR y al finalizar verificar que los duplicados sobrelapen lo mejor posible (no más de un ciclo de diferencia) y que las muestras correspondientes a la misma curva estándar estén separadas una de otra a una distancia similar.

Los valores de los parámetros deben ser:

- $R^2 \sim 0.99$
- Eficiencia 0.9 a 1.1

Al analizar el melting debe haber un solo pico, de lo contrario sospechar de la presencia de DNA genómico. El programa calcula el *Threshold*, este valor debe guardarse como referencia para analizar otros genes en las mismas muestras.

Determinación de la expresión relativa

Para calcular la expresión relativa de los genes de interés con respecto al gen referencia se utilizó el método de ΔCT con la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta CT}$$

Donde ΔCT se calcula de la siguiente manera

$$\Delta CT = ((CT \text{ gene de interés}) - (CT \text{ gen referencia}))$$

Manipulación de DNA

Extracción DNA plasmídico

- De placas de agar-LB Amp (200 µg/ml) picar colonias y reestriar con un asa estéril. Una vez crecidas, tomar una pequeña asa para inocular 3ml de medio LBamp y dejar crecer toda la noche a 37 °C y 300 RPM.
- Al día siguiente, centrifugar a 12 000 RPM por 1 minuto y quitar el sobrenadante por decantación. Resuspender la pastilla formada en 250 µL de solución P1 (50 M de TRIS-HCl pH8, 10 Mm de EDTA y 100 µL/mL de ARNasa). Después, agregar 250 µl de buffer de lisis P2 (0.2 N de NaOH y 1 % de SDS, preparar al momento) mezclar por inversión hasta obtener una solución translúcida, dejar incubando a TA, no exceder 3min.
- Agregar 250 µL de solución P3 (Acetato de potasio 5M, ácido acético 96 %, agua, pH 5.5 ajustado con ácido acético, guardar a 4°C) y mezclar por inversión e incubamos 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12 000 RPM por 10 minutos. Tomar del sobrenadante 600 µL y se colocar en un tubo nuevo. Adicionar 500 µL de isopropanol al 100%, mezclamos por inversión e incubamos por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar por 10 minutos a 13000 RPM y decantar el sobrenadante. Agregar etanol frio al 70% (0.5 ml) mezclando por inversión hasta despegar la pastilla, centrifugar a 13000 RPM por un minuto, decantar el sobrenadante y secar a temperatura ambiente para luego resuspender el precipitado en 15 µL de agua estéril y libre de endonucleasas, por último cuantificar la cantidad de DNA.

PCR punto final

FastStart Taq DNA polymerase, Roche

- Enzima 0.06µl
- Buffer 10X 1.5µl
- MgCl 25mM 1µl
- Mix oligos 10µM 0.6µl
- DNTPs 10µM 0.3µl
- DNA 1µl

- H₂O completar a 15µl

Para amplificar el gene Dll1, utilizamos como blanco cDNA de mesencéfalo ventral de embriones de E11.5.

Digestiones

Los productos de PCR se digirieron con las enzimas BamHI y XhoI (NEB) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se purificaron usando el estuche comercial de Qiagen.

Ligaciones

- Digerir vector y fragmento con las enzimas apropiadas y purificar ambas.
- En un volumen a lo más de 10µl, añadir 200ng de DNA en una relación inserto-vector 5:1. Añadir buffer de ligación 10X y 0.5µl ligasa T4.
- Dejar incubando toda la noche a temperatura ambiente.

Secuenciación

Se mandaron a secuencias los vectores purificados usando el kit comercial de Qiagen para miniprep. La secuenciación se hizo en la unidad de secuenciación del IBT. Dado que la secuenciación arroja datos confiables hasta 600pb y el fragmento correspondiente a Dll1 es de 2216pb utilizamos varios oligonucleótidos para poder secuenciar todo el gen. (Ver tabla de oligonucleótidos)

Transformación de bacterias

1. Mezclar 5 ng de DNA con una alícuota de células competentes DH10B (500 ml)
2. Incubar 30 min en hielo, encender termo bloque a 42°C
3. Incubar para choque térmico a 42 °C 40 s
4. Incubar 2 min en hielo
5. Adicionar 500 ml de medio LB
6. Incubar con agitación suave a 37°C durante 1 hora para que las bacterias se recuperen

7. Centrifugar a 3000 RPM de 2-5 min para bajar las bacterias. Retirar 650 ml y resuspender el pellet en los otros 350 ml.
8. Plaquear en cajas con LB-Ampicilina (200 mg/ml), 100 μ l y 200 ml. Y dejar toda la noche a 37 °C para observar al día siguiente colonias.

Electroporación

Es necesario tener mínimo 500,000 células (STO) por cada electroporación (cada celdilla de 0.2mm se colocan 500,000 células).

- Tripsinizar y contar las STO.
- Mientras se hace lo anterior, colocar 100 μ l de la solución BTX o MIRUS de electroporación en tubos eppendorf, esto es porque el proveedor recomienda utilizar la mezcla BTX atemperada y no fría, (tampoco caliente).
- Añadir 5 μ g de DNA a la solución usando el siguiente criterio: relación 1:100 transposasa-transposón y mezclar suave. Evitar hacer burbujas. Es recomendable que el DNA a utilizar este a una concentración de 1-1.5 μ g/ μ l.
- Colocar el volumen correspondiente a 500,000 – 550,000 células en tubos eppendorf de 1.5 ml y centrifugar las células a 2,500 RPM en una microcentrífuga.
- Resuspender suavemente pero bien el pellet en la solución de electroporación evitando hacer burbujas.
- Con una pipeta de 200 μ l transferir el contenido a una celda (puede utilizarse el dispensador que viene junto con la celdilla).
- Llevar al electroporador (ECM 830 harvard apparatus de onda cuadrada). Las configuraciones a utilizar son 1 pulso de 170 V de 20 milisegundos.
- Inmediatamente transferir el contenido de la celda utilizando el dispensador a un tubo eppendorf (evitar hacer burbujas) y centrifuga el tubo a 12,000 RPM durante 45 segundos en una microcentrífuga, a continuación, quitar el sobrenadante y añadir 100 μ l de medio M10 con suero 2x; resuspender el pellet en el medio y colocar en la incubadora por 20 minutos.
- Añadir una cantidad de 300-500 μ l de medio a la celdilla y transferir el volumen a la caja donde se sembrarán las células (esto es para recuperar

las células que se hayan quedado). Si se reutilizará la celdilla, aspirar todo el medio, lavar con agua destilada y aspirar de nuevo.

- Nota: Es aconsejable hacer una electroporación a la vez, porque las células no pueden pasar mucho tiempo en la solución de electroporación una vez dado el pulso.
- Después de los 20 minutos, resuspender el pellet y colocar en la cajita de cultivo. Utilizar medio M10 con suero 2x (únicamente en este paso), e incubar las células en este medio hasta el día siguiente.
- Al día siguiente cambiar medio para eliminar las células muertas.
- A las 48 horas de transfección, cuantificar mediante fluorescencia la eficiencia de electroporación: Tomar alrededor de 10 fotografías en objetivo 10X, determinar la relación Venus(+) y no transfectadas.
- A las 48 horas añadir purimicina a 1mg/ml de medio por 24 horas para seleccionar las células que hayan sido transfectadas con ambos vectores. No dejar más tiempo para evitar la integración de la transposasa.

Nota: Bajo este protocolo se obtiene en promedio 32% de células Venus+ después del tratamiento con puromicina por 24 horas.

Lipotransfección de ESCs en suspensión

Desde este momento es importante mantener a las ESCs en medio con suero de ESCs puesto que usaremos las células transfectadas para generar quimeras.

- Descongelar un vial de células W9.5 WT y sembrar en caja de 6 cm con capa de feeders, M15 (con suero de ESCs) y LIF. Dejar que las células lleguen a confluencia.
- Tripsinizar las células y resuspender 1×10^6 células en 900 μ l OptiMEM.
- Preparar los complejos de DNA y lipofectamina de la siguiente manera:
 - Complejo DNA: 5 μ g de DNA, relación transposasa-transposón 1:100 (está relación fue la mejor). Agregar 10 μ l de P3000 y completar a 50 μ l con OptiMEM.

IMPORTANTE: Dejar reposar 20 minutos antes de usar.

- Complejo lipofectamina: 10µl de lipofectamina 3000 y 40 µl de OptiMEM. Incubar 5 minutos antes de usar.
- Mezclar ambos complejos durante 10 minutos.
- Añadir la mezcla de complejos a la suspensión de células, incubar en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas (se realiza en crioviales).
- Sembrar células en caja de 10 cm, en medio con suero ESC y LIF, dejar 24 horas.
- Tratar con puromicina (1 µg/ml) durante 48 horas, con recambio de medio diario, esto para seleccionar las células que lleven el vector con la transposasa.
- Posterior al tratamiento con puromicina hay que dejar crecer a las colonias de un tamaño que permita picarlas con facilidad.

Para picar colonias:

- Picar mecánicamente y sembrar una colonia por pozo en cajas de 96 pozos con *feeders*, suero ESC (medio M15) y LIF. Se seleccionarán las mejores colonias (morfología típica de ESCs, colonias en forma de domo, refringentes, con bordes lisos y definidos) y expresión alta de Venus mediante fluorescencia). Debe hacerse en las condiciones más asépticas posibles.
- Tener lista caja de 96 pozos con *feeders* y medio de cultivo para ESC + LIF.
- Preparar caja de 96 pozos con 40 µl de tripsina/EDTA 0.25% atemperada, un pocillo por cada colonia a picar.
- Aspirar el medio de cultivo, lavar con PBS 1X 2 veces, y dejar un volumen pequeño de PBS que cubra la superficie de la caja.
- Se puede realizar sin necesidad de microscopio, pero para mejor precisión (aunque más lento), se puede realizar utilizando el objetivo 4x.
- Picar colonia utilizando punta amarilla. ¡Procurar no tomar más de 5 µl de volumen! (ajustar pipeta a 5 µl, si se toma más volumen, diluirá la tripsina). ¡Es muy importante por cuestiones de viabilidad y contaminación hacerlo lo más rápido posible, se deben picar mínimo 15-30 colonias diferentes, no demorar más de 10 minutos!

- Incubar colonias a 37°C por 5 minutos, sembrar la colonia en la caja, distribuir.
- El resto de colonias que queden en la caja, hay que tripsinizar y congelar este pool por si acaso.
- Al crecer las colonias al tamaño óptimo, pasar a caja de volumen mayor (de 96 pozos a 24 pozos y de 24 pozos a 12 pozos). No contar las células hasta que estén en cajas de 12 pozos.

RESULTADOS

Cinética de disminución del potencial neurogénico *in vitro* de CTNs de mesencéfalo de E10.5

Análisis de las divisiones celulares y morfología celular

Para analizar los cambios de morfología, expresión génica y potencial de diferenciación realizamos cultivos primarios del mesencéfalo ventral de embriones de ratón de E10.5 y E12.5. Las células se cultivaron hasta por 5 pases celulares (aproximadamente 25 días) en medio para precursores neurales con la adición del mitógeno Fgf2 a 10ng/ml (ver métodos). En cada pase celular cuantificamos la cantidad inicial y final de células para determinar qué ocurre con la capacidad de duplicación de estas células a lo largo del tiempo. Realizamos 9 experimentos independientes para los cultivos de E10.5 y cuantificamos el número de divisiones celulares por día a lo largo de 5 pases celulares. Los datos muestran que, en función del tiempo, el número de divisiones por día disminuye en cultivos de E10.5. En el pase 0 (primeros 3 días de cultivo) las células presentan mayor proliferación en comparación con el resto de los pases, esta diferencia es estadísticamente significativa. Conforme el cultivo avanza en el tiempo y las células son subcultivadas, la tasa de división cae a pesar de alcanzar la confluencia celular (figura 10A).

En contraste, en los cultivos de E12.5 la tasa de división no se modifica de forma significativa (figura 10B). La única diferencia notoria es en el pase 0, donde la tasa de división es la menor de todas; a las células les toma entre 5 y 7 días llegar a confluencia en lugar de 3 ó 4 días que le toma a los cultivos de E10.5; esto se debe a que algunas células que inician el cultivo tienen una menor capacidad de división ya que en esta etapa hay una mayor proporción de células posmitóticas. Los resultados obtenidos para los cultivos de E12.5 concuerdan con lo reportado en la literatura para cultivos de la misma etapa embrionaria (Sun et al. 2011).

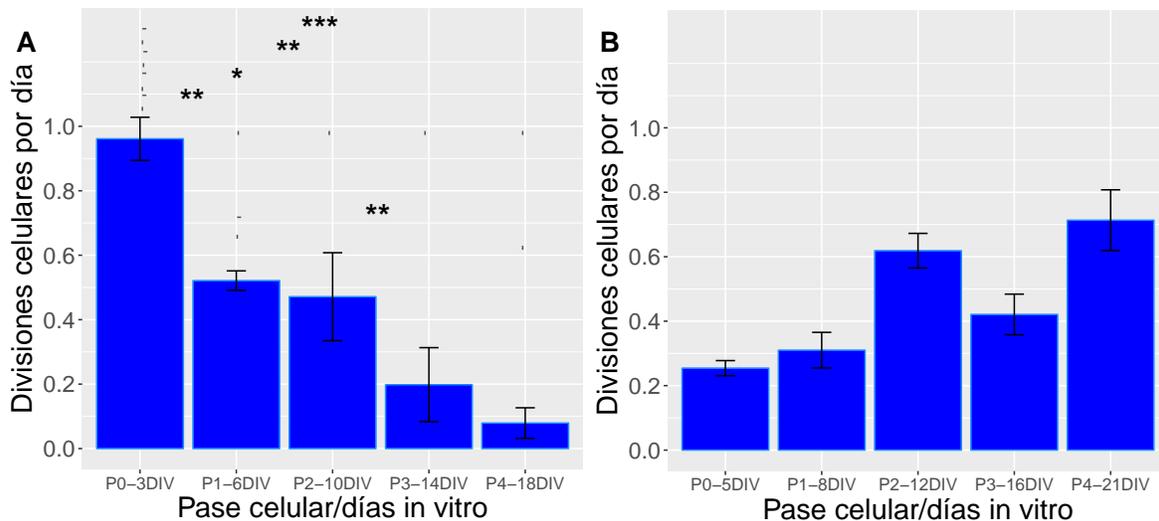


Figura 10 Divisiones celulares por día en cultivos de PNs de E10.5 y E12.5. A) Las células de E10.5 pierden capacidad proliferativa desde el primer pase, observamos el cambio más brusco en los pases finales. B) Los cultivos con PN de E12.5 no presentan cambios significativos en la tasa de división a lo largo del tiempo. Media \pm error estándar. p-value<0.05, **p-value<0.01, ***p-value<0.001

Un marcador muy utilizado para identificar células con un ciclo celular activo es Ki67, proteína que está presente en las fases activas del ciclo celular (G1,S,G2 y mitosis) y ausente en las fases inactivas (G0), por lo que es un excelente indicador de la fracción de células en división en una población determinada (Scholzen & Gerdes 2000). Con inmunodetecciones contra Ki67 podemos conocer el porcentaje de células que contribuyen al aumento de la población en los cultivos de PNs a lo largo de diferentes pases celulares. En la figura 11A observamos que en los cultivos de E10.5 el porcentaje de células Ki67⁺ se mantiene siempre por encima del 50% y sin cambios significativos. Esto sugiere que las células no están dejando de proliferar sino que, más bien, el ciclo celular de estas podría estarse alargando. Por otro lado en la figura 11B, los cultivos de 12.5 empiezan con un porcentaje bajo de células Ki67⁺, probablemente reflejo de que en esta etapa del cultivo encontramos más células diferenciadas. En los siguientes pases celulares el porcentaje aumenta, pues aquellas células que no se dividen se pierden con los pases celulares (figura 11B). En general, podemos decir que el porcentaje de células con un ciclo celular activo no cambia de forma notoria a lo largo del tiempo para ninguna de las etapas evaluadas.

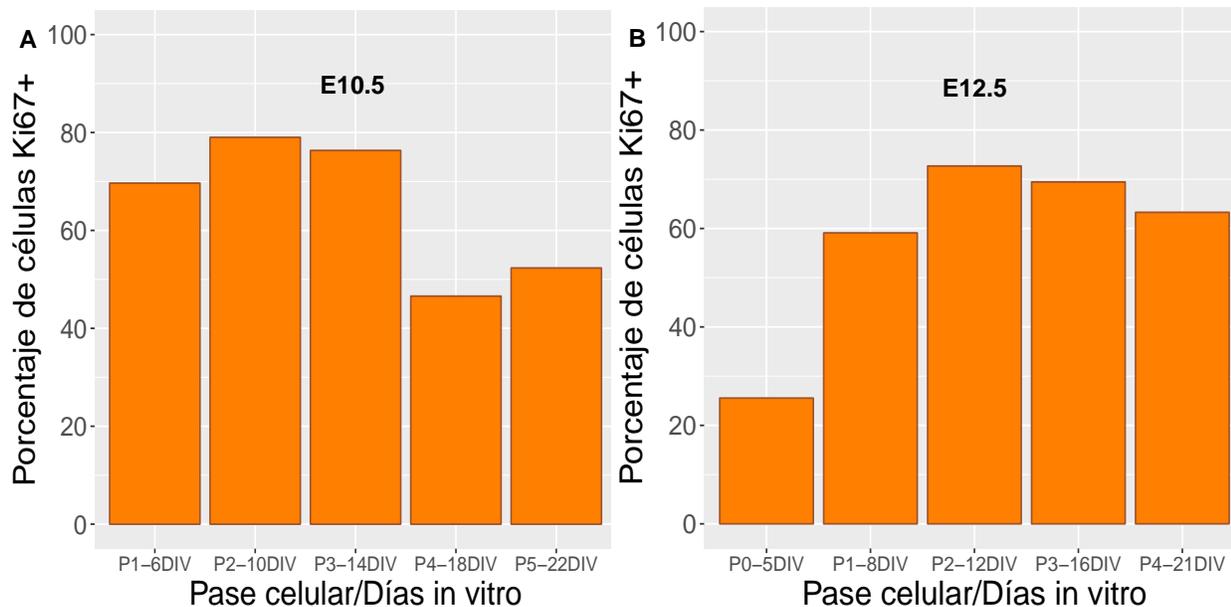


Figura 11: Porcentaje de células Ki67+ en cultivos de PN de E10.5 y E12.5. A) El porcentaje de células Ki67⁺ no cambia significativamente en cultivos de E10.5. B) El porcentaje inicial cambia debido a que en esta etapa el cultivo inicia con un número mayor de células completamente diferenciadas. A partir del pase 1 el porcentaje se normaliza y no cambia a lo largo del tiempo.

La morfología celular se documentó a lo largo del cultivo tomando fotografías en campo claro. En estas es posible observar que la morfología de las células cambia con el tiempo (figuras 12 y 13). En ambos cultivos durante los primeros pases, las células son pequeñas y en ocasiones se agrupan en estructuras llamadas rosetas neurales –arreglos radiales de células que expresan muchas de las proteínas presentes en células neuroepiteliales del tubo neural (Wilson & Stice 2006). A partir del pase 1 es posible notar un cambio en las células, estas se ven un poco más grandes con respecto al pase 0 pero aún tienen características que semejan a CTNs, por ejemplo, en algunos casos es posible observar la formación de rosetas aunque poco definidas. Es en el pase 3 cuando las células pierden su parecido a las células que iniciaron el cultivo. Las células de este pase son mucho más grandes y se observa una mayor cantidad de células con prolongaciones membranales pronunciadas. El aumento de tamaño de las células se ve reflejado también en el hecho de que las cajas terminan con menos células en comparación con los primeros pases. A partir del pase 3 (9 días en cultivo) las células cambian completamente, se extienden más en la caja, se dividen menos y su morfología recuerda más a astrocitos que a CTNs.

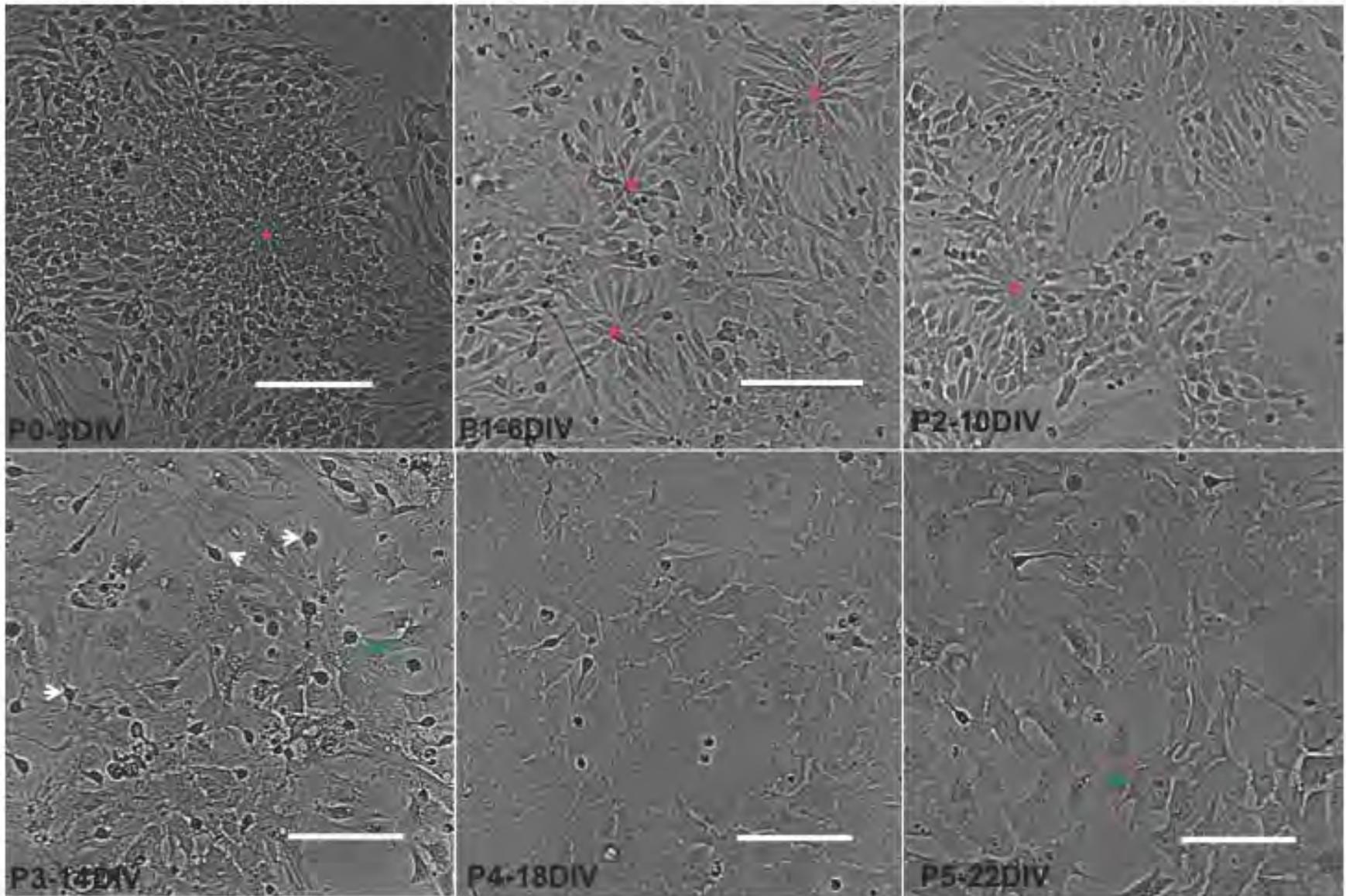


Figura 12: Cultivos de E10.5. Las células cambian su morfología con el tiempo en cultivo. Del P0 al P2 observamos la formación de rosetas neurales o estructuras similares (centro señalado con un asterisco rojo). A partir del P3 el tamaño de las células aumenta y también sus proyecciones membranales, las flechas blancas señalan células con morfología neuronal y las verdes con morfología similar a astrocitos. Barra de escala representa 100 μm .

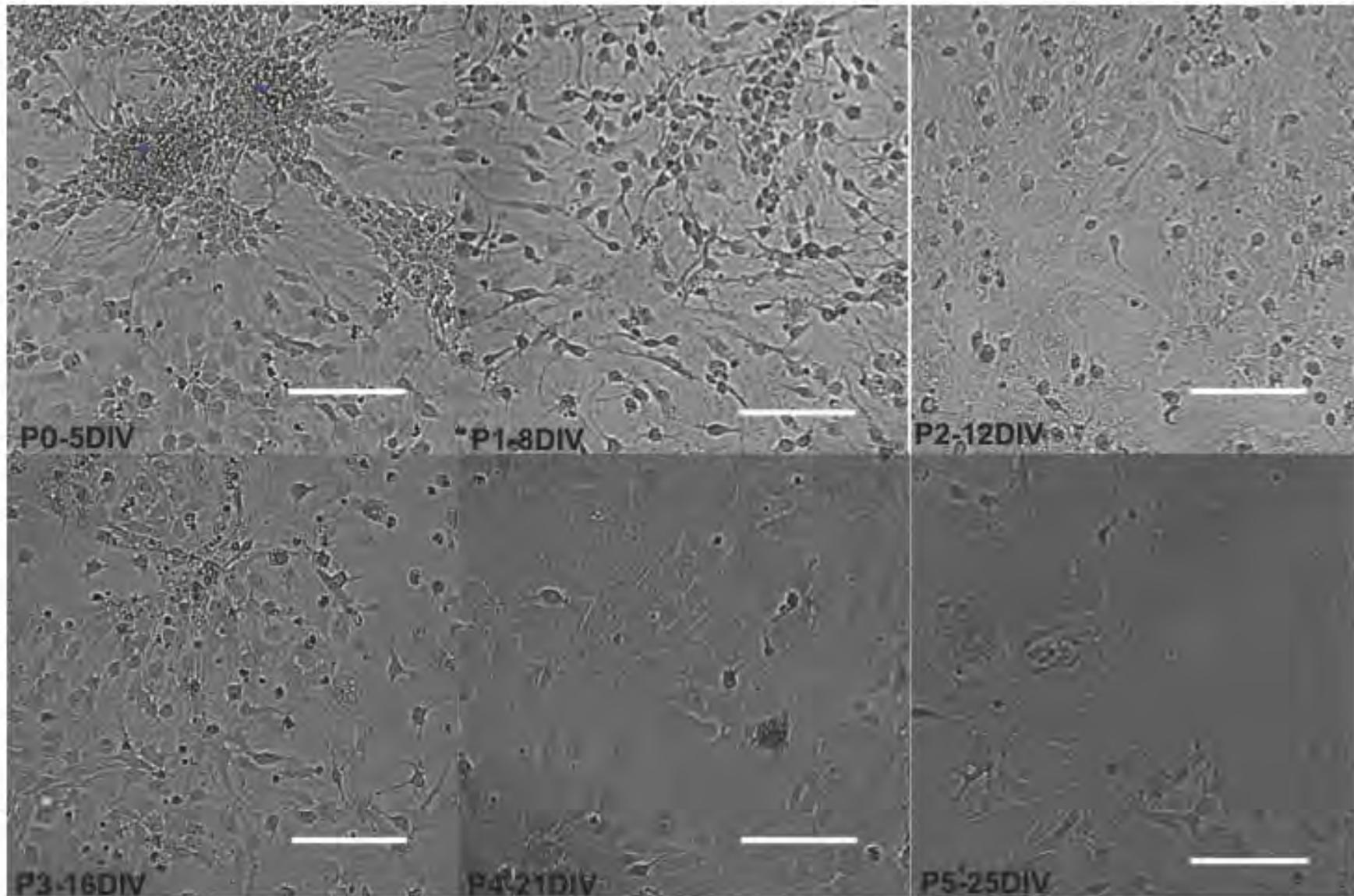


Figura 13 Cultivos de E12.5. Las células en cultivos de PNs de E12.5 cambian su morfología con el tiempo en cultivo. En el pase 0 cultivo es heterogéneo debido a la etapa en la que se toman las células, sin embargo observamos la formación de estructuras radiales similares a las rosetas neurales (asteriscos azules). En el pase1 aún observamos bastantes células con morfología neuronal, a partir del pase 2 tamaño de las células aumenta y también sus proyecciones membranales. Barra de escala representa 100 μm .

Análisis de inmunorreactividad de marcadores neurales en cultivos de CTNs del mesencéfalo embrionario.

Para apreciar un panorama más completo es necesario conocer cómo cambia la expresión de distintos marcadores a lo largo del tiempo. Por inmunocitoquímica analizamos marcadores considerados específicos de CTNs, neuronas inmaduras y astrocitos. Esto nos permitió estimar el cambio del potencial de diferenciación de las células cultivadas.

Nestina es una proteína que pertenece al grupo de filamentos intermediarios tipo IV que marca a las CTNs (Götz & Huttner 2005) por lo que, actualmente es uno de los marcadores más utilizados para distinguir a estas células. Sox2 es un factor de transcripción expresado durante las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso y que juega un papel importante en el mantenimiento de las CTNs (Feng et al. 2013), por lo que al igual que Nestina es utilizado como marcador de CTNs. Con inmunocitoquímicas contra ambos marcadores observamos que una proporción muy alta de las células de E10.5 son positivas para ambos marcadores (figura 14 segunda columna). Lmx1a es un factor de transcripción característico de los precursores mDA (Ono et al. 2007) por lo que se le considera marcador de estos en sus diferentes etapas. Tanto por la etapa como por la región, las células de E10.5 deberían ser Lmx1a⁺, al menos durante los primeros días *in vitro*, se sabe que los precursores dopaminérgicos se dividen poco en cultivo (Smidt & Burbach 2007). A los 3DIV observamos parches de células Lmx1a⁺ (figura 14 primera columna) que va de acuerdo a lo esperado pues la disección de la región ventral incluye otros dominios además del dopaminérgico y por lo tanto trabajamos con una población heterogénea.

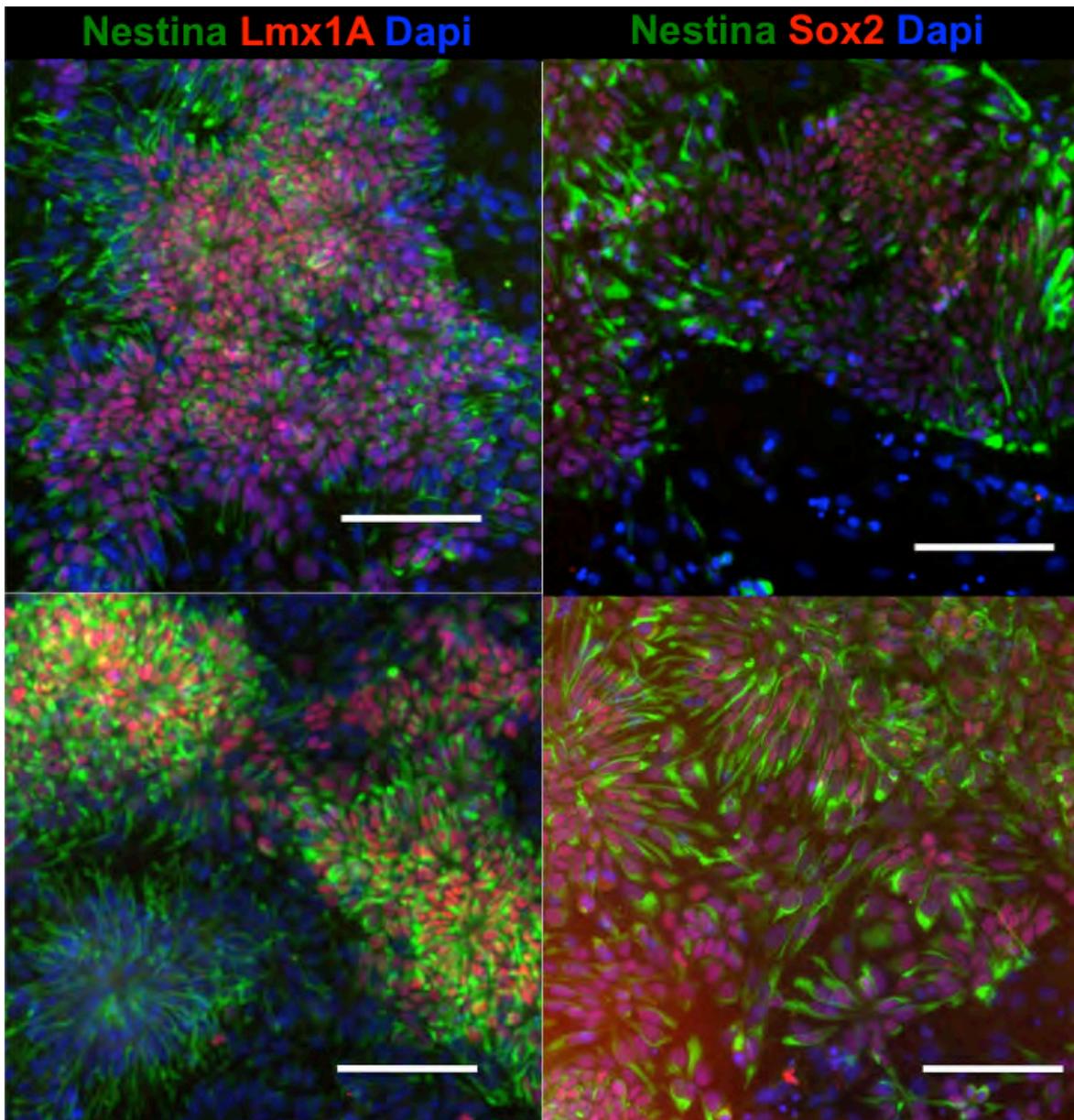


Figura 14: Cultivo de precursores dopaminérgicos. Los cultivos de E10.5 están enriquecidos con células positivas para Nestina y Sox2 lo que indica que son CTNs. Por la región de la disección, observamos además parches de células Lmx1a⁺.

Las CTNs diferencian a neuronas inmaduras posmitóticas que posteriormente migrarán a su destino final en el sistema nervioso y se integrarán a la red neuronal. Para analizar la producción neuronal, hicimos inmunodetecciones contra β III-Tubulina, una proteína de la familia de tubulina. Las tubulinas son un componente fundamental de los microtúbulos, que son elementos estructurales del citoesqueleto y se les atribuyen funciones en el mantenimiento de la estructura celular, la mitosis, la meiosis y el transporte intracelular, entre otros (Brouhard &

Rice 2018). β III-tubulina se encuentra casi exclusivamente en neuronas y se asocia al proceso de diferenciación hacia todos los tipos neuronales. Es posible detectar β III-Tubulina en los cuerpos celulares, las dendritas, los axones y las terminaciones axonales de las neuronas inmaduras (Lee et al. 1990). En la figura 15 observamos que en los cultivos de E10.5 durante los primeros pases, las células β III-Tubulina forman una parte importante del cultivo. En función del pase observamos que la proporción de células β III-Tubulina⁺ disminuye, y en los pases más tardíos la presencia de estas células es mínima. Esto indica que la producción de neuronas está limitada a una fase del cultivo celular.

Sin lugar a dudas, uno de los marcadores astrogiales más utilizados es Gfap, una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de células gliales como los astrocitos. En etapas tardías del desarrollo del sistema nervioso y en el cerebro adulto observamos la expresión de *Gfap*, su presencia en cultivos de CTNs, incluso en etapas tempranas es un indicativo de adquisición de un fenotipo glial (Eng 1985). Una observación reportada varias veces en la literatura es que las CTNs en cultivo empiezan a generar astrocitos conforme pasa el tiempo *in vitro* (Hegarty et al. 2014; Sun et al. 2011; Anderson et al. 2007; Chung et al. 2006). Para corroborar esto, hicimos inmunodetecciones contra Nestina y Gfap. En los cultivos de E10.5 no observamos células Gfap positivas del pase 0 al pase 2. Fue en el pase 3 donde estas células empezaron a surgir (figura 16), y en la mayoría de los casos fueron positivas también para Nestina, lo que indica que son células precursoras de astrocitos. En esta etapa las células no son astrogénicas y además son poco permeables a las señales que inducen astrogénesis (Guerrero-Flores et al. 2017a), por lo que no es de extrañar que durante los primeros pases no existan células Gfap⁺. La presencia de estas células en pases tardíos, indica que las células cambian de potencial.

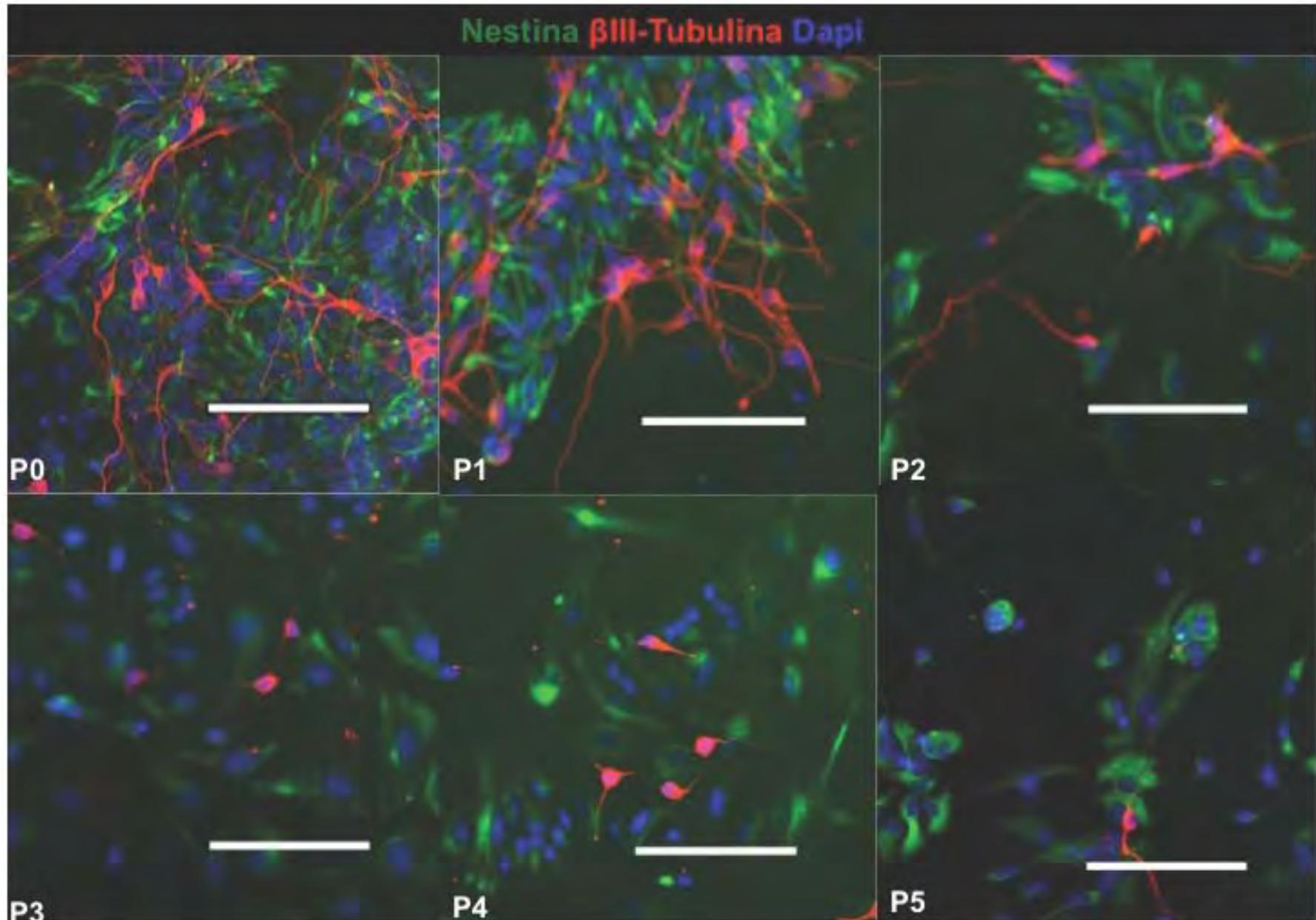


Figura 15: La producción de neuronas cae con el tiempo en cultivos de E10.5. Nestina (verde), III Tubulina (rojo) y núcleos (azul).El número de neuronas disminuye con el tiempo en cultivo. La barra representa 100 μ m.

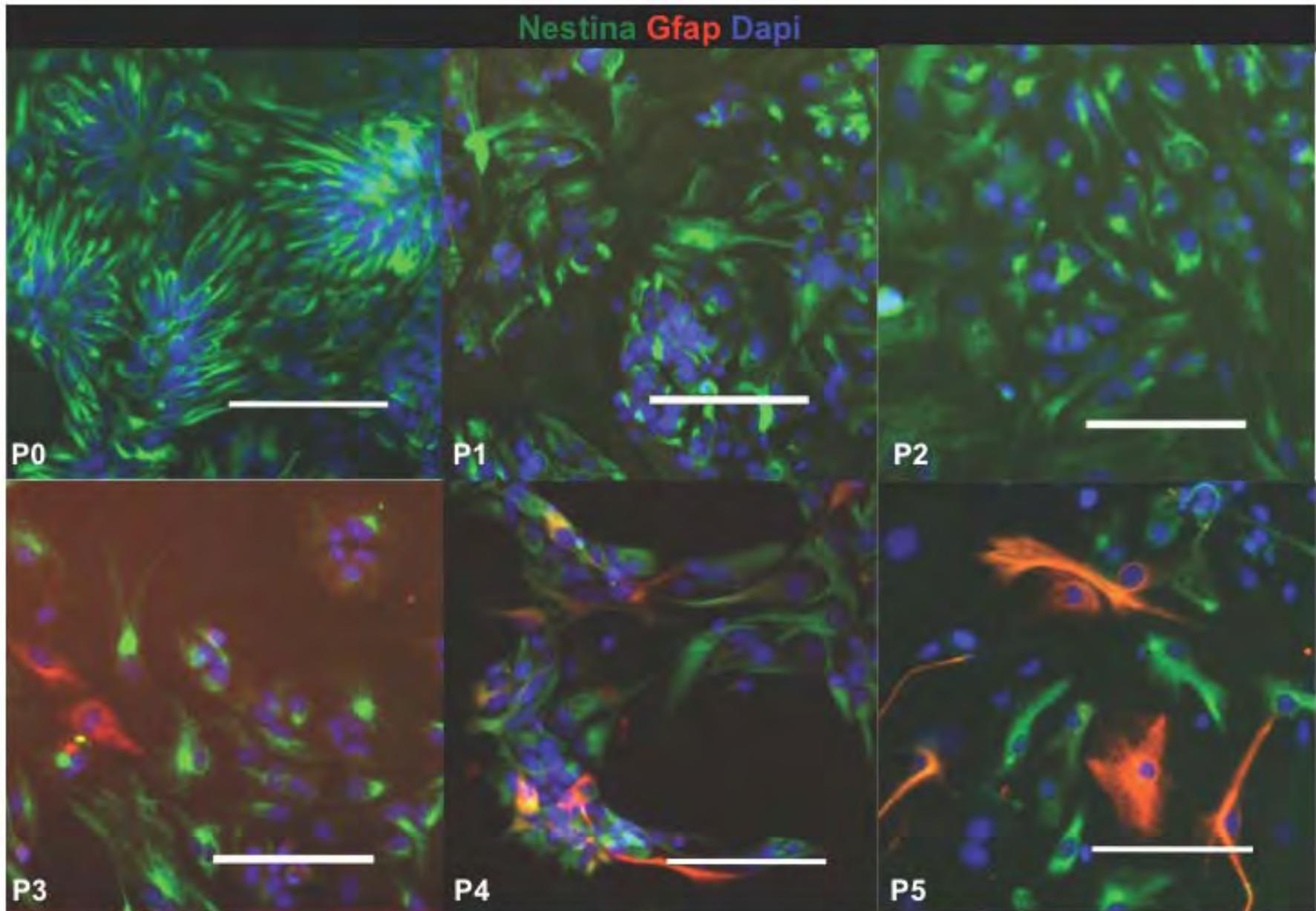


Figura 16: Inmunodetección Nestina/Gfap E10.5. Nestina (verde), GFAP (rojo) y núcleos (azul). Las células Gfap+ aparecen a partir del pase 3. La barra representa 100 μ m.

Con las inmunodetecciones mostradas, cuantificamos el número de células positivas para cada marcador en distintos pases celulares. Los datos obtenidos están representados en la gráfica de la figura 17. A lo largo de los pases celulares la proporción de células β III-Tubulina⁺ disminuyó, mientras que la proporción de células Gfap⁺ aumentó. La producción de neuronas (células β III-tubulina⁺) cayó casi 50% del pase 0 al pase 3 (17.2% y 9.6% respectivamente), lo que sugiere que las CTNs pierden su capacidad de diferenciar hacia el linaje neuronal en función del tiempo en cultivo. Las células Gfap⁺ fueron indetectables antes del pase 3 y constituyeron hasta el 5% del cultivo siendo en su mayoría Nestina⁺, indicando que son precursores de astrocitos. Esto indica que el cultivo ganó capacidad de generar astrocitos con el tiempo en cultivo. Las células marcadas como “otras” corresponden a células negativas a todos los marcadores.

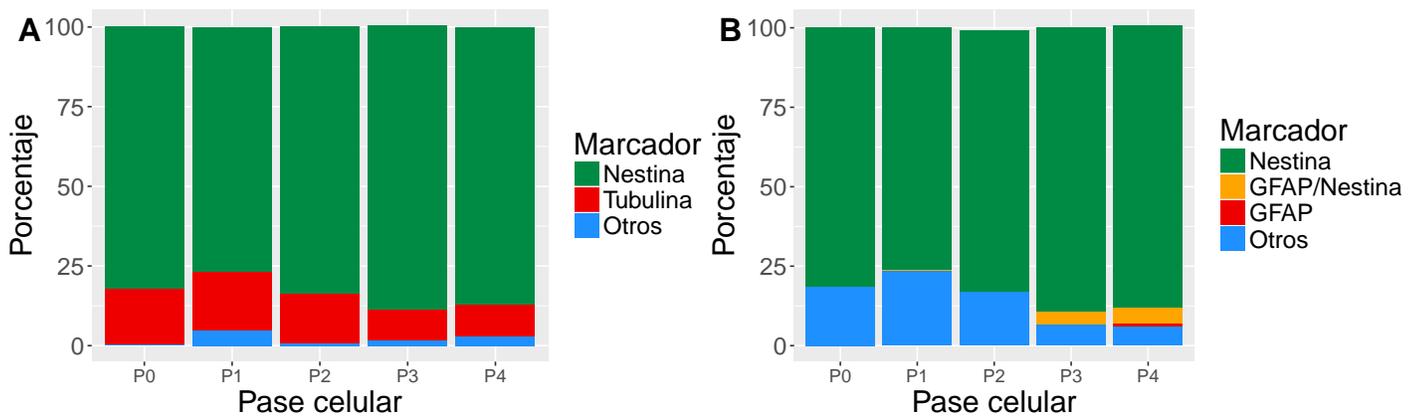


Figura 1: Proporción de astrocitos y neuronas en cultivos de 10.5. A) El porcentaje de células Nestina⁺ se mantiene constante, mientras que el porcentaje de células β IIITubulina⁺ disminuye un 44% del pase 0 a pase 3. B) En el pase 3 aparecen células Gfap⁺ y en el pase 4 conforman el 5% de las células. La mayoría de las células Gfap⁺ son también Nestina⁺.

En los cultivos de E12.5 ocurrió un fenómeno similar al observado en cultivos de E10.5. Durante los primeros pases, la cantidad de células β III-Tubulina fue alta comparada con los pases tardíos (figura 18, primera fila), indicando que la capacidad neurogénica del cultivo disminuye. Por otro lado, la producción de células Gfap⁺ aumentó, aunque hay que considerar que podemos encontrar células Gfap⁺ desde el pase 1 (figura 18). Esto nos dice que el cultivo empieza con capacidad astrogénica basal a diferencia de los cultivos de E10.5.

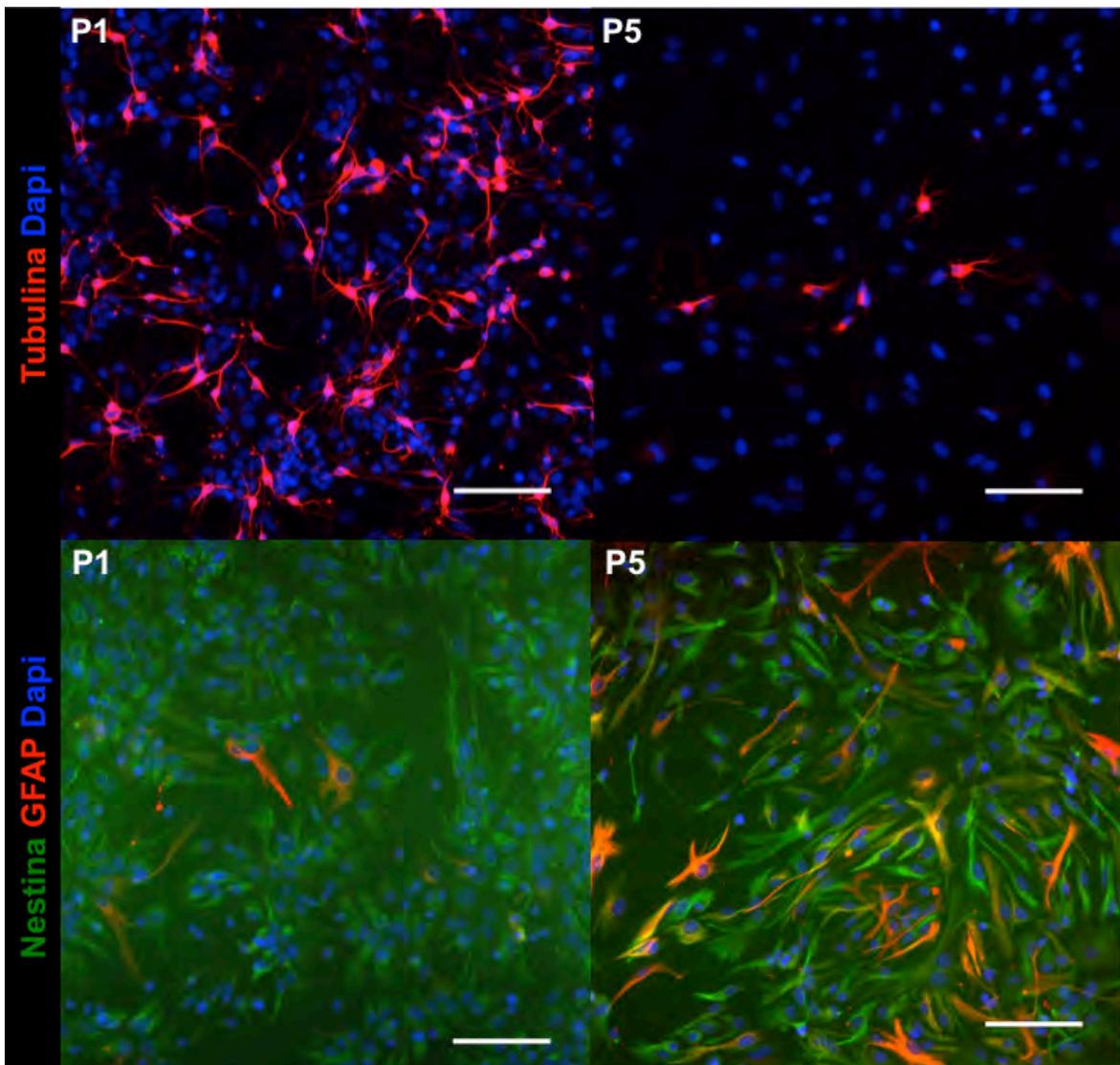


Figura 18: Inmunodetecciones en cultivos de PNs de E12.5. Observamos células β III Tubulina⁺ en una proporción alta en los primeros pases, esta cae dramáticamente en pases tardíos. En el caso de Gfap, pudimos observar que desde el pase 1 ya existen algunas células Gfap⁺, muchas de ellas son también Nestina+, lo que indica que son precursores astrogénicos. La proporción de células Gfap⁺ aumenta visiblemente con el tiempo. La barra representa 100 μ m.

Análisis de expresión de marcadores en cultivos de CTNs por PCR

cuantitativo en tiempo real.

Marcadores de precursores neurales

Las CTNs pueden identificarse por un conjunto de marcadores, entre los más comunes se encuentran Sox1/Sox2 y Nestina. El factor de transcripción Sox1

es el marcador conocido más temprano y más específico para los precursores neurales de mamíferos. Durante el desarrollo, Sox1 se expresa en células en proliferación en casi todo el SNC (Aubert et al. 2003). Las células provenientes de la placa del piso del cerebro medio no expresan Sox1 pero sí Sox2. A lo largo de la evolución de los vertebrados, Sox2 marca el sistema nervioso desde sus primeras etapas de desarrollo y, en él, a las células más indiferenciadas (Pevny & Nicolis 2010). Por su parte, Nestina es una proteína de filamentos intermedarios expresada en células en división durante las primeras etapas de desarrollo en el SNC, en tejidos musculares y otros. Tras la diferenciación, Nestina es reemplazada por filamentos intermedarios tejido específicos (Michalczyk & Ziman 2005). En conjunto, el análisis de expresión de estos marcadores puede indicarnos como cambia la plasticidad de los precursores neurales del nicho dopaminérgico a lo largo del tiempo. Tomamos 3 cultivos celulares independientes de la etapa E10.5, y por medio de PCR cuantitativo en tiempo real analizamos los niveles de expresión de los marcadores. En la figura 19 observamos que la expresión tanto de Sox2 y Nestina fluctúa mucho a lo largo del tiempo, sin embargo no existen cambios significativas entre estadios temporales de acuerdo a la prueba estadística de Kruskal-Wallis.

Marcadores neuronales

Neurogenina 2 (Ngn2) es un gen pro neural involucrado en el inicio de la neurogénesis y la represión de fenotipos gliales (Kele et al. 2006). β III Tubulina, como se mencionó anteriormente, es una proteína encontrada casi exclusivamente en neuronas inmaduras (Lee et al. 1990), por lo que es el marcador más utilizado para identificar neuronas de reciente creación (R&D Systems 2003). En la figura 20 observamos que hasta el pase 2 (~9DIV), el cultivo mantiene niveles altos de expresión de β III-Tubulina en comparación con los siguientes pases celulares. Este dato concuerda con lo observado en las inmunodetecciones. Por su lado la expresión de *Ngn2* tiene más fluctuaciones, hay un incremento significativo en el pase 2 (p-value<0.001) y posterior a eso una disminución en los niveles de expresión a partir del pase 3 (p-values<0.001), lo cual está sincronizado con la caída en β III-tubulina. La tendencia que observamos

es que los fenotipos neuronales están favorecidos en los primeros pases celulares y con el tiempo en cultivo estos disminuyen.

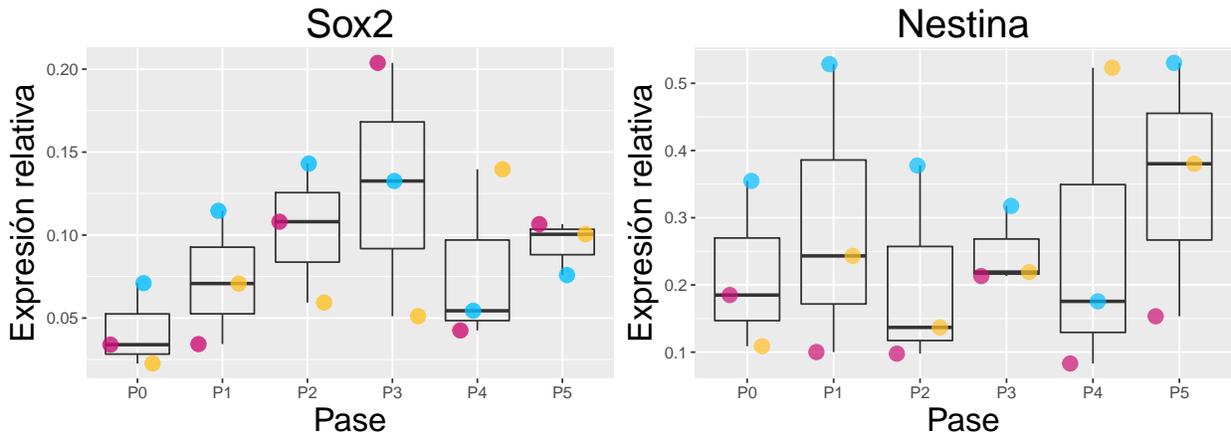


Figura 19: Expresión de marcadores neurales. Expresión de mRNA de Nestina y Sox2 en cultivos de PNs de mesencéfalo ventral de E10.5 a lo largo de distintos pases. Muestras provenientes del mismo cultivo están marcadas en colores iguales. Prueba de Kruskal-Wallis (p-value = 0.8974 y 0.9271 respectivamente)

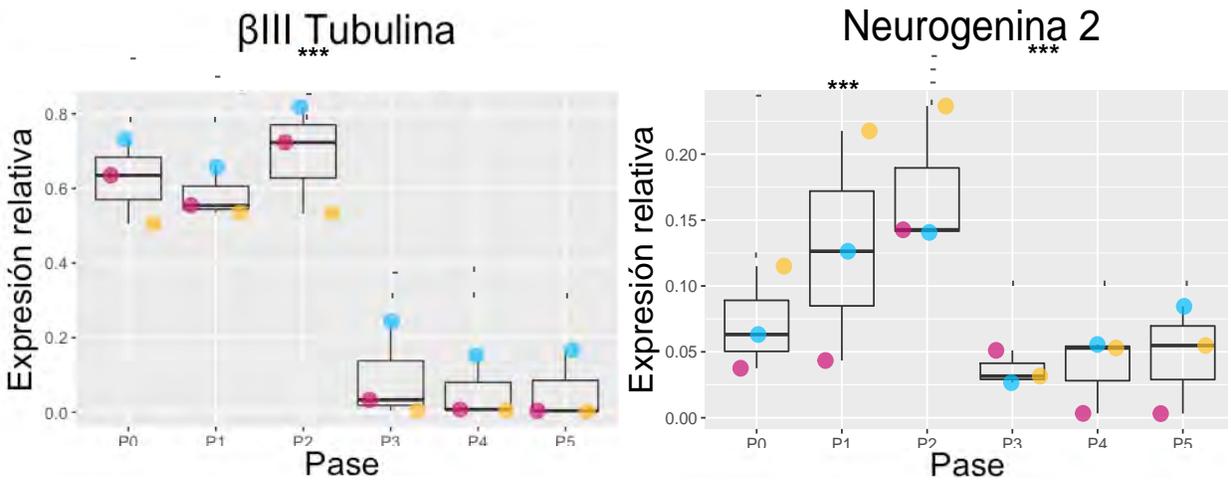


Figura 20: Expresión de marcadores neuronales. Expresión de mRNA de β III-Tubulina y *Ngn2* en cultivos de CTNs E10.5 a lo largo de 5 pases celulares. Muestras provenientes del mismo cultivo están marcadas en colores iguales. La tendencia observada es niveles altos de expresión en β III-tubulina hasta el pase 2 y después niveles bajos de expresión. Prueba de Tukey ***p-value<0.001

Marcadores gliales

Para verificar el cambio de potencial neurogénico a astrogénico cuantificamos los niveles de expresión de tres marcadores gliales, *Gfap*, *Tnc* y *Aldh111*. Como se mencionó anteriormente, *Gfap* es una proteína de filamentos

intermediarios expresada en astrocitos y sin duda el marcador más usado para identificar células astrogiales (Eng 1985). Tenascina-C (Tnc), es una proteína de matriz extracelular involucrada en la regulación de la proliferación de astrocitos. La expresión de esta proteína por la glía radial precede el inicio de la gliogénesis tiempo durante el cual se cree que conduce la diferenciación de astrocitos (Wiese et al. 2012). Aldh1l1 es una enzima de la familia aldehído deshidrogenasa, y que permite identificar astrocitos en un espectro más amplio (Cahoy et al. 2008).

En la figura 21 observamos que los cultivos comenzaron con niveles prácticamente indetectables de los tres marcadores astrogiales. A lo largo del tiempo notamos que los niveles de expresión tendieron a aumentar. En el caso particular de *Gfap* observamos un incremento notorio a partir del pase 4 (~15DIV); dado que *Gfap* es un marcador tardío de astrocitos, nos impide distinguir entre precursores astrogénicos y astrocitos terminalmente diferenciados (Miller & Gauthier 2007). Por el lado de Aldh1l1, está reportado que todas las células *Gfap*⁺ son además Aldh1l1⁺, mientras que no todas las células Aldh1l1⁺ son *Gfap*⁺ y no hay solapamiento con células no astrogiales (Cahoy et al. 2008). Desde el pase 2 (~9DIV) advertimos que los niveles de expresión de Aldh1l1 aumentaron, esto podría indicarnos que tenemos precursores astrogiales incluso antes de lo considerado.

Tnc es el marcador que aumenta más rápido y en proporciones mayores con el tiempo (nótese la escala). Recordando que *Tnc* es una proteína de matriz extracelular, este resultado puede ser consecuencia de que el cultivo adquiere características que le permiten cambiar de potencial neurogénico a astrogénico.

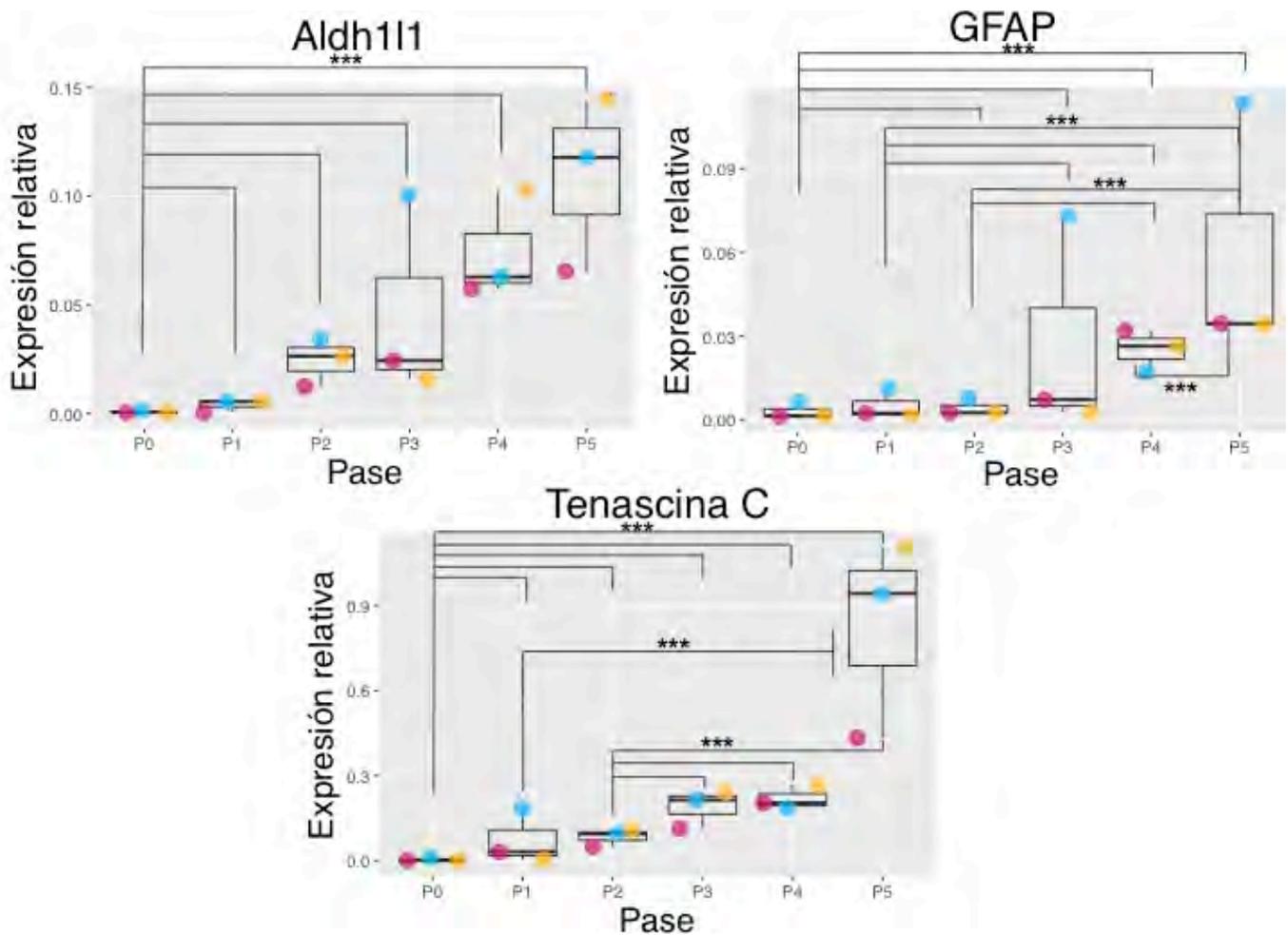


Figura 21: Expresión de marcadores astrogliales. Expresión de mRNA de marcadores astrogliales en cultivos de PNs del mesencéfalo ventral de E10.5 a lo largo de 5 pases celulares. Muestras provenientes del mismo cultivo están marcadas en colores iguales. La tendencia observada es niveles muy bajos de expresión durante los primeros pases y posteriormente un incremento considerable. Esto coincide con los resultados de inmunocitoquímica. Prueba de Tukey ***p-value<0.001

Vía de señalización de Notch

Al activarse la vía de señalización de Notch se activa la expresión de los factores de transcripción Hes, que a su vez inhiben la transcripción de genes pro-neurales como *Mash1* y *Ngn2*. Hes1 y Hes5 tienen papeles complementarios y se piensa que regulan la sincronización de la diferenciación. *Hes5* se expresa en la zona ventricular del mesencéfalo; durante el desarrollo, su punto más alto está en

día E11.5 que concuerda con el pico más alto de *Dll1*. Por los niveles y zona de expresión, *Hes5* es considerado el principal efector de la vía de señalización de Notch en el mesencéfalo. Se piensa además que juega un papel importante en la diferenciación hacia neuronas mDA y en el mantenimiento de la poza de precursores en el cerebro medio (Mesman et al. 2018). Al analizar los niveles de expresión de *Hes1* y *Hes5* observamos que como era de esperarse *Hes5* presenta niveles más altos que *Hes1* (nótese la escala de cada gen). En ambos casos observamos fluctuaciones que pueden ser explicadas por dos eventos; en primer lugar los genes *Hes* oscilan. Este fenómeno se da porque *Hes1* y *Hes5* compiten por los sitios de unión a sus promotores con el complejo NICD-RBPJk, por lo que estos genes reprimen su propia expresión causando las oscilaciones (Shimojo et al. 2008; Imayoshi et al. 2013). Son estas oscilaciones las que de hecho permiten que *Ngn2* y *Dll1* fluctúen, puesto que existe una correlación inversa con los niveles de mRNA de *Ngn2* y *Dll1* (Masamizu et al. 2006; Shimojo et al. 2008), que a su vez conduce al mantenimiento de los progenitores neurales mediante la activación mutua de la vía de señalización de Notch (Shimojo et al. 2008). En segundo lugar, es bien sabido que los efectos de la vía de señalización de Notch son dependientes del contexto celular y la etapa de desarrollo (Liu et al. 2010), por lo que las fluctuaciones podrían ser reflejo del cambio de potencial de diferenciación. Por su parte, los niveles de *Dll1* también fluctuaron, en un principio parece que los niveles de expresión fueron a la baja con los pases celulares para después recuperarse. Este resultado que puede ser explicado por las mismas razones que las fluctuaciones de los genes *Hes*, recordando que las oscilaciones de estos permiten las oscilaciones de *Dll1*.

En conjunto, el análisis por inmunocitoquímica y RT-PCR cuantitativo indican que los cultivos de CTNs originarias del nicho dopaminérgico pierden capacidad neurogénica y ganan capacidad astrogénica con el tiempo en cultivo.

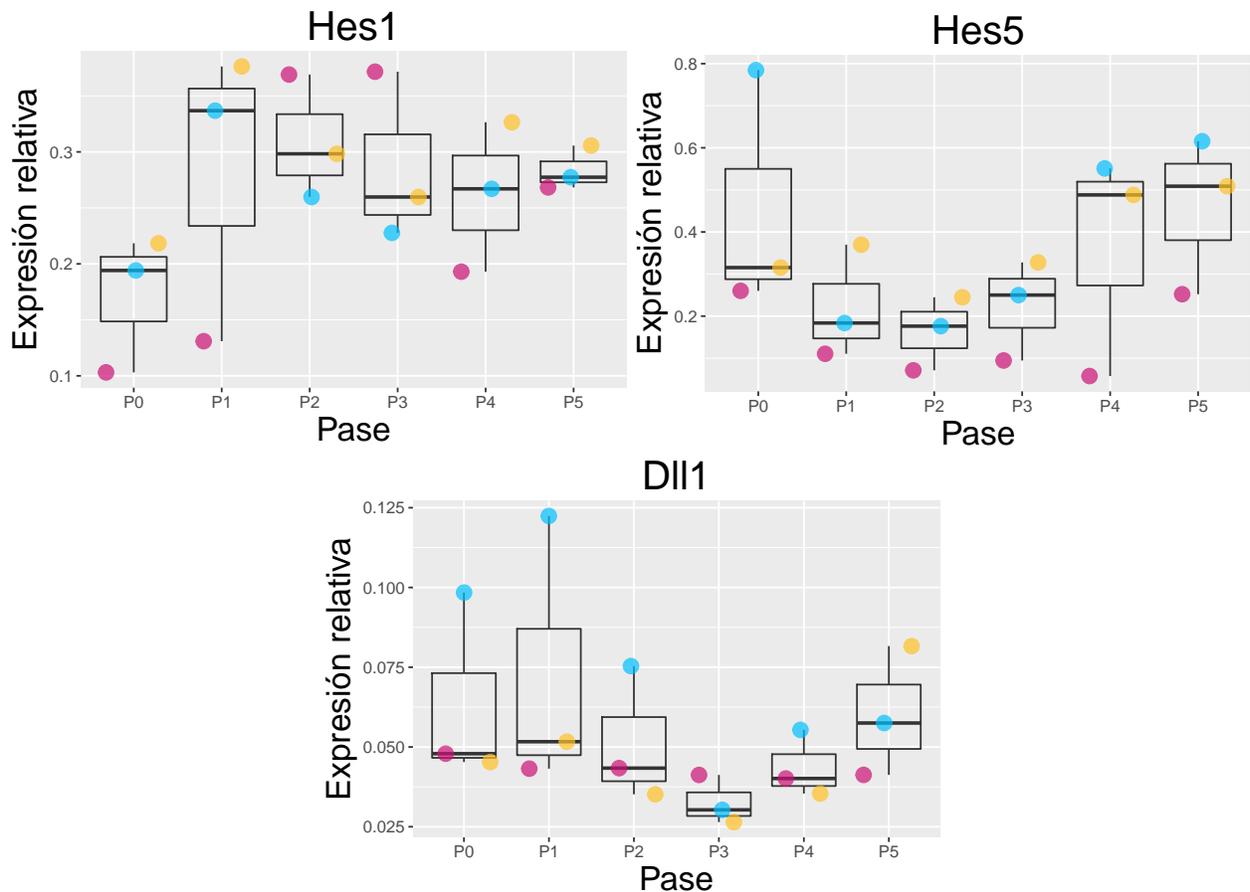


Figura 22: Expresión de los componentes de la vía Notch. Niveles de mRNA en cultivos de PNs de mesencéfalo ventral de E10.5 a lo largo de 5 pases celulares. Muestras provenientes del mismo cultivo están marcadas en colores iguales. Los niveles de expresión de estos marcadores presentan fluctuaciones.

Construcción del vector PB-Dll1

Para tener una construcción que permita la expresión inducible de *Dll1*, usamos un sistema basado en la activación transcripcional controlada por tetraciclina, sistema *Tet-on* que permite expresar el gen de interés en presencia de doxiciclina (análogo de la tetraciclina). En el laboratorio utilizamos como base al transposón Piggybac para poder transfectar la construcción en células eucariontes. En la figura 23 observamos a detalle los componentes del sistema usado. Las secuencias repetidas invertidas (ITR) permiten que el transposón se integre con la ayuda de una transposasa. Tanto Venus (gen reportero) como el transactivador de tetraciclina (rtTA), están bajo el control del promotor constitutivo de la fosfoglicerato quinasa (PGK). El gen de interés, *Dll1*, se encuentra bajo el

promotor TRE que sólo se activa con el complejo rtTA-Dox, por lo que la expresión de *Dll1* dependerá de la presencia de Doxyciclina (Dox) en el medio.

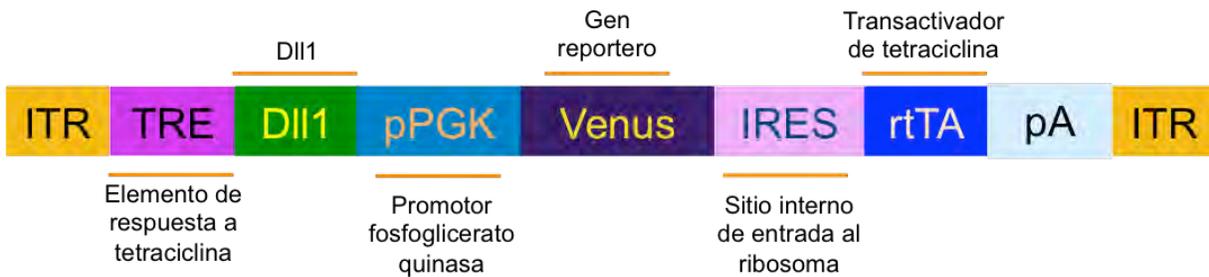


Figura 23: Transposon PB-Dll1. El vector PB-Dll1 expresa a la proteína fluorescente Venus bajo el control del promotor constitutivo pPGK. Al agregar Dox, el promotor TRE es activado por acción del complejo Dox-rtTA. Debido a que hay un único sitio poliA, se genera un único transcrito (Dll1-pPGk-venus-IRES-rtTA).

Para amplificar el gene *Dll1*, utilizamos los oligonucleótidos Dll1FW y Dll1RV que fueron diseñados para flanquear al gene *Dll1* con los sitios de restricción BamHI y XhoI (ver tabla 2 en métodos). Como blanco usamos ADNc de CTNs del mesencéfalo ventral de E10.5. El tamaño esperado del producto es 2216pb y al analizar el PCR por gel de electroforesis observamos una banda que migró a la altura esperada, sin embargo también detectamos bandas que no corresponden a *Dll1*. Estos productos pueden generarse por inespecificidades de los oligonucleótidos usados o ser productos de PCR incompletos (figura 24A).

Para asegurar que el producto observado en el peso molecular estimado corresponda a *Dll1*, hicimos un análisis de restricción con enzimas que permitieran generar productos fácilmente distinguibles de las bandas inespecíficas. Digerimos con las enzimas Scal-HF (productos esperados de 1538pb y 678pb) y SphI-HF (1482pb y 734pb). Como se puede observar en la figura 24B, los productos generados por las enzimas usadas corresponden a los pesos moleculares esperados. Con esto, pasamos a digerir el producto de PCR con las enzimas de restricción BamHI y XhoI y a purificar por corte de banda el producto de PCR correspondiente al tamaño esperado del gene *Dll1*. Este mismo procedimiento se hizo para el vector PB-Sox2 (para obtener el vector PB). Tanto vector como inserto

fueron puestos en una reacción de ligación que posteriormente fue transformada en células quimiocompetentes *E.coli* DH10B.

Las bacterias transformadas con la ligación crecen en cajas de LB agar con ampicilina. Con las colonias obtenidas hicimos extracción de ADN plasmídico mismo que digerimos con las enzimas BamHI y XhoI. Seleccionamos sólo aquellas que liberaron el fragmento correspondiente a *Dll1* (figura 25).

Como resultado de este proceso se obtuvo una colonia que fue mandada a secuenciar usando los oligonucleótidos Fw-mid*Dll1*, Rv-mid*Dll1*, Fwmid2*Dll1*, Rvmid2*Dll1* y pPGK-Rv (ver tabla 2), confirmando que el fragmento insertado en el vector corresponde a *Dll1*. Este fragmento presenta la mutación R661C. Esta modificación se encuentra presente en homólogos de *Dll1* en *Chinchilla lanigera*, *Fukomys damarensis*, *Heterocephalus glaber* y *Cavia porcellus*. La sustitución está en el dominio citoplasmático de la proteína *Dll1*, por lo que posiblemente no tenga ningún efecto en la correcta localización de *Dll1* en la membrana ni interfiera con la interacción *Dll1*-Notch. En la figura 26 se puede observar el mapa final de la construcción PB-*Dll1*.

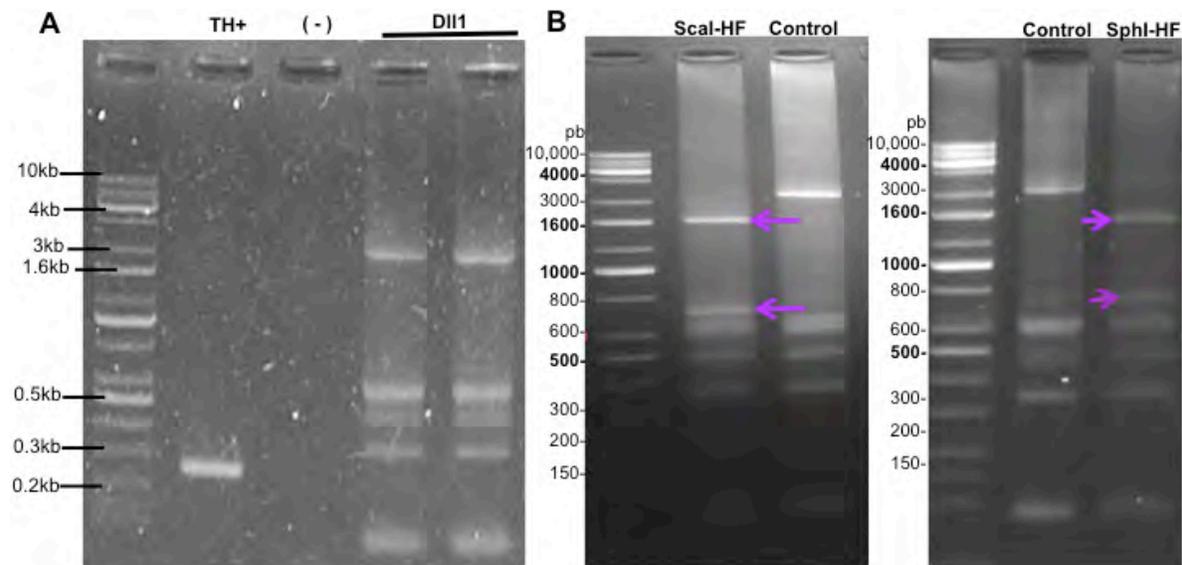


Figura 24: Amplificación del gen *Dll1*. A) PCR para amplificar *Dll1*, carriles de izquierda a derecha, controles positivo de amplificación (TH), negativo de amplificación, dos carriles de PCR *Dll1* (2216pb). B) Patrón de digestión de *Dll1* digerido con Scal-HF(1538pb y 678pb) y SphI-HF(1482pb y 734pb).

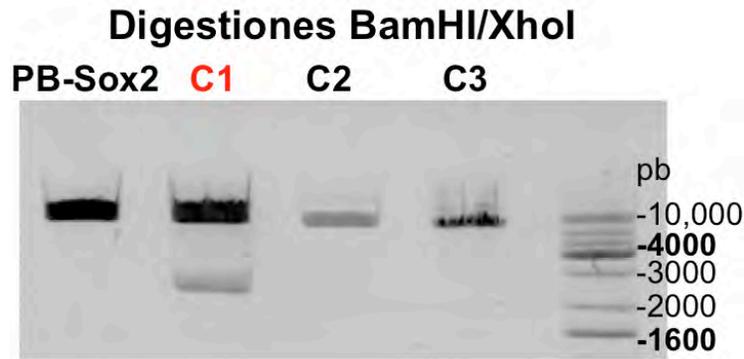


Figura 25: Digestiones para analizar ADN plasmídico. La colonia 1 libera un fragmento de tamaño similar al de *DII1* (2216pb).

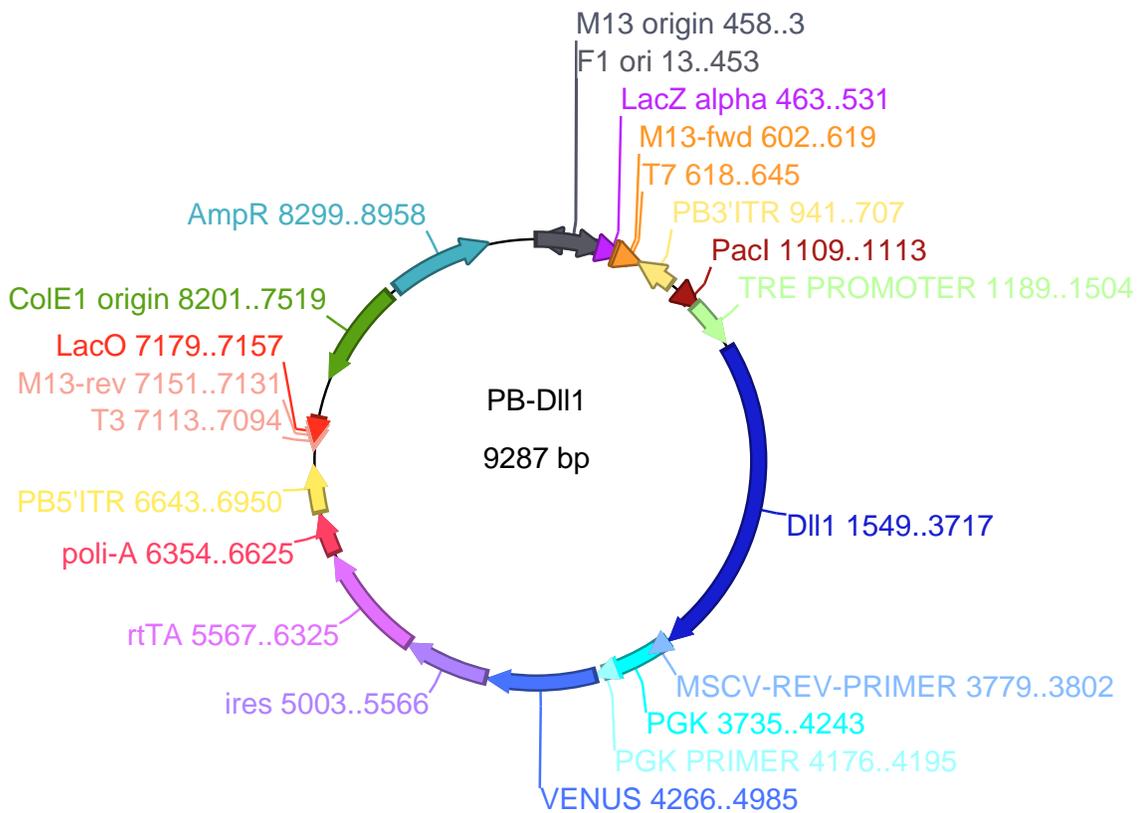


Figura 26: Mapa del plásmido PB-DII1. Esta construcción puede ser integrada en el genoma gracias al transposón piggyBac.

Generación de la línea celular STO-DII1

Transfectamos la construcción PB-DII1 en fibroblastos STO por electroporación usando las siguientes relaciones de transposasa:transposón: 1:10, 1:20, 1:50. Pasadas 36 horas de la electroporación, tratamos a las células con puromicina por 48 horas. Con este tratamiento recuperamos una población con 25% de células Venus⁺. sometimos esta población a un proceso de selección clonal para aislar poblaciones 100% Venus⁺. En la figura 27 podemos ver un ejemplo de un población 100% Venus⁺.

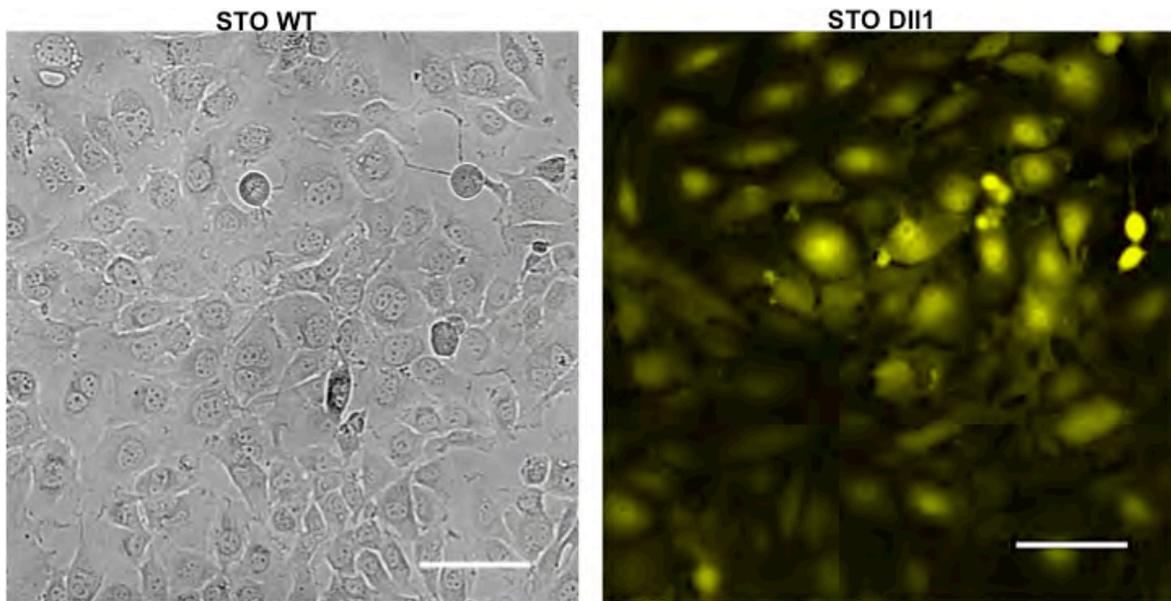


Figura 27: Células STO-DII1. A diferencia de las células STO WT las células DII1 expresan al reportero Venus, detectado por su espectro de emisión a 527nm. Barra de escala 100µm.

Para verificar que DII1 puede expresarse al agregar doxiciclina al medio, probamos distintas concentraciones de Dox y extrajimos ARN total para evaluar los niveles de expresión de *DII1*. En la gráfica de la figura 28, podemos observar que los niveles más altos de *DII1* fueron a la concentración de 150ng/ml. Esto concuerda con datos observados para otros vectores creados en el laboratorio que tienen la misma base que el vector PB-DII1.

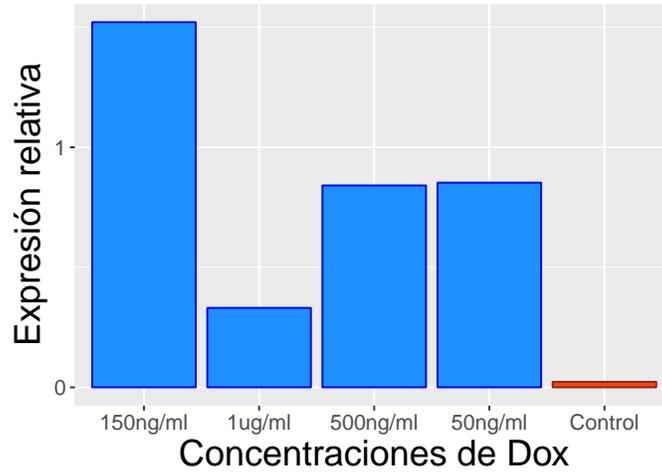


Figura 28: Concentraciones de Dox capaces de inducir la expresión de Dll1. Niveles de expresión de Dll1 en comparación con Ciclofilina en presencia de diferentes concentraciones de doxiciclina. Las células se incubaron con doxiciclina por un periodo de 24 horas.

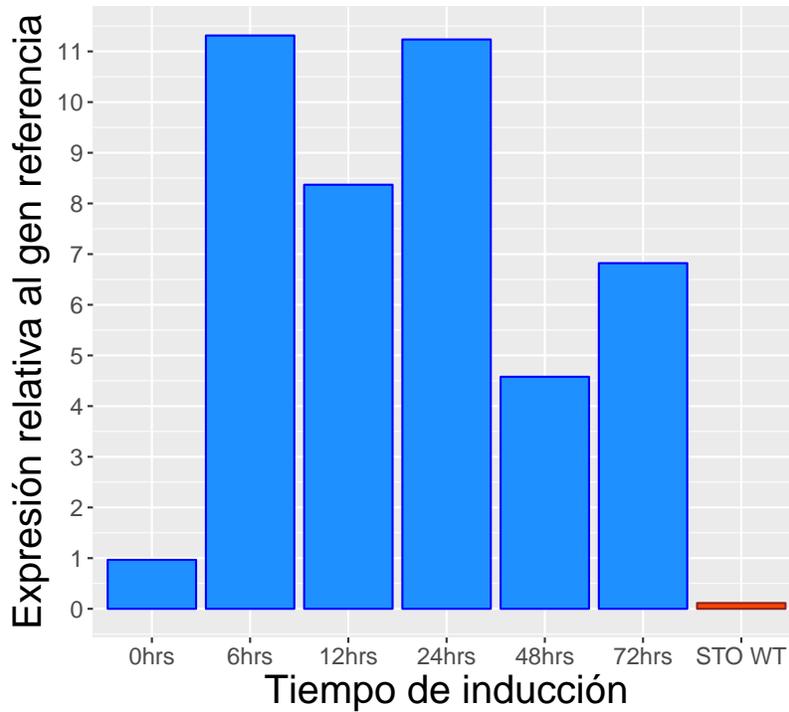


Figura 29: Niveles de expresión de Dll1 a lo largo de distintas horas en presencia de 150ng/ml de Dox. Doxiciclina induce la expresión de Dll1 desde la sexta hora, con un solo pulso de Dox la expresión se mantiene en niveles altos incluso en el tercer día en presencia de Dox.

Una vez que determinamos la concentración óptima para inducir la expresión de *Dll1*, hicimos un análisis para determinar el tiempo que le toma a las células expresar *Dll1* una vez que se agrega doxiciclina al medio. Para esto tomamos muestras a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas, usando una sola dosis de Dox y extrajimos ARN total para evaluar los niveles de *Dll1*. En la gráfica de la figura 29 podemos observar que la respuesta a Dox es rápida pues desde las 6 horas es posible observar niveles altos de *Dll1*.

La construcción PB-*Dll1* fue pensada para generar un ratón transgénico que exprese *Dll1* de forma inducible y poder obtener CTNs a partir de él. Entregamos la construcción a la Unidad de Producción de roedores Transgénicos del IBT para que generen los embriones transgénicos. Al igual que la línea STO-*Dll1*, los embriones transgénicos se detectan por la presencia de la proteína Venus. Hasta el momento sólo en una ocasión fue posible detectar un embrión Venus⁺. En la figura 30, vemos una fotografía en campo claro del mesencéfalo de un embrión de E10.5. Este mesencéfalo presenta una protuberancia en la parte dorsal. En 1996 Lardelli y colaboradores mostraron que cuando aumentan progresivamente los niveles del dominio intracelular de Notch3 (y por lo tanto la vía de Notch se encuentra más activa), los embriones se desarrollan anormalmente y presentan protuberancias similares a las que observamos nosotros en el embrión transgénico. El fenotipo del embrión Venus⁺ es similar al reportado en ese artículo y podría ser producto de la expresión fuga de *Dll1*. La unidad continua trabajando para generar más embriones transgénicos. Como alternativa generamos células troncales embrionarias (ESCs) transgénicas que permitan crear ratones quiméricos.

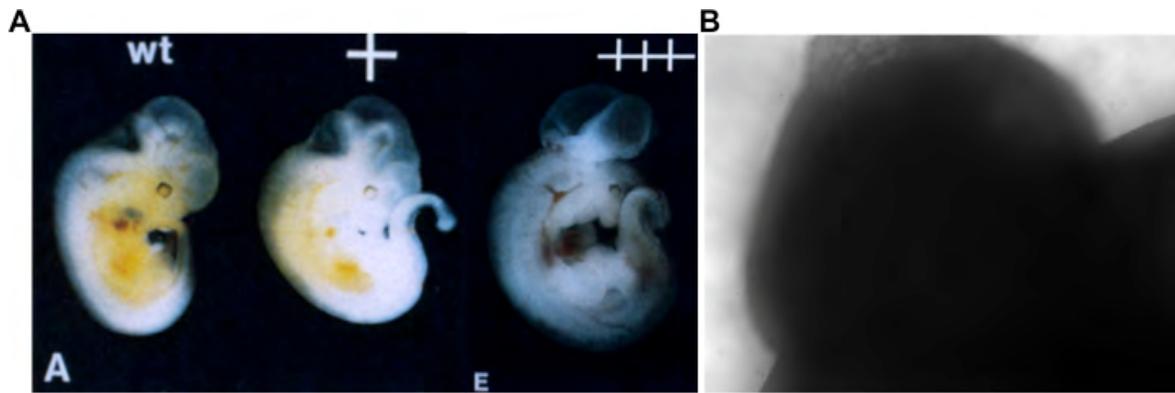


Figura 30: Embrión transgénico con malformación en el mesencéfalo. A) La sobreexpresión del dominio intracelular de Notch 3 produce malformaciones del tubo neural (Figura adaptada de Lardelli et al. 1996). B) El fenotipo observado en un embrión transgénico Dll1 puede ser resultado de la sobreactivación de la vía de Notch por la expresión fuga de *Dll1*.

Cocultivos con las células STO-Dll1

Una de las metodologías que puede ayudarnos a averiguar cómo afecta Dll1 a las CTNs *in vitro*, es el cocultivo con una línea que exprese a la proteína de interés. Utilizamos a las células STO-Dll1 que por los ensayos anteriores sabemos expresa al mensajero de *Dll1* en presencia de doxiciplina. Para evitar que las células STO se dividan y compitan con los precursores neurales, arrestamos su ciclo celular usando mitomicina C. Los precursores neurales fueron tomados de embriones CD1 y GFP según corresponda. Primero hicimos cultivos con las células STO-WT y precursores neurales de E12.5 días de embriones GFP, esto, para ver si los cocultivos con estos dos tipos celulares era posible. En las fotografías de la figura 31 observamos en el canal verde a las células precursoras a lo largo de 5 pases celulares, indicando que los cocultivos sí son posibles, pero, las células crecen más lento y parecen crecer en los “espacios vacíos” dejados por las células STO. Las células STO mueren a lo largo del cultivo, pues a diferencia de su medio habitual el medio de precursores neurales no contiene suero. Es importante notar que a pesar de las dificultades encontradas, los precursores en cocultivos parecen seguir un cambio morfológico similar al cultivo primario ordinario.

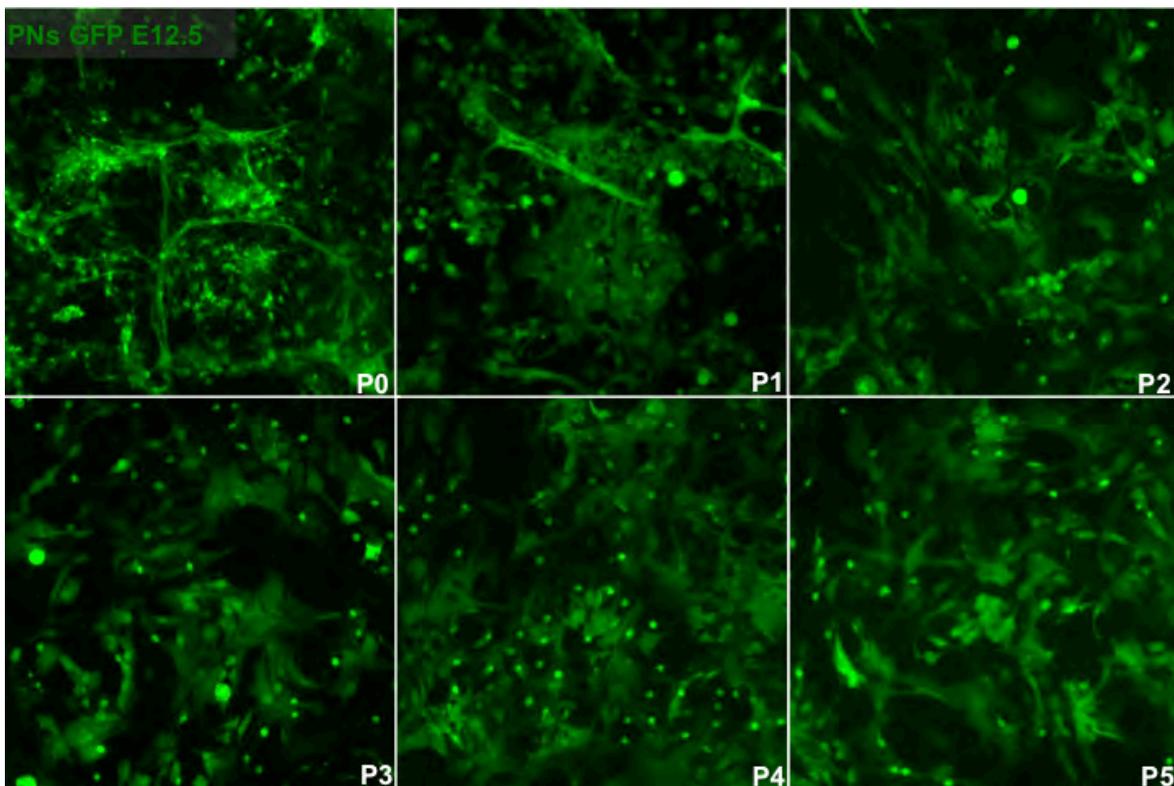


Figura 31: Cocultivos STOWT/PN12.5. Los PNs (GFP) de E12.5 se cultivaron sobre una capa de células STO mitomizadas. Los PNs crecen a una tasa más lenta que un cultivo primario ordinario. Sin embargo es posible ver que las células sufren un cambio morfológico a lo largo del tiempo similar a los cultivos normales. Sólo se muestran las células GFP por claridad.

Una vez establecido el protocolo para el cocultivo, utilizamos precursores neurales de E10.5 para los experimentos. Similar a lo que observamos con los cultivos de E12.5, las células parecen crecer entre los espacios vacíos dejados por las células STO/STODL1. Para saber qué efecto estaba teniendo el cocultivo en la expresión de los componentes de la vía de señalización de Notch, extrajimos ARN y cuantificamos la expresión de *Notch1*, *Dll1*, *Hes1* y *Hes5* en las células STO WT, STO-Dll1, STO-Dll1+dox, PN 10.5 0DIV, PN10.5 5DIV, y los respectivos cocultivos.

En cuanto a la expresión de *Dll1*, las células STO WT no la expresan y hay expresión basal en la línea STO-Dll1, sin embargo, cuando agregamos doxiciclina la inducción es evidente. Los niveles de *Dll1* en los PNs bajan a los 5 días en cultivo y es posible detectar un aumento en el cocultivo, correspondiente a la inducción con doxiciclina.

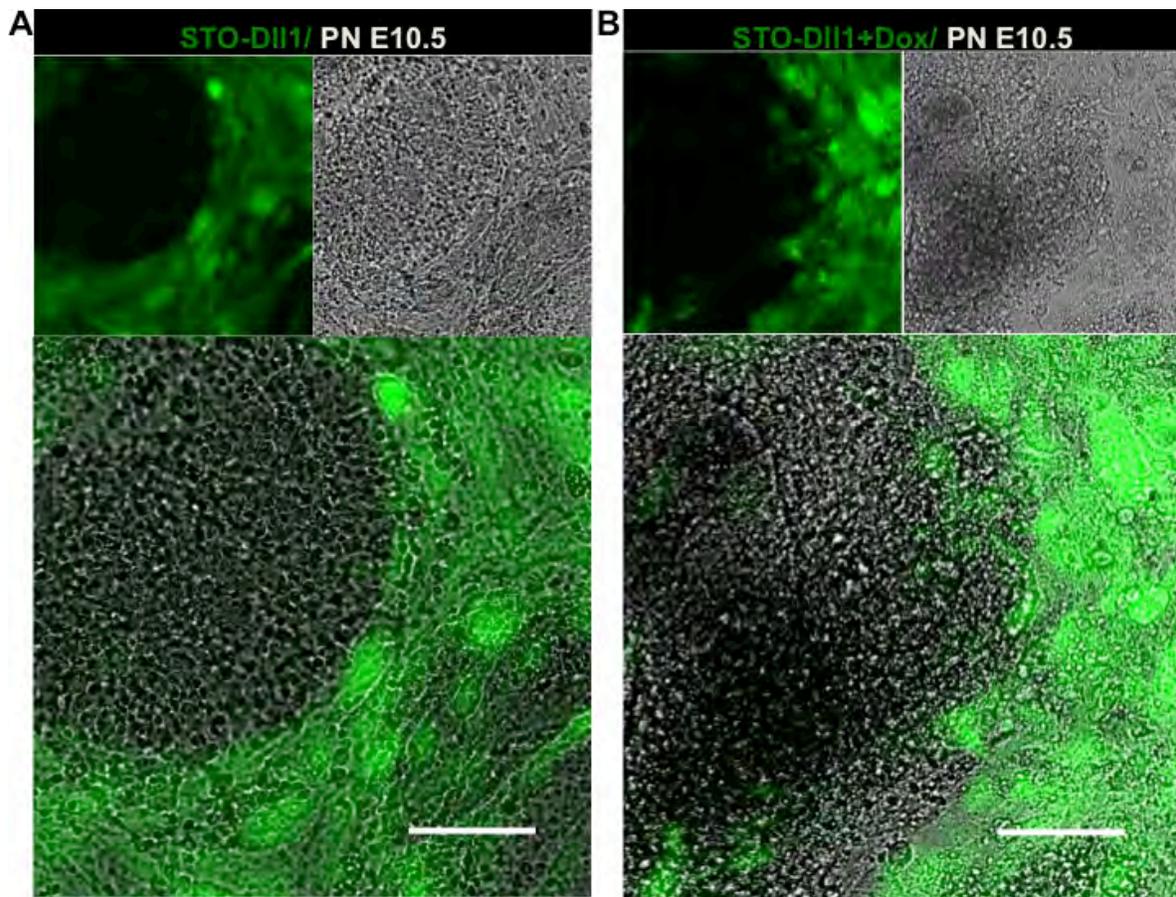


Figura 32 Cocultivos STO-DII1/PN10.5. Las células se cultivaron sobre una capa de células STO-DII1 mitomizadas. Los precursores crecen a una tasa más lenta y sólo en los espacios que parecen no estar ocupados por las células STO. A) Cocultivo STO-DII1 PN10.5 sin doxyciclina, observamos a los precursores rodeados por las STO-DII1. B) Cocultivo con la adición de 150 ng/ml de Doxyciclina, no hubo efecto evidente por la inducción de *DII1*.

En el caso de Notch1, observamos que al inducir *DII1* en las STO-DII1, también aumentan los niveles de *Notch1* y además incrementan los niveles de *Hes1* y *Hes5*. Esto nos indica que la inducción de *DII1* sí activa la vía de señalización de Notch en las células STO-DII1. Este resultado es indicio de que la construcción PB-DII1 es funcional.

A pesar del resultado anterior, en los cocultivos no fue posible observar que los niveles de los efectores *Hes1* y *Hes5* aumentaran como respuesta a la inducción con doxyciclina. La vía de señalización de Notch depende de contacto célula-célula; en las fotografías de los cocultivos vemos como las células no parecen estar en contacto estrecho. Lo anterior puede explicar que no observamos cambios en los niveles de expresión de los efectores en respuesta a la inducción con doxyciclina en los precursores neurales.

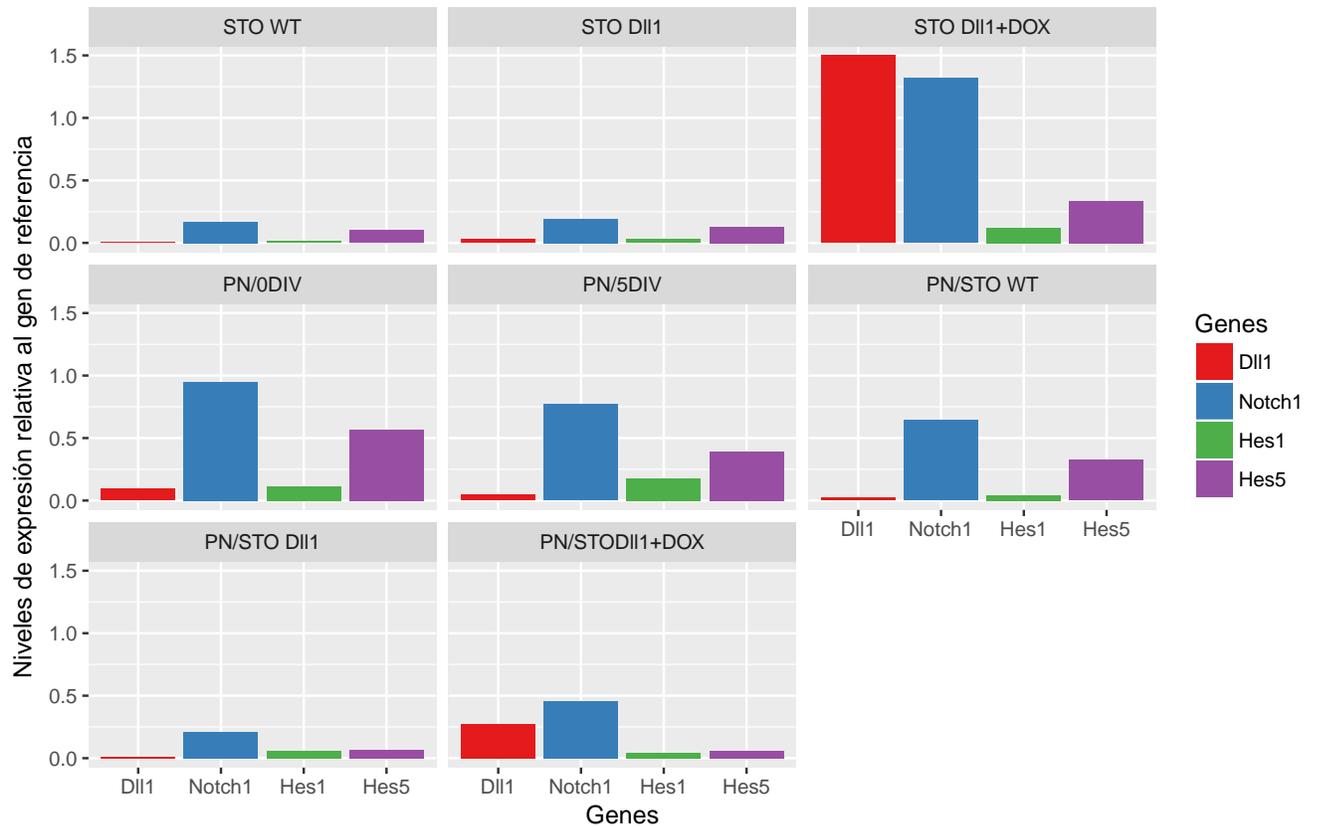


Figura 33: Niveles de expresión de los componentes de la vía de señalización de Notch en los cocultivos entre las células STO WT y STO-Dll1, y los PNs 10.5.

Para establecer si los precursores y las células STO estaban conviviendo estrechamente en los cocultivos, utilizamos embriones que expresan a la proteína mTomato (proteína fluorescente roja) bajo el control del promotor constitutivo Rosa26. En las fotografías de la figura 34, podemos observar que al día 5 en cultivo (en este día generalmente hacemos el primer pase celular), las células no interaccionan estrechamente, pues no observamos colocación de Venus y mTomato y son pocos los PNs que crecen sobre o en cercanía a las células STO. Estos resultados indican que el sistema de cocultivo con las células STO no es el óptimo para probar nuestra hipótesis.

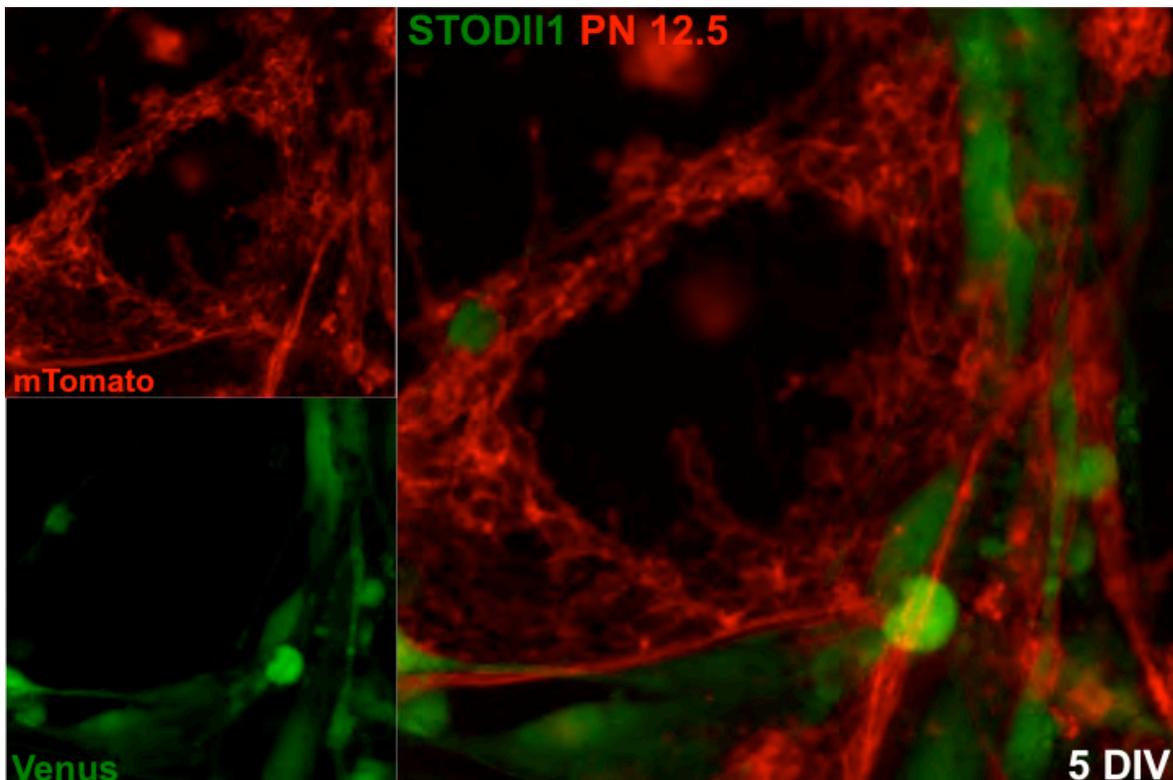


Figura 34 Las células STO-DII1 (verde) y los PNs (rojo) no interactúan estrechamente. Las células no presentan interacciones estrechas, hay pocos puntos de contacto y los PNs crecen preferentemente en los espacios vacíos. Esto puede contribuir a que no veamos cambios en los niveles de expresión de los efectores de la vía de señalización de Notch.

Cocultivos con las células OP9-DI1

Las células OP9-DI1 (Schmitt & Zúñiga-Pflücker 2002), son una línea de células estromales de la médula ósea de ratón que expresan *Dll1* (DII-1:T7- IRES-GFP). La línea fue diseñada para apoyar la diferenciación de células troncales hematopoyéticas a células T. El acceso a esta línea celular (cortesía del Dr. Héctor Mayani) nos permitió llevar a cabo ensayos de cocultivo para conocer los efectos de DII1 en las CTNs. Para discernir entre los efectos causados por DII1 y los causados por las propias OP9, utilizamos también la línea OP9 parental. Al llevar a cabo estos cocultivos utilizamos embriones GFP, para cultivar con la línea parental, y embriones CD1 para cultivar con las OP9-DI1 (que son GFP⁺), y de esta manera distinguir entre los dos tipos celulares.

Mitomizamos a las OP9 en monocapa para que sirvieran de células alimentadoras. En primera instancia trabajamos con CTNs de la etapa embrionaria 12.5 porque podemos obtener más células.

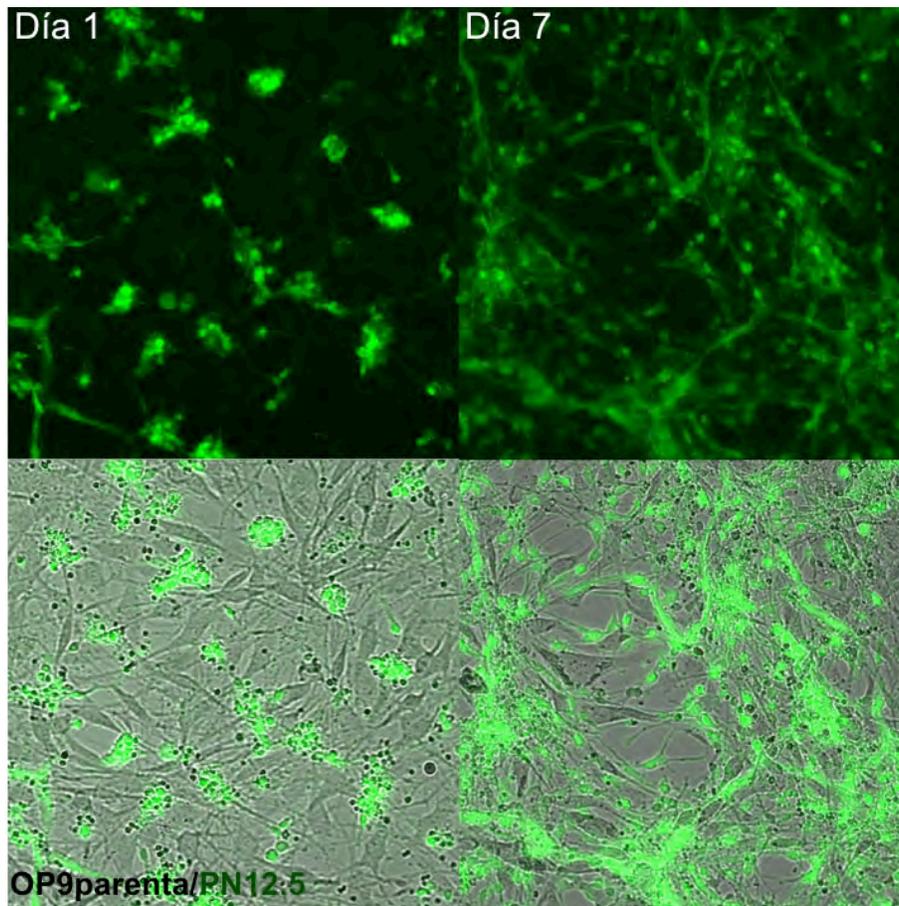


Figura 35: Cocultivos CTNs/OP9parental. Las CTNs (verde) se adhieren a las OP9 formando pequeños aglomerados al principio y extendiéndose conforme pasan los días.

En la figura 35 podemos ver cómo avanza el cocultivo PNsGFP/OP9 parental en diferentes días del pase 0. Las CTNs forman agrupaciones compactas y no se extienden en la caja. Conforme pasan los días estas agrupaciones crecen. En el día 7 es posible ver que varias células se expandieron por la caja; en general los PNs se adhieren poco a las OP9 y prefieren los espacios vacíos de la caja. Al día 7, los PNs tienen estructura similar a aquellas en los cultivos típicos de 12.5 en el pase 0 pero presentan células de mayor tamaño y con prolongaciones membranales.

En los cultivos con las OP9-DI1, no fue posible tener una monocapa de células OP9-DI1 tan densa como en el caso de las OP9parental, las células OP9-DI1 se dividen más despacio y en general nunca llenan la caja y guardan distancia una con otra. En este caso las CTNs usadas fueron CD1 y al igual que en los cocultivos anteriores se tomaron fotografías durante varios días en el transcurso

del P0. En la figura 36, podemos ver que al igual que los cocultivos con las OP9parental, las CTNs se asocian en pequeños aglomerados durante los primeros días y posteriormente la población se expande, preferentemente en regiones donde no hay células OP9-DI1. Cabe mencionar que las células OP9-DI1 se despegan de la caja con mayor facilidad que las OP9parental.

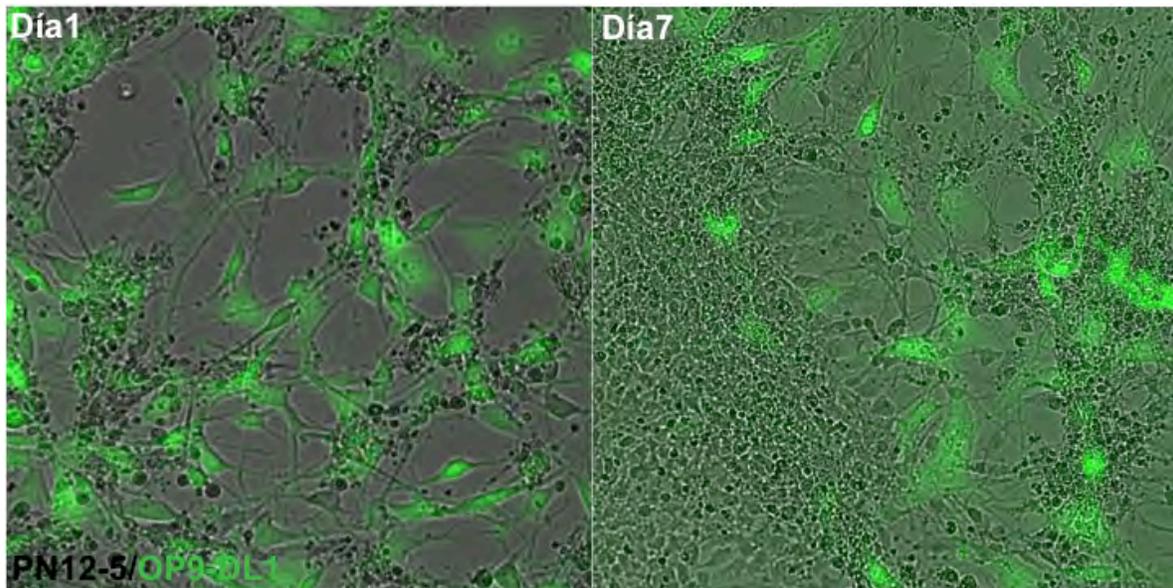
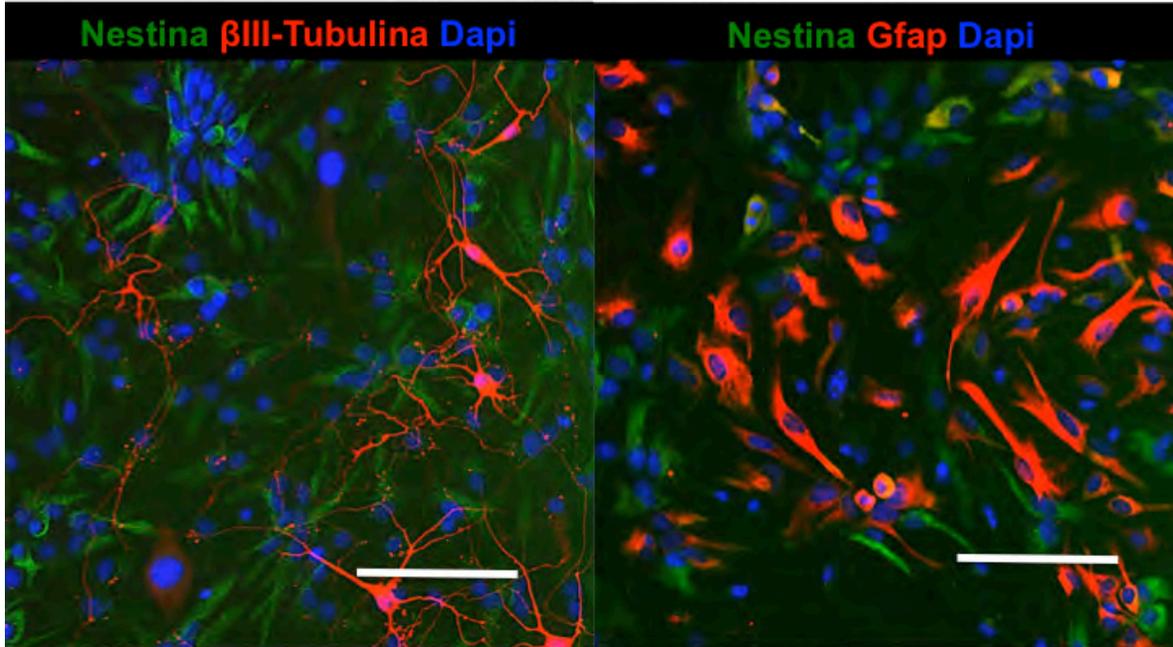


Figura 36: Cocultivos CTNs/OP9DL1. Las CTNs se adhieren poco a las OP9DL1 (en verde) formando pequeños aglomerados al principio y extendiéndose conforme pasan los días.

Al día 7 de los cocultivos, pasamos las células a una caja recubierta con ornitina y laminina, 24 horas después fijamos estas células para hacer inmunodetecciones contra Nestina, Gfap y β III-Tubulina. A pesar de que las CTNs de 12.5 contienen células Gfap+ desde el P1, encontramos que tanto en el cocultivo control como con OP9-DI1 cerca del 25% de las células eran Gfap+ contra sólo el 1% de los cultivos típicos de 12.5. Así mismo, observamos que el número de células β III tubulina+ es mucho menor y que en caso del cocultivo con OP9-DI1 algunas células OP9-DI1 son positivas para β III-Tubulina (figura 37). Estas observaciones indican que las células OP9-DI1 secretan algo que provoca que las CTNs formen astrocitos y precursores astrocíticos en abundancia.

Cocultivos OP9-DI1



Cocultivos OP9 parental

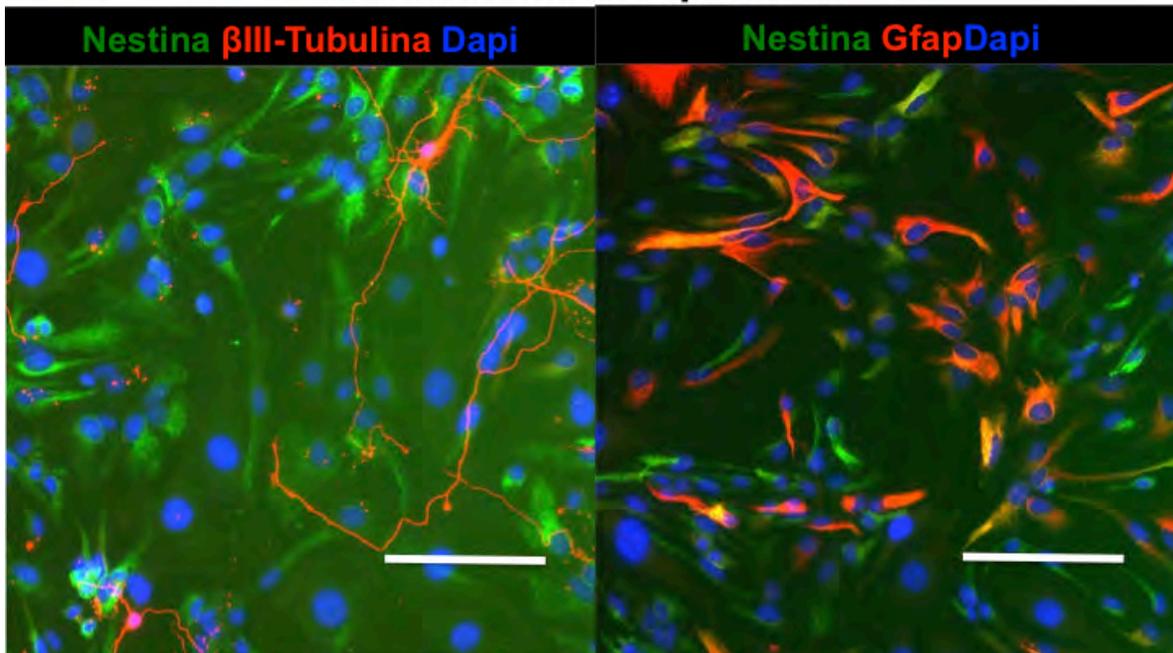


Figura 37: Inmunodetecciones de los cocultivos CTNs/OP9. Los cocultivos parecen promover la adquisición de fenotipos astrogiales y la supresión de fenotipos neurales.

Contamos las células positivas para cada marcador para calcular la composición de nuestro cultivo. Tomamos como total sólo a las CTNs y no a las OP9. Con los datos obtenidos elaboramos la gráfica de la figura 38. Si

comparamos la proporción de células Tubulina⁺ en un cultivo ordinario de PNs contra un cocultivo notaremos que el número es significativamente menor. Por otro lado, en ambos cocultivos aumenta la proporción de células Gfap⁺ como si las células OP9 promovieran la adquisición del fenotipo astrocítico. A la lista de inconvenientes agregamos el hecho de que falta interacción estrecha entre tipos celulares como observamos en la figura 39. Al igual que los cocultivos con las células STO-DII1 esta estrategia es inapropiada para responder nuestras inquietudes.

Ya que los cocultivos no fueron la aproximación correcta, pensamos en alternativas para probar nuestra hipótesis. Una de las ideas es utilizar la construcción PB-DII1 para transfectar células troncales embrionarias y someterlas a un proceso de diferenciación hacia CTNs.

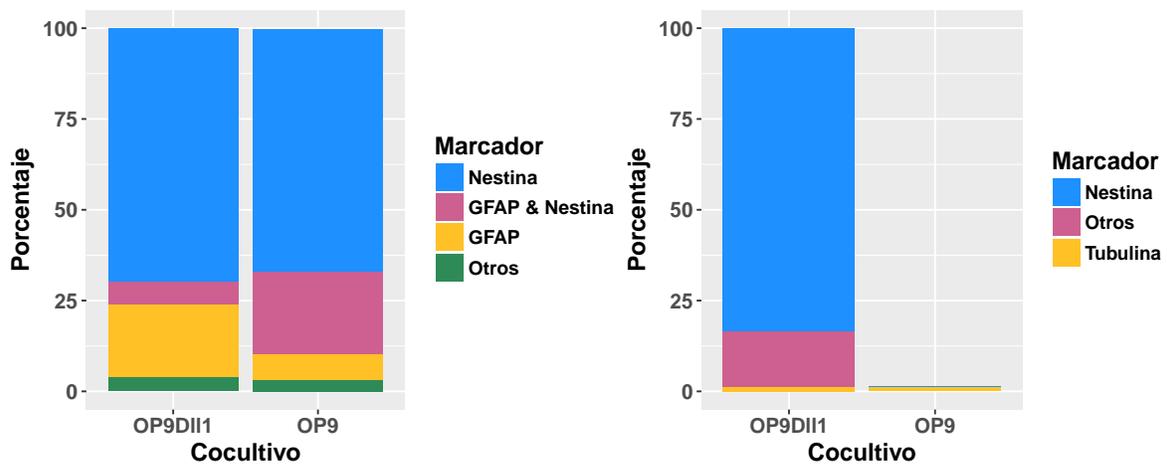


Figura 38: Cocultivos CTNs/OP9, conteos en las inmunodetecciones. Los cocultivos parecen promover la adquisición de fenotipos astrogiales.

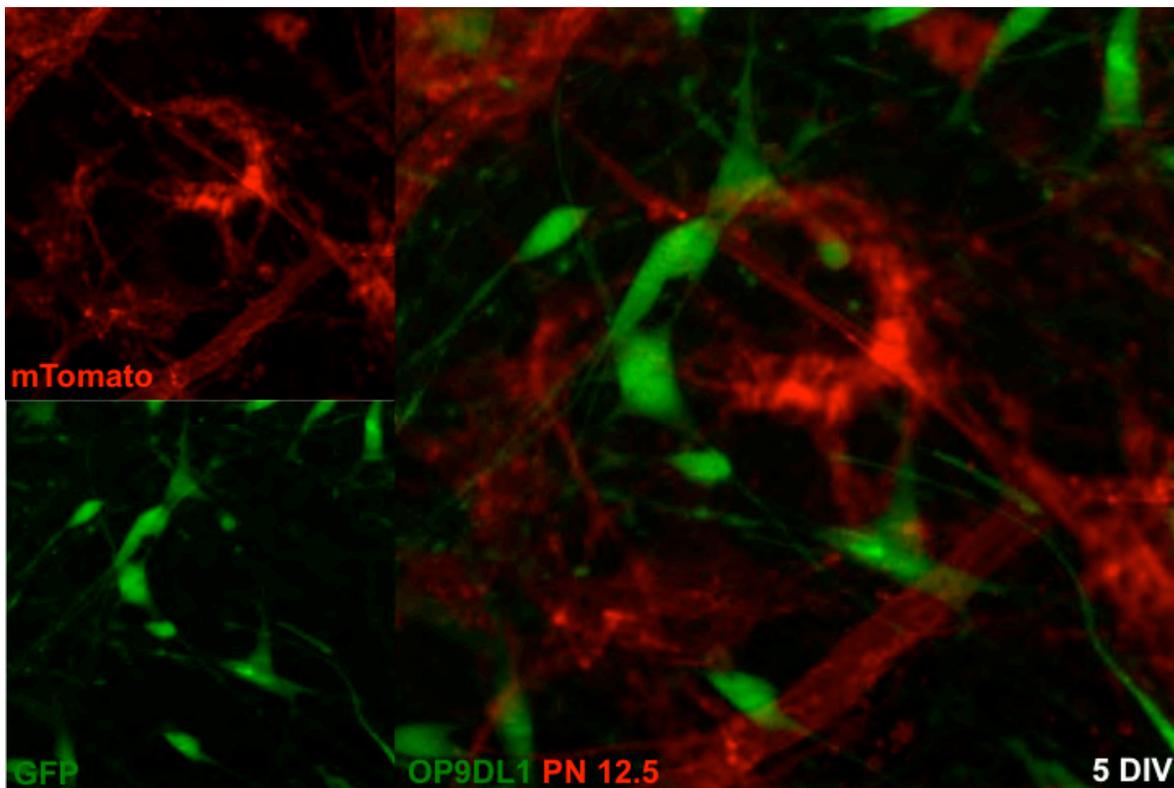


Figura 39: Las CTNs y las OP9 no tienen interacción estrecha. En rojo están los PNs y en verde a las células OP9DL1. Observamos que no hay interacción estrecha entre tipos celulares.

Generación de la línea W9.5-DI1

Otra alternativa para probar nuestra hipótesis es generar una línea de células troncales embrionarias (ESCs) que exprese Dll1. Las ESCs son capaces de generar todos los tipos de células somáticas; constituyen un sistema único para estudiar las bases moleculares de la pluripotencia y para delimitar los mecanismos del compromiso de linaje celular.

Una línea de ESCs-Dll1 nos permitirá hacer ratones quiméricos y en su defecto diferenciar las ESCs hacia el linaje neural. Para este fin, usamos la línea de ESCs W9.5 (Szabo & Mann 1994); lipotransfectamos a las células usando la transposasa y el transposón PB-Dll1 en diferentes relaciones (1:100, 1:250 y 1:500). A las 12 horas de la transfección iniciamos un tratamiento de 24 horas con puromicina para seleccionar las células que lleven a la transposasa. Una vez pasado el tratamiento las colonias se dejan crecer y posteriormente hacemos selección clonal. Al final aislamos 6 clonas Venus⁺ y escogimos 3 por su

morfología (colonias refringentes y con bordes definidos). A estas 3 clonas se les hizo cariotipo y prueba para contaminación micoplasma así como medición de los niveles de expresión basales e inducidos de *Dll1*. Todas las clonas dieron negativo para micoplasma y tuvieron porcentajes similares de cariotipos normales (<80% de células). La clona 1 tuvo la mejor inducción y la menor expresión fuga (figura 40) y el porcentaje más alto de cariotipos normales (84%). Por estas razones, escogimos esta clona para hacer los experimentos de diferenciación neural y mandar a hacer ratones quiméricos (Unidad de transgénicos del IBT)

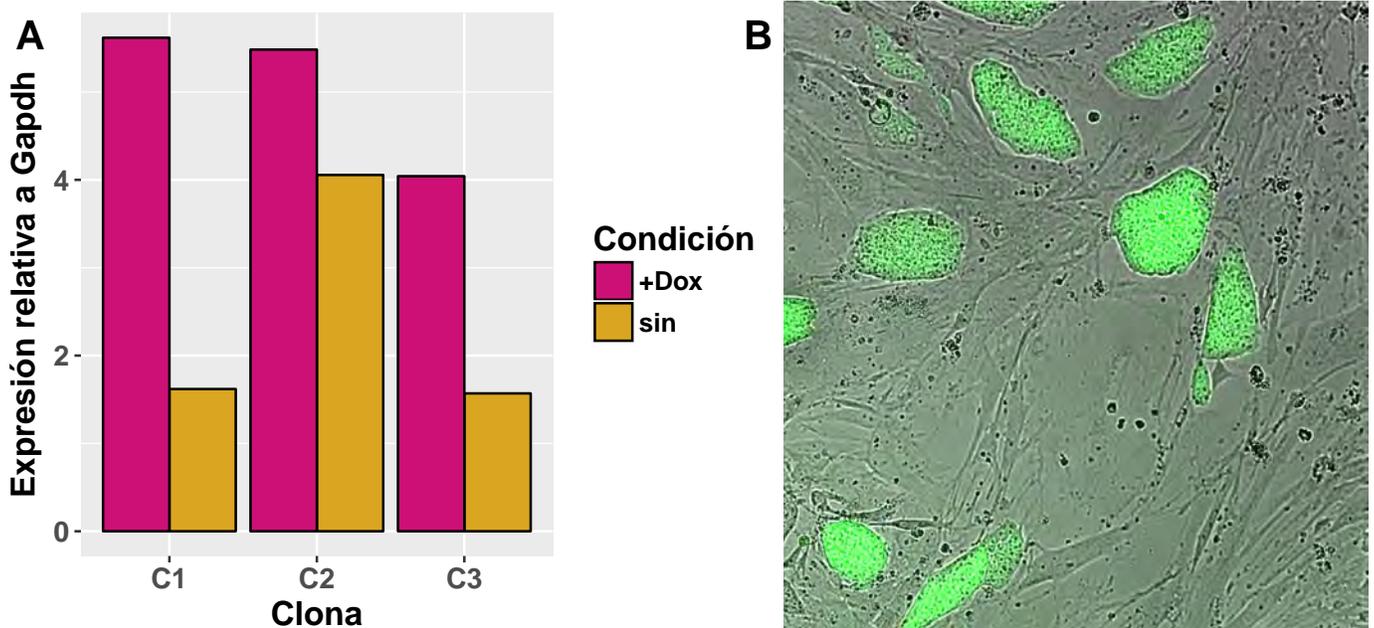


Figura 40: ESCs Dll1. A) Niveles de expresión basal e inducida de Dll1 en tres clonas W9.5 DL1. La clona 1 tiene la mejor inducción y expresión basal más baja. B) Colonias de la clona 1 (verde), sobre capa de feeders.

Diferenciación de la línea de ESCs W9.5-Dl1 a CTNs

Derivar células neuronales y gliales a partir de ESCs, requiere de producir primero CTNs. Por ser de gran interés científico, se han desarrollado varios protocolos que permiten obtener CTNs a partir de ESCs. Existen dos enfoques predominantes en los protocolos de diferenciación: el primero consiste en imitar el ambiente del neuroectodermo, señales e interacciones celulares usando la formación del cuerpo embrioide. El segundo enfoque consiste en privar a las células de interacciones celulares y señales al cultivarlas en baja densidad y en medio sin suero. Este último acercamiento evoca un mecanismo predeterminado

de diferenciación hacia CTNs (Cai & Grabel 2007). Estudios en *Xenopus* muestran que aislar a las células del epiblasto de señales, media la decisión entre linaje neuronal y no neuronal (Muñoz-Sanjuán & Brivanlou 2002). Aun así, estos trabajos también muestran que este proceso de diferenciación es más complejo que sólo activar un mecanismo predeterminado (Stern 2005). Sin embargo, dada la evidencia de una vía “automática” de inducción neural, muchos protocolos utilizan la ausencia de señales para especificar linaje neural. Estos protocolos incluyen una etapa de selección en medio sin suero y con neurobasal poco nutritivo (Ying & Smith 2003). Estas condiciones son exitosas porque apoyan el enriquecimiento de las CTNs promoviendo la apoptosis selectiva de los derivados no neurales y excluyendo los factores inhibidores de la neurulación, tales como las BMP presentes en el suero. En particular, el cultivo a baja densidad en condiciones exentas de suero y libres de LIF promueve la apoptosis de las ESCs positivas para Oct4 (Yamane et al. 2005; Tropepe et al. 2001); las CTNs resisten mejor estas condiciones, quizás debido a señales autocrinas.

El método que implementamos es una modificación del protocolo descrito por Ying y Smith en 2003. Escogimos este método por su rapidez para diferenciar. Este procedimiento requiere cultivar a las ESCs por varios pases sin células alimentadoras (fibroblastos mitomizados) en el medio habitual (M10+LIF). Una vez pasados al menos 3 pases celulares en estas condiciones, sembramos a densidad media (3×10^5 en cajas de 60mm) en medio N2B27 (ver métodos) cambiando el medio cada 2 días. En estas condiciones las células tardan entre 6 y 8 días en formar grupos con morfología de PNs y en el día 10 el cultivo es tratado como si fueran PNs primarios, pasamos las células a cajas recubiertas con laminina-ornitina. Mantuvimos a las células en medio N2B27 por hasta 35 días y documentamos los cambios morfológicos tomando fotografías de campo claro en diferentes días.

Los cultivos de células W9.5 WT al día 12 presentan células de morfología similar a los PNs primarios, y células con evidente morfología neuronal (figura 41). A pesar de lo anterior, encontramos también células con morfologías distintas a los PNs y en muchos casos agrupadas como si fueran colonias. Las observaciones anteriores ocurren con y sin la adición de doxiciclina. Conforme

avanza el tiempo, estos cultivos parecen perder a las células con morfología típica de PN y en cambio se favorece el crecimiento de otro tipo celular no identificado, en la fotografías estas células se ven más oscuras y en ocasiones presentan vacuolas (figura 41).

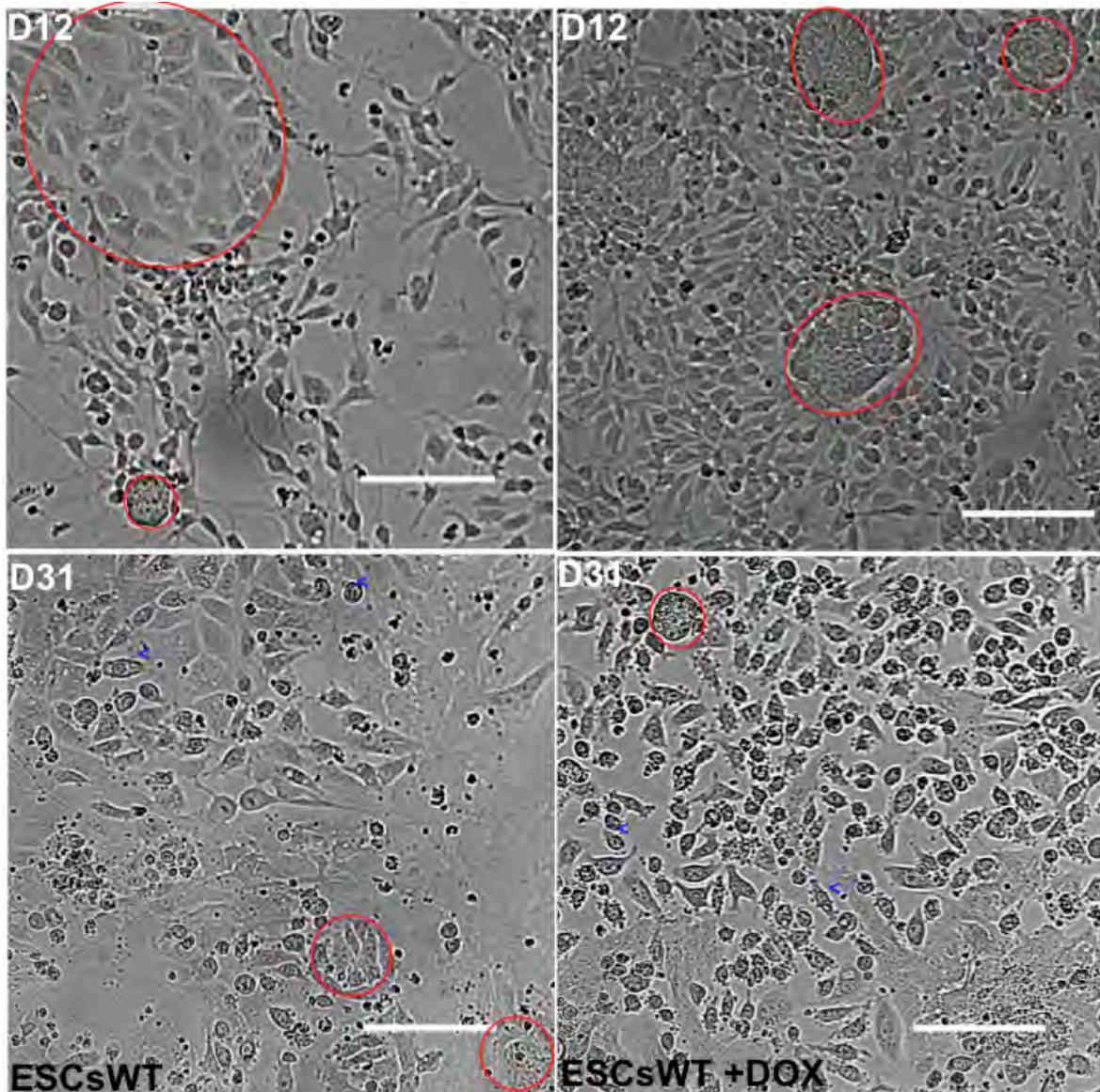


Figura 41: ESCs W9.5 diferenciadas a PNs. Al día 12 de diferenciación observamos células con morfología que recuerda a los PNs primarios y neuronas, además hay grupos de células con morfología diferente y en general agrupadas en colonias (señaladas en círculos rojos). A los 31 días de la diferenciación la mayoría de las células observadas no parecen ser o provenir de PNs y se conserva la formación de colonias. La barra de escala representa 100 μm .

Los cultivos de células W9.5- Dll1 al día 12 también producen células con morfología de PN, aunque parecen hacerlo en proporciones mayores a las WT, notamos un mayor número de células de tamaño pequeño que se arreglan en forma de rosetas neurales, además de células con morfología neuronal clara. Este efecto es incluso más notorio cuando agregamos doxiciclina al medio pues las rosetas neurales son más evidentes (figura 42 segundo panel). En estos cultivos también es posible notar la presencia de células de morfología diferente agrupadas en forma de colonia aunque no es tan evidente como en las células WT. Al transcurrir el tiempo, las células aumentan su tamaño y cambian de morfología de forma similar a los cultivos de PNs primarios pero no se parecen a los PNs de los cultivos primarios. En condiciones sin doxiciclina podemos observar células que parecen neuronas (cabezas de flecha en la figura 42) sin embargo, el cultivo está compuesto principalmente por células similares a PNs primarios de pases tardíos.

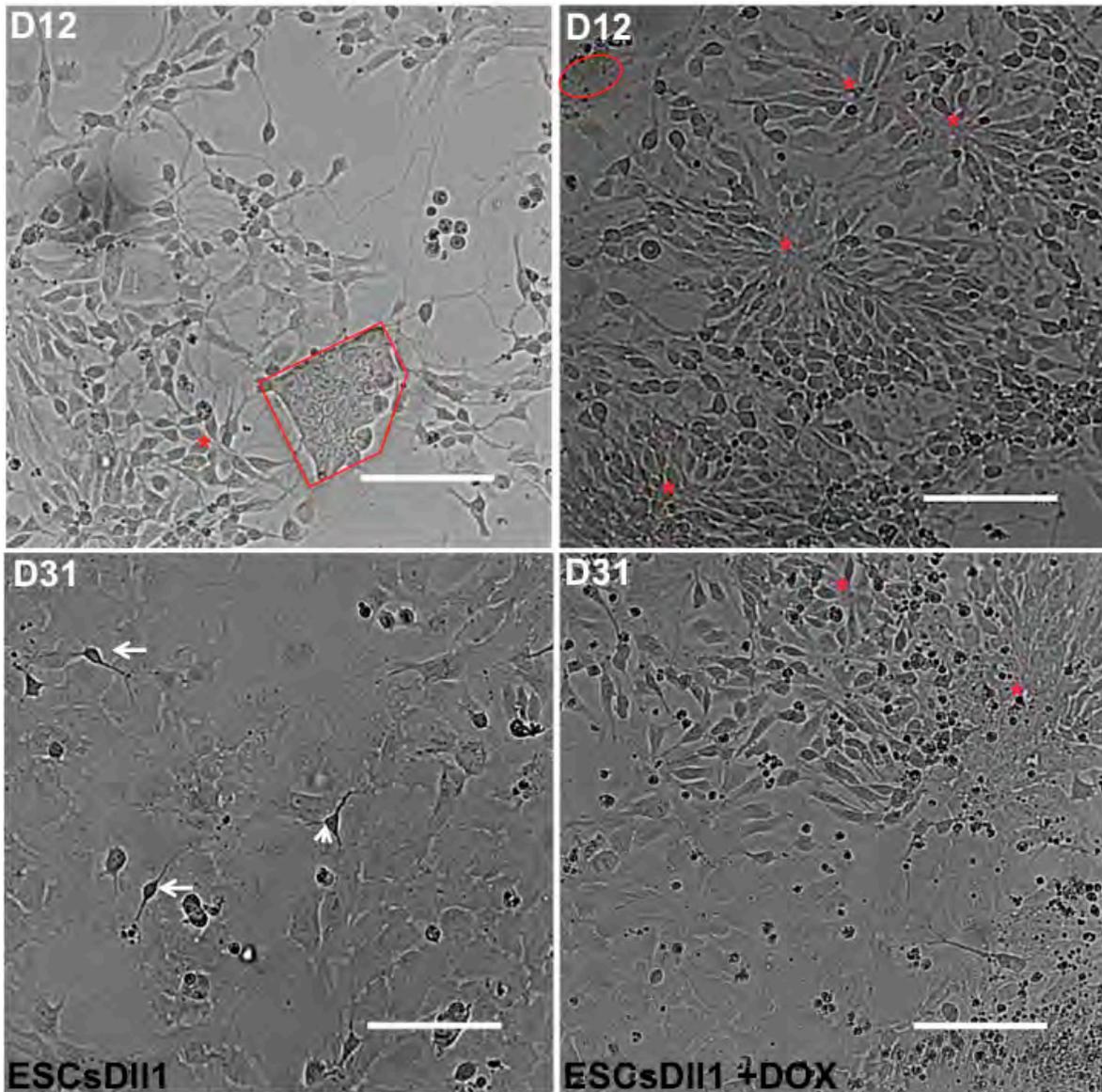


Figura 42: ESCs W9.5-DII1 diferenciadas a PNs. Con y sin Dox observamos la formación de células con morfología de PN. En asteriscos rojos están señalados los centros de rosetas neurales. En ambas condiciones encontramos agrupaciones de células con morfología diferente (rodeadas de rojo). En todos los casos observamos que los cultivos cambian morfológicamente a lo largo del tiempo, similar a los cultivos primarios. La barra de escala representa 100 μm .

Por su parte la adición de doxiciclina a los cultivos de células W9.5-DII1 provocó que en el día 31 aun observemos células de tamaño pequeño que forman estructuras que recuerdan a rosetas neurales. La inducción de DII1 parece ayudar al mantenimiento de una población que conserva la morfología de PN a lo largo del tiempo.

Hicimos inmunodetecciones contra marcadores neurales para elucidar la identidad de las células que nacen en los cultivos de ESCs sometidos al proceso de diferenciación neural. Usamos marcadores relevantes para calcular la eficiencia de nuestro protocolo de diferenciación y analizar el comportamiento de las células con el tiempo. En todos los casos comparamos a las células Dll1 con su contraparte WT, con y sin doxiciplina. En las figura 43 y 44 observamos imágenes representativas de los cultivos de células W9.5 WT y W9.5 WT+Dox respectivamente. En ambos casos observamos una buena proporción de células Sox1⁺/Nestina⁺ a los 17 días en N2B27. Estos cultivos además produjeron células Tubulina⁺. Estos resultados muestran que las ESCs W9.5 WT son capaces de producir PNs y neuronas. Es importante mencionar que los cultivos de ESCs WT tuvieron una proporción más alta de células negativas para los marcadores usados y que concuerdan con las células que se agrupan en colonia, lo que nos dice que en efecto estas células no diferenciaron hacia el linaje neural. Al día 31 notamos que las células Sox1⁺/Nestina⁺ que se conservan tienen morfología similar a los PNs de pases tardíos, lo que nos dice que los PNs provenientes de estas ESCs se comportan de forma similar a los PNs primarios. En el caso de la producción de neuronas vimos que a los 31 días las células Tubulina⁺ son prácticamente inexistentes en esta etapa del cultivo, resultado que concuerda con lo observado en los PNs primarios. Es importante mencionar que a pesar de que las colonias observadas en los primeros días disminuyen, la proporción de células negativas a los marcadores va en aumento, lo que nos sugiere que en estos cultivos se favorece el crecimiento de otro tipo celular no identificado.

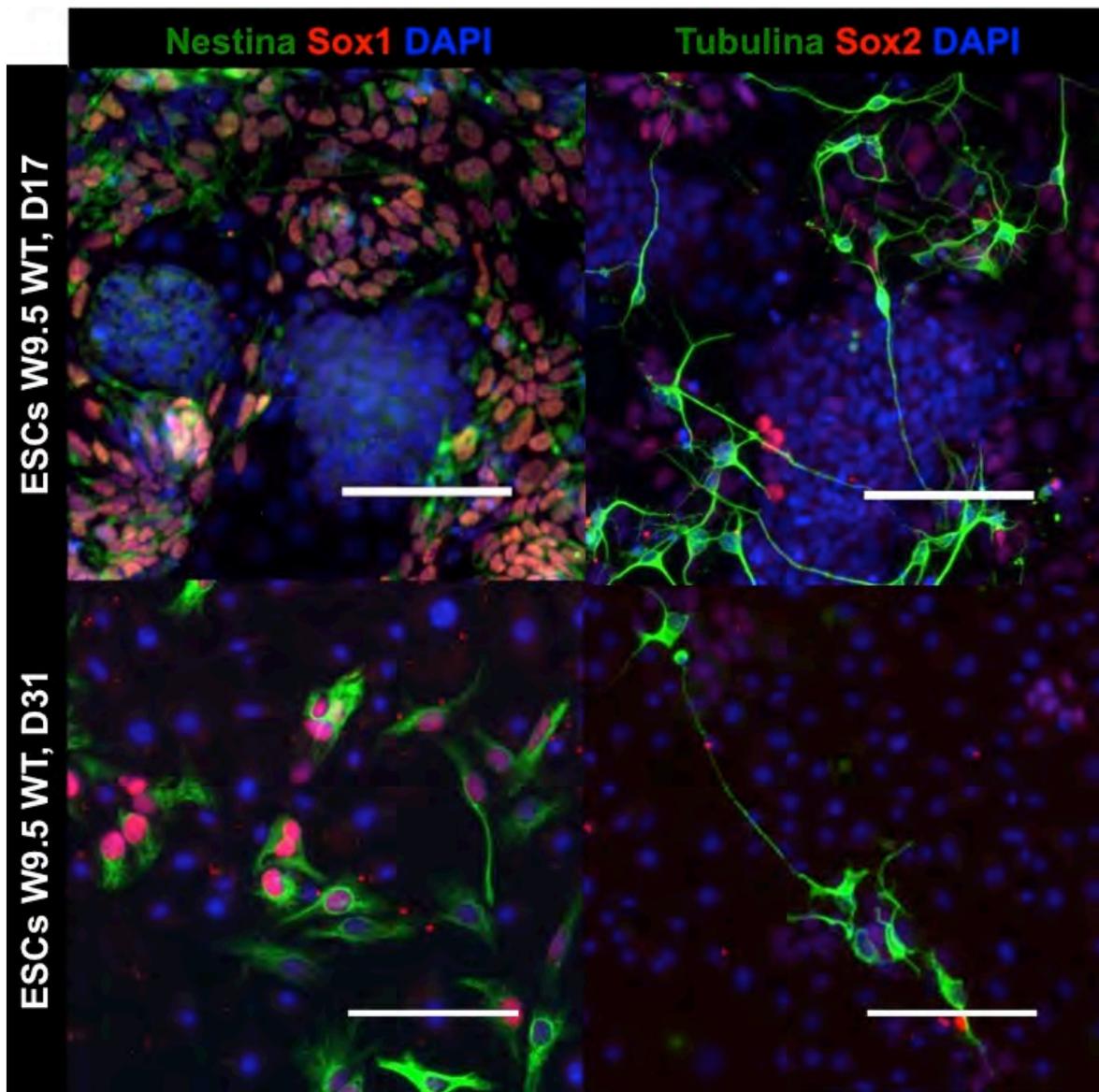


Figura 43: Inmunodetecciones de W9.5 WT. En la primera columna observamos a los marcadores neurales, Nestina (verde) y Sox1 (rojo). A los 31 días el número de células positivas a ambos marcadores disminuye. En la segunda columna observamos al marcador Sox2 (rojo) y β -tubulina⁺ (verde), en general observamos una caída en la proporción de células β -tubulina⁺

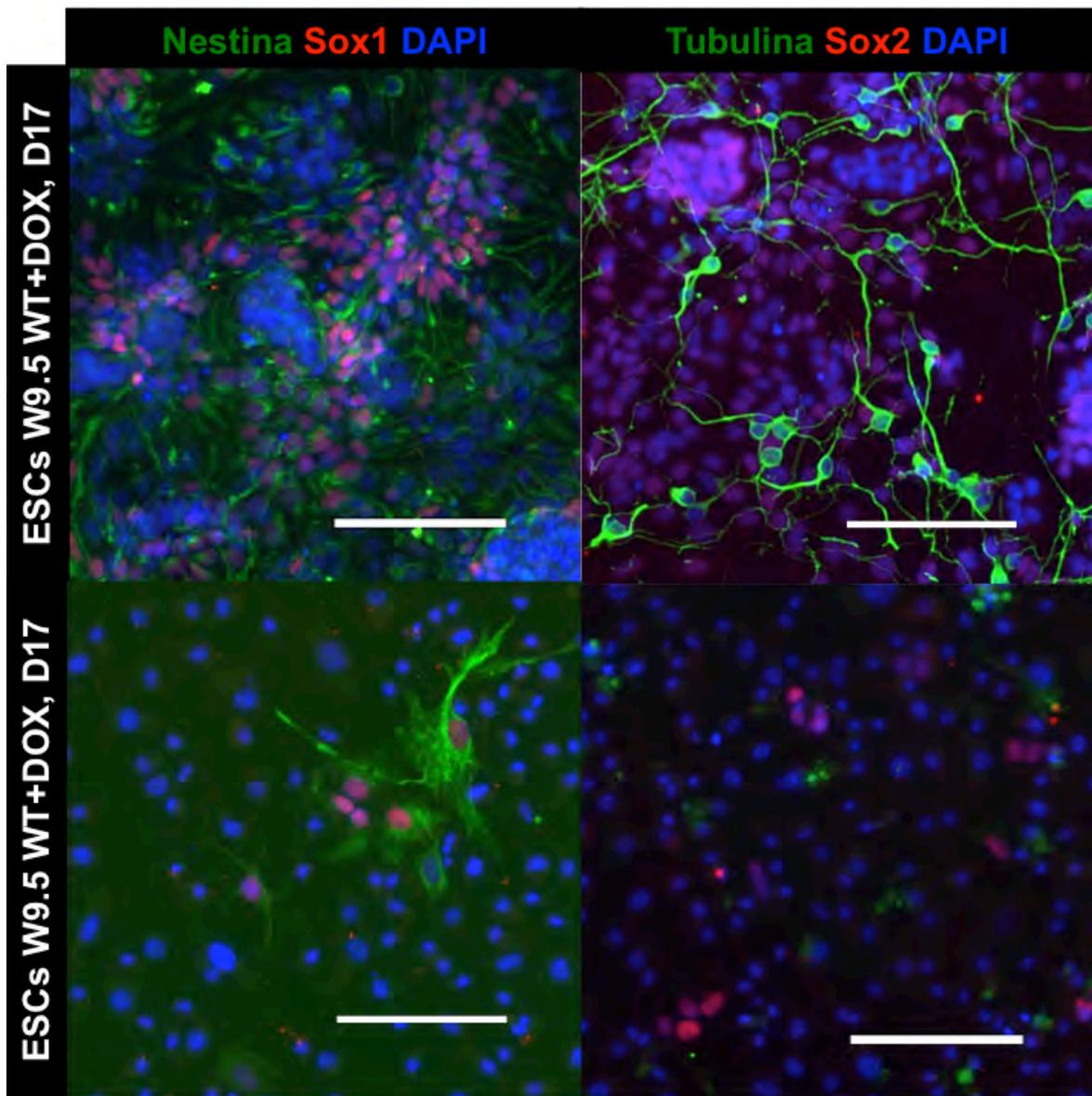


Figura 44: Inmunodetecciones de W9.5 WT en presencia de doxiciclina. En la primera columna observamos a los marcadores neurales, Nestina (verde) y Sox1 (rojo). A los 31 días el número de células positivas a ambos marcadores disminuye. En la segunda columna observamos al marcador Sox2 (rojo) y β -tubulina⁺ (verde), en general observamos una caída en la proporción de células Tubulina⁺. La barra representa 100 μ m.

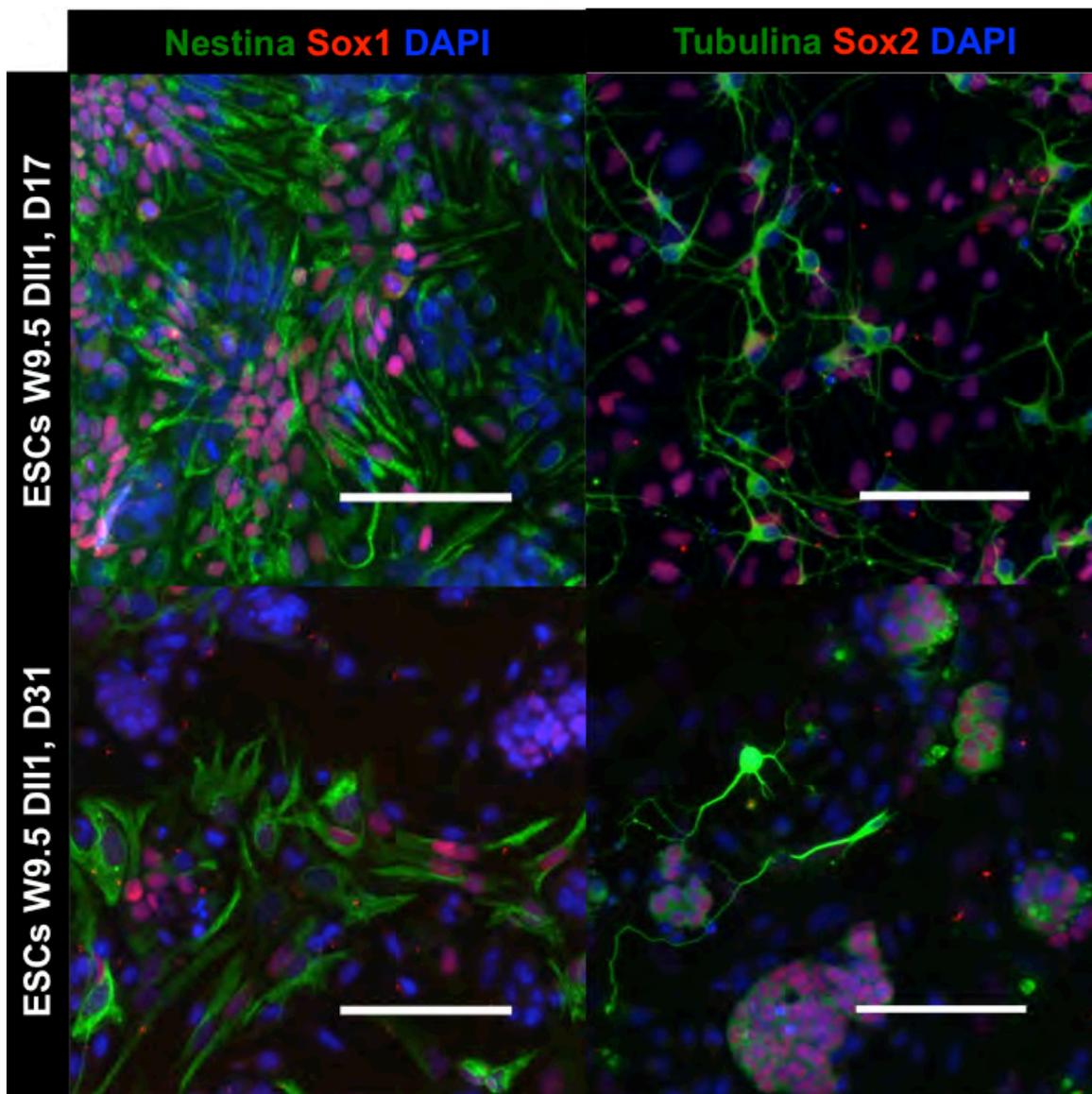


Figura 45: Inmunodetecciones en células W9.5-DII1 durante la diferenciación hacia PNs.
 ESCsDII1, estas células producen alto número de células Sox1⁺/Nestina⁺ y Tubulina⁺, al día 31 esta población se ve reducida. Al agregar doxiciclina para inducir DII1, vemos que la producción de células Sox1/Nestina y Tubulina se mantiene alta incluso en el día 31.

Los cultivos de células W9.5-DII1 también generaron células Sox1⁺/Nestina⁺ y β III tubulina⁺ en condiciones con y sin doxiciclina (figura 45 y figura 46). A diferencia de las WT, la proporción de células negativas para los marcadores fue menor. Además, en presencia de doxiciclina los cultivos de las W9.5 DII1 mantuvieron mayores cantidades de células positivas a Sox1⁺/Nestina⁺ y β III tubulina⁺ a pesar del tiempo.

Tomamos las inmunodetecciones anteriores para cuantificar el porcentaje de células positivas para cada marcador. El porcentaje de los marcadores se calculó usando como total a los núcleos Dapi⁺. Graficamos los datos obtenidos utilizando varios estadios temporales. En la figura 47 mostramos los resultados de la cuantificación en células WT y podemos observar que tanto las células positivas a marcadores de PNs y de neuronas disminuye con el tiempo en las dos condiciones.

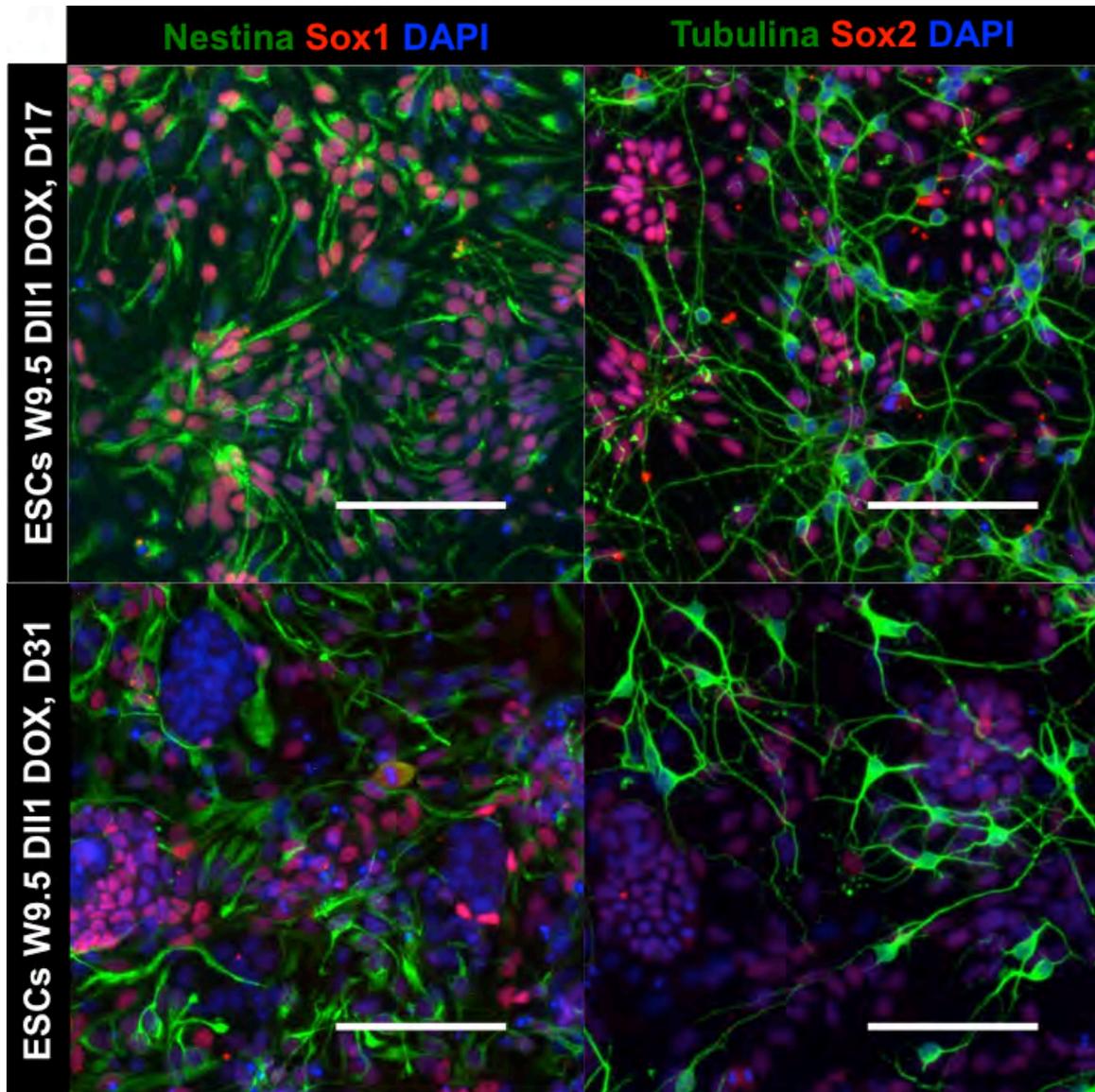


Figura 46: Inmunodetecciones en células W9.5-DII1+ Dox durante la diferenciación hacia PNs. En el primer panel observamos que sí se producen células Sox1⁺/Nestina⁺ y β III Tubulina⁺. En presencia de doxiciclina la producción de células Sox1⁺/Nestina⁺ y Tubulina⁺ se mantiene alta incluso en el día 31.

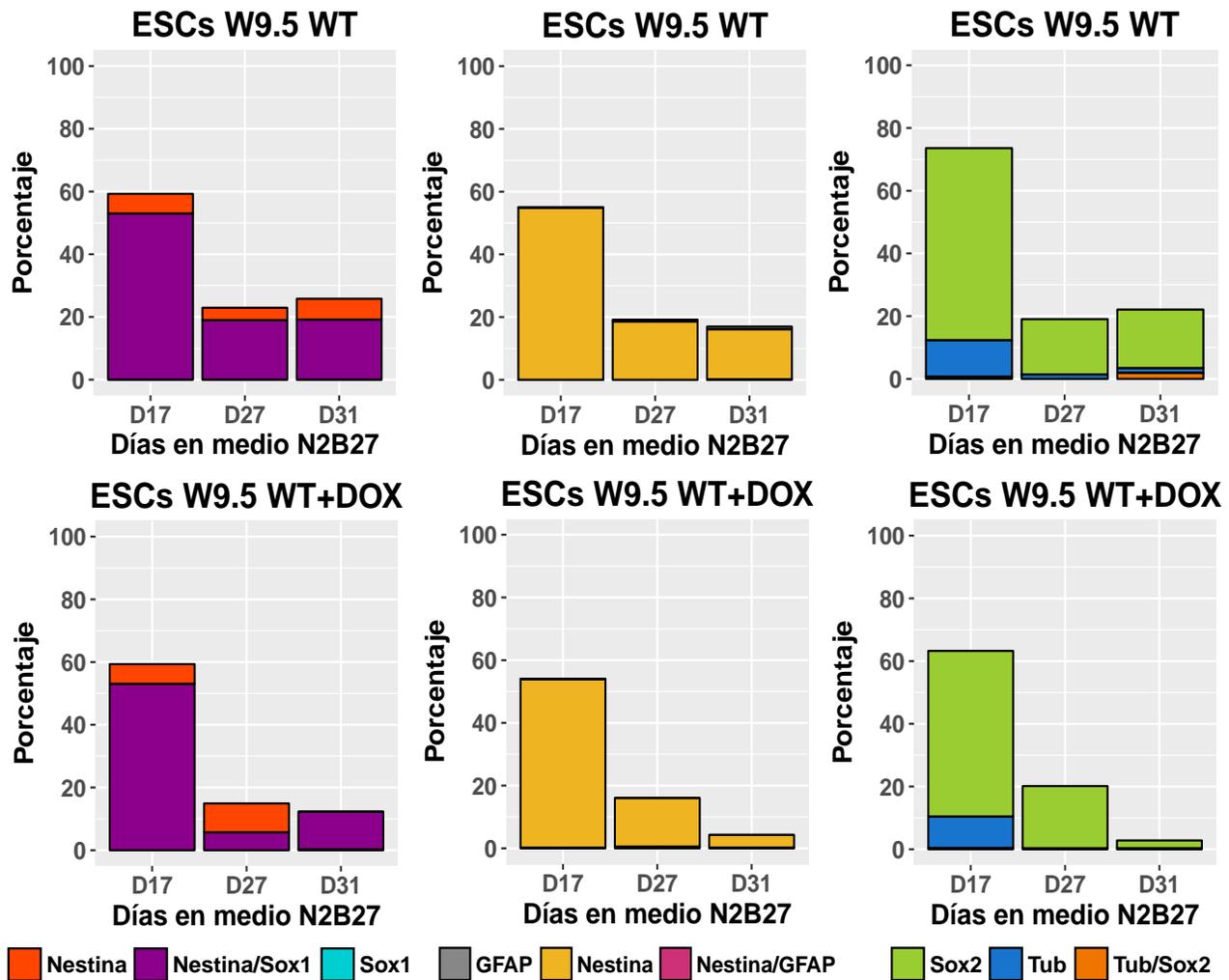


Figura 47: Porcentajes de células inmunorreactivas a marcadores neurales durante el protocolo de diferenciación hacia CTNs. En la primera columna observamos que alrededor del 50% de las células son Sox1/Nestina para ambas condiciones. Este porcentaje cae con el tiempo, llegando hasta el 10% con doxiciclina. La segunda columna muestra la proporción de células Nestina/Gfap. Aunque es posible detectar células Gfap desde etapas tempranas, estas no aumentan en ninguna de las condiciones. Por otro lado el cultivo produce 15% de células Tubulina+, este número cae dramáticamente con el tiempo en ambas condiciones.

En el caso de las ESCs Dll1, al día 17, el porcentaje de células Sox1⁺/Nestina⁺ es comparable al de las WT en condiciones con y sin doxiciclina, sin embargo las células Dll1 mantuvieron una proporción mayor de células positivas a marcadores neurales a lo largo del tiempo. En la figura 48 (primer panel) observamos que la proporción de células Sox1⁺/Nestina⁺ decayó con el tiempo, sin embargo, la caída fue lenta comparada con las ESCs WT. Este efecto

fue más notorio cuando inducimos la expresión de *Dll1* con la adición de doxiciclina. Observamos células $Gfap^+$ a lo largo de todo el cultivo, sin embargo esta población no aumentó considerablemente en ninguna de las condiciones, a diferencia de los cultivos primarios.

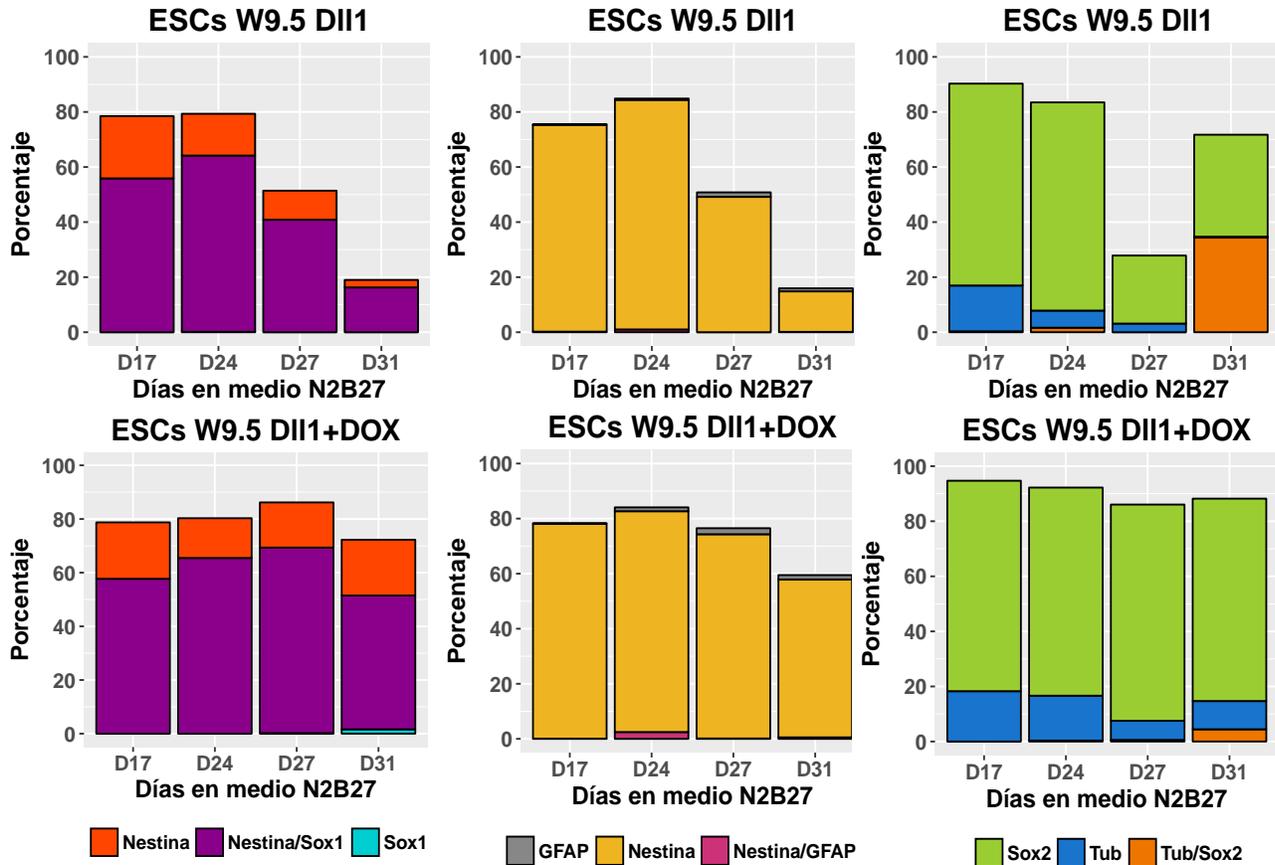


Figura 48: Porcentajes de células inmunorreactivas a marcadores neurales durante el protocolo de diferenciación hacia CTNs de las W9.5DII1. Las ESCs DII1 tienen un comportamiento similar al de las W9.5 WT. En adición de doxiciclina, los marcadores se conservan por periodos más largos de tiempo.

En cuanto a la producción de neuronas, las W9.5 Dll1 produjeron cerca de 20% de células β III tubulina⁺ en los primeros días de diferenciación, esta población disminuyó con el paso del tiempo. Sin embargo, notamos que en los últimos días (~30) se evidenció una población Sox2⁺Tubulina⁺ sin morfología neuronal (figura 45). Con la inducción de *Dll1*, notamos que la población Sox1⁺Nestina⁺ disminuyó a una razón menor, pues al día 31, 50% de la población es positiva para ambos marcadores. Además, la proporción de células Tubulina no disminuye de la misma manera que en el resto de los cultivos. Al día 31, ~20% de las células son β III-tubulina⁺. Es importante notar que el único cultivo que no disminuyó el porcentaje

de células Sox2⁺ es el cultivo de ESCs Dll1 con doxiciplina. Sox2 es un marcador tanto de PNs como de ESCs; el hecho de que disminuya con el tiempo, indica que los cultivos en estas condiciones no son capaces de conservar ninguna de estas poblaciones por periodos prolongados de tiempo.

En conjunto, estos resultados indican que activar Dll1 en ESCs diferenciadas a CTNs favorece la preservación de células Sox1⁺Nestina⁺ y Sox2⁺, y mantiene la producción de neuronas.

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Gracias a que hemos sido capaces de aislar y expandir a los PNs *in vitro*, nuestro entendimiento sobre su identidad y propiedades durante el desarrollo se ha revolucionado. Aun así, las metodologías *in vitro* muchas veces alteran la estructura tridimensional del tejido promoviendo la pérdida de contactos celulares, modificando el entorno extracelular y las cascadas de señalización. El resultado, la alteración de las propiedades biológicas y moleculares de estas células. Las CTNs tienen potencial terapéutico, sin embargo, es crucial poder manipular sus propiedades antes de mover el campo hacia procedimientos de reemplazo celular o regenerativos.

Una de las dificultades cuando trabajamos con CTNs es la pérdida de potencial neurogénico a lo largo del tiempo. En nuestros experimentos, nosotros observamos que las células originarias del cerebro medio ventral disminuyen su capacidad para producir neuronas. Esto lo sabemos por inmunodetecciones (figura 15) y por análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (figura 20). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente (Chung et al. 2006), donde los PNs del mesencéfalo embrionario ventral pierden la capacidad de producir neuronas. Además, este fenómeno va acompañado de cambios en la morfología celular (figuras 12 y 13) y la ganancia de la producción de células Gfap⁺ (figuras 16 y 17). Es claro que en los cultivos de E10.5 hay un cambio de potencial hacia el destino astrocítico. El modelo tripotente de las CTNs nos dice que estas pueden generar astrocitos, oligodendrocitos y neuronas a partir de la misma célula. Este caso se ha probado con ensayos clonales, pero los resultados dependen de la concentración de mitógenos, la etapa embrionaria de la que se tomaron las células y el tiempo en cultivo (Qian et al. 2000). Uno podría argumentar que durante el desarrollo las CTNs primero originan neuronas y luego células gliales, por lo que el fenómeno que observamos no sería una pérdida de potencial sino un cambio intrínseco a la célula. Este último caso parece ser el más acertado. El laboratorio desarrolló un modelo donde explica que los PNs tienen capacidad neurogénica transitoria, es decir, al principio sólo pueden producir neuronas pues las células no son responsivas a las señales astrogénicas, aún cuando las agregues al medio.

Pasado el tiempo de desarrollo, las células ganan la capacidad para responder a estas señales y durante un breve momento son bipotentes, para finalmente perder por completo la capacidad neurogénica y volverse células gliogénicas exclusivamente (Guerrero-Flores et al. 2017b). En apoyo a esta visión, se ha observado que las neuronas secretan factores que promueven la adquisición de fenotipos gliales, es decir que las células una vez diferenciadas hacia neuronas ayudan al cultivo a cambiar hacia el destino glial (Chang et al. 2003; Miller & Gauthier 2007). Incluso, existe la teoría de que el verdadero destino default de las CTNs es la generación de células gliales, pues en el cerebro adulto algunas poblaciones de astrocitos suelen servir como reservorio de CTNs (Doetsch 2003). Los resultados presentados en este trabajo, como los previamente reportados por nuestro grupo, concuerdan con un modelo en el que la CTN neural tripotente no existe y en cambio solo hay CTNs con potencial neurogénico que más adelante en el desarrollo se convierte en CTNs astrogénicas. Bajo este modelo, es interesante notar que las células con potencial astrogénico son las que mejor crecen *in vitro* las cuales, si bien aún muestran memoria de su capacidad neurogénica *in vitro*, *in vivo* solo son capaces de derivar a astrocitos (Guerrero-Flores et al. 2017b).

Independientemente de las propiedades intrínsecas de las células, es un hecho que el destino celular puede ser manipulado con señales externas. Por ejemplo, usar Fgf2 y/o EGF es común en los cultivos de CTNs de diversas áreas cerebrales. Aún así, los reportes muestran que la presencia de Fgf2 promueve la desmetilación del promotor de Gfap, en otras palabras, promueve astrogénesis (Song & Ghosh 2004); además, a concentraciones mayores de Fgf2 se forman más células gliales. Lo anterior ilustra que las condiciones de cultivo sí tienen efecto en el destino celular. A su vez, por la manera en que los PNs están organizados en el tubo neural, reciben diferentes señales que les permiten especificar un tipo neuronal en concreto. Los protocolos de diferenciación de ESCs hacia tipos neuronales específicos toman esta información para favorecer la adquisición de un fenotipo neuronal particular (Cai & Grabel 2007; Conti & Cattaneo 2010). Esto nos dice, de nuevo, que el destino celular es moldeable.

En la placa del piso del cerebro medio nacen los precursores dopaminérgicos. Existe la creencia de que las células de la placa del piso no se

dividen *in vitro* o lo hacen poco. En condiciones estandarizadas para cultivar células de otras regiones cerebrales, las células humanas del mesencéfalo ventral no proliferan ni diferencian *in vitro* (Storch et al. 2001; Svendsen et al. 1997; Svendsen et al. 1996). En nuestros experimentos, mostramos que gran parte de los cultivos de E10.5 están compuestos por células Lmx1A⁺ durante los primeros días (figura 14). Sin embargo, es importante mencionar que aunque este marcador es indetectable desde el segundo pase celular siguen siendo Sox2⁺ hasta el pase 5. Esto nos dice que en efecto el precursor dopaminérgico no se mantiene en división en estas condiciones de cultivo.

Una vía de señalización conocida por su participación en la toma de decisiones celulares es la vía de Notch. En el caso de la neurogénesis, la vía de Notch activa la transcripción de los factores de transcripción Hes. Estos a su vez reprimen la transcripción de genes proneurales, inhibiendo así la neurogénesis (Kageyama, Ohtsuka & Kobayashi 2008; Ohtsuka et al. 1999). Por esta razón, se cree que una de las funciones de la vía es conservar la poza de CTNs para que el sistema nervioso se desarrolle correctamente (Zhang et al. 2017).

Con el fin de activar la vía de señalización de Notch de forma controlada, construimos un transposón que permite la expresión inducible de Dll1 por la adición de doxicilina. Este transposón fue transfectado en fibroblastos de la línea STO, en donde pudimos probar que al inducir la expresión de Dll1 induce la expresión de *Notch1*, *Hes1* y *Hes5* en estas células (figura 33), por lo tanto, nuestra construcción es funcional. Pese a ello, los cocultivos de las STO-Dll1 con los PNs tuvieron resultados negativos. En primer lugar, aunque logramos cultivar ambas poblaciones en el mismo plato, estas no tuvieron interacción estrecha, misma que se requiere para activar la vía de Notch. Ambas poblaciones tenían un aspecto desmejorado, quizás como consecuencia de que las células STO necesitan suero y el medio de PNs carece de él.

Al intentar aplicar una estrategia similar usando la línea OP9-DL1, los resultados fueron de nuevo negativos. Las células OP9-DL1 y los PNs tampoco forman interacciones estrechas (figura 36). Además, observamos que los cultivos producen una gran cantidad de células Gfap⁺ en presencia de las líneas OP9. Las OP9 son células estromales de la médula ósea, como tales, secretan una gran

cantidad de factores, entre los cuales podrían estar varios factores astrogénicos dando como resultado la producción exacerbada de células Gfap⁺ (figuras 37 y 38). Con estos resultados decidimos optar por otras estrategias.

Usamos la construcción PB-Dll1 en ESCs W9.5 y las sometimos a un proceso de diferenciación hacia el linaje neural. Obtuvimos hasta el 80% de células Sox1⁺/Nestina⁺, con un promedio máximo de 60%. Este resultado es similar al del protocolo original (Ying & Smith 2003) en donde, hasta el 75% de las células obtenidas diferenciaron hacia el fenotipo neural. Es importante mencionar que obtuvimos células negativas para ambos marcadores en todas las condiciones y que aunque Nestina es uno de los marcadores más utilizados para identificar PNs, la presencia de un solo marcador muy pocas veces identifica a un tipo celular específico. Por ejemplo, existen células que son negativas para Nestina a pesar de ser PNs (Kukekov et al. 1997), y existen células que no son PNs y son Nestina⁺ (Selander & Edlund 2002). Si bien desconocemos si todas las células Nestina⁺ en nuestro protocolo son de fenotipo neural es muy probable que la mayoría lo sea dada la frecuencia de coexpresión con Sox1 y la continua actividad neurogénica del cultivo.

Es innegable que existen diferencias entre las W9.5 WT y las Dll1. Desde el día 12 en N2B27, las ESCs Dll1 en presencia de dox, producen más rosetas neurales y presentan menos células con morfología atípica a los PNs. Además, hay mayor producción de neuronas en estas condiciones a lo largo del tiempo y conservación de las células Sox1⁺/Nestina⁺ (figuras 46 y 48). Estos resultados contrastan con lo observado en los cultivos primarios de PNs, pues el porcentaje de inmunorreactividad a β III-tubulina decae casi a la mitad para el 5to pase celular.

Está reportado que, la activación de la vía de Notch en ESCs promueve una diferenciación más eficiente hacia el linaje neural (Lowell et al. 2006). Esto querría decir que los cultivos de células W9.5Dll1+Dox tendrían un mayor porcentaje de células Nestina⁺/Sox1⁺ en las primeras etapas del cultivo. Sin embargo, en el día 17 no observamos diferencias significativas para estos marcadores entre condiciones. Aun así, la línea W9.5-Dll1 presenta menor proporción de células sin morfología neural. Además, el marcador Sox2 sí presenta diferencias entre condiciones al día 17. Las W9.5 WT sólo llegan al 55% de células Sox2⁺ (figura

47), mientras que entre el 70-80% de las células Dll1 son Sox2⁺ independientemente de la adición de doxiciclina (figura 48). Esta última observación podría indicar que la expresión fuga de Dll1 en la clona usada es suficiente para tener un efecto visible durante el proceso de diferenciación. Recordemos que la expresión constitutiva de Sox2 inhibe la diferenciación neuronal y promueve el mantenimiento de características de PNs.

Al pasar del tiempo, las W9.5 disminuyen sus porcentajes de células inmunorreactivas a todos los marcadores usados, Nestina, Sox1, Sox2 y β III tubulina (figuras 43, 44 y 47). Esto concuerda con las fotografías en campo claro donde vemos que al paso del tiempo la población que compone el cultivo no tiene características neurales (figura 41). Las células W9.5-Dll1 con doxiciclina conservan estos marcadores con el paso del tiempo en mejores proporciones que el resto de los cultivos (figuras 46 y 48), por lo que podemos concluir que este efecto es causado por la inducción de la expresión de *Dll1*.

Por otra parte, observamos un fenómeno inesperado durante estos experimentos; la aparición de células Sox2+Tubulina+ en las etapas tardías. Aunque detectamos esto en todas las condiciones en proporciones muy bajas, estas células son muy evidentes en los cultivos Dll1 sin doxiciclina, en donde hasta el 33% de las células son positivas para ambos marcadores. A pesar de ser β III tubulina⁺, estas células no poseen morfología neuronal y se agrupan en una especie de cúmulos parecidos a colonias de ESCs. Sox2 es considerado un marcador de PNs que proliferan, mientras que β III tubulina es un marcador de neuronas posmitóticas. En el tubo neural en desarrollo los dominios de expresión de ambos marcadores son mutuamente excluyentes, aún así, es posible encontrar células positivas para ambos en la frontera, pero en frecuencias muy bajas (Graham et al. 2003; Cavallaro et al. 2008). Este fenómeno podría reflejar un estado pasajero en el proceso de diferenciación neuronal, es decir, que las células estén atrapadas en un estado en el que ya no son PNs pero no son neuronas aún. Este estado podría ser dependiente de los niveles de expresión de *Dll1*, ya que está exacerbado en las ESCsDll1 sin inducción; los niveles de *Dll1* en estas células no son suficientes para mantener la expresión de marcadores de PNs pero

sí para atrapar a las células en un estado cuya existencia en la naturaleza sea tan breve que es indetectable.

Con los datos recabados en este trabajo, podemos concluir lo siguiente:

- Los PNs del cerebro medio ventral disminuyen su capacidad para producir neuronas y en cambio ganan capacidad astrogénica con el tiempo en cultivo.
- Los cocultivos de PNs con células OP9 o STO no son viables para probar nuestra hipótesis pues no hay interacción estrecha entre células.
- La construcción PB-Dll1 es funcional; la inducción con doxiciclina aumenta los niveles de expresión de *Notch1*, *Hes1* y *Hes5* en células STO.
- La sobreexpresión de Dll1 durante la diferenciación de ESCs al linaje neural contribuye a mantener una población de PNs con capacidad neurogénica.

Por otra parte, quedan pendientes experimentos para responder otras preguntas:

- Corroborar que el efecto de Dll1 en las ESCs sea consecuencia de la activación de la vía de Notch usando por ejemplo el inhibidor de la γ -secretasa para bloquear la vía. Este experimento además nos permitiría saber si la producción de células Sox2⁺/βIII Tubulina⁺ es consecuencia de la expresión fuga de *Dll1*.
- Validar los resultados de las inmunocitoquímicas de las ESCs haciendo análisis de expresión, así como conocer los niveles de otros marcadores relevantes. Por ejemplo, los niveles de los efectores de la vía de Notch, genes proneurales, marcadores astrocíticos.
- Usando la información anterior, inferir efectores o interacciones responsables de los fenómenos provocados por la inducción de Dll1.
- Hacer experimentos para ver si los efectos de Dll1 ocurren también en PNs del mesencéfalo ventral. Para esto podremos usar los ratones quimera que están en proceso de producción o someter a las ESCs Dll1 a un protocolo de diferenciación para obtener neuronas dopaminérgicas (Lee et al. 2000).

- Averiguar más acerca de las células Sox2⁺/ βIII Tubulina⁺, si son células atrapadas en un estado transitorio o producto por ejemplo de un fenómeno de dediferenciación. Indagar sobre su capacidad de división y posible malignidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, L. et al., 2007. Gene expression changes in long term expanded human neural progenitor cells passaged by chopping lead to loss of neurogenic potential in vivo. *Experimental neurology*, 204(2), pp.512–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306795>.
- Arenas, E., Denham, M. & Villaescusa, J.C., 2015. How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development (Cambridge, England)*, 142(11), pp.1918–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26015536>.
- Aubert, J. et al., 2003. Screening for mammalian neural genes via fluorescence-activated cell sorter purification of neural precursors from Sox1-gfp knock-in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl(90001), pp.11836–41. Available at: http://www.pnas.org/content/100/suppl_1/11836.short.
- Bertrand, N., Castro, D.S. & Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(7), pp.517–530. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn874>.
- Bianchi, S., Dotti, M.T. & Federico, A., 2006. Physiology and pathology of notch signalling system. *Journal of Cellular Physiology*, 207(2), pp.300–308.
- Bray, S.J., 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(9), pp.678–689.
- Brouhard, G.J. & Rice, L.M., 2018. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, p.1. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41580-018-0009-y>.
- Cahoy, J.D. et al., 2008. A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *Journal of Neuroscience*, 28(1), pp.264–278. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>.

- Cai, C. & Grabel, L., 2007. Directing the differentiation of embryonic stem cells to neural stem cells. *Developmental Dynamics*, 236(12), pp.3255–3266.
- Cavallaro, M. et al., 2008. Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development*, 557, pp.541–557.
- Chang, M.Y. et al., 2003. Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes, respectively. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23(3), pp.414–426.
- Chiba, S., 2006. Notch signaling in stem cell systems. *Stem cells*, 24(11), pp.2437–2447.
- Chung, S. et al., 2006. Neural precursors derived from embryonic stem cells, but not those from fetal ventral mesencephalon, maintain the potential to differentiate into dopaminergic neurons after expansion in vitro. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(6), pp.1583–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2613224&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Conti, L. & Cattaneo, E., 2010. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nature Reviews Neuroscience*, 11(mArCH). Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrn2761>.
- Davie, C.A., 2008. A review of Parkinson's disease. *British Medical Bulletin*, 86(1), pp.109–127.
- Desai, A.R. & McConnell, S.K., 2000. Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development*, 127(13), pp.2863–2872.
- Doetsch, F., 2003. The glial identity of neural stem cells. *Nature Neuroscience*, 6(11), pp.1127–1134.
- Eng, L.F., 1985. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 8(C), pp.203–214.

- Feng, R. et al., 2013. Sox2 protects neural stem cells from apoptosis via up-regulating survivin expression. *The Biochemical journal*, 450, pp.459–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301561>.
- Finlay, B. & Darlington, R., 1995. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science*, 268(5217), pp.1578–1584. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.7777856>.
- Furlan-Magaril, M. & Covarrubias, L., 2004. Neural Stem Cells in Development and Regenerative Medicine. *Archives of Medical Research*, 34(2003), pp.572–588.
- Götz, M. & Huttner, W.B., 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), pp.777–788.
- Graham, V. et al., 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39(5), pp.749–765.
- Grant, S.G.N. et al., 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), pp.4645–4649.
- Guerrero-Flores, G. et al., 2017a. Functional determination of the differentiation potential of ventral mesencephalic neural precursor cells during dopaminergic neurogenesis. *Developmental Biology*, 429(1), pp.56–70. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.008>.
- Guerrero-Flores, G. et al., 2017b. Functional determination of the differentiation potential of ventral mesencephalic neural precursor cells during dopaminergic neurogenesis. *Developmental Biology*, (July), pp.1–15. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160617300969>.
- Guillemot, F., 2007. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development*, 134(21), pp.3771–3780. Available at: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.006379>.
- Hegarty, S. V. et al., 2014. Ventral midbrain neural stem cells have delayed

neurogenic potential in vitro. *Neuroscience Letters*, 559, pp.193–198.
Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.009>.

Hegarty, S. V., Sullivan, A.M. & O’Keeffe, G.W., 2013. Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Developmental Biology*, 379(2), pp.123–138. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.014>.

Hirabayashi, Y. & Gotoh, Y., 2005. Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. *Neuroscience Research*, 51(4), pp.331–336.

Imayoshi, I. et al., 2010. Essential Roles of Notch Signaling in Maintenance of Neural Stem Cells in Developing and Adult Brains. *The Journal of Neuroscience*, 30(9), pp.3489–3498. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/30/9/3489><http://www.jneurosci.org/content/30/9/3489.full.pdf><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203209>.

Imayoshi, I. et al., 2013. Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6163), pp.1203–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24179156>.

Ishibashi, M. et al., 1994. Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *The EMBO journal*, 13(8), pp.1799–805. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=395019&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Jaeger, I. et al., 2011. Temporally controlled modulation of FGF/ERK signaling directs midbrain dopaminergic neural progenitor fate in mouse and human pluripotent stem cells. *Development*, 138(20), pp.4363–4374. Available at: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.066746>.

Joksimovic, M. et al., 2009. Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 12(2), pp.125–131. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.2243>.

- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., et al., 2008. Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nature Neuroscience*, 11(11), pp.1247–1251. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nn.2208>.
- Kageyama, R. et al., 2005. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Experimental Cell Research*, 306(2), pp.343–348.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T. & Kobayashi, T., 2008. Roles of Hes genes in neural development. *Development Growth and Differentiation*, 50(SUPPL. 1).
- Kawaguchi, D. et al., 2013. Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nature Communications*, 4(May), pp.1–12. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms2895>.
- Kawaguchi, D. et al., 2008. Selection of differentiating cells by different levels of delta-like 1 among neural precursor cells in the developing mouse telencephalon. *Development (Cambridge, England)*, 135(23), pp.3849–3858.
- Kele, J. et al., 2006. Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development*, 133(3), pp.495–505. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410412>.
- Kelley, A.E. & Berridge, K.C., 2002. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(9), pp.3306–3311.
- Kobayashi, T. et al., 2009. The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes and Development*, 23(16), pp.1870–1875.
- Kopan, R. & Ilagan, M.X.G., 2009. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*, 137(2), pp.216–233.
- Kukekov, V.G. et al., 1997. A nestin-negative precursor cell from the adult mouse brain gives rise to neurons and glia. *Glia*, 21(4), pp.399–407. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9419015>.

- Lahti, L., 2012. *FGF SIGNALING IN NEUROGENESIS AND PATTERNING OF THE DEVELOPING MIDBRAIN AND ANTERIOR HINDBRAIN*. PhD Thesis University of Helsinki.
- Lardelli, M. et al., 1996. Expression of the Notch 3 intracellular domain in mouse central nervous system progenitor cells is lethal and leads to disturbed neural tube development. *Mechanisms of Development*, 59(2), pp.177–190.
- Laruelle, M., 2013. The second revision of the dopamine theory of schizophrenia: Implications for treatment and drug development. *Biological Psychiatry*, 74(2), pp.80–81. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.016>.
- Lee, M.K. et al., 1990. The Expression and Posttranslational Modification of a Neuron-Specific Beta-Tubulin Isotype During Chick Embryogenesis. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 132, pp.118–132.
- Lee, S. et al., 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 18, pp.675–679.
- Liu, J. et al., 2010. *Notch Signaling in the Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation*, Elsevier Inc. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91012-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91012-7).
- Lowell, S. et al., 2006. Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biology*, 4(5), pp.805–818.
- Martínez, S., 2001. The isthmus organizer and brain regionalization. *International Journal of Developmental Biology*, 45(1), pp.367–371.
- Masamizu, Y. et al., 2006. Real-time imaging of the somite segmentation clock: Revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), pp.1313–1318. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508658103>.
- Mesman, S., Krüse, S.J. & Smidt, M.P., 2018. Expression analyzes of early factors

- in midbrain differentiation programs. *Gene Expression Patterns*, 27, pp.8–15.
Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gep.2017.09.001>.
- Michalczyk, K. & Ziman, M., 2005. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histology and histopathology*, 20(2), p.665—671. Available at: <https://doi.org/10.14670/HH-20.665>.
- Miller, F.D. & Gauthier, A.S., 2007. Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron*, 54(3), pp.357–369.
- Mizutani, K. et al., 2007. Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature*, 449(7160), pp.351–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721509>.
- Muñoz-Sanjuán, I. & Brivanlou, A.H., 2002. Neural Induction, the Default Model and Embryonic Stem Cells. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(4), pp.271–280. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn786>.
- Ohtsuka, T. et al., 1999. Hes1 and Hes5 as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *The EMBO Journal*, 18(8), pp.2196–2207.
- Ono, Y. et al., 2007. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development*, 134(17), pp.3213–3225. Available at: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.02879>.
- Pevny, L.H. & Nicolis, S.K., 2010. Sox2 roles in neural stem cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(3), pp.421–424.
- Placzek, M. & Briscoe, J., 2005. The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(March), pp.230–240.
- Qian, X. et al., 2000. Timing of CNS Cell Generation. *Neuron*, 28(1), pp.69–80. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627300000866>.
- R&D Systems, 2003. Neural Stem Cells & Differentiation Markers. , pp.2–6.

- Rowitch, D.H. & Kriegstein, A.R., 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*, 468(7321), pp.214–222.
- Sadler, T.W., 2005. Embryology of neural tube development. *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*, 135 C(1), pp.2–8.
- Saga, Y. et al., 1991. Murine tenascin: cDNA cloning, structure and temporal expression of isoforms. *Gene*, 104(2), pp.177–185.
- Scadden, D.T., 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441(7097), pp.1075–1079. Available at:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature04957>.
- Scherer, T. et al., 2011. Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. *Cell Metabolism*, 13(2), pp.183–194. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.008>.
- Schmitt, T.M. & Zúñiga-Pflücker, J.C., 2002. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity*, 17(6), pp.749–756.
- Scholzen, T. & Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182(3), pp.311–322. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653597>
<http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-4652%28200003%29182%3A3%3C311%3A%3AAID-JCP1%3E3.0.CO%3B2-9>.
- Seaberg, R.M. et al., 2004. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nature Biotechnology*, 22(9), pp.1115–1124.
- Selander, L. & Edlund, H., 2002. Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mechanisms of Development*, 113(2), pp.189–192.
- Shimazaki, T., 2015. Vertebrate Neural Stem Cells: Development, Plasticity, and Regeneration. *The Keio Journal of Medicine*. Available at:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/kjm/advpub/0/advpub_2015-0005-IR/_article.

Shimojo, H., Ohtsuka, T. & Kageyama, R., 2008. Oscillations in Notch Signaling Regulate Maintenance of Neural Progenitors. *Neuron*, 58(1), pp.52–64.

Shults, C.W. et al., 1990. Dopaminergic cells align along radial glia in the developing mesencephalon of the rat. *Neuroscience*, 38(2), pp.427–436.

Siebel, C. & Lendahl, U., 2017. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiological Reviews*, 97(4), pp.1235–1294.
Available at:
<http://physrev.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physrev.00005.2017>.

Singh, N. et al., 2013. Murine craniofacial development requires Hdac3-mediated repression of Msx gene expression. *Developmental Biology*, 377(2), pp.333–344.

Smidt, M.P. & Burbach, J.P.H., 2007. How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(1), pp.21–32.

Song, M.-R. & Ghosh, A., 2004. FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nature neuroscience*, 7(3), pp.229–35. Available at:
http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=CitingArticles&qid=9&SID=3AK7CHrHbtki2OaNA9v&page=1&doc=2&cacheurlFromRightClick=no%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14770186.

Stern, C., 2002. *Essential Developmental Biology: No-frills developmental biology*, Available at:
<http://discovery.ucl.ac.uk/111422/%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892402022675>.

Stern, C.D., 2005. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development*, 132(9), pp.2007–2021. Available at:
<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.01794>.

- Storch, a et al., 2001. Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Experimental neurology*, 170(2), pp.317–325.
- Sun, T. et al., 2011. A comparison of proliferative capacity and passaging potential between neural stem and progenitor cells in adherent and neurosphere cultures. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(7), pp.723–731.
- Svendsen, C.N. et al., 1997. Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 148(1), pp.135–46. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488697966346>.
- Svendsen, C.N. et al., 1996. Survival and Differentiation of Rat and Human Epidermal Growth Factor-Responsive Precursor Cells Following Grafting into the Lesioned Adult Central Nervous System. *Experimental Neurology*, 137(2), pp.376–388. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8635554%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8635554%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488696900394.
- Szabo, P. & Mann, J.R., 1994. Expression and methylation of imprinted genes duping in-vitro differentiation of mouse parthenogenetic and androgenetic embryonic stem-cell lines. *Development*, 120, pp.1651–1660.
- Temple, S., 2001. The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859), pp.112–117.
- Tropepe, V. et al., 2001. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: A primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron*, 30(1), pp.65–78.
- Trujillo-Paredes, N. et al., 2016. Regulation of differentiation flux by Notch signalling influences the number of dopaminergic neurons in the adult brain. *Biology Open*, 1, pp.1–12. Available at:

<http://bio.biologists.org/cgi/doi/10.1242/bio.013383>.

Vukicevic, V. et al., 2010. Genetic instability and diminished differentiation capacity in long-term cultured mouse neurosphere cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(2), pp.124–132.

Wallén, A. & Perlmann, T., 2003. Transcriptional control of dopamine neuron development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, pp.48–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12846973>.

Wiese, S., Karus, M. & Faissner, A., 2012. Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Frontiers in Pharmacology*, 3 JUN(June), pp.1–13.

Wilson, P.G. & Stice, S.S., 2006. Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews*, 2(1), pp.67–77.

Wong, R.H.F. et al., 2009. A Role of DNA-PK for the Metabolic Gene Regulation in Response to Insulin. *Cell*, 136(6), pp.1056–1072. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.040>.

Yamane, T. et al., 2005. Enforced Bcl-2 expression overrides serum and feeder cell requirements for mouse embryonic stem cell self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), pp.3312–7. Available at: <http://www.pnas.org/content/102/9/3312.full>.

Ying, Q.L. & Smith, A.G., 2003. Defined Conditions for Neural Commitment and Differentiation. *Methods in Enzymology*, 365, pp.327–341.

Zhang, R., Engler, A. & Taylor, V., 2017. Notch: an interactive player in neurogenesis and disease. *Cell and Tissue Research*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-017-2641-9>.

Zhao, X. et al., 2009. The N-Myc-DLL3 Cascade Is Suppressed by the Ubiquitin Ligase Huwe1 to Inhibit Proliferation and Promote Neurogenesis in the Developing Brain. *Developmental Cell*, 17(2), pp.210–221.

Anexo I

Controles negativos de fluoróforos

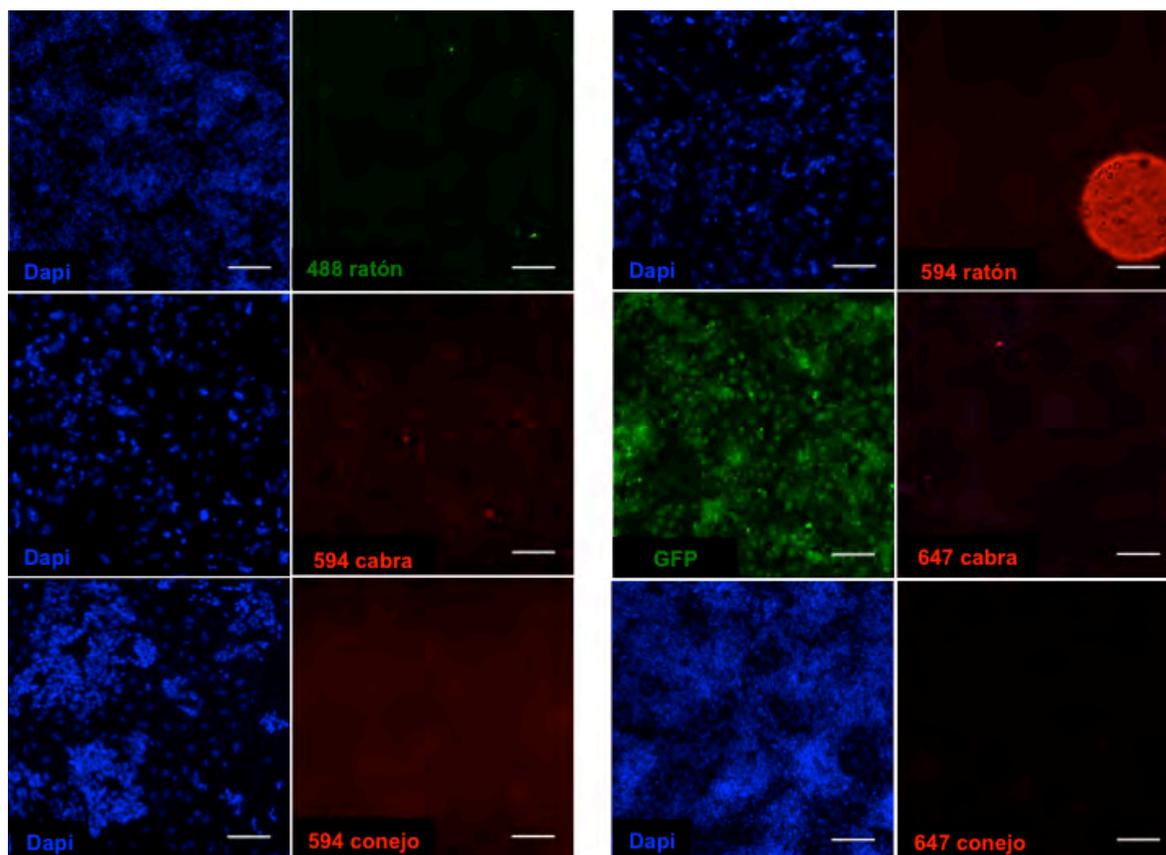


Figura 49: Controles negativos de los fluoróforos usados en este trabajo. En algunos casos es posible ver más fondo que en otros.