



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Actividad de telomerasa y regulación del ciclo celular
durante la transición de la fase de neurogénesis a la fase
de gliogénesis en la médula espinal

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
LEONORA OLIVOS CISNEROS

TUTOR PRINCIPAL:
DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
COMITÉ TUTOR:
DR. LUIS F. COVARRUBIAS ROBLES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DR. LUIS A. HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Mayo, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi madre, por inspirar y guiar todos y cada uno de mis pasos

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, la **Universidad Nacional Autónoma de México** por los primeros 30 años de mi formación profesional y humana.

Al **Instituto de Investigaciones Biomédicas** (IIBm) por toda la preparación científica que recibí durante la licenciatura y el doctorado.

Al **Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas** y al apoyo financiero del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

Al **Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina** por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y su contribución a mi formación académica. Porque en su laboratorio aprendí que hay muchas formas de hacer las cosas y tuve la libertad de escoger mi estilo.

Al **Dr. Jesús Ramírez Santos** por ser un ejemplo a seguir; por el gusto y la dedicación con la que desempeña su trabajo. Muchas gracias por la infinita paciencia y por el apoyo para sacar adelante este proyecto, porque si no hubiera sido en equipo, no hubiera sido.

A la **Dra. Carmen Gómez Eichelmann** por ser una pieza clave en mi formación, por todas sus enseñanzas y todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado de grado que revisaron minuciosamente esta tesis: **Dr. Iván Velasco**, **Dra. Aliesha González**, **Dra. Leonor Pérez** y **Dra. Diana Escalante**. Muchas gracias por la pertinencia de sus observaciones que permitieron que este escrito quedara lo mejor posible.

A los miembros del laboratorio del Dr. Gutiérrez con quienes tuve la oportunidad de convivir: Ana Ingrid, Danna, Fernanda, Giselle, Eduardo, Jatziri, Marcela, Queletzú, Raquel, Sarafí, Silvia, Ximena; a todos los considero valiosos compañeros que apoyaron la realización de este trabajo y amigos que llenaron estos años de increíbles anécdotas; gracias por hacer del laboratorio un equipo que siempre recordaré con mucho afecto.

A la **Dra. Ingrid Fetter Pruneda**, por su amistad y sus constantes enseñanzas científicas y de vida; por los buenos viajes, la buena música, y todos los seminarios que compartimos.

Al **Dr. Pablo Hofmann Salcedo** por el ejemplo de disciplina y la complicidad para reorganizar el mundo; por las largas caminatas y ricas charlas.

A la **Dra. Julieta Mendoza Torreblanca** por las enseñanzas, las porras, los ánimos y por creer más que yo en que podría alcanzar esta meta.

A la **Dra. Esperanza Meléndez Herrera** por ser la maestra de las disecciones que fueron fundamentales para este trabajo; pero sobre todo por las discusiones científicas que enriquecieron el proyecto.

Al personal del bioterio del IIBm, en especial a la **MVZ Georgina Díaz Herrera**, cuyo apoyo en el cuidado y programación de las cruzas fue fundamental para la realización de este trabajo.

Al personal del Instituto de IIBm a quienes recurrí en innumerables ocasiones: Azucena Ayala, Blanca Huerta, Cynthia Lima, Fabiola Melgarejo, Juan Luis Vázquez, Martha Melgarejo, Salomón Martínez.

Al apoyo que recibí por parte de los miembros de otros laboratorios del IIBm encabezados por la Dra. Leticia Rocha, la Dra. Clorinda Arias y el Dr. Jesús Chimal.

Un agradecimiento muy especial al **Dr. Daniel Kronauer**, Universidad Rockefeller, por darme la oportunidad y el honor de ser parte de su equipo. Por su apoyo y respaldo académico cuando lo he necesitado. Pero sobre todo por la inspiración constante para seguir disfrutando hacer ciencia.

A mi familia, en especial a mi hermano, **Leonardo Olivos Pérez**, por tu respaldo y tu cariño en esta y en otras vidas; a los que me vieron nacer y crecer, familia Cisneros-Alvarado; pero muy en especial a los que han tomado el riesgo de adoptarme, familias, Martínez-Flores, Campos-López y Bustabad-Hernández. A todos los quiero y los admiro mucho. Muchas gracias por su apoyo y comprensión, pero sobre todo por todo su cariño.

A la única e inigualable **Penélope Martínez Campos**, por ser como eres, por todo lo que representas, por todo lo que hemos vivido, crecido y aprendido juntas, pero sobre todo por todo lo que hemos reído juntas y lo que nos falta.

Por último, a la más importante, mi madre, **Antelma Cisneros Alvarado** por ser la mujer que más admiro, el ser que más amo, gracias por TODO. Por educarme con el ejemplo, por tu congruencia de vida, por el apoyo constante y por la confianza que siempre me has tenido; me siento la persona más afortunada por poder contar siempre con tu inmensurable cariño y sabiduría con los que siempre me has nutrido.

ÍNDICE

◆ Resumen	1
◆ Abstract	2
◆ Introducción	3
◆ Antecedentes:	4
> Células troncales	
> Células troncales neurales	
> Desarrollo del sistema nervioso central	
> Neurogénesis adulta	
• Pérdida del potencial neurogénico de las células troncales neurales durante el desarrollo del sistema nervioso central	
• La zona subventricular, una zona de excepción	
> Telómeros y telomerasa	
• Telómeros en el sistema nervioso central	
> Ciclo celular	
• Control del ciclo celular en las células troncales neurales	
◆ Planteamiento del problema	28
◆ Hipótesis	29
◆ Objetivo general	29
◆ Objetivos particulares	29
◆ Modelo de estudio	30
◆ Materiales y métodos:	31
> Caracterización inmunohistoquímica de la médula espinal cervical de ratón	
> Extracción de proteínas para cuantificación o ensayo de actividad enzimática	
> Cuantificación de proteínas mediante Western blot	
> Cuantificación de actividad de telomerasa: ensayo TRAPeze	
> Cultivo de células troncales neurales: modelo de neuroesferas	
> Caracterización inmunohistoquímica de las neuroesferas	
> Ensayo para medir proliferación celular	
> Extracción, cuantificación de mRNA y PCR	
> Análisis estadístico	

◆ Resultados:	37
> Validación del modelo de estudio: Al día embrionario 11, las células progenitoras neurales son neurogénicas y expresan de forma abundante la subunidad catalítica de la enzima telomerasa	
> El nivel de la enzima telomerasa y su actividad disminuyen durante la transición de neurogénesis a gliogénesis <i>in vivo</i>	
> Validación del modelo de neuroesferas: el potencial de diferenciación observado <i>in vivo</i> se conserva <i>in vitro</i>	
> La actividad de telomerasa no disminuye durante la transición de neurogénesis a gliogénesis <i>in vitro</i>	
> Las células troncales neurales con potencial neurogénico se dividen más rápido, su ciclo celular es más corto	
> El nivel de algunos reguladores del ciclo celular aumenta durante la transición a gliogénesis <i>in vitro</i>	
> Alargar el ciclo celular no afecta el potencial de diferenciación de las neuroesferas neurogénicas	
◆ Discusión:	48
> Modelo de regulación intrínseca del potencial de diferenciación	
> Alternativas experimentales y futuros experimentos	
> Mecanismos de envejecimiento en células troncales	
> La senescencia celular como parte del desarrollo embrionario	
◆ Conclusiones	55
◆ Perspectivas	55
◆ Artículo de primer autor	56
◆ Referencias	65

ABREVIATURAS

BMP	Proteínas Morfogenéticas de Hueso
CDK	Cinasas Dependientes de Ciclinas
CKI	Inhibidor de Cinasas Dependientes de Ciclinas
CTN	Células Troncales Neurales
DCX	Proteína Doblecortina
E11	Día embrionario 11
E14	Día embrionario 14
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
GFAP	Proteína Acídica Glial Fibrilar
MAP2	Proteína Asociada a Microtúbulos
P1	Día postnatal 1
RB	Proteína de Retinoblastoma
SNC	Sistema Nervioso Central
TERT	Subunidad Proteica de la Enzima Telomerasa
TERC	Componente de RNA de la Enzima Telomerasa
ZSV	Zona Subventricular

RESUMEN

La función de las células troncales neurales (CTN) cambia a través del tiempo, durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC). En etapas tempranas, las CTN del neuroepitelio se amplifican numéricamente mediante divisiones simétricas (fase de expansión), posteriormente se dividen asimétricamente para generar células comprometidas a un linaje específico: las neuronas se generan primero (fase neurogénica), luego se producen las células gliales (fase gliogénica). Los mecanismos que regulan la temporalidad de la transición, entre una fase y otra, dependen tanto de señales extracelulares como de la participación de mecanismos intrínsecos, entre los que destaca la interacción de factores de transcripción neurogénicos y gliogénicos. Desafortunadamente, los mecanismos que restringen la capacidad de las CTN de generar neuronas, una vez que la fase de gliogénesis se establece, son poco claros.

En este trabajo se evaluó la correlación temporal entre la pérdida del potencial neurogénico, cambios en la actividad de telomerasa y la longitud del ciclo celular, durante el desarrollo de la médula espinal cervical de ratón. Los resultados aquí presentados demuestran que durante la transición de la fase neurogénica a la fase gliogénica, *in vivo*, la actividad de la enzima telomerasa disminuye. Posteriormente, se utilizó el cultivo de neuroesferas para hacer una descripción más detallada de esta transición. Se observó que las neuroesferas obtenidas de fases tempranas del desarrollo generan preferencialmente neuronas, mientras que las provenientes de una fase tardía se diferencian a células gliales; esta diferencia se presentó a pesar de que ambas poblaciones fueron tratadas y mantenidas en las mismas condiciones de cultivo. Sin embargo, en estas condiciones la actividad de la enzima telomerasa no cambia. Durante el establecimiento de la fase de gliogénesis *in vitro*, la velocidad de proliferación disminuyó y la longitud del ciclo celular aumentó 1.5 veces. Por último, se utilizó un inhibidor de la progresión del ciclo celular para alargar su duración en cultivos neurogénicos y se observó que este alargamiento no modifica su capacidad de diferenciarse a neuronas.

Con este estudio se pretende contribuir a la descripción del modelo de regulación intrínseca del potencial de diferenciación de las células troncales de la médula espinal. Se mostró una correlación entre el establecimiento de la fase de gliogénesis y la disminución de la actividad de telomerasa, *in vivo*, y el alargamiento del ciclo celular, *in vitro*.

ABSTRACT

Neural stem cells (NSC) change over time during the embryonic development of the mammalian central nervous system. At early stages, NSC in the neuroepithelium divide symmetrically to self-renew (expansion phase), and then divide asymmetrically to generate differentiated progeny: neurons are generated first (neurogenesis phase), and later glial cells emerge (gliogenesis phase). The timing mechanisms, that regulate the transition from one phase to the following, depend on extracellular signals as well as neurogenic and gliogenic transcription factors interplay. Nevertheless, the mechanisms that restrict the capability of NSC to generate neurons after the gliogenic phase is established are unclear.

In this work, we assessed the temporal correlation between the loss of the neurogenic potential and changes in telomerase activity and cell cycle length, in the cervical spinal cord of mouse embryos. Our results show that the transition from the neurogenic phase to the gliogenic phase, *in vivo*, correlates with a decrease in telomerase activity. Then we used the neurosphere assay, as an *in vitro* approach, to further characterize this transition. We observed that neurospheres obtained from an early stage of development give rise mostly to neurons, whereas those obtained from later stages produce preferentially glial cells. During the transition from neurogenesis to gliogenesis, we did not observe changes in telomerase activity *in vitro*, but the proliferation rate dropped, and the cell cycle length increased 1.5 fold, as monitored by BrdU incorporation. By using a cell cycle inhibitor, we artificially lengthened the cell cycle of neurogenic neurospheres; this did not affect their differentiation potential.

This study aims to provide additional insight on the intrinsic regulation of the gliogenic switch, by focusing on a region of the central nervous system, where the differentiation potential of the NSC has been less studied, the spinal cord. We showed a correlation between the decrease of the telomerase activity and the gliogenic phase onset *in vivo*, and a between short cell cycles and the neurogenic phase *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

El potencial de diferenciación de las células troncales hacia diversos tipos de linajes celulares las ha convertido en atractivos candidatos para ser utilizadas en tratamientos médicos, como modelo para desarrollar nuevos fármacos y como fuente de tejidos que puedan ser usados en trasplantes. En los últimos años, se han establecido un gran número de protocolos para diferenciar células somáticas a células troncales embrionarias pues se considera que éstas son las de mayor potencial; a su vez, se han desarrollado protocolos para diferenciar células troncales embrionarias hacia linajes celulares específicos. Sin embargo, la existencia de células troncales no es una característica exclusiva del desarrollo embrionario. Este tipo celular también está presente en tejidos adultos. En éstos, las células troncales somáticas se encargan de la restitución celular que garantiza la conservación de la homeostasis e integridad física de un organismo. Por ejemplo, las células troncales hematopoyéticas en la médula ósea garantizan la renovación de células sanguíneas; mientras que, el recambio de la epidermis y de la mucosa intestinal es posible gracias a células troncales epiteliales ubicadas en los folículos pilosos y en las criptas intestinales, respectivamente. También se ha mostrado la presencia de células troncales neurales a lo largo del sistema nervioso central. Los mecanismos que regulan la función de las células troncales somáticas incluyen señales extracelulares del nicho en el que residen, así como programas genéticos intrínsecos a cada tipo celular.

No obstante la capacidad regenerativa de las células troncales en varios tejidos adultos, su potencial de diferenciación se compromete con el paso del tiempo, de forma tal que pueden perder la habilidad para originar algunos subtipos celulares conforme el organismo envejece. Esta pérdida de potencial, asociada con el incremento en la edad y con el número de divisiones celulares que las células troncales llevan a cabo durante un periodo determinado, conduce a una disminución de la capacidad de autorreparación y renovación de un tejido que puede afectar la fisiología de un organismo adulto. Es por ello que, el estudio de los mecanismos celulares que regulan la pérdida de potencialidad de las células troncales, tanto embrionarias como somáticas, se torna fundamental.

Desafortunadamente los mecanismos que regulan la restricción del potencial de diferenciación ligado a la división celular y/o al paso del tiempo son aún poco claros. En el presente trabajo se evaluaron la actividad de la enzima telomerasa y la progresión del ciclo celular en el periodo de tiempo en el que las células troncales neurales dejan de generar neuronas, para determinar de qué manera estos mecanismos participan en la regulación del potencial de diferenciación de estas células.

ANTECEDENTES

CÉLULAS TRONCALES

La definición de las células troncales se basa en sus características funcionales. Se consideran células troncales aquellas que tienen capacidad de autorrenovarse y de poder generar uno o más linajes celulares especializados. A lo largo del desarrollo de un organismo, es posible observar diversos tipos de células troncales cuyo potencial de diferenciación varía; se ha observado que la progresión del desarrollo es acompañada por una pérdida gradual de su potencial de generar múltiples linajes. Se han establecido algunos términos para clasificar a las células troncales por su potencial de diferenciación (figura 1): son **Células Totipotentes** aquellas capaces de producir todas las células que conforman un animal (tejido embrionario), así como el componente fetal de la placenta (tejido extraembrionario); el cigoto producto de la fecundación es considerada la primera célula totipotente, sin embargo, esta capacidad sólo se conserva hasta el estadio de 8 células. Las **Células Pluripotentes** no pueden generar tejido extraembrionario, pero dan origen a las células germinales y a las células troncales de tejido específico. Las **Células Multipotentes** pueden tener un amplio repertorio de diferenciación, pero únicamente dentro de una capa germinal, órgano o tejido. Las **Células Progenitoras** tienen una capacidad proliferativa limitada y un potencial de diferenciación más restringido, pero sirven para incrementar el número de células diferenciadas por cada división de la célula troncal (Mayani, 2003; Rao and Mattson, 2001). La función de las células troncales no se restringe al desarrollo embrionario; aunque se diluyen conforme el organismo crece, algunos tejidos conservan células troncales que, durante la vida adulta de un organismo, mantienen la homeostasis tisular o se activan para reparar algún daño.

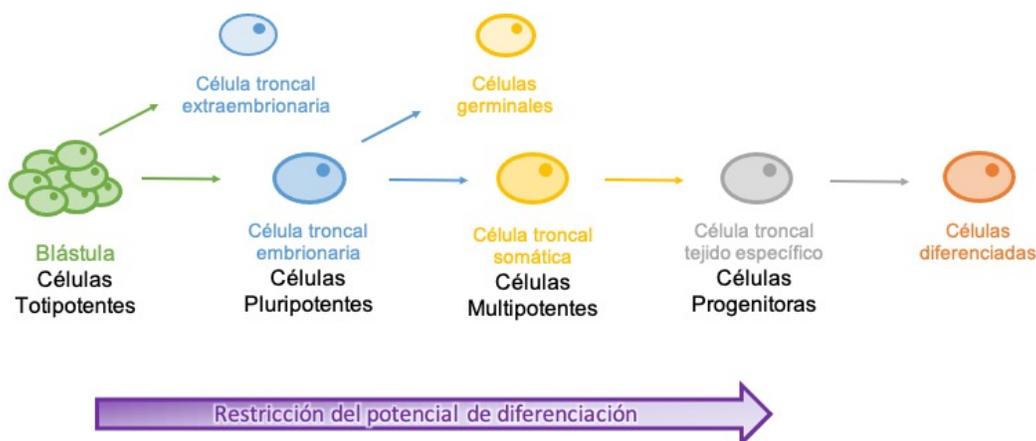


Figura 1. Tipos de células troncales según su potencial de diferenciación. Conforme el desarrollo avanza, el potencial de las células troncales disminuye (basada en Rao y Mattson, 2001).

Los diferentes tipos de células troncales han sido estudiados desde diferentes perspectivas, para tratar de caracterizar el perfil molecular que les permite conservar su capacidad de renovarse y que regula la generación de diversos tipos celulares a partir de un mismo genoma. Se ha documentado la importancia de los factores SOX-2, OCT-4 y Nanog como parte de la maquinaria que regula la jerarquía transcripcional que establece a las células troncales pluripotentes; se probó que estos tres factores ocupan las regiones promotoras de sus genes blanco de manera simultánea, que éstos pueden ser tanto genes activos como inactivos, y que codifican para otros factores transcripcionales o reguladores cromatínicos (Boyer et al., 2005). Células troncales multipotentes también han sido estudiadas por separado; por ejemplo, en las células troncales hematopoyéticas se ha demostrado que vías de señalización muy conservadas como Wnt, Sonic hedgehog, la familia TGF β , la familia Notch y BMI1 juegan un papel importante en la regulación de su función y mantenimiento; también en estas células se ha observado un proceso de remodelación cromatínica, asociado a la diferenciación de las células troncales a las células sanguíneas maduras (Ma et al., 2007). También se ha intentado caracterizar el perfil molecular de las células troncales neurales. Sin embargo, la mayoría de los estudios utilizan poblaciones heterogéneas, debido a las dificultades para aislarlas; en estos estudios destaca la presencia de los reguladores del ciclo celular como la proteína de retinoblastoma (RB) y las ciclinas D1 y D2, enriquecidas en células progenitoras (Ma et al., 2007).

Por sus potenciales usos medicinales, el objetivo de muchos laboratorios alrededor del mundo ha sido aislar o generar células troncales toti o pluripotentes. En 1981, se derivaron las primeras líneas de células troncales embrionarias de ratón (Evans and Kaufman, 1981), pero no fue sino hasta 1998 que se pudieron derivar las de origen humano (Thomson, 1998). Para ese entonces también se habían generado células pluripotentes mediante la transferencia del núcleo de una célula somática a un ovocito enucleado, en ranas desde 1962 (Gurdon, 1962) y en mamíferos en 1996 (Campbell et al., 1996). Y en 2007, se logró inducir células troncales pluripotentes humanas expresando únicamente cuatro factores transcripcionales (OCT3/4, SOX-2, c-MYC y KLF-4, conocidos como factores Yamanaka) en células somáticas diferenciadas, fibroblastos humanos (Takahashi et al., 2007).

El funcionamiento adecuado de las células troncales depende tanto de factores y programas intrínsecos, así como de señales regulatorias ambientales. El estudio de la ubicación de las células troncales ha permitido definir al **nicho** como los componentes celulares que conforman el microambiente que rodea a las células troncales, así como, las señales liberadas por dichas células de soporte (por ejemplo: BMP, Wnt, FGF, Notch, etc.). En estos espacios las moléculas de adhesión, como las cadherinas, son muy importantes pues permiten generar cierta asimetría estructural en la que células más diferenciadas se separan de las que conservan un mayor potencial (Li and Xie, 2005). La influencia del nicho, sobre el funcionamiento de las células troncales, es evidenciado por estudios en los que, al trasplantar células germinales de animales jóvenes a gónadas de

animales envejecidos, la gametogénesis se ve comprometida. Por otro lado, estudios en los que se estimula la actividad del nicho con tratamientos hormonales puede incrementar el número de células troncales. De esta forma, el estudio del nicho de las células troncales ha abierto la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (Jones and Wagers, 2008).

CÉLULAS TRONCALES NEURALES

Las células troncales neurales (CNT) son células multipotentes, derivadas del neuroectodermo, con capacidad de generar las neuronas, los astrocitos y los oligodendrocitos que conforman el sistema nervioso central (SNC) (Gage, 2000). Los estudios en los que se ha evaluado sus principales características, sostienen que las CNT adultas son un tipo de células que se desarrollan a partir de la glía radial que presentan marcadores de astrocitos diferenciados y que conservan propiedades de células troncales (Alvarez-Buylla et al., 2001; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2011).

Durante la ontogenia del SNC, las CNT se expanden mediante varios ciclos de divisiones simétricas; luego empiezan a generar progenitores neuronales, mediante divisiones asimétricas, durante el periodo de neurogénesis; al término de éste empieza la gliogénesis, en la que se generan todos los progenitores de astrocitos y oligodendrocitos (figura 2) (Temple, 2001).

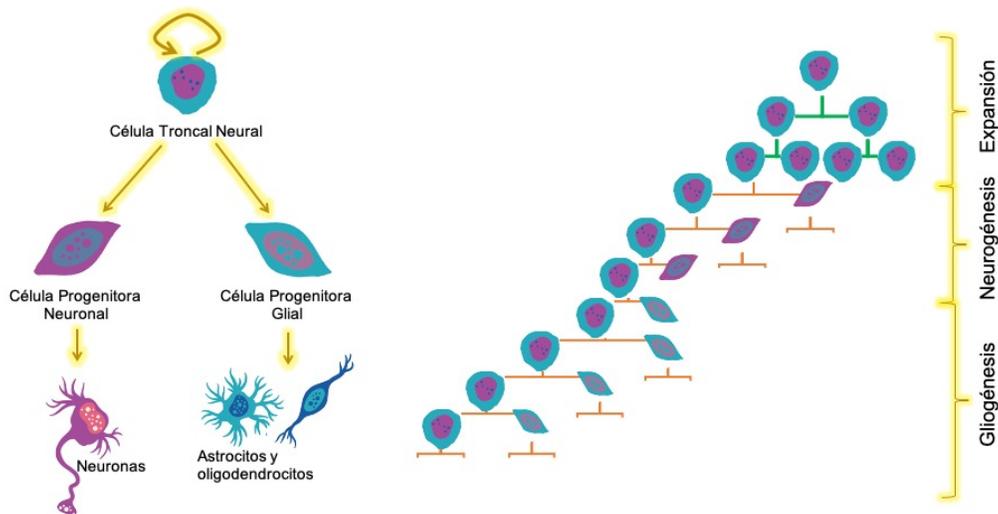


Figura 2. Las células troncales neurales son células multipotentes. Las CNT tienen la capacidad de renovarse y generar todas las neuronas, los astrocitos y los oligodendrocitos del SNC, pero no de forma simultánea sino secuencial (basada en Gage, 2000 y Temple 2001).

El establecimiento del cultivo de **neuroesferas** (Reynolds and Weiss, 1992) en el que las CTN se expanden clonalmente en flotación, ha permitido definir las experimentalmente y cuantificar su capacidad de autorrenovación y multipotencia. Mediante este ensayo, se pudo identificar a los factores de crecimiento epidermal (EGF) y fibroblástico (FGF) como los mitógenos que mantienen su proliferación a lo largo del desarrollo, y que lo hacen de manera diferencial pues la respuesta de las células a éstos varía con el paso del tiempo, conforme se establecen subtipos de CTN (Tropepe et al., 1999). La especificación del linaje, al que se diferenciarán las CTN, está regulada por factores que las mantienen en un estado no diferenciado, como Notch, y factores que instruyen el tipo celular al que se diferenciarán, como JAK/Stat y BMP. El efecto de algunos de estos reguladores depende del contexto celular; por ejemplo: Notch puede inducir la autorrenovación o la diferenciación astrocítica en diferentes etapas del desarrollo. La diferenciación también depende de los contactos célula-célula, del estado de la estructura de la cromatina y de grado de metilación del DNA (Okano, 2002).

Los factores de la subfamilia de factores transcripcionales SOXB1, SOX-1, SOX-2 y SOX-3, participan en la especificación inicial de las CTN. La expresión de SOX-2 es una propiedad de todos los progenitores neurales que no es influenciada por la posición de éstos a lo largo del eje dorso-ventral. Las células que mantienen la expresión de SOX-2, también mantienen su capacidad proliferativa y no se diferencian (Graham et al., 2003). La expresión de SOX-2 se observa en la placa neural, se conserva en células multipotentes en cultivo, posteriormente se limita a la zona ventricular proliferativa del embrión y del sistema nervioso central adulto; con el uso de este tipo de marcadores se ha podido identificar las poblaciones de células troncales *in vivo* (Ellis et al., 2004). Neuroesferas aisladas de diferentes regiones que expresan SOX-2 en el SNC conservan la capacidad de autorrenovarse, de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos y comparten la expresión de marcadores de células no diferenciadas; sin embargo, en estas neuroesferas es posible distinguir subpoblaciones de células troncales con diferentes capacidades de diferenciación que recapitula la heterogeneidad existente *in vivo* (Brazel et al., 2005). La expresión artificial de SOX-1, 2 ó 3 mantiene a las CTN en un estado indiferenciado y su inhibición induce el cese de su proliferación (Wegner and Stolt, 2005).

La transición de célula multipotente a progenitor neuronal o glial conlleva a cambios en la expresión génica que han sido estudiados tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos cambios abarcan genes relacionados con adhesión celular, componentes de matriz extracelular, citoesqueleto de actina y tubulina, proliferación celular, moléculas de transducción de señales, reguladores cromatínicos y factores de transcripción, metabolismo, canales iónicos, transportadores y lipoproteínas (Gurok, 2004). Las fases que se distinguen en el proceso de diferenciación son:

- Cese de proliferación, los genes involucrados en la replicación del DNA y en la progresión del ciclo celular disminuyen su expresión.
- Adhesión a la superficie de cultivo, cambios en la expresión de los componentes de matriz extracelular.

- Desprendimiento de células del núcleo del agregado celular, disminuye la expresión de moléculas de adhesión célula-célula.
- Migración celular, cambios en la expresión de genes de citoesqueleto.
- Diferenciación celular, genes asociados a linajes celulares se expresan de forma específica y cambia el perfil de factores de transcripción expresados (Gurok, 2004).

Se han estudiado también los cambios epigenéticos que regulan la diferenciación de las CTN. Múltiples genes neuronales comparten un elemento de respuesta que recluta desacetilasas de histonas y reprime su expresión en células no neuronales; en contraste, el tratamiento con agentes que promueven la acetilación de nucleosomas, como el ácido valpróico, promueve la diferenciación neuronal y reprime la glial; en otro contexto, la actividad de las desacetilasas es importante para que los progenitores de oligodendrocitos se diferencien en oligodendrocitos maduros. La metilación del DNA que promueve la represión transcripcional también es importante en el SNC. La proteína de unión a DNA metilado, MeCP2, es abundante en neuronas posmitóticas y las enzimas que establecen la metilación y el mantenimiento del DNA metilado, son esenciales para el funcionamiento neuronal (Hsieh and Gage, 2004).

Otro sistema de remodelación de cromatina, que regula la expresión génica, es el formado por los productos del grupo Trithorax (trxG) y del grupo Polycomb (PcG); el gen *Mll1* del trxG, codifica para una metiltransferasa de histonas, que regula el patrón de expresión de genes homeóticos y es necesario para la neurogénesis posnatal (Lim et al., 2009); el gen *Bmi1* del PcG, es necesario para la auto-renovación de las CTN, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, pues regula negativamente la expresión de inhibidores del ciclo celular codificados en el locus *INK4A* (Molofsky et al., 2003).

Otro elemento regulador del balance entre proliferación y diferenciación son los microRNAs. Por ejemplo: *miR-9* y *let-7b* son microRNAs que se expresan tanto en zonas neurogénicas embrionarias como en adultas; su expresión aumenta para favorecer la diferenciación, ya que bloquea la función del receptor nuclear TLX, el cual es necesario para regular la expresión de genes encargados de la proliferación de las células troncales neurales (Shi et al., 2010).

El estado oxidativo de las células troncales también puede influir en su potencial de diferenciación. Condiciones oxidativas favorecen la diferenciación de las CTN hacia astrocitos; éstas condiciones pueden ser inducidas mediante la activación con resveratrol de la desacetilasa dependiente de NAD⁺, SIRT1. SIRT1 es capaz de reclutar a los represores HES1 y TLE1 a la región promotora del gen responsable del programa transcripcional de diferenciación neuronal, Mash1. Por el contrario, en condiciones reductoras, donde SIRT1 no se expresa o es inactivado, la transcripción de Mash1, promueve la diferenciación neuronal (Prozorovski et al., 2008).

La descripción de todos los factores antes mencionados no ha sido suficiente para definir la secuencia de eventos que ocurren durante la producción de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos a partir de CTN. Únicamente en células troncales de telencéfalo, aisladas al día embrionario 14.5, se ha observado la existencia de progenitores bipotentes que son intermediarios entre la célula troncal neural tripotente y las células diferenciadas, *in vitro*. Se vio también que la especificación del linaje final es temprana, se da en células que están proliferando, antes de la aparición de marcadores de diferenciación, y no es aleatoria pero en ciertas condiciones puede ser modificada (Ravin et al., 2008). Es por eso por lo que, es necesario revisar los mecanismos encargados de promover la autorrenovación y regular el potencial de diferenciación, de las células troncales neurales, en función del desarrollo del sistema nervioso central.

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso central (SNC) es un tejido complejo que se forma a partir del ectodermo, una de las tres capas germinales. Durante la gastrulación, el ectodermo se establece como la capa exterior del embrión. El SNC se genera en la región dorsal que se engruesa y aplana para formar la placa neural, el resto del ectodermo formará la epidermis; al establecimiento de las células ectodermales en neuroectodermales se le conoce como **inducción neural** y es el evento más temprano en el desarrollo del SNC (Gilbert, 2013). Las señales que inducen la neurulación, es decir, la formación del tubo neural, son secretadas por la notocorda, que es el tejido del mesodermo dorsal que se ubica debajo de la futura placa neural después de la gastrulación. Las moléculas secretadas por la notocorda son inhibidores de los ligandos de las vías de señalización inducidas por BMP y TGF β tales como: nogina (noggin), cordina (chordin), folistatina (follistatin) o cerberus. El efecto de las BMP en el resto del ectodermo es inducir el fenotipo epidermal, sin estas señales instructivas el ectodermo formaría tejido neural exclusivamente. Otras moléculas que participan en la inducción del neuroectodermo son los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) y tipo insulina (IGF) (Christie et al., 2013; Ozair et al., 2013).

Conforme el embrión crece longitudinalmente, la placa neural se alarga en el eje antero-posterior y se adelgaza por extensión convergente. A estos cambios le siguen el plegamiento de la placa y la formación del surco neural, por la acción coordinada de las células localizadas en los puntos de bisagra medial y dorsolaterales. La progresión del plegamiento de los bordes del surco neural conlleva a que éstos se unan en la línea media dorsal dando origen al **tubo neural**. El proceso de cierre del tubo, sin embargo, no es simultáneo a lo largo de la extensión rostro-caudal del surco neural; los extremos son los últimos sitios en cerrarse. Al paso del tiempo, la estructura cilíndrica del tubo neural se pierde con la aparición de tres vesículas primarias en la porción anterior del tubo: el proscencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. Posteriormente, el prosencéfalo se subdivide en telencéfalo (en la región rostral) y diencefalo (en la región caudal) y el

rombencéfalo lo hace en el metencéfalo (en la región rostral) y mielencéfalo (en la región caudal) dando origen a las cinco vesículas secundarias que formarán el cerebro. El segmento restante del tubo neural dará origen a la médula espinal (Gilbert, 2013).

Hasta la formación del tubo neural, las células troncales neurales (CTN), que forman el neuroepitelio pseudoestratificado, se expanden mediante divisiones simétricas. El epitelio de una sola capa parece estratificado porque durante cada división el núcleo celular se desplaza a lo largo del eje apical-basal; el contenido citoplásmico de las células neuroectodermales está polarizado en este mismo eje, por lo que es importante que la división de su contenido sea simétrica, perpendicular a la membrana basal, para que ambas células resultantes conserven las propiedades de célula troncal. Un factor importante en el mantenimiento de la simetría son las uniones adherentes entre las células neuroepiteliales, las cuales dependen de la expresión de N-cadherinas (Götz and Huttner, 2005). La vía de Notch, mediante los efectores HES1 y HES5, es la encargada de reprimir la expresión de los genes de diferenciación y de esta forma mantiene la **fase de expansión** en la que las CTN se dividen activamente; otros factores de transcripción que promueven la auto-renovación en esta fase son GLI2 y GLI3 que activan la expresión de los factores *Hes* y SOXB1, en particular SOX-2 (Christie et al., 2013). El extremo anterior del tubo neural, que se distingue por ser más grueso, dará origen al cerebro, mientras que la región posterior, que es más delgada, dará origen a la médula espinal. El establecimiento de estas estructuras a lo largo del eje antero-posterior responde a la formación de gradientes de morfógenos tipo WNT, FGF y ácido retinoico (Christie et al., 2013; Ozair et al., 2013).

Conforme el desarrollo progresa, las divisiones simétricas son remplazadas por divisiones asimétricas, paralelas a la membrana basal; las características que distinguen a este tipo de divisiones son: la orientación de los polos del huso mitótico y la división asimétrica de los componentes membranales debida a la fusión de proteínas membranales apical-lateral en lugar de apical-basal (Götz and Huttner, 2005). En esta transición las características epiteliales de las CTN disminuyen y se empiezan a distinguir las características gliales; además, el epitelio simple se convierte en un tejido de varias capas. En este punto las células troncales adquieren el fenotipo de la glía radial y da inicio la **fase de neurogénesis**.

La transición de la fase de expansión a la fase de neurogénesis se caracteriza por el cambio en el perfil transcripcional de las CTN. Éste está mediado, principalmente, por los factores tipo hélice-asa-hélice (HLH) de la familia bHLH: Mash1 y la familia de neurogeninas (NGN1, NGN2 y NGN3). Los cuales inducen la delaminación y la salida del ciclo celular de los progenitores neuronales, así como la inhibición de genes asociados a la diferenciación glial (Christie et al., 2013; Kintner, 2002). La expresión de los factores bHLH es activada por el factor PAX6. Se han caracterizado algunos de los genes blanco de cada uno de estos factores, por ejemplo, en el caso de Mash1 se ha visto que éstos abarcan genes de diferenciación, migración, guía axonal y formación de sinapsis (Vasconcelos and Castro, 2014).

Otra característica relevante de la transición de la fase de expansión a la fase de neurogénesis es el alargamiento del ciclo celular el cual se asocia a un alargamiento de la fase G1 (el resto de las fases parecen permanecer constantes). El hecho de que el alargamiento inducido por inhibidores del ciclo celular pueda a su vez inducir la diferenciación neurogénica, llevo a plantear la hipótesis de la longitud del ciclo celular, la cual propone que el alargamiento de la duración le da tiempo a los determinantes neurogénicos de ejercer su efecto (Calegari, 2003).

En etapas posteriores, el estado de la cromatina correspondiente a los promotores de genes de la diferenciación glial (como GFAP y S100 β) se vuelven más accesibles debido a la desmetilación de los sitios de unión de la proteína STAT (Fan, 2005); de esta manera las CTN pueden responder a citocinas gliogénicas como las BMP, LIF y CNTF, y da inicio la **fase de gliogénesis** (Christie et al., 2013). Las BMP, al unirse a su receptor, activan la fosforilación directa de las proteínas SMAD1 y 4; por su parte LIF y CNTF activan a la cinasa JAK1 que a su vez induce la dimerización y translocación al núcleo de los factores STAT. Las actividad de SMADs y STATs es facilitada por la familia de proteínas co-activadoras p300/CBP para inducir la expresión de los genes responsables de la generación de astrocitos (He et al., 2005; Sun et al., 2001). Por su parte, la diferenciación de oligodendrocitos depende de factores de transcripción específicos: OLIG2, OLIG1, SOX-10, NKX2.2 entre otros (Christie et al., 2013). Se han descrito diversos tipos de progenitores gliales, los cuales se distinguen por los antígenos que expresan y por la etapa del desarrollo en la que parecen (Liu et al., 2002); los que generan oligodendrocitos predominan la región ventral del tubo neural mientras que los que dan origen a astrocitos se asocian a la región dorsal; esta polarización obedece a los gradientes de morfógenos como Sonic hedgehog, BMP y FGF (Lee et al., 2000).

En la fase gliogénesis son fundamentales los factores transcripcionales de la subfamilia SOXE tales como SOX-8, SOX-9 y SOX-10; aunque estos factores son esenciales para la diferenciación de astrocitos y oligodendrocitos, no son necesarios para el mantenimiento de las células troncales neurales como los son los de la familia SOXB1 (Wegner and Stolt, 2005). A SOX-9, en particular, se le ha atribuido la capacidad de regular el inicio de la transición de neurogénesis a gliogénesis (Stolt et al., 2003). En el perfil transcripcional de la transición de neurogénesis a gliogénesis destacan los factores nucleares NFIA y NFIB. Aunque en etapas tempranas de la gliogénesis NFIA es necesario y suficiente para la especificación del linaje glial en precursores de astrocitos y oligodendrocitos, en etapas posteriores, promueve la diferenciación final de astrocitos e inhibe la generación de oligodendrocitos (Deneen et al., 2006).

El control espaciotemporal de la neurogénesis y la gliogénesis depende en gran medida del efecto combinatorio de factores transcripcionales tipo HLH; éstos han sido propuestos como el vínculo entre señales extracelulares, reguladores transcripcionales intracelulares y la identidad posicional. Como ya se mencionó, Mash1 y las neurogeninas, en etapas distintas, inducen la diferenciación a neuronas y oligodendrocitos, mientras que Id1 y HES inducen a los astrocitos pero la regulación de su efecto depende de PAX6, OLIG2 y

NKX2.2; estos últimos tienen un patrón de expresión diferencial a lo largo del eje dorso ventral del tubo neural, lo que les confiere la capacidad de regular a los factores bHLH. Por ejemplo, en dominios donde se expresa PAX6, Mash1 es neurogénico, pero es oligodendrogénico donde la expresión de OLIG2 es mayor. Células que expresan tanto PAX6, OLIG2 y NKX2.2, como los factores bHLH, se mantienen en un estado no diferenciado; para que la diferenciación astrocítica sea posible debe disminuir la expresión de PAX6, OLIG2 y NKX2.2, lo cual explica que los astrocitos aparezcan en las últimas etapas del desarrollo del SNC (Sugimori et al., 2007).

En general **la neurogénesis precede a la gliogénesis**, en algunas regiones del SNC pueden sobrelaparse, pero en la mayoría de los casos la generación de neuronas termina antes y la generación de células gliales, particularmente astrocitos, continúa durante toda la vida. Esta secuencia ha sido recapitulada invariablemente *in vitro*; incluso en modelos experimentales donde se ha utilizado tejido humano para generar organoides cerebrales (Velasco et al., 2019). Dado que la capacidad de generar neuronas y glía varía dependiendo de la edad del tejido del que las células troncales fueron aisladas, se ha planteado que el potencial neurogénico puede ser regulado por factores ambientales pero que en determinado momento las células dejan de responder a los factores neurogénicos y sólo generan glía (Qian et al., 2000). El efecto del tiempo como factor intrínseco regulador de esta transición ha sido probado de diferentes maneras; por ejemplo, CTN aisladas de estadios tempranos del desarrollo que son co-cultivadas en rebanadas corticales embrionarias adoptan el fenotipo neuronal, pero si son co-cultivadas con rebanadas posnatales sólo generan glía (evidenciando el efecto de los factores ambientales). Sin embargo, CTN aisladas en estadios posnatales sólo generan células gliales sin importar la edad del tejido cortical con el que se co-cultiven. Además, CTN aisladas en estados gliogénicos generan astrocitos en menos de 24 horas tras ser expuestas al factor CNTF *in vitro*, pero si son aisladas de estadios neurogénicos, se demoran un par de días (Miller and Gauthier, 2007; Sauvageot and Stiles, 2002). Otro mecanismo que ayuda a mantener el orden en que se generan neuronas y glía es la cardiotropina1, que es un factor sintetizado y secretado por las neuronas recién diferenciadas y que funciona como un mecanismo de retroalimentación que instruye a las células troncales a generar astrocitos (Barnabé-Heider et al., 2005).

Además de que el periodo de neurogénesis, para la mayoría de las células troncales neurales, es muy breve, su duración e inicio varía entre las distintas regiones del sistema nervioso central. En mamíferos, únicamente en el bulbo olfatorio y en el hipocampo la neurogénesis se prolonga hasta edades adultas avanzadas. En la siguiente sección se abordan características exclusivas de los nichos que mantienen la neurogénesis adulta y que distinguen a las CTN adultas.

NEUROGÉNESIS ADULTA

Por mucho tiempo se pensó que la generación de neuronas ocurría exclusivamente durante el desarrollo embrionario y que las células que proliferaban en el sistema nervioso central (SNC) adulto daban origen únicamente a células gliales. El desarrollo de análogos de timidina, que se incorporan al DNA de células que proliferan, permitió identificar áreas del SNC en las que las neuronas se siguen generando en edades adultas avanzadas, que sobreviven por largos periodos y que se integran a circuitos neuronales ya establecidos, formando sinapsis y extendiendo proyecciones axonales (Fuentealba et al., 2012). Estudios comparativos enfocados a la neurogénesis adulta en aves, peces y mamíferos, incluido el humano, han permitido indagar en la relevancia evolutiva de este fenómeno (Kempermann, 2016); sin embargo aún es controversial si su función es regenerativa o parte de los mecanismos de plasticidad que favorecerían procesos cognitivos en humanos (Kempermann, 2016; Kempermann et al., 2015).

A principios de los años noventa se lograron aislar células troncales neurales (CTN) de animales adultos y se logró demostrar la importancia funcional de la generación de nuevas neuronas para el aprendizaje del canto estacional en canarios adultos (Kirn et al., 1991; Ming and Song, 2005; Nottebohm, 2004; Reynolds and Weiss, 1992). Aunque se ha logrado aislar CTN multipotentes de todo el eje neuroventricular y de la médula espinal, las únicas dos regiones que, desde roedores hasta primates, generan neuronas en condiciones no patológicas, *in vivo*, de forma continua durante toda la vida son: la zona subventricular que limita los ventrículos laterales telencefálicos (ZSV) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG) (Hagg, 2005; Weiss et al., 1996)(Obernier and Alvarez-Buylla, 2019).

La naturaleza de las CTN adultas ha sido difícil de establecer; hoy en día, la hipótesis mejor aceptada es que se trata de un subtipo celular con propiedades astrogiales (que expresan marcadores como GFAP y tienen características ultraestructurales de astrocitos) y largos procesos celulares que les permite mantener contacto con compartimentos del nicho, que proveen factores específicos para regular su función (Fuentealba et al., 2012).

Las fases que se distinguen en el proceso de neurogénesis adulta son:

- Proliferación: Los mitógenos EGF y FGF mantienen la proliferación de células troncales adultas *in vitro* e *in vivo*. El CNTF activa la expresión de Notch para promover su autorrenovación. La actividad de Notch y de otras proteínas transmembranales de la familia de TGF β , que estimulan la proliferación depende de su procesamiento por metaloproteasas, las cuáles son particularmente abundantes en las zonas neurogénicas.
- Especificación de linaje. La diferenciación neuronal en los nichos neurogénico es posible gracias a la secreción de moléculas como Noggin, que antagoniza los efectos de las BMP que inducen la diferenciación a astrocitos.

- Migración. Los neuroblastos generados en la ZSV migran por la corriente rostral migratoria para llegar al bulbo olfatorio donde terminan su diferenciación a interneuronas granulares y periglomerulares. Para desplazarse, los neuroblastos se deslizan uno sobre otro (migración en cadena), el proceso puede tomarles 14 días. La migración de las células generadas en la ZSG es mucho más breve pues sólo deben desplazarse a la capa granular.
- Incorporación funcional. En el bulbo olfatorio las nuevas interneuronas no tienen axón y liberan su neurotransmisor por las espinas dendríticas, en sinapsis especializadas entre ellas y las células mitrales o las células en penacho; Las nuevas neuronas del hipocampo extienden sus axones hacia la capa de células piramidales en CA3 y sus dendritas en dirección opuesta hacia la capa molecular; éstas reciben estímulos de la corteza entorrinal y los proyectan hacia la región CA3.

En las regiones neurogénicas del cerebro adulto existe un microambiente muy especializado que favorece el mantenimiento de células troncales neurales activas. En la ZSV adulta se han caracterizado los principales componentes celulares de este nicho: Células tipo A (precursores neuronales migratorios; forman grupos de hasta 4 células a lo largo de la pared lateral del ventrículo y en la corriente rostral migratoria; presentan inmunomarcaje para las proteínas PSA-NCAM, TUJ1 y nestina), Células tipo B (astrocitos con propiedades de célula troncal; forman trabéculas, aíslan y dan soporte a las células tipo A; son positivas al inmunomarcaje de GFAP, vimentina y nestina), Células tipo C (células amplificadoras; sólo están presentes en la ZSV y son positivas al marcaje con nestina) Células tipo D: tanacitos; células poco abundantes que se intercalan entre las células endoteliales) y Células tipo E (células endoteliales que forman el epitelio que recubre los ventrículos) (Doetsch et al., 1997; García-Verdugo et al., 1998). Además de los componentes celulares, la vasculatura y la matriz extracelular de la ZSV y de la ZSG juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la neurogénesis adulta a través de la secreción de factores que promueven la autorrenovación y la diferenciación neuronal tales como BDNF, VEGF y BMP (Alvarez-Buylla and Lim, 2004).

También se han descrito algunos mecanismos intracelulares que distinguen a las regiones neurogénicas. Para mantener su proliferación, las células troncales neurales adultas conservan la expresión del factor transcripcional SOX-2, dependen del factor del grupo polycomb, BMI1, y de la proteína que se une a DNA metilado, MBD1; para promover la expresión de genes encargados de la diferenciación neuronal, las células troncales neurales adultas expresan a la metiltransferasa, Mll1, y poseen una baja actividad de desacetilasas de histonas; además, diversos RNAs pequeños como *miR-184*, *miR-137* y *miR-124* regulan los programas epigenéticos asociados con el proceso de diferenciación (Komitova and Eriksson, 2004; Ma et al., 2010). El análisis de la actividad transcripcional de la ZSV permitió identificar a los genes que codifican para la maquinaria del splicing de RNAs mensajeros, así como a los genes que codifican para moléculas reguladoras del estado de compactación de la cromatina, como mecanismos relevantes para la neurogénesis adulta (Lim et al., 2006).

Pérdida del potencial neurogénico de las células troncales neurales durante el desarrollo del sistema nervioso central

Como ya se mencionó, durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) la neurogénesis precede a la gliogénesis; una vez que termina la fase de generación de neuronas que permite el establecimiento de la circuitería neuronal, las células troncales neurales (CTN) pierden su potencial neurogénico. Esta es una característica distintiva de las CTN pues, en contraste con la concepción canónica de que una célula troncal multipotente puede generar diversos tipos celulares a lo largo de la vida de un organismo, la multipotencialidad de las CTN se manifiesta de forma secuencial (figura 2).

En los últimos años se han descrito algunos de los mecanismos que regulan la diferenciación secuencial de las CTN durante el desarrollo del SNC (Miller and Gauthier, 2007; Okano and Temple, 2009). Es claro que la especificidad espaciotemporal de la generación de los múltiples linajes neuronales y gliales se debe a la interacción de señales extracelulares provistas por el nicho (como factores de crecimiento o citocinas) y mecanismos intracelulares (como reguladores epigenéticos o la expresión diferencial de factores de transcripción). El estudio de la generación de neuronas durante el desarrollo de la corteza cerebral muestra que existe un mecanismo intrínseco a las células que codifica la temporalidad de la neurogénesis, y que la pérdida de la multipotencialidad es un fenómeno gradual (Shen et al., 2006); sin embargo, la naturaleza restrictiva de estos mecanismos aún no se conoce.

Además de las dos regiones del cerebro murino adulto que conservan CTN con la capacidad de generar neuronas en edades adultas avanzadas: la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, diversos experimentos han mostrado la presencia de CTN capaces de autorrenovarse y de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos *in vitro*, en las cavidades del eje neuro-ventricular e incluso en la médula espinal de animales de distintas edades postnatales, en las que los circuitos neuronales ya están establecidos (Johansson et al., 1999; Weiss et al., 1996). Se ha documentado que éstas residen en la capa de células ependimales que delimitan la pared ventricular o en el subependima ventricular. Sin embargo, cuando el potencial de diferenciación de la mayor parte de estas CTN se prueba *in vivo*, los experimentos demuestran que estas células carecen de la habilidad para generar neuronas como consecuencia de la temprana restricción en su potencial de diferenciación; sugiriendo que el mecanismo de regulación se mantiene incluso cuando las células están fuera de su nicho (Johansson et al., 1999; Martens et al., 2002).

Por otro lado, no es del todo claro si las CTN adultas conservan las propiedades de autorrenovación y multipotencia que define a las células troncales, algunos estudios sugieren que la capacidad de autorrenovación se pierde rápidamente con la edad (Fuentelba et al., 2012; Luo et al., 2006), otros estudios cuestionan la existencia de

células unipotentes o si estas células conservan la capacidad de generar tanto el linaje glial como el neuronal (Fuentealba et al., 2012; Schneider et al., 2019; Seaberg and van der Kooy, 2002). Lo que es un hecho es que el descubrimiento de la neurogénesis adulta abrió la posibilidad de entender mejor los mecanismos de desarrollo y plasticidad del SNC.

Por lo anterior, para el planteamiento de este trabajo se revisaron algunos de los mecanismos moleculares que distinguen a la ZSV (descritos a continuación) durante el desarrollo temprano del SNC, como modelo para estudiar los mecanismos celulares que restringen el potencial de diferenciación en células troncales multipotentes.

La zona subventricular, una zona de excepción

Un importante número de CTN con capacidad de generar neuronas persiste, hasta edades avanzadas en la zona subventricular (ZSV) que delinea las paredes de los ventrículos laterales en el cerebro murino adulto. En la ZSV existe un microambiente permisivo para la constante producción de neuronas. Éste se caracteriza por 1) una población de astrocitos que proveen tanto soporte estructural como señales inductivas de la especificación de linajes (estas últimas pueden estar asociadas a la membrana celular o ser secretadas, incluyen citocinas, factores de crecimiento y neurotransmisores); 2) un sistema vascular que, junto con los astrocitos, brinda sustento a los procesos de proliferación y coordina distintos eventos de la neurogénesis; 3) señales moleculares que regulan la autorrenovación y especificación de linajes (Obernier and Alvarez-Buylla, 2019). Entre las señales moleculares asociadas a la neurogénesis en la ZSV destacan:

- Notch: Regula la permanencia de las CTN en estado quiescente
- FGF-2: Induce la autorrenovación de las CTN
- EGF y Sonic hedgehog: Promueven la proliferación de las células amplificadoras
- Noggin: Inhibe la vía de señalización que induce la diferenciación glial, mediada por BMP, para promover la diferenciación a neuronas

Estudios *in vivo* han mostrado que sólo un 20% de las divisiones de las CTN en la ZSV adulta son simétricas (como en la fase de expansión, durante el temprano desarrollo del sistema nervioso central) (Obernier et al., 2018). El resto de las divisiones asimétricas no permiten la renovación de las CTN, lo cual provoca la disminución gradual de estas células en animales adultos.

Los componentes del microambiente mencionados, tienen una función importante en la regulación del potencial neurogénico de las CTN en la ZSV adulta, pero no son el único mecanismo que facilita la diferenciación neuronal. Esto fue demostrado mediante experimentos que evaluaron el efecto del microambiente en el potencial de diferenciación de progenitores neurales obtenidos de diferentes regiones del SNC durante el periodo

posnatal temprano *in vitro*. A pesar de que todas las células mostraron multipotencialidad y capacidad de autorrenovarse en los primeros pasajes de cultivo, la restricción del potencial neurogénico fue evidente en todos los progenitores evaluados, independientemente del medio en el que se realizaron los cultivos, excepto en los progenitores obtenidos de la ZSV. Además, los estudios referidos mostraron que la restricción del potencial neurogénico depende de la región del sistema nervioso y de la edad del animal en la que las células fueron obtenidas. En estas condiciones, la manipulación del microambiente de cultivo fue incapaz de rescatar el potencial de diferenciación a neuronas de las CTN ajenas a la ZSV. Estos resultados apoyan que las CTN de la ZSV poseen mecanismos moleculares intrínsecos a que les permiten conservar su potencial neurogénico (Seaberg et al., 2005).

Dado que, además de un microambiente favorecedor, se requieren mecanismos intracelulares para conservar el potencial neurogénico de las CTN adultas, es necesario revisar algunas características moleculares que sólo se manifiesten en la ZSV; una de éstas es la actividad de la enzima **telomerasa**. Es interesante destacar que la actividad de esta enzima disminuye drásticamente en etapas muy tempranas del desarrollo del cerebro y, con excepción de la ZSV, desaparece en los primeros días de vida postnatal (Caporaso et al., 2003; Klapper et al., 2001). Así, la reducción de la actividad de esta enzima podría estar relacionada temporal y espacialmente con el decremento del potencial neurogénico de las CTN durante el desarrollo y/o en CTN que han sido aisladas de otras regiones del SNC que no conservan el potencial de generar neuronas en animales adultos.

Otra característica molecular que distingue a las CTN de la ZSV adulta es la expresión del factor transcripcional **BMI1** (Zencak, 2005). Durante la vida embrionaria y postnatal temprana de roedores, se mostró que la expresión de este factor, en las CTN telencefálicas, es necesaria para que éstas conserven su capacidad de autorrenovarse, pues éste mantiene reprimida la expresión del locus *INK4A* y, como consecuencia, la acumulación del regulador del ciclo celular $p16^{INK4A}$ (Molofsky et al., 2003). La acumulación de $p16^{INK4A}$ en la ZSV, que incrementa de forma gradual con el paso del tiempo, se ha asociado a la pérdida progresiva de la neurogénesis que se presenta en esta zona en edades adultas avanzadas (Molofsky et al., 2006). Además, estudios muestran que la deficiencia de BMI1 no tiene consecuencias en el tamaño corporal o del cerebro de los ratones al nacimiento. Sin embargo, el cerebro de los animales adultos, que no expresan este factor, es más pequeño que el de los animales que sí lo expresan, lo cual se asocia con una disminución de la proliferación y la autorrenovación de las CTN de la ZSV (Zencak, 2005). También resulta interesante que, los animales deficientes en dicho factor, poseen un mayor número de astrocitos en el cerebro anterior al nacimiento y en edades adultas, y que las CTN derivadas de la ZSV de ratones deficientes en BMI1 muestran que la progenie resultante se diferencia preferencialmente a astrocitos (Zencak, 2005). Estos datos indican que este factor no sólo regula la capacidad de autorrenovación de las CTN de la ZSV, sino que es un componente relacionado con su capacidad de generar neuronas hasta edades adultas avanzadas.

Así, es posible que mecanismos asociados con el mantenimiento de la actividad de telomerasa y de reguladores del ciclo celular pudiesen participar en la regulación del potencial de las CTN en otras regiones del SNC durante el desarrollo temprano, cuando éstas pierden la capacidad de generar células del linaje neuronal.

TELÓMEROS Y TELOMERASA

Los telómeros son complejos nucleoprotéicos (de DNA y proteínas) que protegen los extremos de los cromosomas lineales en organismos eucariontes. En los mamíferos, estas estructuras están formadas por múltiples repeticiones contiguas de la secuencia TTAGGG. La extensión de la región de secuencias repetidas puede ser de 10 mil a 100 mil pares de bases (componente de DNA de doble cadena), seguida por una extensión de 50 a 300 nucleótidos con la misma secuencia (región de cadena sencilla). Esta región de cadena sencilla, rica en guaninas, puede adquirir las estructuras secundarias que distinguen a los extremos de DNA protegidos, tales como la estructura tipo bucle (T-loop en inglés), en la que la región de cadena sencilla invade la región de DNA doble de la que también es complementaria, o los cuádruplos-G (G-quadruplex en inglés) en los que una tétrada de guaninas puede formar una estructura cuadrada con hasta 4 asas de DNA plegado. Las regiones teloméricas son de poca afinidad para los nucleosomas, pero reclutan a un complejo protéico formado por seis diferentes proteínas: TRF1 y TRF2 se unen a la región telomérica de doble cadena, POT1 a la extensión de cadena sencilla; TPP1 y TIN2 forman el vínculo entre estas dos regiones; RAP1 interacciona directamente con TRF2. La función de este grupo de proteínas es: regular la longitud, proteger de enzimas de degradación, controlar cascadas de señalización y reclutar las enzimas necesarias para la función telomérica. El DNA telomérico también es transcrito, el RNA telomérico (TERRA por sus siglas en inglés) consiste en múltiples repeticiones de la secuencia UUAGGG y tiene una función estructural mediante su interacción con TRF2 o mediante la formación de complejos DNA-RNA (O'Sullivan and Karlseder, 2010).

La replicación del DNA durante la fase S del ciclo celular se lleva a cabo de forma semiconservativa. Las DNA polimerasas sintetizan DNA en dirección 5' a 3', usando como templado la cadena de DNA original; para iniciar la polimerización de nucleótidos requieren de un oligómero de DNA o RNA que es degradado posteriormente. Conforme la horquilla de replicación se desplaza, una de las cadenas se sintetiza de forma continua (hebra líder) y la otra en fragmentos discontinuos que son posteriormente ligados (hebra rezagada). La degradación de los primeros nucleótidos que dan inicio a la polimerización representa un problema para la replicación de moléculas de DNA lineal pues, en la hebra rezagada, siempre quedara inconclusa la copia de los extremos. Se estima que se pierden entre 100 y 200 nucleótidos con cada división celular, debido a este fenómeno. Esta pérdida limita el número de veces que una célula puede dividirse en función de la longitud telomérica que posee. El descubrimiento de la enzima telomerasa representó

una solución al problema de la replicación de dichos extremos (Chan and Blackburn, 2004; O'Sullivan and Karlseder, 2010).

La telomerasa es un complejo ribonucleoprotéico con actividad de transcriptasa reversa, es decir, sintetiza DNA a partir de un templado de RNA. Esta enzima puede extender la región de cadena sencilla de DNA telomérico para compensar la pérdida de nucleótidos en la región de los extremos que no se pueden replicar. Los componentes esenciales de la enzima son el protéico de 127 KDa y aproximadamente 112 aminoácidos, TERT, y el componente de RNA de aproximadamente 430 nucleótidos, TERC. TERT cataliza la polimerización de nucleótidos y TERC funciona como templado. Otras proteínas auxiliares a la función de telomerasa son: DKC1 (dyskerin), TCAB1 (proteína de los cuerpos de Cajal), RUVBL1 (pontín) y RUVBL2 (reptin); los complejos TERT, TER y DKC1 se forman en los cuerpos de Cajal y son transportados a las regiones teloméricas por TCAB1, donde RUVBL1 y 2 funcionan como ATPasas (Chan and Blackburn, 2004; O'Sullivan and Karlseder, 2010; Ozturk et al., 2014).

La expresión y actividad de telomerasa se restringe a células y tejidos que están proliferando activamente, tales como: células troncales, células de la línea germinal, células cancerosas, parte de las células hematopoyéticas, el endometrio, la placenta, el hígado y la epidermis. Pero no se expresa en células somáticas diferenciadas o envejecidas; lo cual significa que las células somáticas que se dividen activamente pueden acumular la pérdida de hasta 5 mil pares de bases de sus extremos teloméricos durante toda la vida. Dado que en estos casos el acortamiento de los telómeros es progresivo con cada ronda de duplicación del DNA, los telómeros son considerados un reloj biológico que cuenta el número de divisiones celulares. Si eventualmente los telómeros se reducen a una longitud crítica, son procesados mediante la respuesta de daño a DNA mediada por p53 (a través de la cinasa ATM si el daño se interpreta como un corte de doble cadena, o a través de ATR si el acortamiento deja libre DNA de cadena sencilla). Independiente de la respuesta mediada por p53, el acortamiento telomérico también puede promover la acumulación del CKI p16^{INK4A} (Morgan, 2007). La principal repercusión es la pausa, o incluso la salida del ciclo celular, que puede culminar en apoptosis o senescencia replicativa. Debido a esto, la longitud telomérica es considerada reflejo de la edad y mecanismo supresor de tumores (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007; Collado et al., 2007).

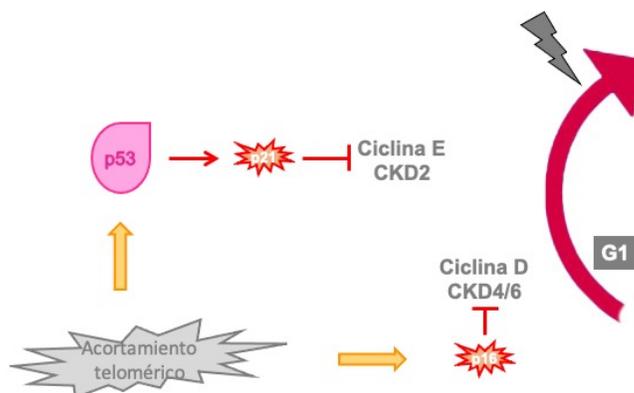


Figura 3. Reguladores del ciclo celular que se activan por acortamiento telomérico. Vías dependientes e independientes de p53 promueven la acumulación de CKI, lo cual inhibe la progresión del ciclo celular como consecuencia del acortamiento de telómeros.

Si la respuesta mediada por p53 falla y las células siguen proliferando a pesar del acortamiento telomérico, los extremos de los cromosomas no protegidos ocasionan la inestabilidad del genoma que puede resultar en rearrreglos cromosomales que pueden promover el desarrollo y la progresión tumoral (Morgan, 2007). De ahí que entender los mecanismos que regulan la actividad de telomerasa en condiciones no patológicas, como mecanismo que permite la replicación de cromosomas lineales durante el desarrollo (cuando el material genético se replica continuamente), también tiene implicaciones para el entendimiento de condiciones patológicas relacionadas con rearrreglos cromosomales.

Telómeros en el sistema nervioso central

Dada la importancia de entender los mecanismos que conservan la estabilidad genómica y la longitud telomérica durante el desarrollo embrionario, cuando se llevan a cabo rápidas divisiones celulares que permiten la organogénesis, diversos estudios han descrito la expresión y regulación de las subunidades de la enzima telomerasa, TERT y TERC, durante el desarrollo embrionario en roedores (Blasco et al., 1998). De forma más específica, durante el desarrollo del cerebro también se ha caracterizado la expresión de la enzima telomerasa. Se ha observado que la mayor disminución de su actividad ocurre de forma rápida y temprana en el desarrollo, alrededor del día 18 en el embrión murino; este fenómeno coincide con la disminución de la proliferación de los progenitores neurales (Klapper et al., 2001). Como ya se mencionó, sólo la ZSV conserva la actividad de telomerasa en roedores adultos, en el resto del cerebro la expresión y actividad se pierde poco después del nacimiento (Caporaso et al., 2003); en este estudio se probó que la expresión corresponde a la porción celular que incluye a los progenitores neurales. Otra diferencia entre las CTN de distintas etapas de desarrollo del cerebro, son los mecanismos para contener con la inestabilidad genómica relacionada con el acortamiento telomérico; CTN adultas, deficientes de telomerasa, proliferan a menor velocidad que las CTN aisladas de un embrión de 14.5 días (Ferron, 2004) lo cual sugiere que la proliferación de las CTN adultas está sujeta a la regulación de otros mecanismos moleculares intracelulares.

Otros estudios han demostrado el efecto del factor de crecimiento fibroblástico (FGF-2), que es un regulador importante de la neurogénesis, para inducir la proliferación y la actividad de telomerasa en progenitores neurales de la corteza cerebral, evidenciando otro mecanismo por el que es un factor importante durante el desarrollo del SNC (Haik et al., 2000).

La relevancia de la estabilidad telomérica también se ha descrito durante el proceso de diferenciación neuronal, en el que la mayor parte de las neuronas recién generadas se elimina por apoptosis y sólo una pequeña fracción se transforma en neuronas maduras con

conexiones sinápticas. Se ha visto que las neuronas recién generadas son particularmente sensibles a daño al DNA telomérico por una disminuida expresión de telomerasa y de la proteína TRF2; la expresión de TRF2 aumenta en neuronas maduras y su sobreexpresión puede proteger a la neuronas recién generadas del proceso de apoptosis (Cheng et al., 2007). Cabe resaltar que, en células no mitóticas, como las neuronas maduras, inducir la inestabilidad telomérica mediante la inhibición de TRF2 no activa la vía de reparación de daño al DNA mediada por p53 pero sí incrementa la expresión del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, p21^{Cip} (Zhang et al., 2006).

Por otro lado, también se ha demostrado cómo el acortamiento telomérico afecta el número de neuronas que se puede obtener de progenitores multipotentes de la SZV, así como induce un desarrollo deficiente de las ramificaciones neuríticas; este fenómeno está asociado a la actividad de p53 y es de mayor intensidad en organismos de edad avanzada (Ferron et al., 2009).

Aunque el efecto de la regulación telomérica se ha estudiado desde diferentes perspectivas, no se ha evaluado su papel en la regulación de potencial de diferenciación de CTN multipotentes.

CICLO CELULAR

El ciclo celular es el proceso mediante el cual una célula se multiplica; se trata de una secuencia ordenada de eventos altamente regulados, que permite la transmisión de la información genética de una célula a otra, y en la que los componentes celulares son duplicados y distribuidos en las dos células resultantes (Morgan, 2007).

Las **fases** del ciclo celular se definen en función de la cantidad de DNA presente: en la Fase S el DNA se replica para duplicar todos los cromosomas; en la fase M se distribuyen los componentes celulares duplicados. Durante la Fase M se da lleva a cabo la división nuclear (mitosis) y, en la mayoría de los casos, la división celular (citocinesis); al periodo entre el final de la mitosis y el inicio de la siguiente se le conoce como interfase. En la mayoría de las divisiones celulares se distinguen dos fases adicionales denominadas Gap 1 o G1 (que precede a la Fase S) y Gap 2 o G2 (que precede a la mitosis); las fases Gap son fases de crecimiento para la célula, en la que se concluye la duplicación de componentes y en la que se presentan importantes eventos regulatorios. Muchas células son funcionales sin dividirse por largos periodos o salen definitivamente del ciclo celular cuando alcanzan su diferenciación terminal y entran a lo que se denomina estado G0; a este estado se le define como una fase G1 extendida.

El ciclo celular debe llevarse a cabo de forma rápida y muy precisa. La fidelidad, con la que se transmite la información genética de una célula a otra, depende de un **sistema de**

control basado en reacciones bioquímicas finamente cronometradas que no permiten el inicio de una fase hasta que la anterior se concluya adecuadamente.

Los componentes centrales del sistema de control del ciclo celular son las cinasas dependientes de ciclinas (CDK por sus siglas en inglés), las cuales catalizan la fosforilación dependiente de ATP de diversos sustratos proteicos. Aunque su expresión es constante, la actividad de las CDK oscila a lo largo del ciclo en función de las fluctuaciones en la expresión de las ciclinas, sus reguladores. Se pueden formar múltiples complejos ciclina/CDK al combinar los diversos tipos de cinasas y ciclinas; diferentes complejos actúan en cada una de las etapas del ciclo celular por lo que se les identifica como G1, G1/S, S y M; cada complejo promueve la activación de la fase que sigue, fosforilando sustratos específicos.

Las CDK son una familia de cinasas de serina/treonina de entre 30 y 40 KDa que en células animales consta de 9 miembros, de los cuales sólo 4 participan directamente en la regulación del ciclo celular (CDK1, 2, 4 y 6). Su actividad, además de depender de la unión de la ciclina correspondiente,

es también regulada por la fosforilación de un residuo de treonina cerca de su sitio activo la cual es catalizada por las cinasas activadoras de CDK (CAK por sus siglas en inglés) así como por la fosforilación/desfosforilación de uno o dos residuos en el sitio activo de la enzima mediadas por las cinasas Wee1 y Myt1 y la fosfatasa CDC25.

Las ciclinas también se clasifican en los mismos cuatro grupos que las CDK: G1, G1/S, S y M, sin embargo, la misma ciclina puede tener diferentes funciones, diferentes patrones de expresión en diferentes tipos celulares o contribuir a diferentes procesos. Aunque todas poseen una estructura terciaria similar, la longitud de la región amino-terminal es particularmente variable pues contiene los dominios reguladores específicos de cada ciclina.

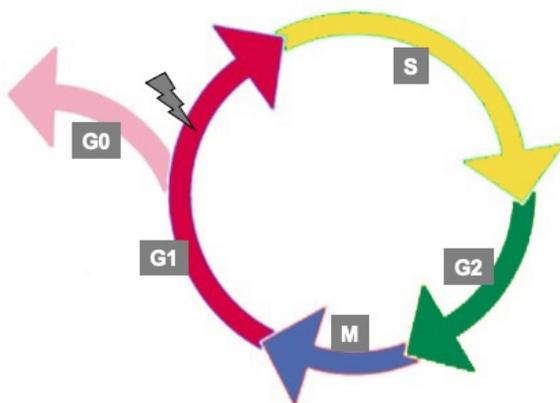


Figura 4. Fases del ciclo celular. En cada fase se activa un complejo Ciclina-CDK encargado de fosforilar proteínas específicas de las que depende la progresión del ciclo.

Fase	Ciclina	CDK
G1	Ciclina D	CDK 4 y 6
G1/S	Ciclina E	CDK 2
S	Ciclina A	CDK 2
G2	Ciclina A	CDK 1
M	Ciclina B	CDK 1

La actividad de los complejos de ciclina/CDK también es regulada por sus respectivos inhibidores (CKI por sus siglas en inglés), los cuales se pueden clasificar en dos familias de acuerdo con su estructura. Los miembros de la familia INK4 inhiben específicamente las subunidades catalíticas de los complejos CDK4 y CDK6, este grupo incluye a las proteínas p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} y p19^{INK4D}. La familia Cip/Kip incluye a p21^{Cip}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, y su actividad afecta las cinasas dependientes de ciclina D, E y A. Los miembros de la familia INK4 actúan interfiriendo con la unión de las ciclinas pues se unen a las formas monoméricas de la CDK; mientras que los miembros de la familia Cip/Kip interactúan tanto con la cinasa como con la ciclina, modificando así la estructura del complejo y bloqueando el sitio de unión de ATP. Contraria a su función inhibitoria, la unión de las proteínas Cip/Kip a los complejos de CDK4 y 6 con la ciclina D aumenta su interacción y promueve su actividad en lugar de inhibirla en la fase G1 temprana (Sherr and Roberts, 1999; Vidal and Koff, 2000).

Existen tres **puntos de control** cruciales para la progresión del ciclo celular. El primero es el G1/S en el cual se requiere que se cumplan las condiciones apropiadas para la proliferación, se activan los complejos ciclina/CDK de Fase S e incluso algunos de la Fase M. El segundo es el G2/M en el que se requiere la fosforilación de las proteínas que ensamblan el huso mitótico. Y el tercero es el de la transición entre metafase y anafase, en el que se da la degradación de las ciclinas y proteínas que mantienen unidas a las cromátides hermanas por parte del sistema de proteólisis denominado complejo promotor de la anafase (APC por sus siglas en inglés), permitiendo así que se complete la mitosis.

El punto de control G1/S determina la tasa de proliferación de un organismo unicelular o de las células que forman un tejido; depende de factores tanto intrínsecos como extrínsecos. En la mayoría de las células, mitógenos extracelulares activan las cascadas de señalización que repercuten en la activación y desinhibición de los complejos ciclina-CDK de G1; uno de los blancos principales de estos complejos son las proteínas de la familia RB que, al estar desfosforilados en células quiescentes, se unen a los factores de transcripción de la familia E2F manteniéndolos inactivos. Pero una vez que RB es fosforilada por el complejo ciclina D-CDK4/6, se activa la transcripción de los genes de G1/S mediada por E2F.

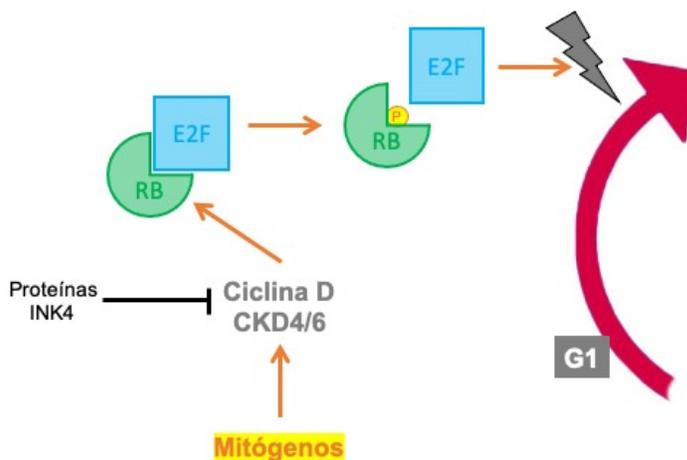


Figura 5. Reguladores del punto de control G1/S. Principales reguladores del complejo ciclina D-CDK4/6, cuyo efecto es fosforilar a RB para que E2F pueda activar la transcripción

El ciclo celular se puede describir como la secuencia de los siguientes eventos (Israels and Israels, 2001; Morgan, 2007; Sherr and Roberts, 1999):

- Mitógenos extracelulares activan la cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés) la cual promueve la expresión de las ciclinas tipo D.
- El ciclo comienza con un incremento en la expresión de las ciclinas D que se asocian a las CDK 4 y 6.
- Los complejos ciclina D-CDK4/6 se transportan al núcleo donde son fosforilados y activados por las CAK y donde fosforilan a la proteína RB, lo cual la disocia del factor de transcripción E2F.
- Al ser liberado, E2F activa la expresión de genes como las ciclinas E que se asocian a la CDK2 permitiendo la transición G1/S; este complejo también contribuye al mantenimiento de RB fosforilado.
- Los complejos ciclina E-CDK2 promueven la transcripción de la maquinaria necesaria para la replicación de DNA durante la fase S, así como la transcripción de la ciclina A.
- Con la unión de la ciclina A-CDK2 procede la síntesis de DNA e incrementan los niveles de ciclinas A y B.
- Los complejos ciclina A/B-CDK1 dirigen la progresión de la mitosis y activan al complejo promotor de la anafase (APC).
- El APC degrada a las proteínas que mantienen unidas a las cromátides hermanas para que concluya la mitosis.
- El APC degrada las ciclinas de fase S y M para que las condiciones sean apropiadas para que el ciclo pueda reiniciar.

A lo largo de todo el ciclo celular, el contenido de DNA de una célula está expuesto a cambios químicos que pueden ir desde una modificación sutil en la estructura de un nucleótido tales como: depurinación, deaminación, alquilación o la formación de enlaces entre pirimidinas adyacentes, hasta cortes en ambas cadenas de la doble hélice; la respuesta celular a éstos es proporcional a la magnitud del daño, para reparar alteraciones de nucleótidos, la célula cuenta con los sistemas de escisión de bases o de nucleótidos que simplemente remueven la región del DNA dañado y la vuelven a sintetizar utilizando a la cadena no dañada como templado. Los cortes de doble cadena son reparados por ligasas de DNA que simplemente reúnen los extremos rotos; esta unión de extremos no homólogos no es ideal pues se corre el riesgo de perder algunas bases si los extremos de DNA fueron degradados antes de ser reunidos. Un método más preciso de reparación es mediante la recombinación homóloga entre cromátides hermanas o cromosomas homólogos.

En casos extremos, cuando el daño al DNA es extenso o difícil de reparar, se activa la **respuesta especializada de daño a DNA** con la cual la progresión del ciclo celular se

detiene. Esta respuesta está centrada en las cinasas ATR y ATM. La unión de estas cinasas al DNA dañado sirve como plataforma para el ensamblaje de los componentes de los complejos de reparación de DNA que a su vez unen y activan a las cinasas efectoras Chk1 y Chk2, las cuales transmiten la señal de daño a los componentes del sistema de control del ciclo celular para inhibirlo. Dado que la respuesta de daño a DNA se puede activar en cualquier fase del ciclo, ésta puede interferir sobre los tres puntos de control del ciclo celular.

En células animales, la proteína reguladora **p53** es de particular importancia en la respuesta de daño a DNA. p53 se une directamente a los promotores de sus genes blanco para regular su tasa de transcripción; el resultado de la activación de p53 es un incremento en las proteínas que inhiben la progresión del ciclo celular (como p21^{Cip} y RB) o estimulan apoptosis, así como una disminución de los inhibidores de muerte celular. Dado que la falta de p53 genera una respuesta de daño a DNA deficiente y la acumulación de mutaciones que incrementan la posibilidad de perder el control de la proliferación, se le considera un supresor de tumores. El principal regulador de p53 es la ligasa de ubiquitinas MDM2, que promueve su degradación proteosomal y mantiene los niveles de p53 al mínimo cuando no hay daño al DNA; la actividad de MDM2 es a su vez regulada negativamente por la proteína ARF (producto de splicing alternativo del gen que codifica para el CKI p16^{INK4A}). Tanto MDM2 como p53 son blancos de fosforilación por parte de las cinasas de la respuesta a daño a DNA: la fosforilación de MDM2 en la Ser395 mediada por ATR inhibe su unión a p53; la fosforilación de p53 en las Serinas 15 y 20 por ATR y Chk2 respectivamente, inhibe también la unión de MDM2; la fosforilación de p53 también promueve su tetramerización, lo cual garantiza su localización nuclear.

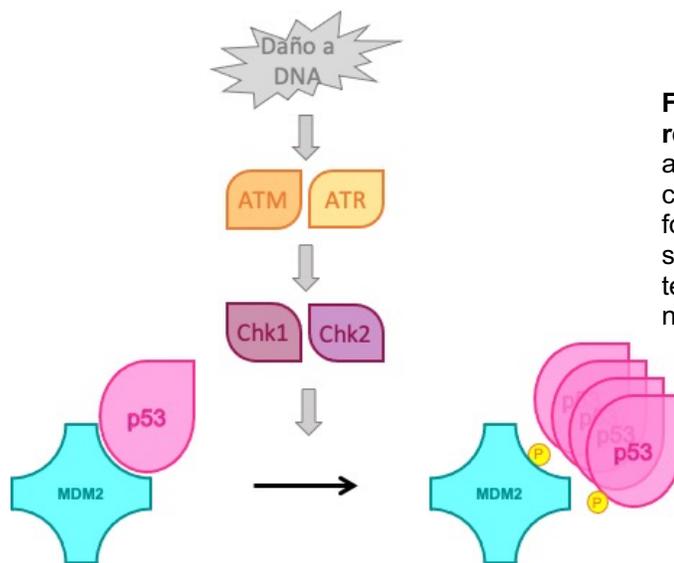


Figura 6. Activación de p53 como respuesta a daño al DNA. La activación de las cinasas correspondientes permite la fosforilación que activa p53, inhibe su degradación, permite su tetramerización y su translocación al núcleo.

El resultado de un ciclo celular que progresa sin contratiempos son dos células hijas; sin embargo, hay que recalcar que no todas las células de un organismo se encuentran proliferando permanentemente; una célula puede entrar a un estado de quiescencia o de

senescencia, puede diferenciarse o puede morir por apoptosis. Estas alternativas del ciclo celular son cruciales durante toda la vida de un organismo multicelular y son producto de la actividad de los mismos reguladores de proliferación ya descritos (Blomen and Boonstra, 2007):

Un desbalance en estímulos mitogénicos o la acumulación de cierto tipo de daño al DNA que no comprometa la integridad celular pueden inducir un estado de senescencia replicativa en el cual las células dejan de dividirse.

Control del ciclo celular en las células troncales neurales

Como se mencionó anteriormente, una de las características moleculares que distingue a las CTN es la expresión del factor transcripcional BMI1. Éste silencia de forma directa la expresión del locus *INK4A*, el cuál codifica a los reguladores p16^{INK4A}, que inhibe los complejos ciclina-CDK, y p19^{ARF}, que promueve la acumulación de p53; lo cual implica que la expresión de BMI1 previene la expresión de factores que interfieren con la progresión del ciclo celular.

Diversos estudios han mostrado que interferir con la progresión del ciclo celular afecta el potencial de diferenciación de las CTN. La olomoucina es un derivado de purina que actúa como un potente inhibidor del complejo ciclina B-CDK1, pues compite con el sitio de unión de ATP de la cinasa; de esta forma inhibe la progresión del ciclo celular y en dosis elevadas puede incluso bloquearlo (Schutte et al., 1997). Este compuesto se ha usado como inhibidor de la fase G1 para hacer que la duración de la división celular se alargue e inducir la anticipación de la fase de neurogénesis en CTN aisladas del telencéfalo embrionario (Calegari, 2003, 2005). A la inversa, acortar la fase G1, mediante la sobreexpresión del complejo CDK4-ciclina1, retarda el establecimiento de la fase neurogénica y permite una mayor expansión de la población de CTN (Lange et al., 2009). Lo que estos estudios plantean es que modificar la duración del ciclo celular representa un mecanismo para modular la transición entre la fase de expansión y la fase de neurogénesis, argumentado que el tiempo al que la maquinaria celular está expuesta a los determinantes de una fase u otra, es fundamental. Estos estudios se enfocan a la fase del desarrollo en que las CTN dejan de expandirse como población y empiezan a generar células del linaje neuronal, no existen estudios enfocados a la fase en la que la capacidad neurogénica se pierde y las CTN adoptan un perfil gliogénico.

Otros estudios han mostrado que la regulación del ciclo celular de las CTN depende de los inhibidores del ciclo celular clásicos; por ejemplo: la salida del ciclo celular de las CTN al adoptar el linaje neuronal en la médula espinal, depende de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas de la familia Cip/Kip (Gui et al., 2007). Se ha caracterizado también la expresión del inhibidor p19^{INK4D} durante el desarrollo embrionario del SNC en neuronas postmitóticas (Coskun and Luskin, 2001). La importancia de regular el ciclo

celular no sólo tiene que ver con mecanismos antitumorales, también se ha visto que la carencia de inhibidores de la progresión del ciclo celular, como p21^{Cip}, afecta el mantenimiento de la población de CTN que se requiere durante etapas avanzadas de la vida de un organismo pues, sin éste, las células tienen un límite de proliferación que se agota en edades tempranas, si el ciclo celular no se regula negativamente (Kippin et al., 2005).

p53 también tiene un papel importante en el control del ciclo celular de las CTN. *In vitro*, la deficiencia de p53 favorece la expansión de progenitores neurales en forma de neuroesferas y éstas tienen una preferencial capacidad de diferenciarse a neuronas; como se esperaba, éstas tienen una menor respuesta a daño a DNA (Armesilla-Diaz et al., 2009). La vía p19^{ARF}-p53 ha sido descrita como esencial para el establecimiento de la fase de gliogénesis en CTN telencefálicas. El mecanismo de acción de esta vía parece ser similar al de los fármacos que al alargar la duración del ciclo celular promueven una mayor exposición a determinantes de linaje celular; en este caso, la vía p19^{ARF}-p53 favorece el efecto de factores gliogénicos tales como el factor ciliar neurotrófico o CNTF, por sus siglas en inglés (Nagao et al., 2008).

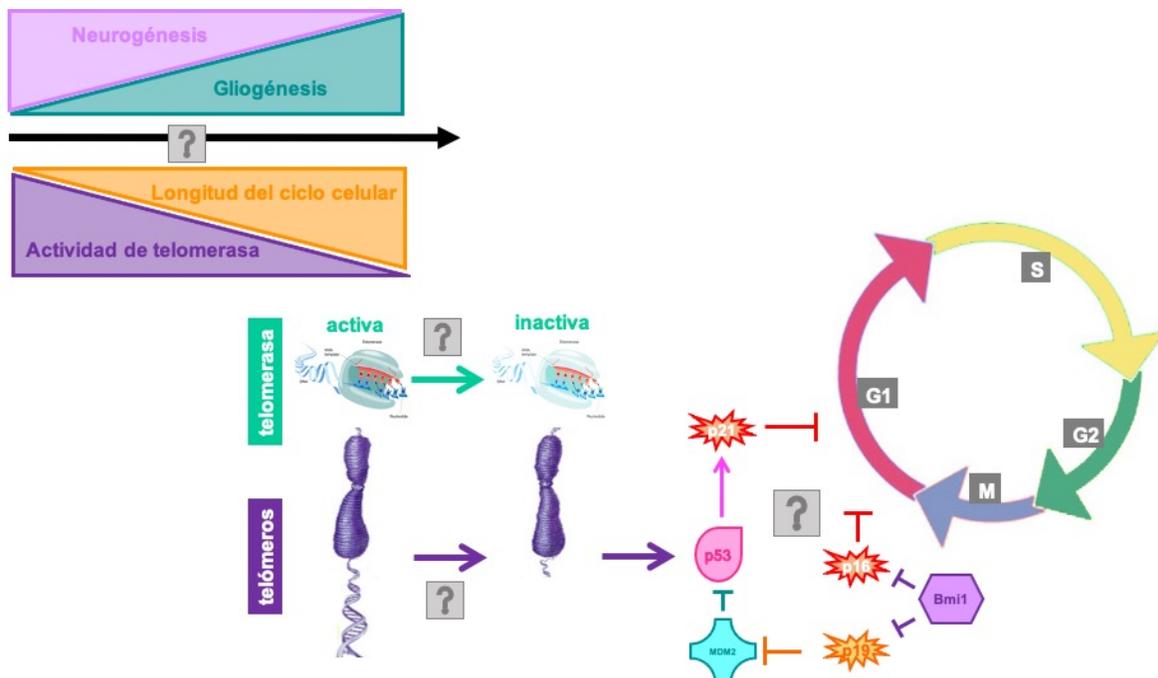
Se han medido cinéticas de proliferación durante el desarrollo del SNC desde los años 60s con lo cual se ha mostrado una gran variabilidad en la duración del ciclo celular, la cual depende, principalmente, de la región del tubo neural que se evalúe, y de la edad del organismo (Molina and Pituello, 2017). A la duración del ciclo celular incluso se le ha dado la atribución de determinar el fenotipo cortical entre especies, pues resulta que no sólo la duración del desarrollo cortical es mayor en primates que en roedores, también lo es la duración del ciclo celular (Borrell and Calegari, 2014). Aunque esta última sólo sea una hipótesis evolutiva, lo que sí es un hecho es que la duración de la división proliferativa para expandir una población celular es siempre menor que la división cuando las células van a diferenciarse; por ejemplo, en el embrión de pollo, la duración del ciclo celular durante la fase de expansión de las CTN es de 8 horas, sin embargo, al iniciar la fase neurogénica la duración se duplica a 16 horas (Olivera-Martinez and Storey, 2007). No existen estudios que describan posibles cambios en la duración del ciclo celular durante la transición de la fase neurogénica a la fase gliogénica cuando las CTN pierden el potencial de generar neuronas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los mecanismos moleculares que, hasta el momento, se conocen como reguladores de la transición de la fase de neurogénesis a la fase de gliogénesis, durante el desarrollo del sistema nervioso central, no explican la irreversibilidad de la pérdida del potencial neurogénico de las células troncales neurales.

El acortamiento telomérico es una modificación a la estructura del DNA que es irreversible cuando las células dejan de expresar la enzima telomerasa, y su efecto se puede ver reflejado en el producto de las subsecuentes divisiones celulares. Aunque éste podría estar asociado con el potencial de diferenciación, se desconoce el estado de la regulación telomérica y del ciclo celular de las células troncales neurales durante la transición de la fase de neurogénesis a la fase de gliogénesis.

Resulta interesante que dos de los mecanismos capaces de interferir con la progresión del ciclo celular, a través del punto de revisión en la fase G1, estén abatidos en la zona subventricular, la única región del sistema nervioso central donde las células troncales neurales conservan la capacidad de generar neuronas hasta edades adultas avanzadas. Por un lado, la actividad de telomerasa previene la erosión telomérica que activaría la vía p53/ p21^{Cip}; por otra parte, la expresión preferencial de BMI1 evita la acumulación del CDKI p16^{INK4A} y de p19^{ARF}. Es por esto que, en este trabajo, se decidió evaluar la longitud telomérica y el estado de los reguladores del ciclo celular en las células troncales neurales, de otras regiones del sistema nervioso, que no conservan el potencial neurogénico, y probar si éstos están relacionados con el proceso de diferenciación celular.



HIPÓTESIS

La transición de neurogénesis a gliogénesis está regulada por la duración del ciclo celular de las células troncales neurales que, a su vez, depende de que éstas conserven la actividad de telomerasa.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el estado de la regulación telomérica y del ciclo celular de las células troncales neurales, durante el desarrollo del sistema nervioso central para determinar si, conforme el desarrollo procede y el potencial de diferenciación se restringe, la actividad de la enzima telomerasa disminuye y los telómeros se acortan; así como, evaluar si se activan vías de regulación del ciclo celular, alargando la longitud de éste, mientras se da la transición de neurogénesis a gliogénesis.

Para alcanzar este objetivo se plantean los siguientes:

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Caracterizar la expresión y actividad de la enzima telomerasa durante las fases de neurogénesis, de transición y de gliogénesis.
- 2) Determinar la longitud telomérica en células troncales neurales durante el desarrollo.
- 3) Evaluar la expresión de reguladores del ciclo celular y la duración de la longitud del ciclo en estadios neurogénicos, de transición y gliogénicos.
- 4) De encontrarse cambios significativos alrededor de la transición de neurogénesis a gliogénesis, evaluar el potencial de diferenciación modificando alguno de los reguladores de la longitud telomérica o del ciclo celular.

MODELO DE ESTUDIO

Por su relativa simplicidad anatómica en este estudio se utilizó la médula espinal cervical de ratón como modelo para alcanzar los objetivos planteados.

La médula espinal ha sido ampliamente utilizada como modelo de diferenciación neuronal, se han hecho descripciones muy detalladas del establecimiento de los diferentes linajes neuronales a lo largo del eje dorso-ventral durante el desarrollo embrionario (Jessell, 2000). Se ha descrito la relevancia de las señales inductivas y la posición de los progenitores neuronales a lo largo de los ejes dorso-ventral y rostro-caudal para la diferenciación y el establecimiento de los distintos subtipos neuronales, encargados de la transmisión sensorial, la integración de señales propioceptivas y el control motor. La organización estereotípica de la médula espinal se debe a la integración de señales extrínsecas (gradientes de Sonic hedgehog y BMP) y señales intrínsecas (regulación transcripcional mediada por factores de homeodominio y factores hélice-asa-hélice) que controlan la proliferación y la diferenciación celular (Helms and Johnson, 2003).

Además, respecto a las células troncales neurales presentes en la médula espinal adulta, se ha estimado que su tiempo de duplicación *in vivo* es de cinco a siete días, que las células resultantes expresan marcadores de progenitores gliales inmaduros y que hasta las cuatro semanas empiezan a expresar marcadores específicos de astrocitos u oligodendrocitos diferenciados (Horner et al., 2000). La actividad mitótica de las CTN en la médula espinal puede ser estimulada en respuesta a un daño tisular o por la infusión de factores de crecimiento. Sin embargo, las células diferenciadas que resultan son de las estirpes astrocítica y oligodendrogial, en ningún caso son neuronas, debido a la restricción generalizada del potencial neurogénico (Martens et al., 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizaron ratones de la cepa CD1 provistos por la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM o por la compañía comercial Harlan México S.A de C.V. Se solicitaron ratonas gestantes cronometradas, donde el día que se observó el tapón vaginal fue considerado como día postconcepción 1.

Las ratonas gestantes se sacrificaron por dislocación cervical y se realizaron las cirugías necesarias para obtener las muestras embrionarias al día postconcepción 11 (E11) y al día postconcepción 14 (E14). Para la obtención de las muestras postnatales, se monitoreó el nacimiento de la camada y los animales se sacrificaron por hipotermia 24 horas después del nacimiento, día postnatal 1 (P1). Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Caracterización inmunohistoquímica de la médula espinal cervical

Embriones completos del E11 y E14, así como el segmento cervical de la columna vertebral de ratones del P1, se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% por 48 horas a 4°C. Después de la fijación todas las muestras se lavaron con amortiguador de fosfatos y solución salina 0.1 M (PBS), se crioprotegieron deshidratándolas mediante un gradiente de sacarosa (10, 20 y 30%) y se congelaron en metilbutano. Se realizaron cortes histológicos de 20 µm en criostato, sólo se colectaron los correspondientes a la sección cervical.

El tratamiento de los cortes previo a la inmunotinción consistió en: incubación de 60 minutos en desenmascarador de antígenos comercial (immunoretriever, Bio-SB) a 65°C; incubación de 15 minutos en desenmascarador de antígenos comercial a temperatura ambiente; 3 lavados de 20 minutos con Tritón al 0.5% en PBS (PBST).

Para la inmunotinción se utilizó una solución de suero de caballo al 8% en PBST como solución de bloqueo; los cortes se incubaron en anticuerpo primario, diluido en solución de bloqueo, en las condiciones descritas en la Tabla 1 para cada anticuerpo (como control negativo, los cortes se incubaron en solución de; después de 3 lavados de 10 minutos con PBST, los cortes se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en anticuerpo secundario, acoplado a peroxidasa o al fluoróforo Alexa 488 o Alexa 594, diluido en solución de bloqueo y se hicieron 3 lavados de 10 minutos con PBS.

En los cortes que fueron procesados con microscopía de luz blanca se realizó la contratinción nuclear con verde de metilo al 0.5% en acetato de sodio; el tejido que fue observado con fluorescencia se contratiñó con DAPI 1 µg/ml en PBS. Las imágenes se

capturaron en un microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio.

Tabla 1. Especificaciones de cada anticuerpo primario utilizado

Antígeno	Hospedero	Marca y núm. de cat.	Dilución	Duración de la incubación	Temperatura de la incubación
TERT	Conejo	Santa Cruz SC-7212	1:400	48 horas	4°C
DCX	Cabra	Santa Cruz SC-8066	1:500	15 horas	Ambiente
GFAP	Pollo	Millipore AB5541	1:1000	15 horas	Ambiente
SOX-2	Cabra	Santa Cruz SC-17320	1:500	15 horas	Ambiente

Extracción de proteínas para cuantificación o ensayo de actividad enzimática

Se reunió el tejido resultante de la disección de la médula espinal cervical de 4 animales por edad para cada muestra destinada a Western blot, o de un animal para cada muestra del ensayo de actividad enzimática.

El tejido se lisó y homogeneizó en solución CHAPS (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, Benzamidina 0.1 mM, β-Mercaptoetanol 5 mM, CHAPS 0.5% y glicerol 10%) con inhibidor de RNAsas (160 U/ml). Las muestras se homogeneizaron mecánicamente con micropistilos de plástico, se incubaron 30 minutos a 4°C y se centrifugaron a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo de ácido bicinonínico, según las indicaciones del proveedor (Pierce, ThermoFisher) utilizando una curva de albúmina como referencia. La absorbancia se determinó con un espectrofotómetro tipo NanoDrop 1000, las lecturas se realizaron a una longitud de 562nm

Cuantificación de proteínas mediante Western blot

Se separaron 25 µg de proteína por muestra mediante electroforesis a 175 V en un gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia semiseca a 300 mA por 1.5 horas. La eficiencia de la transferencia se evaluó con la tinción de Ponceau. Después de desteñirla, la membrana se incubó en solución de bloqueo (leche descremada al 5% y suero bovino fetal al 3% en amortiguador Tris y solución salina (TBS) con Tween-20 al 0.1%) por 1 hora.

Para el inmunoblot, la membrana se incubó simultáneamente con los anticuerpos primarios anti-Telomerasa (Santa Cruz sc-7212, hecho en conejo) y anti-Actina (abcam 16039, hecho en conejo), diluido en solución de bloqueo, por 15 horas; después de 3 lavados de 10 minutos con TBS con Tween-20 al 0.1%, la membrana se incubó con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano anti-IgG de conejo (Chemicon AP182P, generado en burro), diluido en solución de bloqueo, por 2 horas a temperatura ambiente y se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TBS. La actividad de peroxidasa se reveló usando como sustrato luminol según las instrucciones del proveedor (Millipore).

La luminiscencia se capturó en un documentador digital marca GelLogic 1500 y la intensidad se cuantificó en la imagen digital con el software ImageJ. Los valores de densidad de telomerasa se normalizaron con respecto a los de actina, que se usó como control de carga.

Cuantificación de actividad de telomerasa: ensayo TRAPeZe

Para medir la actividad de telomerasa se utilizó el kit TRAPeZe según las instrucciones del proveedor (Chemicon). La solución incluida en el kit contiene un templado sintético de 50 nucleótidos (TS) que sirve como sustrato de la actividad catalítica de telomerasa y como oligonucleótido para la reacción de PCR, un oligonucleótido reverso, dNTPs y taq polimerasa. El ensayo consta de dos etapas, en la primera, la telomerasa presente en la muestra de interés o en el control positivo, extiende el TS añadiendo repeticiones de 6 nucleótidos (GGTTAG) por 30 minutos; en la segunda etapa, los oligonucleótidos de diferentes longitudes (50, 56, 62, 68, etc.) se amplifican por PCR. Se preparó la mezcla indicada con los reactivos contenidos en el kit y a cada tubo se le agregaron 500 ng de proteína por muestra (para que las reacciones fueran comparables). La reacción se llevó a cabo con el programa para termociclador recomendado en el kit que consiste en: Ciclo 1 (1x) 30 minutos a 30°C. Ciclo 2 (30x) 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 55°C; 60 segundos a 72°C. Los productos de PCR se separaron por electroforesis a 300 V en un gel de acrilamida al 17% en TBE 1x.

El gel se tiñó con una solución de Bromuro de Etidio para su visualización con luz UV y se documentó en el equipo digital marca GelLogic 1500; la intensidad se cuantificó en la imagen digital con el software ImageJ.

Cultivo de células troncales neurales: modelo de neuroesferas

Se reunió el tejido resultante de la disección de la médula espinal cervical de 5 animales de los días E11, E14 y P1 para cada muestra destinada a este ensayo.

El tejido obtenido de los animales de edades embrionarias se disgregó mediante digestión enzimática con tripsina 0.1% (20 minutos a 37°C); para disgregar el tejido obtenido de los animales de edad posnatal se utilizó una solución de digestión con tripsina 1.33 mg/ml, hialuronidasa 0.67 mg/ml, ácido quinurénico 0.2 mg/ml y DNAsa 0.02 mg/ml. Al cabo de la digestión, el tejido se dispersó mecánicamente con 20 pases por micropipeta de 200 µl y 30 pases por pipeta Pasteur con la punta redondeada. Posteriormente, el tejido disgregado se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante; el pellet se resuspendió en 1 ml de medio definido (DMEM/F12 con Hepes sin suero, suplementado con Glutamax y una mezcla hormonal que contiene: insulina 25 µg/ml, transferrina 100 µg/ml, progesterona 20 nM, putrescina 60 µM, selenito de sodio 30 nM y heparina 1 µg/ml). Las células se contaron y se sembraron, en cajas de múltiples pozos de baja adherencia, en medio definido con EGF y FGF-2 (20ng/ml de cada uno) a una densidad de 250 mil células viables por mililitro. Se almacenaron en una incubadora a 37 °C y 5% CO₂. La misma dosis de factores de crecimiento se agregó cada tercer día para mantener las células en estado no diferenciado. A partir del día 7, después de sembradas, se revisó la formación de neuroesferas.

Las neuroesferas generadas se recolectaron y se disociaron con Tripsina al 0.025% (10 minutos a 37°C) para obtener un subcultivo a partir de las células remanentes. Las células se contaron y se sembraron, en cajas de múltiples pozos de baja adherencia, en medio definido con EGF y FGF-2 (20 ng/ml de cada uno) a una densidad de 100 mil células viables por mililitro. El subcultivo se almacenó en las mismas condiciones que el cultivo primario y también se le adicionaron factores de crecimiento cada tercer día y se dio seguimiento a la formación de neuroesferas secundarias a partir del día 7.

Olomoucina es un derivado de purina que actúa como un potente inhibidor del complejo ciclina B-CDK1, pues compite con el sitio de unión de ATP de la cinasa; de esta forma inhibe la progresión del ciclo celular y en dosis elevadas puede incluso bloquearlo (Schutte et al., 1997). Este inhibidor específico de CDK de la fase G1 alarga el ciclo celular de células progenitoras neurales. Se agregó al medio de cultivo de neuroesferas secundarias de E11 a una concentración de 50 µM (a partir de una solución stock 50 mM en DMSO). El mismo volumen de DMSO fue añadido a cultivos control. Estos cultivos fueron mantenidos en las mismas condiciones que el cultivo primario por siete días.

Caracterización inmunohistoquímica de las neuroesferas

Para realizar las inmunotinciones, las neuroesferas formadas en el subcultivo se sembraron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina, se incubaron con Suero Bovino Fetal al 1% en medio definido, para promover su diferenciación por 48 horas y se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS por 30 minutos. Se hicieron tres lavados de 5 minutos con PBS. Se incubaron 20 minutos en solución de bloqueo (glicina al 1%, tritón X-100 al 0.2% y suero de caballo al 10% en PBS); posteriormente se incubaron los anticuerpos

primarios en solución de bloqueo durante 2 horas: anti-MAP2 (1:500, AB5622, Millipore) y anti-GFAP (1:500, AB5541, Millipore). Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se incubaron los anticuerpos secundarios por 1.5 horas en solución de bloqueo, se hicieron nuevamente 3 lavados con PBS y se contratiñeron con DAPI 1 µg/ml. Las imágenes se capturaron en un microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio.

Ensayo para medir proliferación celular

El subcultivo de neuroesferas de las tres edades de interés fue tratado con BrdU (5 µM) durante las últimas 1, 3, 6, 12, ó 24 h de cultivo, tras las cuales, las neuroesferas fueron colectadas, el medio con BrdU fue remplazado por solución de disgregación en la que se incubaron por 10 minutos a 37°C; la disgregación enzimática fue inactivada y la suspensión celular fue disociada y centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente; el pellet fue resuspendido en medio definido para hacer el conteo celular; se sembraron 100,000 células en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina a una densidad de 1000 células por microlitro y se incubaron por 2 horas a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂; posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% por 30 minutos. Para la inmunodetección de BrdU, las células fijadas se trataron secuencialmente con ácido clorhídrico 0.5 N por 20 minutos a 37°C, borato de sodio 0.1 M por 10 minutos, PBS por 10 minutos, PBS con Tritón X-100 al 0.2% por 20 minutos y solución de bloqueo por 30 minutos. El anticuerpo primario anti-BrdU se diluyó 1:500 en solución de bloqueo y se incubó por dos horas. Después de 3 lavados con PBS, se incubó el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 488 por 90 minutos. Por último, las células se contra-tiñeron con DAPI 1 µg/ml. Las imágenes se capturaron en un microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio, con el cuál se realizó el muestreo de 10 campos visuales elegidos de manera sistemática y aleatoria (software StereoInvestigator, MBF). Los núcleos con tinción positiva de BrdU fueron contados manualmente y en los resultados se representan como la proporción del total de núcleos.

Extracción, cuantificación de mRNA y PCR

El subcultivo de neuroesferas de las tres edades fue colectado después de 7 días de cultivo y las neuroesferas fueron disgregadas; un millón de células fueron colectadas en un tubo de 1.5 ml. La suspensión fue centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos y lavada con PBS, después fue centrifugada y se congeló el pellet sin sobrenadante. El pellet descongelado fue resuspendido en Trizol y el RNA se extrajo mediante el método de fenol y cloroformo, siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen). Se determinó la

concentración de RNA por espectrofotometría en NanoDrop. El cDNA se sintetizó utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems).

Se utilizaron 100 ng de cDNA para cada reacción de PCR con la mezcla Kapataq (KAPA Biosystems) y las siguientes condiciones de amplificación: 2 min a 94°C; 25 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C, y 1 min a 72°C; 5 min a 72°C.

Las siguientes parejas de oligonucleótidos (5' -> 3') se utilizaron para amplificar cada gen de interés:

p16INK4A, TCACACGACTGGGCGATTG y AGCTCTGCTCTTGGGATTGG (amplicón de 79 pb),
p19ARF, TGAAGTTCGTGCGATCCCGG y TGAGCAGAAGAGCTGCTACG (amplicón de 160 pb),
p19INK4D, TCCCATCCATCTGGCGATA y ATGGCTGTTGCCTGTAGGAG (amplicón de 400 pb),
p21CIP, GGAACATCTCAGGGCCGAAA y CTGAGGATCACCCCCAGGTA (amplicón de 519 pb),
p27KIP, AGATACGAGTGGCAGGAGGT y TGTTTACGTCTGGCGTCGAA (amplicón de 381 pb),
p53 ATTCAGGCCCTCATCCTCCT and GAAGCCATAGTTGCCCTGGT.

Se utilizó el gen de *actina* como control interno de carga. Como control negativo, las reacciones se incubaron sin añadir el cDNA de las muestras.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio para su visualización y documentación con luz UV en el equipo digital marca GelLogic 1500; la intensidad se cuantificó en la imagen digital con el software ImageJ.

Análisis estadístico

El análisis se realizó con el programa Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Los datos se presentan como el promedio (\pm error estándar). Las comparaciones entre edades se hicieron con una prueba de ANOVA de una vía. El análisis post hoc de la densidad integrada del Western blot, del ensayo TRAPeze, y de los niveles de mRNA se hicieron con la prueba Kruskal-Wallis; para el diámetro de neuroesferas se usó la prueba de Tukey.

RESULTADOS

Validación del modelo de estudio: Al día embrionario 11, las células progenitoras neurales son neurogénicas y expresan de forma abundante la subunidad catalítica de la enzima telomerasa

Estudios radiográficos de los años 70's evaluaron los patrones de neurogénesis en distintas áreas del SNC, incluida la médula espinal cervical en la que el nivel más alto de producción neuronal se da entre los días 10 y 14 de desarrollo murino (Nornes and Carry, 1978). Para este trabajo se validaron las edades de estudio con marcadores moleculares asociados a progenitores neurales y relacionados al linaje neuronal y astrocítico.

SOX-2 es un factor de transcripción que se expresa tempranamente durante el desarrollo del tubo neural. Se le atribuye la inducción neural del ectodermo y el mantenimiento de los progenitores neurales tempranos. Es incluso considerado un buen marcador de progenitores neurales en el cerebro adulto (Komitova and Eriksson, 2004). En las figuras 7 y 8 podemos observar que SOX-2 es expresado por las células que rodean la luz del tubo neural al día embrionario 11 (E11) y 14 (E14), así como por un menor número de células que rodean el canal central de la médula espinal cervical, al día postnatal 1 (P1).

Doblecortina (DCX) es una proteína asociada a microtúbulos que es indispensable para la migración neuronal durante el desarrollo del SNC y es utilizado como marcador de neuroblastos. En la figura 7 podemos observar que sólo está presente en la médula espinal cervical del E11, etapa a la que se le atribuimos una neurogénesis activa.

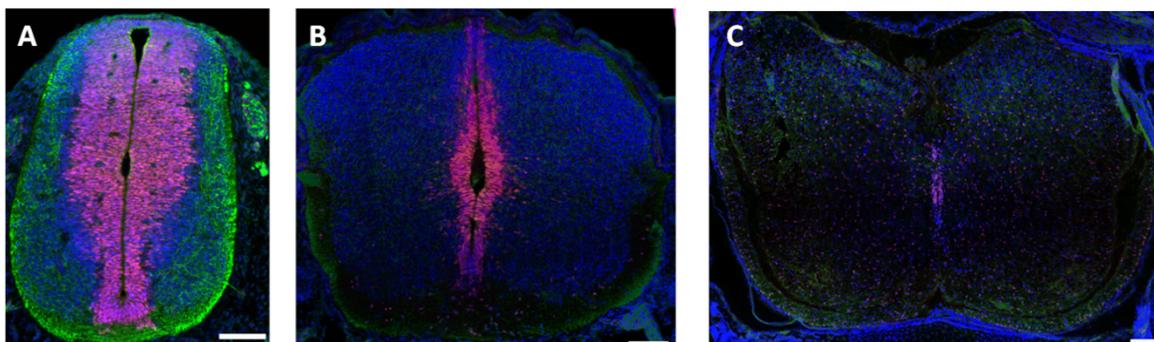


Figura 7. Expresión de SOX-2 y doblecortina (DCX) durante el desarrollo de la médula espinal cervical. Fotomicrografías que ilustran cortes transversales de 20 μ m de médula espinal cervical inmunoteñidos para DCX (verde) y SOX-2 (rojo), contrateñidos con DAPI (azul). A: E11; B: E14; C: P1 (escala= 50 μ m).

La proteína ácida glial fibrilar (GFAP) es una proteína asociada a filamentos intermedios que modula la forma y el movimiento de los astrocitos; es utilizada como un método de identificación de rutina de astrocitos maduros. En la figura 8 podemos ver que sólo está presente en las regiones externas de la médula espinal cervical del P1, en las células

ubicadas en la región correspondiente a la materia blanca. El hecho de que no esté presente en las etapas fetales, E11 y E14, confirma que en éstas aún no están presentes células maduras de la estirpe astrocítica.

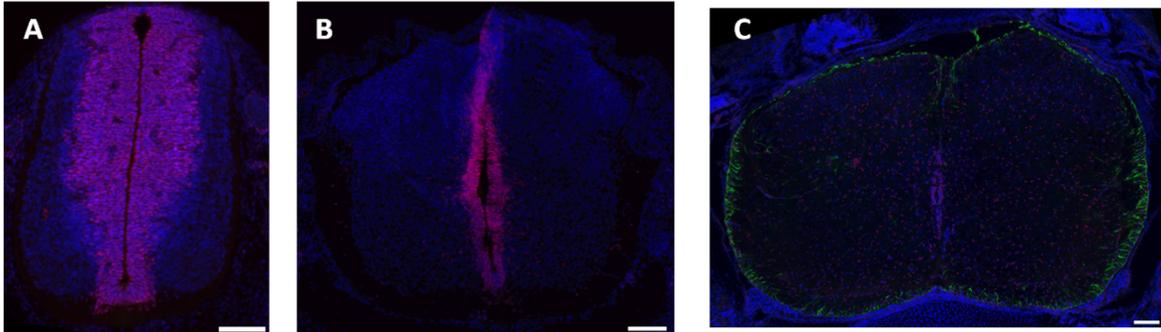


Figura 8. Expresión de SOX-2 y la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) durante el desarrollo de la médula espinal cervical. Fotomicrografías que ilustran cortes transversales de 20 μm de médula espinal cervical inmunoteñidos para GFAP (verde) y SOX-2 (rojo), contrateñidos con DAPI (azul). A: E11; B: E14; C: P1 (escala= 50 μm).

Visualizar la localización de estos marcadores de diferenciación en el tejido neural, permitió confirmar que E11 es un estadio neurogénico, P1 gliogénico y E14 un estado de transición; de esta forma se establecieron estas edades para realizar la evaluación de los mecanismos moleculares de interés.

De forma equivalente, se visualizó la presencia de la subunidad proteica de la enzima telomerasa (TERT) para validar el modelo de estudio. En la figura 9 se puede observar que la expresión de TERT es muy abundante en los núcleos de toda la médula espinal en E11, ésta disminuye para E14 pero muchos de los núcleos de la zona ventricular la conservan y para P1 la expresión se concentra en los núcleos de las células que rodean el canal central, pero la intensidad de la marca y la frecuencia de los *foci* por núcleo es menor si se compara con los núcleos de la zona ventricular de E11.

Es importante señalar que TERT en E14 y P1 parece expresarse en la misma población que presentó expresión de SOX-2, pero no se realizaron las tinciones dobles para validar que fueran las mismas células.

Con estos resultados se validó la caracterización de estas tres etapas del desarrollo como representativas de la fase neurogénica, el día embrionario 11 (E11), de la fase gliogénica, el día posnatal 1 (P1) y de transición, el día embrionario 14 (E14).

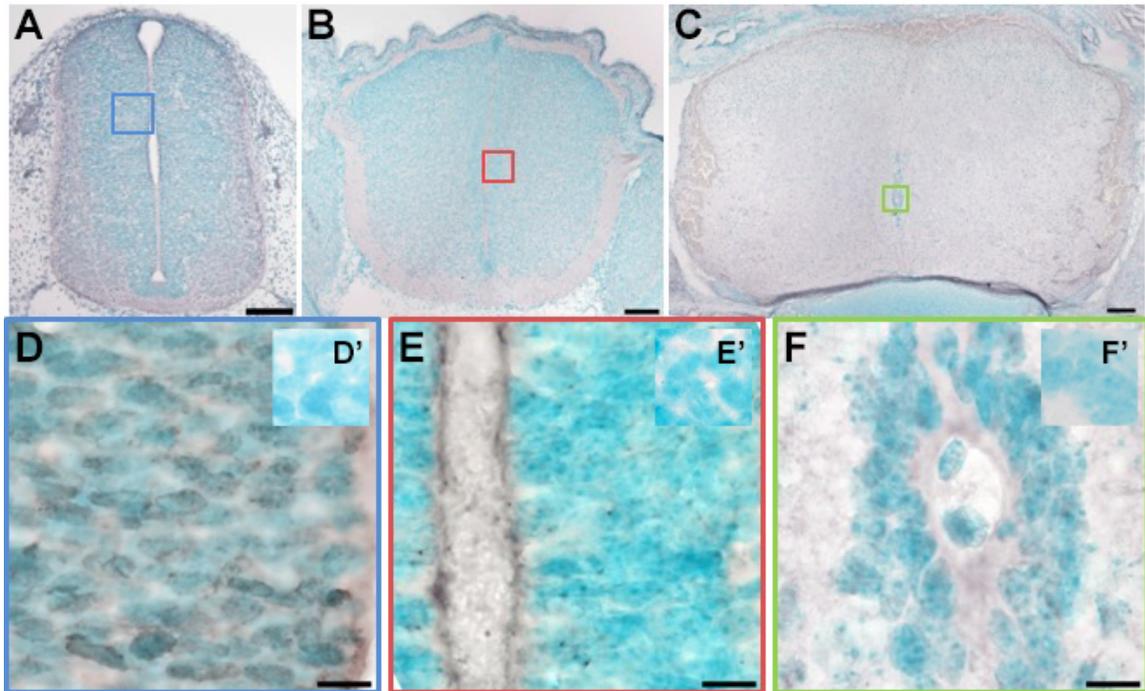


Figura 9. Expresión de telomerasa durante el desarrollo de la médula espinal cervical. Fotomicrografías que ilustran cortes transversales de 20 μm de médula espinal cervical inmunoteñidos para TERT (precipitados específicos de color negro) y contrateñidos con verde de metilo. A y D: E11; B y E: E14; C y F: P1. Insertos D' E' y F' muestran núcleos de los controles negativos como referencia (escala= 100 μm en ABC; 10 μm en DEF).

El nivel de la enzima telomerasa y su actividad disminuyen durante la transición de neurogénesis a gliogénesis *in vivo*

Además de la evaluación cualitativa en el tejido, se cuantificó el nivel de TERT durante el desarrollo de la médula espinal cervical mediante Western blot y la actividad de telomerasa con el ensayo enzimático correspondiente.

En la figura 10 se muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos con la inmunodetección, así como la cuantificación respectiva; la cantidad del componente proteico de la enzima telomerasa (TERT) se determinó normalizando la densidad integrada de su inmunodetección, con la densidad integrada de la inmunodetección de la proteína actina. Es posible observar una clara disminución de la subunidad catalítica de la enzima de E11 a E14 que se mantiene disminuida en P1. Resulta también importante evaluar cuantitativamente en estas etapas la actividad enzimática o la longitud telomérica, para entender las posibles consecuencias de la disminución de la expresión de la enzima.

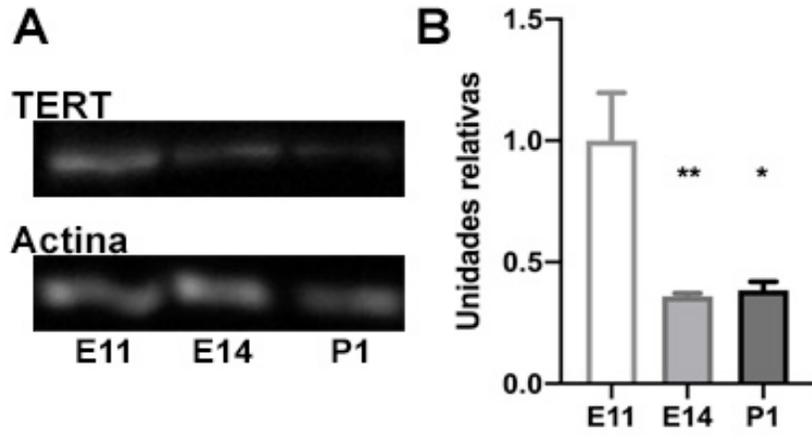


Figura 10. Análisis por Western blot de la subunidad catalítica de la enzima telomerasa. A. Inmunoblot para TERT y para actina, representativos de las tres edades estudiadas. B. Representación gráfica de la cuantificación hecha de la densidad integrada de la inmunodetección de TERT normalizada con la inmunodetección de actina. Los datos se presentan como el promedio (+/- error estándar) de 4 experimentos independientes. **p=0.006 y *p=0.049 tras prueba Kruskal-Wallis respecto a E11.

Para medir la actividad de telomerasa se utilizó el kit TRAPeze según las instrucciones del proveedor (Chemicon). Como parte de este protocolo, los componentes de la reacción *in vitro* incluyen un sustrato de DNA sintético que contiene la secuencia que reconoce la enzima telomerasa y nucleótidos que son usados por la enzima que esté presente en 500 ng de proteína de la muestra de interés, para ampliar la longitud del sustrato mediante la adición repetida de seis nucleótidos por ciclo. Como resultado se obtienen fragmentos de DNA de múltiples tamaños que son amplificados por PCR y visualizados en un gel de acrilamida. El análisis de los productos obtenidos se realizó con el programa ImageJ, el cual permite graficar el patrón de bandeado que se observa en la figura 11A. Para el análisis estadístico de la figura 11B, se analizó la densidad de cada carril en función del área (Densidad Integrada) en tres muestras por edad.

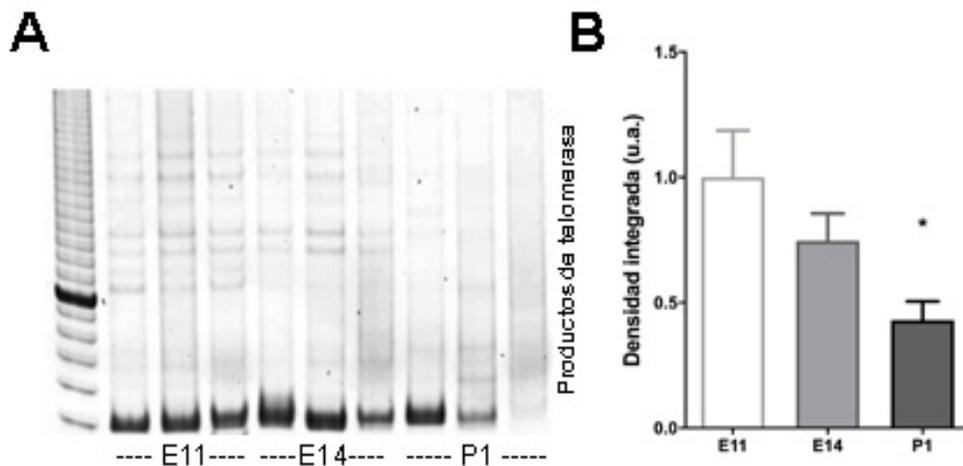


Figura 11. Análisis de la actividad de la enzima telomerasa *in vivo*. A. Gel de acrilamida con los productos de la PCR de los oligonucleótidos extendidos por la telomerasa de las siguientes muestras: Carril 1 marcador de peso molecular; carriles 2, 3 y 4 productos obtenidos con muestras de E11. Carriles 5, 6 y 7 productos obtenidos con muestras de E14. Carriles 8, 9 y 10 productos obtenidos con muestras de P1. B. Representación gráfica de la cuantificación hecha de la densidad integrada de la actividad de la enzima telomerasa. Los datos se presentan como el promedio (+/- error estándar) de 3 experimentos independientes. * $p=0.03$ tras prueba Kruskal-Wallis respecto a E11.

En el gel se puede observar que el patrón de bandeo más abundante se presenta en las muestras de E11, lo cual refleja una mayor actividad de telomerasa respecto a las otras edades; aunque los productos de las muestras de E14 alcanzan la misma longitud máxima que los de E11, los de menor longitud no parecen ser tan abundantes y en general la intensidad de todos los productos es menor; con las muestras de P1 no se obtiene un patrón de bandeo constante, lo cual se puede atribuir a la baja actividad de telomerasa en la muestra, misma que correlaciona con la disminución en la expresión de la subunidad catalítica que se había observado anteriormente por Western blot.

En ambos casos, debe tomarse en cuenta que la disminución de TERT y de la actividad enzimática pueden estar influenciada por la dilución de la población de CTN conforme el desarrollo avanza. Lo cual se puede constatar con la disminución en el número de células positivas a SOX-2 en las figuras 7 y 8. Sería ideal poder medir estos parámetros en CTN aisladas. Una alternativa es el uso de un modelo *in vitro*.

Validación del modelo de neuroesferas: el potencial de diferenciación observado *in vivo* se conserva *in vitro*

Para profundizar la caracterización de los mecanismos moleculares de diferenciación se utilizó una aproximación *in vitro* mediante el cultivo de neuroesferas. Lo primero que se validó fue el patrón de diferenciación que se había observado *in vivo*. Se aislaron CTN del segmento cervical de las tres edades de interés, se expandió la población por una semana y después se disgregaron las neuroesferas primarias y se hizo un subcultivo a menor densidad celular. Las neuroesferas secundarias se fijaron y tiñeron con los marcadores de diferenciación neuronal y glial, MAP2 y GFAP, respectivamente (figura 12A). De la población total de neuroesferas obtenidas, se cuantificó la proporción con capacidad de generar ambos linajes, o que mostraban una diferenciación preferencial hacia el linaje neuronal o glial. Como se observa en la figura 12B, casi 60% de las neuroesferas secundarias obtenidas del tejido E11 muestran inmunoreactividad neuronal (positivas para MAP2); una proporción similar de neuroesferas de E14 muestran un doble inmunomarcaje para MAP2 y GFAP y, por último, las neuroesferas de P1 dan origen, de forma preferencial, a células del linaje glial (que expresan GFAP).

Estos resultados confirman las observaciones de otros autores respecto al efecto de los factores intrínsecos que conservan el potencial de diferenciación sin importar el microambiente de cultivo (Seaberg et al., 2005). Por lo que consideramos que las neuroesferas son un modelo útil para evaluar los mecanismos de restricción del potencial de diferenciación.

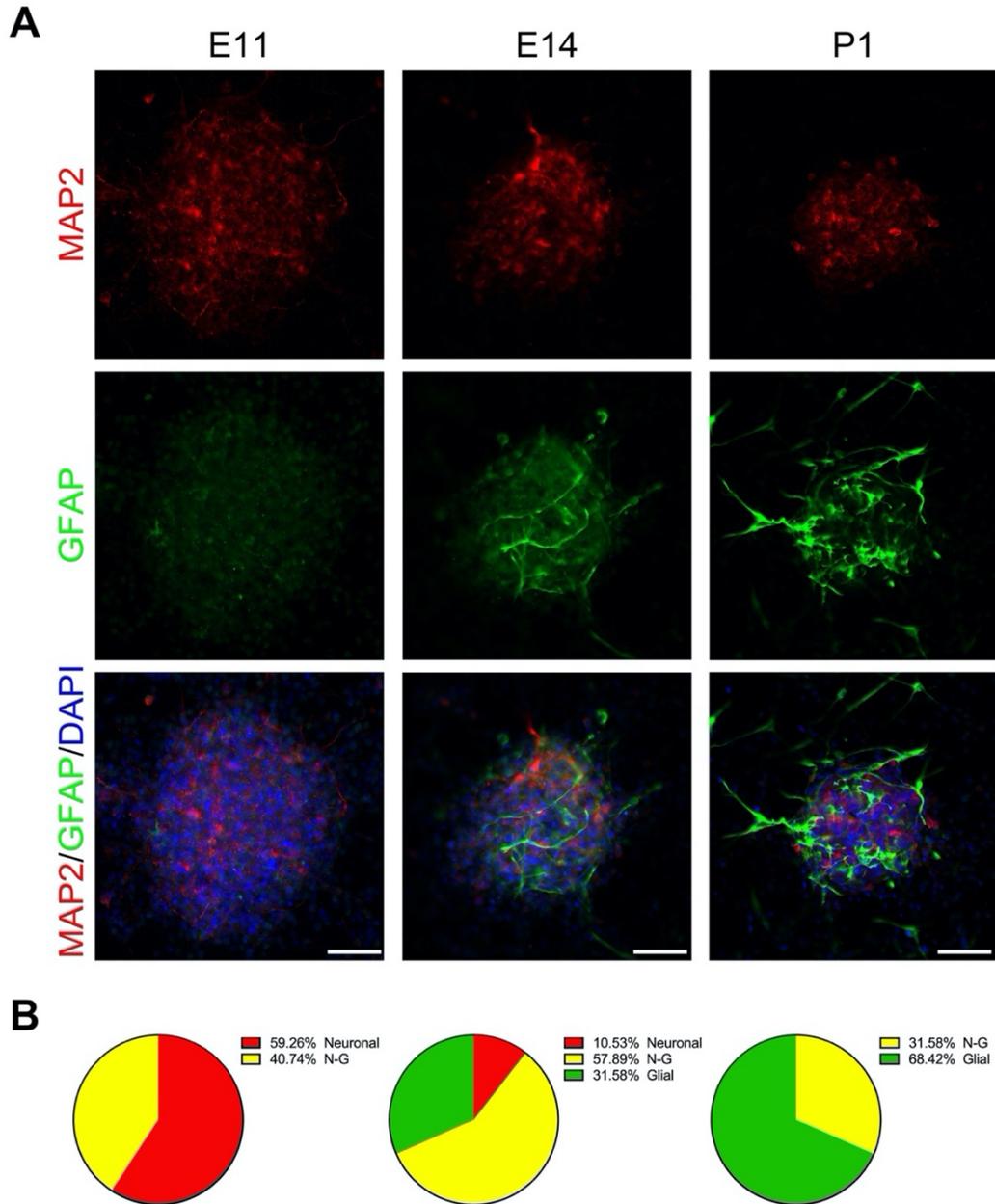


Figura 12. Potencial de diferenciación de CTN de médula espinal cervical durante el desarrollo. A. Fotomicrografías de neuroesferas representativas de las tres edades de interés, inmunoteñidas para MAP2 (rojo), GFAP (verde) y contrateñidos con DAPI (azul) escala= 100 μ m. B. Representación gráfica de la cuantificación de las subpoblaciones de neuroesferas con diferentes potenciales de diferenciación (E11 n=43; E14 n=28; P1 n=40).

La actividad de telomerasa no disminuye durante la transición de neurogénesis a gliogénesis *in vitro*

Se repitió el análisis de actividad enzimática descrito anteriormente, pero para éste, los 500 ng de proteína de la muestra de interés se obtuvieron del extracto de un millón de células provenientes de la disgregación del subcultivo de neuroesferas secundarias de las edades de interés.

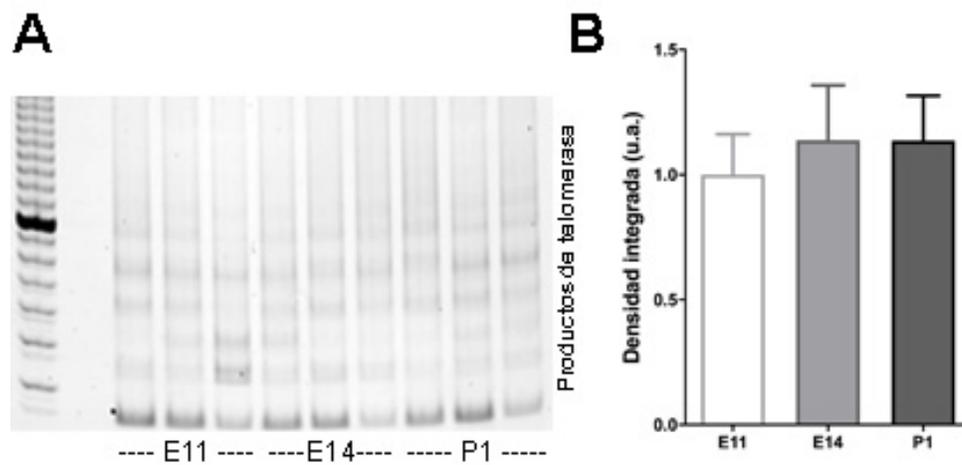


Figura 13. Análisis de la actividad de la enzima telomerasa *in vitro*. A. Gel de acrilamida con los productos de la PCR de los oligonucleótidos extendidos por la telomerasa de las siguientes muestras: Carril 1 marcador de peso molecular; carriles 2, 3 y 4 productos obtenidos con muestras de E11. Carril 5, 6 y 7 productos obtenidos con muestras de E14. Carril 8, 9 y 10 productos obtenidos con muestras de P1. B. Representación gráfica de la cuantificación hecha de la densidad integrada de la actividad de la enzima telomerasa. Los datos se presentan como el promedio (+/- error estándar) de tres experimentos independientes.

A diferencia de lo observado *in vivo*, la actividad de telomerasa no disminuye *in vitro*. Con esta observación surge la duda de si la falta de la correlación entre lo observado *in vivo* e *in vitro* se podría explicar como un artefacto del cultivo celular; no podemos descartar que alguno de los componentes del medio de cultivo active a la telomerasa, o que el medio carezca del componente del microambiente encargado de inhibir a la enzima *in vivo*; aunque así fuera, no tenemos la resolución experimental para medir la longitud telomérica en los cultivos y por lo tanto no podemos evaluar el efecto de estas estructuras sobre el potencial de diferenciación.

Las células troncales neurales con potencial neurogénico se dividen más rápido, su ciclo celular es más corto

Al día 7 de cultivo, las neuroesferas secundarias obtenidas de la médula espinal del día embrionario 11 son de mayor tamaño que las obtenidas de la médula de E14 y P1 (figuras 12A y 14A). La reducción del tamaño de las neuroesferas se ha asociado a una disminución en la capacidad de autorrenovación, pero no a un incremento en la muerte celular (Molofsky et al., 2003). Para evaluar si en este modelo el ciclo celular se alarga y la proliferación disminuye, se utilizó un marcaje con BrdU. Se agregó BrdU al medio de cultivo, durante las últimas 24, 12, 6, 3 ó 1 hora de cultivo (todos los cultivos se procesaron de manera simultánea después de 7 días). El número de células que incorporaron este análogo de timidina fue mayor en neuroesferas de E11, respecto a las de E14 y P1 (figura 14B). Mediante un análisis de regresión descrito anteriormente (Kippin et al., 2005; Smith and Luskin, 1998), en el que se utiliza el recíproco de la pendiente de la regresión lineal que se genera en cada ensayo para cada edad de interés, se calculó con un intervalo de confianza del 95%, que la duración del ciclo celular para las tres edades es de 34.7 horas para E11, 51.4 horas para E14 y 52.8 horas para P1. Con lo que se puede aseverar que el establecimiento de la fase gliogénica está acompañado de un alargamiento del ciclo celular.

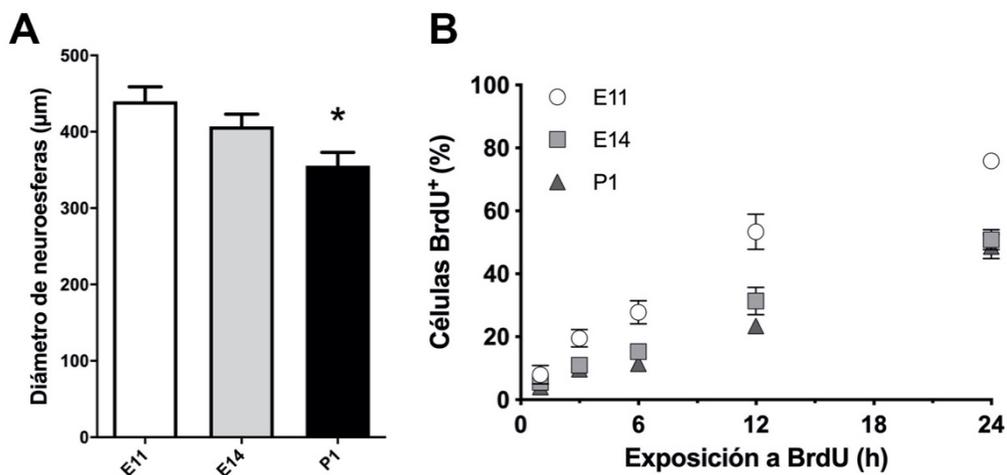


Figura 14. Análisis del tamaño de las neuroesferas y su velocidad de proliferación. A. Representación gráfica de la cuantificación del diámetro de las neuroesferas secundarias de las tres edades de interés a los 7 días de cultivo. Los datos se presentan como el promedio (+/- error estándar). E11 = 439.9 ± 18.94 µm (n=43); E14 = 407 ± 15.95 µm (n=28); P1 = 355.5 ± 17.47 µm (n=40). *p = 0.0021 tras análisis de varianza con prueba de Tukey. B. Representación gráfica del curso temporal en el que se observó el marcaje con BrdU. Los datos se presentan como el promedio de tres experimentos (+/- error estándar).

El nivel de algunos reguladores del ciclo celular aumenta durante la transición a gliogénesis *in vitro*

Se ha observado que algunos inhibidores de los complejos de cinasas dependientes de ciclinas (CKI) se activan durante el establecimiento de la fase gliogénica en estructuras telencefálicas, en particular los asociados a la vía p19^{ARF}-p53 (Nagao et al., 2008). Dado el alargamiento de la longitud del ciclo celular observado en el modelo de neuroesferas de la médula espinal, se decidió evaluar los niveles de expresión del mRNA que codifica para algunos CKI: p27^{Kip1}, p21^{Cip}, p19^{INK4D}, p16^{INK4A} and p19^{ARF}; estas moléculas representan a las familias Cip/Kip e INK4. En la figura 15 se puede observar que la expresión de p27^{Kip1}, p21^{Cip} y p19^{INK4D} no cambia en las neuroesferas obtenidas de las tres edades de interés (aunque p21^{Cip} parece aumentar la tendencia no es significativa). La expresión de p16^{INK4A} no fue detectada consistentemente. Sí se observó un incremento significativo en la expresión de p19^{ARF}, por lo que suponemos que la vía de señalización de p53 podría también participar en el establecimiento de la fase gliogénica de la médula espinal. Sin embargo, el mRNA que codifica para p53 está presente en las tres edades de forma equiparable.

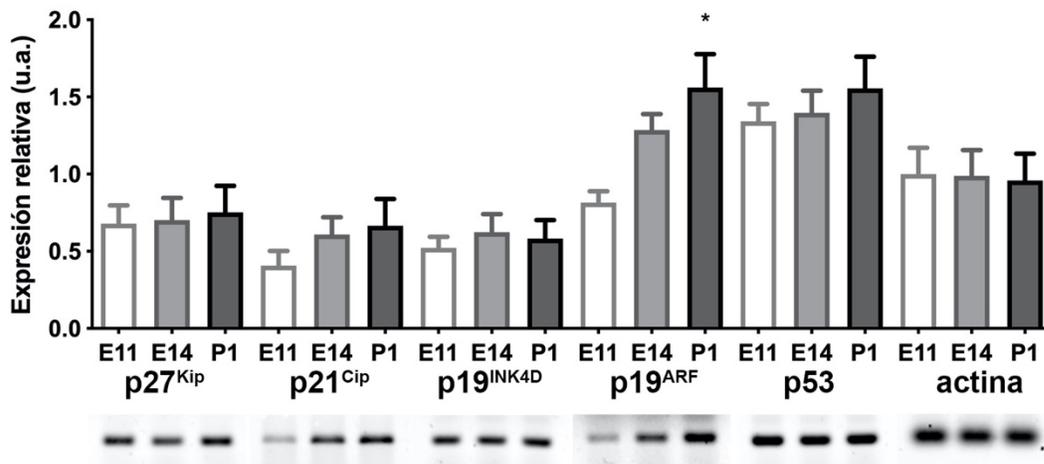


Figura 15. Expresión de reguladores del ciclo celular en neuroesferas de la médula espinal. A. Representación gráfica de la cuantificación de los niveles de expresión de los diferentes reguladores del ciclo celular en neuroesferas de las tres edades de interés. Los datos se presentan como el promedio de tres experimentos (+/- error estándar) **p=0.0048. Las fotografías alineadas en la parte inferior corresponden a los geles respectivos a cada gen analizado. Los datos se normalizaron con la expresión de actina.

Alargar el ciclo celular no afecta el potencial de diferenciación de las neuroesferas neurogénicas

Los resultados obtenidos correlacionan la pérdida del potencial neurogénico de las CTN de la médula espinal y el establecimiento de la fase gliogénica, con el incremento de la duración del ciclo celular y la disminución de la capacidad proliferativa. Para evaluar la relación se trataron neuroesferas neurogénicas del día embrionario 11 con el fármaco olomoucina, que es un inhibidor específico de los complejos de cinasas dependientes de ciclinas que alarga la duración de la fase G1 del ciclo celular.

Los cultivos tratados generaron, como se esperaba, neuroesferas de menor tamaño respecto a las generadas en cultivos control (figura 16A). De la población total de neuroesferas obtenidas, se cuantificó la proporción formada principalmente por neuronas, por astrocitos o por células de ambos linajes (figura 16B). A pesar del efecto en el tamaño de las neuroesferas, el tratamiento con olomoucina no generó diferencias significativas en el potencial de diferenciación. Las neuroesferas ilustradas en la figura 16C representan los perfiles de diferenciación más representativos en ambos tratamientos.

Fue sorprendente encontrar neuroesferas pequeñas con potencial de diferenciación neurogénico, pues las neuroesferas de tamaño equivalente obtenidas de la médula de P1 están formadas principalmente por astrocitos. Este resultado parece descartar que el establecimiento de la fase gliogénica esté asociado a la longitud del ciclo celular. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el alargamiento de la fase G1 del ciclo celular sea insuficiente para eliminar el potencial neurogénico, si el mecanismo que subyace la irreversibilidad no se ha establecido.

Desafortunadamente, para la realización de este trabajo no se contó con la resolución técnica que nos permitiera medir la longitud telomérica en nuestro modelo de estudio, ni *in vivo*, ni *in vitro*. Por lo que no es posible descartar la posibilidad de que éste sea el mecanismo que regula la irreversibilidad de la pérdida del potencial neurogénico de las células troncales neurales durante el desarrollo del sistema nervioso.

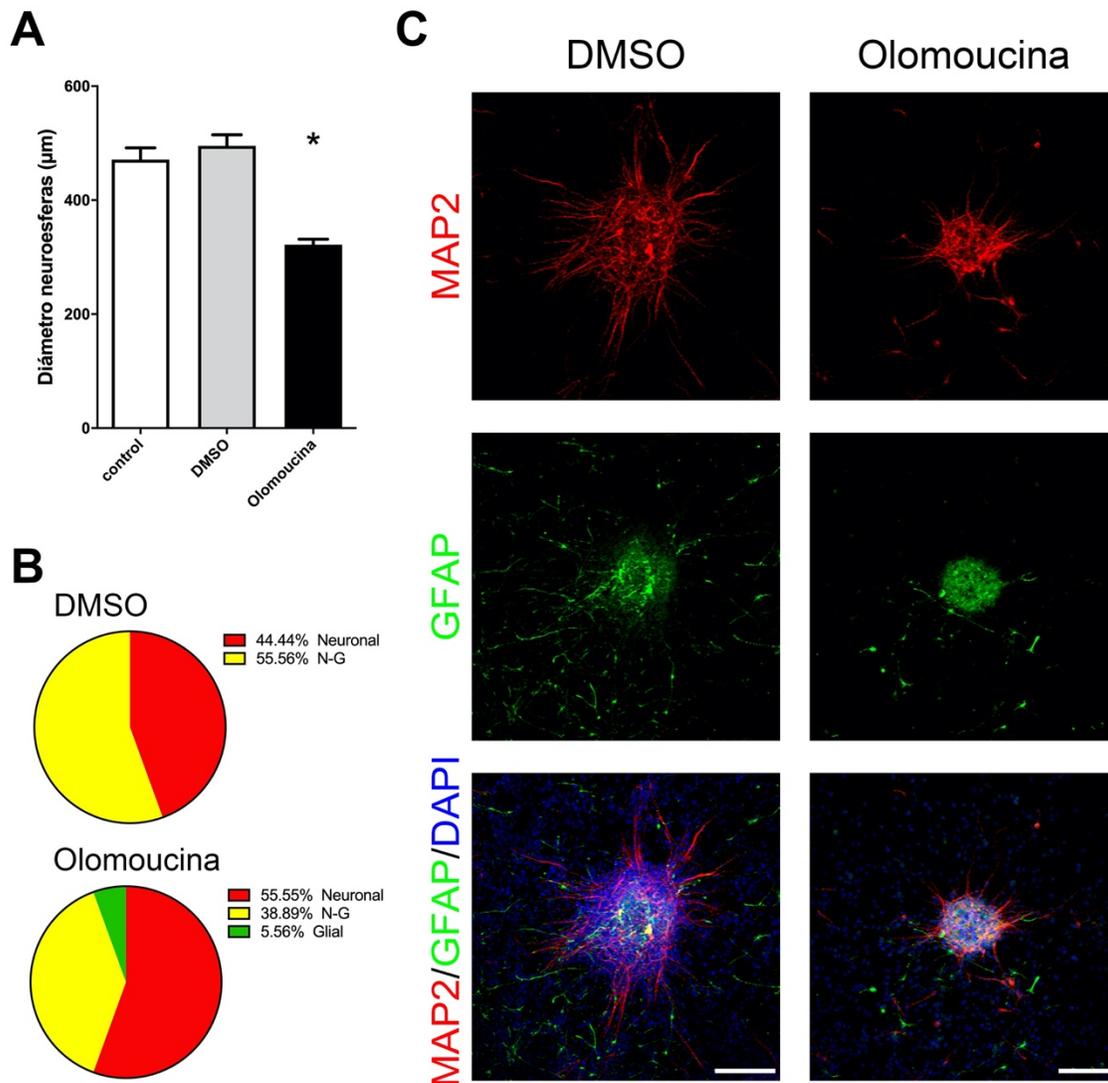


Figura 16. Tamaño de las neuroesferas y potencial de diferenciación de CTN tratadas con olomoucina. A. Representación gráfica de la cuantificación del diámetro de neuroesferas tratadas con olomoucina, con el vehículo o sin tratamiento. Los datos se presentan como el promedio (+/- error estándar). * $p = 0.0001$ tras análisis de varianza con prueba de Tukey Control = $471.3 \pm 20.37 \mu\text{m}$ ($n = 68$); DMSO = $495.4 \pm 19.48 \mu\text{m}$ ($n=58$); Olomoucina = $322 \pm 9.665 \mu\text{m}$ ($n=63$). B. Representación gráfica de la cuantificación de las subpoblaciones de neuroesferas con diferentes potenciales de diferenciación. C. Fotomicrografías de neuroesferas representativas de las tres edades de interés, inmunoteñidos para MAP2 (rojo), GFAP (verde) y contrateñidos con DAPI (azul) escala= $100\mu\text{m}$.

DISCUSIÓN

MODELO DE REGULACIÓN INTRÍNSECA DEL POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN

La diferenciación secuencial de las células troncales neurales, durante el desarrollo del sistema nervioso central, las hace un modelo muy interesante para estudiar la diferenciación y el establecimiento de linajes celulares. En este trabajo se planteó como objetivo aprovechar que, en la médula espinal, en una ventana de tiempo corta se observa la pérdida de potencial de diferenciación de las células troncales neurales, que en otros tejidos se presenta en etapas mucho más avanzadas de la vida de un organismo.

El diseño experimental de este trabajo estuvo basado en el modelo conceptual descrito en la figura 17. En este modelo se esperaba que la pérdida gradual del potencial neurogénico y el establecimiento de la fase gliogénica estuvieran acompañados de un decremento en la actividad de telomerasa, que promovería el acortamiento telomérico, y una acumulación de las señales de daño al DNA, que tendría como consecuencia un aumento en la duración del ciclo celular. Desafortunadamente, no se contó con la capacidad experimental de evaluar el elemento que pudiera fungir como el mecanismo regulador de la irreversibilidad de la pérdida del potencial neurogénico, la longitud telomérica.

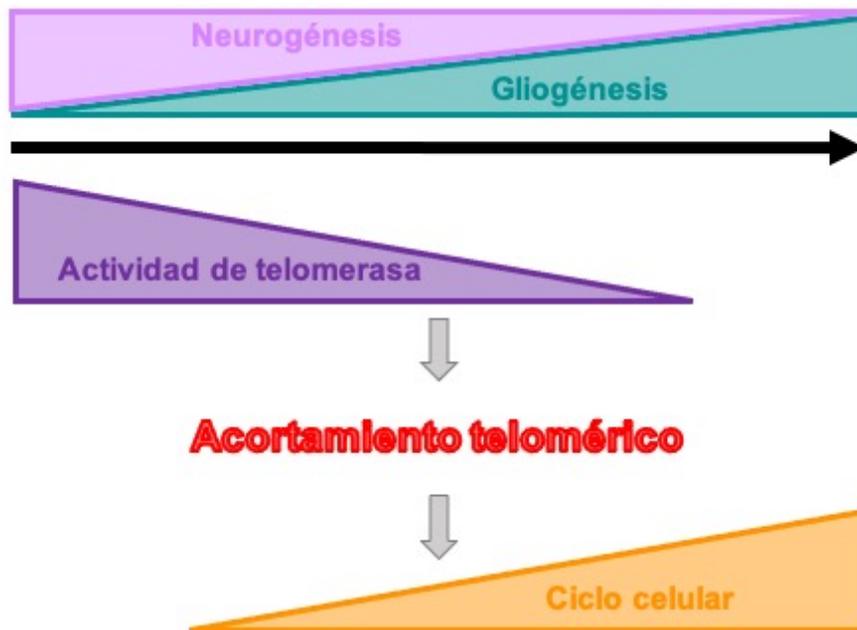


Figura 17. Modelo de la regulación intrínseca de la transición de neurogénesis a gliogénesis.

Hubo dos instancias en particular en las que medir la longitud telomérica hubiese sido fundamental para la validación de este modelo: 1) al obtener neuroesferas de las tres edades de interés (figura 12); y 2) después de tratar neuroesferas neurogénicas con olomoucina (figura 16). El no observar diferencias en la actividad de telomerasa en los cultivos de neuroesferas, pone en duda la validez del modelo. Sin embargo, existe la posibilidad de que la actividad de telomerasa documentada en la figura 13 sea un artefacto del cultivo celular, debido a que los modelos *in vitro* no recapitulan todos los componentes del microambiente. Los dos factores de crecimiento utilizados en el cultivo de neuroesferas, EGF y FGF-2, activan la expresión de telomerasa (Haik et al., 2000; Hsu et al., 2015). De ser así, la activación enzimática parece no ser suficiente para restaurar el potencial de diferenciación neurogénico en las neuroesferas aisladas del día postnatal 1, que muestran un inmunomarcaje glial; una posibilidad es que la duración del cultivo no haya sido suficiente para recuperar la longitud telomérica equiparable a las de las neuroesferas neurogénicas. De forma análoga, que el tratamiento de olomoucina no afecte el potencial de diferenciación de las neuroesferas aisladas a partir del tejido del día embrionario 11, como se observa en la figura 16, también hace cuestionable el modelo planteado. Pero esto pudo deberse a que este tratamiento no afecta la longitud telomérica y por lo tanto no se activen en su totalidad los mecanismos de diferenciación glial. Los datos obtenidos que apoyan el modelo son: 1) la disminución de la actividad de telomerasa durante la transición de la fase de neurogénesis a gliogénesis *in vivo*, 2) la conservación de los perfiles de diferenciación en las neuroesferas de las tres edades, generadas en las mismas condiciones de cultivo, que corresponden a las observaciones *in vivo*, 3) el alargamiento del ciclo celular en neuroesferas que se diferencian preferencialmente al linaje glial.

Un modelo similar en el que el alargamiento del ciclo celular regula la diferenciación durante el desarrollo del sistema nervioso central fue propuesto por Federico Calegari y Wieland Huttner en el año 2003. Su modelo de estudio fue el establecimiento de la fase de neurogénesis en el telencéfalo. Su propuesta fue que el alargamiento de la fase G1 del ciclo celular es causa y no consecuencia de la diferenciación neuronal pues, según su propuesta, para que un determinante de linaje induzca la transición de la fase proliferativa a la fase neurogénica se requiere un tiempo determinado en el que la molécula se produzca, alcance la localización subcelular en la que tendrá efecto y/o se genere el producto suficiente que regula la diferenciación. La principal similitud con el modelo planteado en esta tesis es la relevancia que se le da a los mecanismos moleculares intrínsecos que regulan el potencial de diferenciación de las células troncales. Una notable diferencia respecto al modelo planteado en este trabajo es la región del sistema nervioso estudiada, los estudios sobre la regulación de ciclo celular, que no implican la salida de éste, y la determinación de los linajes neuronales en telencéfalo, que dan origen a la corteza cerebral, son mucho más abundantes que los enfocados en la médula espinal. Gracias a los estudios enfocados en CTN se han podido establecer comparaciones evolutivas enfocadas a entender cómo se ha dado la evolución de funciones cognitivas complejas en los humanos. Entre las características distintivas de la corticogénesis en primates resaltan: 1) la presencia de zonas germinales adicionales, 2)

un retraso relativo en el establecimiento de la neurogénesis y 3) cambios en la longitud del ciclo celular neurogénico (Salomoni and Calegari, 2010). Además del efecto en el desarrollo de la neocorteza, se ha sugerido que la longitud del ciclo celular permite el refinamiento en la distinción de subtipos neuronales entre células hermanas (Borrell and Calegari, 2014).

El principal aporte de este trabajo es contribuir al modelo de regulación de la diferenciación celular mediada por factores intrínsecos, así como a la descripción de la médula espinal y la transición de la etapa de neurogénesis a la de gliogénesis que han sido menos estudiadas con esta perspectiva.

ALTERNATIVAS EXPERIMENTALES Y FUTUROS EXPERIMENTOS

Una alternativa experimental interesante para evaluar la longitud telomérica, como mecanismo regulador de la irreversibilidad de la pérdida del potencial neurogénico, sería evaluar la transición de la fase de neurogénesis a la fase de gliogénesis en animales deficientes de telomerasa.

Un modelo murino que carece del gen que codifica para el componente de RNA de la enzima telomerasa, TERC, ha permitido la descripción de efecto fisiológico del acortamiento telomérico (Lee et al., 1998). En estos ratones, la deficiencia de la enzima telomerasa *per se* no afecta el desarrollo embrionario, es posible obtener hasta cinco generaciones de estos animales. Sin embargo, la función gonadal disminuye en ambos sexos y la función hematopoyética también se ve afectada en generaciones tardías. Al estudiar otro tejido de alta proliferación en estos animales, la piel, se observó que son más resistentes al desarrollo tumoral (González-Suárez et al., 2000). En estos animales se observó que la neurogénesis disminuye en células troncales neurales telencefálicas adultas, pero no en las embrionarias (Ferron, 2004). En este modelo también se estableció que p53 es un regulador fundamental de los efectos del acortamiento telomérico en las células troncales neurales adultas (Ferron et al., 2009). Sin embargo, no se ha caracterizado el establecimiento de la fase gliogénica en el desarrollo del sistema nervioso central de estos animales. Sería interesante evaluar si la duración de las fases se mantiene y si la relación entre el número de neuronas y células gliales conserva su proporción.

El hecho de que los animales que no expresan telomerasa sean viables haría cuestionable la función del acortamiento telomérico como mecanismo de regulación de la irreversibilidad de la pérdida del potencial neurogénico de las células troncales neurales. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el mecanismo dependa de una longitud telomérica relativa; es decir, que la longitud telomérica para activar la fase de gliogénesis deba ser proporcionalmente más corta, que la longitud telomérica de la fase neurogénica, puede ser suficiente para la activación de las vías de daño a DNA que alentarían el ciclo

celular. Aunque la vía de p53 esté mucho más activa en las generaciones tardías de animales deficiente en telomerasa que presentan defectos de viabilidad, las vías de daño también se activan tanto en generaciones tempranas como en animales control (Ferron, 2004).

Otro motivo para considerar relevante la longitud telomérica como regulador del potencial de diferenciación es el efecto de la reactivación de la enzima telomerasa en los animales deficientes de TERC. Si se producen generaciones tardías de animales deficientes de esta enzima y posteriormente, en éstas se induce la expresión del gen que codifica para telomerasa, el daño al DNA se puede reducir *in vitro*, y cultivos que estarían en un estado quiescente pueden reactivar proliferación celular (Jaskelioff et al., 2011). *In vivo*, la reactivación de la expresión de la enzima telomerasa en estos animales puede revertir los fenotipos degenerativos observados en órganos reproductivos, bazo e intestino. Respecto al sistema nervioso, los defectos observados, *in vitro* e *in vivo*, en la capacidad proliferativa de las células troncales neurales que no expresan telomerasa, también se pueden revertir (Jaskelioff et al., 2011).

Es importante recalcar que estos estudios se han enfocado principalmente a las células troncales neurales ubicadas en el telencéfalo de animales adultos por lo que es posible plantear, como futuras direcciones, el estudio de la transición de la fase neurogénica a la fase gliogénica de la médula espinal en ambos modelos, tanto en los animales deficientes de la actividad de telomerasa como en aquellos en que ésta se puede reintroducir.

MECANISMOS DE ENVEJECIMIENTO EN CÉLULAS TRONCALES

Aunque el modelo de estudio de este trabajo no implica la salida del ciclo celular, los mecanismos moleculares aquí planteados se han asociado con mecanismos de envejecimiento celular y senescencia replicativa (Collado et al., 2007).

Desde los años 60's se planteó la existencia de mecanismos moleculares que permiten el conteo de divisiones celulares, una especie de reloj biológico que indica en qué momento las células deben dejar de dividirse. Los primeros mecanismos considerados como parte del reloj biológico fueron la longitud telomérica, la acumulación de daño al DNA y la activación del locus INK4A/ARF (que codifica para p16^{INK4A} y p19^{ARF}). El principal efecto de estos mecanismos es como supresor de tumores, múltiples líneas de investigación han documentado la deficiencia de al menos uno de estos mecanismos en células cancerosas. Por otro lado, la activación de estos mecanismos tiene como consecuencia el envejecimiento de los organismos, esto se debe a que la acumulación de células senescentes puede comprometer la funcionalidad de un órgano o tejido y a que la senescencia de las células troncales puede limitar su función regenerativa (Collado et al., 2007).

Cambios en el funcionamiento de las células troncales, asociados con la edad, han sido documentados en diversos órganos y tejidos, tales como: el intestino, la piel, el tejido hematopoyético, el tejido nervioso y las células germinales (Schultz and Sinclair, 2016; Signer and Morrison, 2013). Los cambios en el funcionamiento de las células troncales a lo largo de la vida de un organismo se consideran adaptaciones a la velocidad de crecimiento, es decir, proliferan a alta velocidad durante el desarrollo embrionario; son quiescentes durante casi toda la vida adulta de un organismo que deja de crecer, pero se dividen intermitentemente para garantizar la homeostasis o reparación de un tejido; en edades avanzadas, entran en un estado de senescencia replicativa para prevenir la aparición de tumores. Sin embargo, dichos cambios también son consecuencia de la acumulación a través del tiempo de diferentes tipos de daño en macromoléculas y organelos, derivados de la exposición a especies reactivas de oxígeno, mutágenos exógenos, errores en la replicación del DNA o en la síntesis y degradación de proteínas (Signer and Morrison, 2013). Otros mecanismos que afectan la función de las células troncales están relacionados con reguladores epigenéticos que desregulan la expresión genética, deficiencia mitocondrial que afecta el estado oxidativo de las células, así como influencias extrínsecas relacionadas con cambios en el microambiente (Schultz and Sinclair, 2016).

Resulta interesante que muchos de los mecanismos moleculares y las vías de señalización que regulan longevidad y funcionamiento de células troncales se han descrito principalmente en levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, y modelos invertebrados como el nematodo, *Caenorhabditis elegans*, y la mosca, *Drosophila melanogaster* (Jones and Rando, 2011). En estos modelos, los principales cambios asociados al envejecimiento que afectan el funcionamiento de las células troncales se atribuyen a: la pérdida de la capacidad de renovarse; la deficiencia en los mecanismos de señalización extrínseca o a la deficiencia en la respuesta a estos; la pérdida de multipotencialidad que sesga la diferenciación de las células resultantes; el desencadenamiento de las vías de senescencia replicativa o apoptosis.

En el caso específico de las células troncales neurales, la mayoría de los estudios que describen cambios asociados al paso del tiempo están enfocados a la población que conserva la función neurogénica en el cerebro adulto. Análisis transcripcionales de la zona subventricular muestran que los genes que expresan cambian poco a lo largo del tiempo, aunque el número de CTN disminuya, como consecuencia de la activación de las vías de quiescencia, inducidas por el microambiente (Kalamakis et al., 2019). Análisis de célula única han mostrado que las poblaciones de CTN, tanto en los ventrículos laterales como en el hipocampo, son heterogéneas (Ibrayeva et al., 2021; Mizrak et al., 2019). La heterogeneidad de la zona subventricular se manifiesta en los linajes que generan las CTN de esta zona; la heterogeneidad en el hipocampo repercute en la velocidad a la que cada subpoblación entra en quiescencia y muestra señales de envejecimiento.

No todos los mecanismos que regulan el envejecimiento celular se presentan de igual forma en todos los modelos ni en todos los tejidos y órganos que conforman a un organismo de forma simultánea. En la caracterización del desarrollo de la médula espinal de este trabajo, se observó un subtipo de estos cambios: la pérdida de la capacidad de generar el linaje neuronal asociada a la disminución de la actividad de la enzima telomerasa y al alargamiento de la longitud del ciclo celular. No se descarta que haya otras modificaciones como cambios en la regulación epigenética o cambios en el estado oxidativo que pudieran también influir en la regulación del potencial de diferenciación.

LA SENESCENCIA CELULAR COMO PARTE DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Los mecanismos de envejecimiento, mencionados en la sección anterior, se han descrito principalmente en células troncales somáticas de organismo adultos. Sin embargo, en este trabajo se estudiaron mecanismos asociados al envejecimiento durante el desarrollo embrionario.

En el año 2013, dos grupos reportaron eventos de senescencia celular durante el desarrollo embrionario murino en múltiples tejidos tales como: el mesonefros, el saco endolinfático, y el oído interno (Muñoz-Espín et al., 2013), así como la cresta ectodermal y el techo de la placa neural (Storer et al., 2013). En ambos trabajos se utilizó el marcador de daño oxidativo, beta-galactosidasa, para identificar tejido senescente no patológico. Estos trabajos plantean que, de forma similar a la muerte programada por apoptosis, la senescencia podría ser parte de los mecanismos que regulan el desarrollo. En ambos trabajos se observó que la senescencia observada en el embrión comparte múltiples características con la observada en animales adultos, tales como: la presencia de focos de heterocromatina asociados a senescencia y la presencia de algunos miembros del fenotipo secretorio asociado a senescencia. La principal molécula reguladora documentada fue el CKI p21^{Cip} (que en nuestro modelo tiene una ligera tendencia a aumentar en la fase gliogénica, pero ésta no es significativa) pero en ninguno de los dos trabajos documentaron la activación de p53 o p16^{INK4A}. Aunque los autores plantean que la senescencia embrionaria es independiente de daño a DNA, no se determinó la longitud telomérica en estos modelos.

En la médula espinal embrionaria de ratón, también se ha observado que algunos tipos celulares presentan marcadores de senescencia celular (Domínguez-Bautista et al., 2021). En etapas tempranas, durante el periodo de neurogénesis, se observó tinción para beta-galactosidasa y p21^{Cip} en células endoteliales y células de la notocorda; en las placas del piso y del techo de la médula se observaron marcadores que podrían ser tanto de senescencia como de quiescencia celular; además, se observó la expresión de p16^{INK4A} en una subpoblación de motoneuronas y se sugiere que la senescencia podría contribuir al ajuste numérico de esta población.

En este trabajo no se intentó determinar la actividad de la enzima beta-galactosidasa pues el modelo aquí planteado no implica la salida del ciclo celular, puesto que existe proliferación activa durante la gliogénesis. Sin embargo, este trabajo podría contribuir a la discusión de si los cambios en el funcionamiento de las células troncales asociados con el envejecimiento, tales como la pérdida de la multipotencialidad, pueden ser parte de la progresión regular del desarrollo embrionario, sin la connotación patológica.

CONCLUSIONES

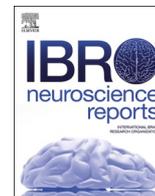
- 1) La transición de la fase de neurogénesis a la fase de gliogénesis en la médula espinal, correlaciona con la disminución en la actividad de la enzima telomerasa.
- 2) La transición de la fase de neurogénesis a la fase de gliogénesis en el modelo de neuroesferas, correlaciona con el alargamiento de la longitud del ciclo celular. Sin embargo, el tratamiento con olomoucina no afecta la producción de neuronas en neuroesferas tempranas.
- 3) Los datos obtenidos en este trabajo pretenden contribuir al planteamiento de un modelo de regulación intrínseca del potencial de diferenciación de las células troncales de la médula espinal.
- 4) Para validar el modelo planteado es necesaria la determinación de la longitud telomérica de células troncales neurales durante la fase neurogénica y durante la fase gliogénica.

PERSPECTIVAS

A demás de medir la longitud telomérica, otros experimentos que podrían contribuir a dilucidar los mecanismos moleculares que forman parte del mecanismo de regulación intrínseca del potencial de diferenciación de las células troncales neurales podrían incluir:

- 1) Inhibir la actividad de telomerasa en CTN neurogénicas o inducir la expresión de esta enzima en células gliogénicas. En el primer caso, si se conserva la proliferación activa, se esperaría que los telómeros se acortaran y se indujera la diferenciación glial. En el segundo, si la inducción permite el alargamiento telomérico, se esperaría que el potencial neurogénico se restaurara.
- 2) Medir otros marcadores del estado oxidativo o del estado de compactación de la cromatina que se han asociado a tejidos y células senescentes. Estos marcadores no se han evaluado durante el desarrollo embrionario de la médula espinal. Una posibilidad es que se observe una acumulación gradual conforme las CTN pierden la capacidad de generar neuronas.

Artículo de primer autor



Research Paper

Proliferation rate and differentiation potential are independent during the transition from neurogenesis to gliogenesis in the mouse embryonic spinal cord

Leonora Olivos-Cisneros^{a,b,*}, Jesús Ramírez-Santos^b, Gabriel Gutiérrez-Ospina^{b,**}

^a Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico

^b Laboratorio de Biología de Sistemas, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

Cell cycle
Gliogenesis
Neurogenesis
Neurosphere culture
Spinal cord

ABSTRACT

Neural stem cells (NSC) restrict their differentiation potential as the central nervous system develops. Experimental evidence suggests that the mechanisms governing the transition from the neurogenic to the gliogenic phase irreversibly affect the ability of NSC to generate neurons. Cell cycle regulation has been associated with cell fate in different models. In this work, we assessed the temporal correlation between the loss of the neurogenic potential and cell cycle lengthening of NSC obtained from embryonic mouse spinal cords, during the transition of the neurogenic to the gliogenic phase, using neurospheres. We also used the cell cycle inhibitor Olomoucine to increase cell cycle length by decreasing the proliferation rate. Our results show that neurospheres obtained from a neurogenic stage give rise mostly to neurons, whereas those obtained from later stages produce preferentially glial cells. During the transition from neurogenesis to gliogenesis, the proliferation rate dropped, and the cell cycle length increased 1.5 folds, as monitored by DNA BrdU incorporation. Interestingly, Olomoucine-treated neurogenic-neurospheres display a reduced proliferation rate and preserve their neurogenic potential. Our results suggest that the mechanisms that restrict the differentiation potential of NSC are independent of the proliferation control.

1. Introduction

During prenatal development, Neural Stem Cells (NSC) undergo a series of symmetrical divisions that expand, asynchronously, NSC pools throughout distinct regions of the central nervous system (CNS). Once the NSC expansion phase ends in each region, asymmetric divisions follow and originate, during several rounds, neural progenitors committed to produce neuroblasts. By the end of neurogenesis, neural progenitors become compromised to generate glioblasts (Qian et al., 2000; Temple, 2006). In most of the developing central nervous system, this transition ends with the ability of NSC to produce neurons (Miller and Gauthier, 2007). Hence, the transition from neuron to glia production may hold clues on the cellular processes underlying the restriction of the NSC neurogenic potential. In this regard, it is well known

that this transition is modulated by the interplay of extracellular signals and transcription factors that regulate the expression of specific cell-lineage genes (Christie et al., 2013). Nevertheless, the manipulation of these signaling cascades does not lead to the full recovery of NSC neurogenic potential (He et al., 2009; Martens et al., 2002; Seaberg et al., 2005; Whittemore et al., 1999). Understanding the mechanisms that regulate neurogenesis in vivo, can lead to the design of new therapies to promote neural repair after injury (as reviewed by Ruddy and Morshead (2018)) or treatment for pathologies that impair the functioning of NSC during development, like parasitic infections (Bottari et al., 2019; Fracasso et al., 2019). Many of these studies have focus on the telencephalic NSC, in this work we focus on the differentiation potential of the spinal cord because of the biomedical relevance of this tissue.

A mechanistic possibility to explain the loss of NSC neurogenic

* Corresponding author at: Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico.

** Corresponding author.

E-mail addresses: [lolivos@rockefeller.edu](mailto:loliv@rockefeller.edu) (L. Olivos-Cisneros), ramirez@iibiomedicas.unam.mx (J. Ramírez-Santos), gabo@iibiomedicas.unam.mx (G. Gutiérrez-Ospina).

¹ Current address: Laboratory of Social Evolution and Behavior, The Rockefeller University, New York 10065, United States.

<https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2020.11.004>

Received 1 December 2019; Accepted 25 November 2020

2667-2421/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Brain Research Organization. This is an open access article under the CC

BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations

CNS	Central nervous system
NSC	Neural stem cells
MAP2	Microtubule associated protein 2
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
E11	Embryonic day 11
E14	Embryonic day 14
P1	Postnatal day 1
CDK	Cyclin dependent kinases
CKI	CDK inhibitors
ARF	Alternative reading frame
INK4	Inhibitor of CDK4
Cip	CDK interacting protein
Kip	Kinase inhibitor protein

potential comes from studies on the regulation of cell cycle. The lengthening of cell cycle (particularly the G1 phase) by inhibiting cyclin-dependent kinases (CDK) 1 and 2, has been shown to induce a premature onset of neurogenesis in the ventral mesencephalon and rostral telencephalon of whole embryo cultures (Calegari and Huttner, 2003). Conversely, if the lengthening of G1 is inhibited, the neurogenic phase gets delayed and the expansion of NSC increases (Lange et al., 2009). It is known that the cell cycle length is variable, depending on the position within the neural tube and the age of the embryo. A thorough characterization of the neural tube growth and specification shows that the proliferation rate decreases, and the cell cycle lengthens, once the neuronal differentiation starts in mouse and chicken embryos (Kicheva et al., 2014). Given that cell cycle lengthening participates on the transition of NSC from the expansion phase to neurogenesis, it is possible that a similar process takes place between neurogenesis and gliogenesis, when the neurogenic potential is lost throughout the developing CNS.

During brain development, the p19^{ARF}-p53 signaling pathway regulates the transition from neurogenesis to gliogenesis in telencephalic NSC. Indeed, p19^{ARF} overexpression decreases neurogenesis and promotes glial cell generation by increasing the NSC responsiveness to gliogenic signals (e.g., CNTF); downstream p19^{ARF}, p53 decreases NSC self-renewal by inhibiting Myc activity, thus allowing the progression of gliogenesis (Nagao et al., 2008). In addition, downstream p53, some cyclin-dependent kinases inhibitors (CKI) might be upregulated, lengthening the cell cycle and allowing the neurogenesis to gliogenesis transition to occur. This last possibility has not been explored in the spinal cord. The likelihood of it, however, is supported by evidence showing that, during spinal cord development, the three members of the Cip/Kip family of CKI are expressed during neurogenesis; the expression of at least one of them regulates the timing of the cell cycle exit in differentiating neurons (Gui et al., 2007). Hence, this work was set out to address whether the onset of gliogenesis and the loss of NSC neurogenic potential are associated with the lengthening of the NSC cycle in response to the accumulation of cell cycle inhibitors in the spinal cord of mouse embryos.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

CD1 mouse embryos and newborn male and female mice were used to conduct the experiments described below. Embryos were obtained through caesarean sections performed to timed pregnant females at embryonic days 11 and 14 (E11 and E14). Newborns were sacrificed within the first 24-to-36 h, at postnatal day 1 (P1) of having been born. Pregnant or parturient females were all kept under regular housing

conditions (12/12-dark/light cycles, controlled temperature and humidity) at the animal facility of the Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Animal handling and experimental protocols were revised and approved by the Animal Rights Committee at IIB, UNAM.

2.2. Neurosphere cultures

Neurospheres were produced from the cervical segment of the spinal cord dissected from E11, E14 and P1 mice. Cervical spinal cords were collected in pools (n = 5) and incubated 20 min at 37 °C in embryonic digestion solution (0.1% trypsin diluted in versene) or postnatal digestion solution (trypsin (1.33 mg/mL), hyaluronidase (0.67 mg/mL), kynurenic acid (0.2 mg/mL) and DNase (0.02 mg/mL) diluted in artificial cerebrospinal fluid); the embryonic tissue digestion was inactivated with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) diluted in versene and the postnatal tissue digestion with 0.7 mg/mL of trypsin inhibitor. Then, the samples were mechanically dissociated. The resultant cell suspensions were centrifuged at 3000 rpm for 5 min at room temperature and the pellet was then re-suspended in culture media (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and F12 (1:1 v/v supplemented with 25 µg/mL insulin, 100 µg/mL transferrin, 20 nM progesterone, 60 µM putrescine, 30 nM sodium selenite, 1 µg/mL heparin and 1 × Glutamax supplement). Cells were plated at a density of 250,000 cells/mL and maintained at 37 °C, 5% CO₂. The culture was supplemented with 20 ng/mL FGF2 and 20 ng/mL EGF on days 1, 3, 5 and 7. Secondary neurospheres were obtained from 7 days old, primary neurospheres disaggregated with a solution containing trypsin (0.025%) diluted in versene for 10 min at 37 °C; the disaggregation was inactivated with 10% FBS. Secondary neurospheres were kept in culture for 7 days following the protocol described previously, except for the initial plating density (50,000 cells/mL).

2.3. Neurosphere staining and measurement

To induce cell adhesion and differentiation, neurospheres were harvested and seed onto poly-L-lysine treated coverslips for 48 h at 37 °C, 5% CO₂ and fixed with buffered paraformaldehyde (2%) for 30 min at room temperature. After a thorough wash with phosphate buffer-saline (PBS; 0.1 M, pH 7.4), neurospheres were treated with 0.2% Triton X-100, 1% glycine and 10% horse serum diluted in PBS for 20 min at room temperature, and then incubated with a mixture of primary polyclonal antibodies raised in rabbit against MAP2 (1:500, AB5622, Millipore) and raise in chicken against GFAP (1:500, AB5541, Millipore) during 2 h at room temperature. After three PBS rinses, neurospheres were incubated with a mixture of secondary polyclonal antibodies raised in donkey against chicken (biotin conjugated) and against rabbit (Alexa 594 conjugated) for 90 min; finally, they were incubated with fluorescein avidin for 60 min at room temperature. Neurospheres were counterstained with DAPI and the coverslips carrying them mounted on microscope glass slides using anti-fading mounting medium (Dako). These preparations were used to acquire digital images on a Nikon confocal laser scanning microscope or an Olympus disc spinning unit microscope. The diameter (or the short axis in non-spherical neurospheres) was measured using ImageJ software (NIH) at the middle focal plane.

2.4. Cumulative BrdU incorporation and cell cycle length estimate

Secondary neurosphere cultures (n = 3 per exposure time) were prepared as described above and BrdU (5 µM) was added during the last 1, 3, 6, 12, or 24 h before being collected (i.e. all exposure times were collected at the same time, on day seven of culture). After BrdU exposure, neurospheres were harvested and disaggregated to a single cell suspension that was seeded on poly-L-lysine treated coverslips at a density of 1000 cell/µl. After a 2 h incubation at 37 °C, 5% CO₂, cells were then fixed with 2% paraformaldehyde for 30 min, as described above. For BrdU immunodetection, fixed cells were sequentially treated

with 0.5 N HCl for 20 min at 37 °C, 0.1 M Sodium Borate for 10 min, PBS for 10 min and 0.2% Triton X-100 for 20 min at room temperature. Then, they were incubated with the primary polyclonal antibody raised in mouse against BrdU (1:500, Roche Applied Science) for 2 h at room temperature. After three PBS rinses, cells were incubated with a secondary polyclonal antibody raised in donkey against mouse IgGs conjugated to Alexa 488 for 90 min at room temperature. Finally, cells were counter-stained with DAPI and the coverslips were mounted as described above. These preparations were imaged with an Olympus disc spinning unit microscope. Ten sites per exposure time from separate cultures were imaged using the Systematic Random Sampling tool of the Stereo Investigator software (MBF Bioscience). The proportion of BrdU and DAPI stained nuclei was determined to estimate the cell cycle length using a regression analysis of the active portion of the labeling curve of each age, as described before (Kippin et al., 2005).

2.5. CKI mRNA expression levels

Seven-day-old cultured, secondary neurospheres from four different cultures per age, were harvested and disaggregated to a single cell suspension as previously described. One million cells per condition were rapidly frozen and stored at – 80 until used. When thawed for extraction, the cells were re-suspended in Trizol and the RNA was extracted following protocol recommended by the supplier (Invitrogen). RNA concentration was determined using a NanoDrop and cDNA was synthesized using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). The following sense and antisense primers were used for RT-PCR: p19^{ARF}, TGAAGTTCGTGCGATCCCGG and TGAGCAGAA-GAGCTGCTACG (160 bp), p19^{INK4D}, TCCCATCCATCTGGCGATA and ATGGCTGTTGCCTGTAGGAG (400 bp), p16^{INK4A}, TCA-CACGACTGGGCGATTG and AGCTCTGCTCTTGGGATTGG (79 bp), p21^{Cip}, GGAACATCTCAGGGCCGAAA and CTGAGGATCACCC-CAGGTA (519 bp), p27^{Kip}, AGATACGAGTGGCAGGAGGT and TGTTTACGTCTGGCGTCGAA (381 bp), p53 ATTCAGGCCCT-CATCCTCCT and GAAGCCATAGTTGCCCTGGT. Actin was used as an internal control. Amplification was accomplished by incubating 100 ng of the cDNA in a 20 µl reaction volume by using 20 pmoles of specific sense and antisense primers and Kapataq Ready mix DNA polymerase (KAPA BIOSYSTEMS) using following conditions: 2 min at 94 °C; 25 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 55 °C, and 1 min at 72 °C; and 5 min at 72 °C. PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels. We quantify the expression levels of each mRNA as the ratio of the Mean Gray Value of the band that each of them displayed on the gel, relative to the loading control. The Mean Gray Value determinations were made with ImageJ software (NIH).

2.6. Olomoucine treatment

Olomoucine is a specific inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases that lengthens the cell cycle of neuroepithelial cells. It was added to the culture medium of secondary neurospheres from embryonic day 11 to a final concentration of 50 µM (from a 50 mM stock in DMSO). The same volume of DMSO was added to the control cultures. The neurospheres were collected at day seven of culture, fixed, stained and measured as described above.

2.7. Statistics

Data analyses were carried out with GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data are given as means plus/minus standard errors. Statistical comparisons of neurosphere diameter between ages and treatments were done with one-way ANOVA test followed by a Tukey's post hoc analysis. The Kruskal–Wallis test was used to compare CKI mRNA expression levels.

3. Results

3.1. The timing of the neurogenesis to gliogenesis transition of spinal cord NSC is preserved in vitro

Neurospheres were used to evaluate the temporal association between cell cycle lengthening and the loss of the NSC neurogenic potential. In the cervical spinal cord, neurogenesis progresses through days 10–14 of embryonic development (Normes and Carry, 1978). We then compared the neurogenic/gliogenic potential of neurospheres from a neurogenic stage, embryonic day 11 (E11), a transition stage, embryonic day 14 (E14) and a gliogenic stage, postnatal day 1 (P1). The differentiation potential was assessed by double immunostaining with MAP2, a neuron marker, and GFAP, a marker of astrocytes. Given that each cellular aggregate is the result of clonal divisions (Suslov et al., 2002), quantifying the proportion of neurospheres that were formed mostly by neurons, mostly by astrocytes or by a mixed population of neurons and astrocytes, allows the assessment of the heterogenic differentiation potential of the parental cells that were obtained from each stage. As shown in Fig. 1, almost 60% of neurospheres obtained from E11 displayed MAP2 immunoreactivity. A similar proportion of E14 neurospheres gave rise to either MAP2 or GFAP positive cells. Lastly, P1 neurospheres preferentially originated GFAP positive cells. The neurospheres illustrated on Fig. 1A represent the most abundant profile of each stage of development.

3.2. Neurogenic NSC divide faster and display shorter cell cycle duration

At first glance, neurospheres reduced their sizes from E11 to P1 (Figs. 1 and 2A). Reduction in neurosphere size has been associated to a decrease in the self-renewal potential of NSCs that is not associated with an increase of cell death, but to a reduced proliferation (Molofsky et al., 2003); thus we decided to test if proliferation decreases, and the cell cycle length increases, as the developmental time progressed. Cumulative BrdU labeling allows the assessment of changes in NSC proliferation rate; we used this technique to estimate changes in the duration of the cell cycle during development. The number of BrdU labeled cells was significantly higher in E11 neurospheres than in E14 and P1 neurospheres (Fig. 2B). The regression analysis conducted to estimate cell cycle length based on BrdU cumulative data revealed that E11 NSC cycle lasts 34.7 h, whereas that for E14 and PD1 NSC spans 51.4 and 52.8 h respectively. Hence, the neurogenesis to gliogenesis transition encompasses a lengthening of NSC cell cycle and a decay of the proliferation rate.

3.3. NSC expression of CKI increase during the transition to the gliogenic phase

CKI participate in the control of cell proliferation and cell cycle length, as well as in the modulation of the cell cycle length during the onset of the gliogenic phase in telencephalic structures (Nagao et al., 2008). Then, mRNA expression levels of p27^{Kip}, p21^{Cip}, p19^{INK4D}, p16^{INK4A} and p19^{ARF}, prominent members of the Cip/Kip and INK4 CKI families, respectively, were estimated in E11, E14 and P1 spinal cord neurospheres. As seen in Fig. 3, there seemed to be an increased expression of p21^{Cip} mRNA on E14 and P1 neurospheres, but not of p27^{Kip}, nor p19^{INK4D}; nevertheless, this was not a statistically significant increase ($p > 0.05$). p16^{INK4A} mRNA expression was not consistently detected. A significant increased expression was observed for p19^{ARF}, and because of it, we reasoned p53 could be involved in the regulation of the NSC proliferation and cell cycle length during the transition from the neurogenic to the gliogenic phase. Even though high levels of the p53 mRNA expression were observed at all time points, its levels were comparable among E11, E14 and P1 neurospheres (Fig. 3).

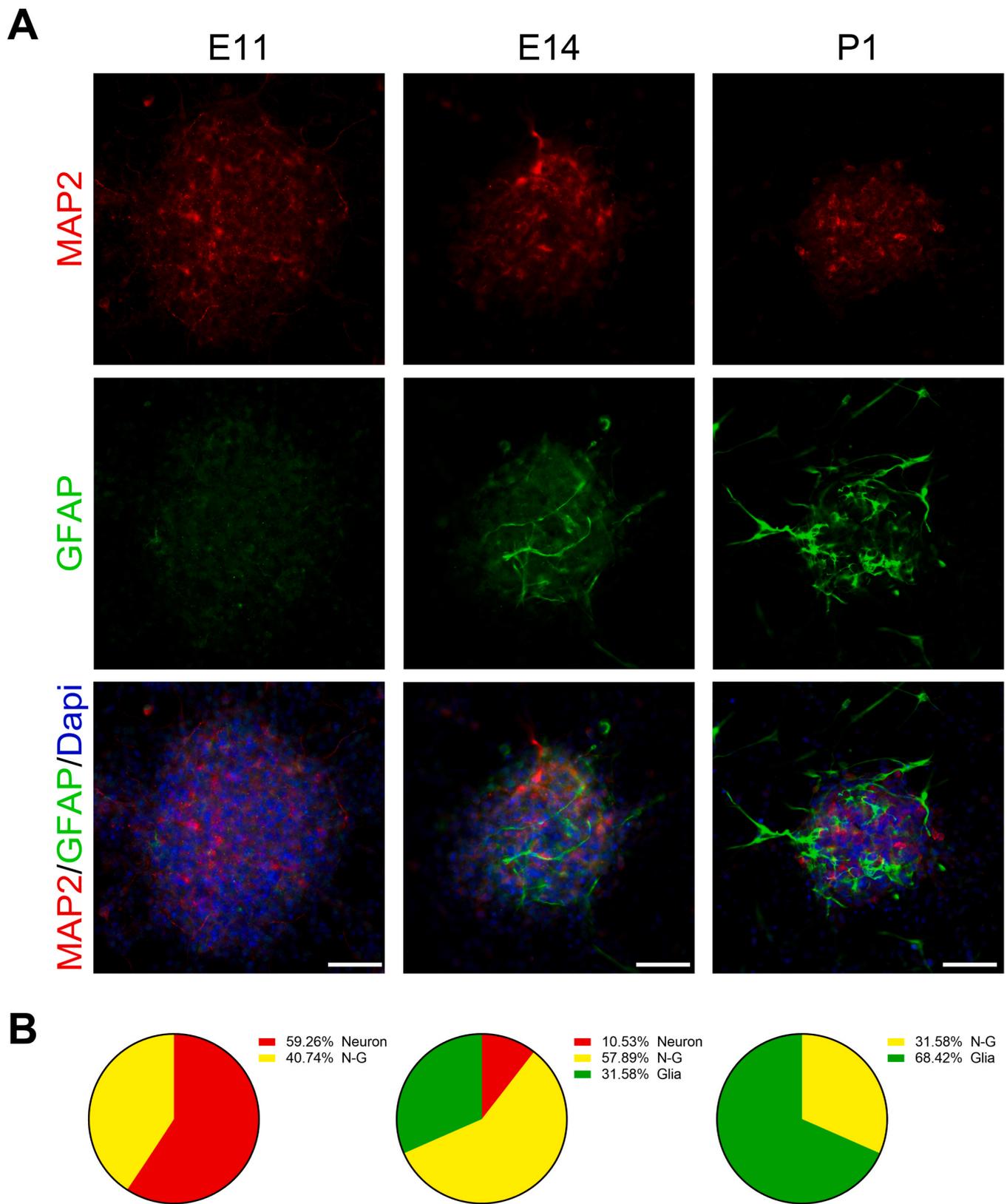


Fig. 1. Embryonic spinal cord neurospheres recapitulate timely the neurogenesis to gliogenesis transition reported in vivo. A) Fluorescence photomicrographs showing one secondary neurosphere from E11, E14 and P1 cultures, stained for MAP2 and GFAP, and counterstained with DAPI. Scale bar: 100 μ m. B) Quantification of the proportion of neurospheres that were formed mostly by neurons, mostly by astrocytes or by a mixed population of neurons and astrocytes on the secondary neurosphere cultures from each stage of development.

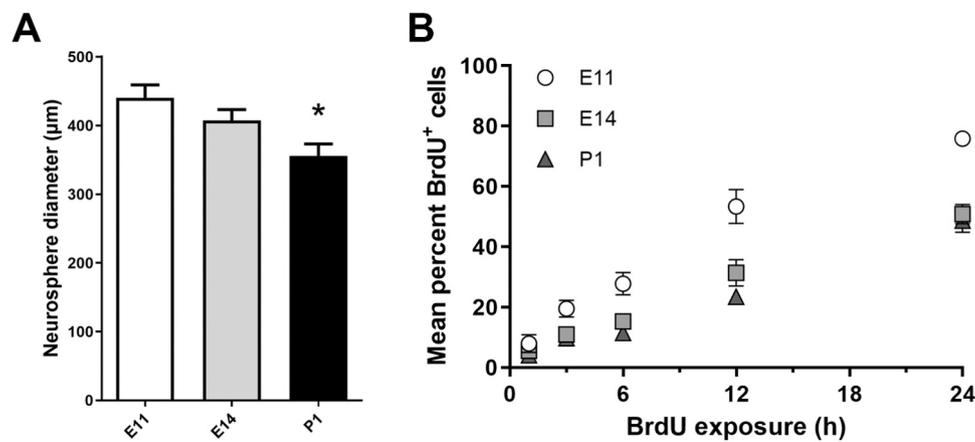


Fig. 2. Embryonic spinal cord NSC proliferation drops and cell cycle lengthens during development. A) Bar graph displaying the average diameter of E11, E14 and P1 neurospheres. Data are presented as mean + SEM. * $p = 0.0021$. E11 = $439.9 + 18.94$ ($n = 43$); E14 = $407 + 15.95$ ($n = 28$); P1 = $355.5 + 17.47$ ($n = 40$). B) Dot graph depicting the time-course of cumulative BrdU labeling in E11, E14 and P1 neurospheres. Data are presented as mean \pm SEM.

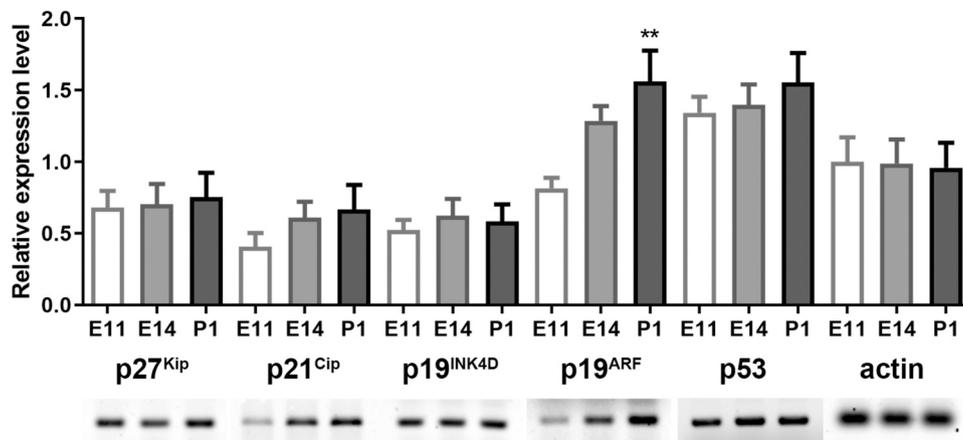


Fig. 3. Members of the Cip/Kip and INK4 CKI families accumulate in spinal cord NSC during de neurogenesis to gliogenesis transition phase. Bar graph that depicts the relative expression levels of CKI in E11, E14 and P1 spinal cord neurospheres. The photographs aligned below the graph illustrate representative bands for each CKI analyzed at different age. Data are presented as mean \pm SEM. ** $p = 0.0048$.

3.4. Olomoucine affects the proliferation rate but not the differentiation potential of E11 neurospheres

So far, our results support the idea that the loss of the neurogenic potential of spinal cord NSC during the neurogenesis to gliogenesis transition is associated with increments of the expression of key CKI that might reduce NSC proliferation rate by lengthening the cell cycle. This notion was further evaluated by exposing E11 neurogenic neurospheres to Olomoucine, a specific inhibitor of CDK that lengthen the G1 phase progression. Accordingly, the size of Olomoucine-treated, E11 neurospheres was significantly smaller than that documented for untreated E11 neurospheres (Fig. 4A). We quantified again the proportion of neurospheres that were formed mostly by neurons, mostly by astrocytes or by a mixed population of neurons and astrocytes, to assess the effect of the olomoucine treatment on the differentiation potential of the cells obtained from the E11 spinal cord. DMSO treated cultures gave rise to neurospheres formed mostly by neurons and formed by neurons and astrocytes; the percentage difference with the non-treated culture (Fig. 1B) was not significant (according to a chi-square test). Despite the effect on size, the proportion of neurospheres MAP2 positive cells did not change with the Olomoucine treatment (Fig. 4B and C), suggesting that the intracellular mechanisms that regulate the gliogenesis onset are independent of the cell cycle progression. The neurospheres illustrated on Fig. 4C represent the most abundant profile of each treatment; it was

surprising to find small neurospheres mostly formed by neurons because the similar size neurospheres from P1 cultures (Fig. 1A) were mostly formed by astrocytes.

4. Discussion

The mechanisms underlying the restriction of the neurogenic potential of embryonic NSC remain unclear. The fact that this constraint coincides with the onset of glial cell generation suggests that the molecular processes governing the transition from the neurogenic to the gliogenic phase might be involved. Accordingly, it has been established that the imbalance of pro-neuronal/anti-glial and/or anti-neuronal/pro-glial transcription factors and of their associated second messenger signaling cascades influence NSC commitment to one or the other phenotype (Christie et al., 2013). Multiple efforts have been made to understand lineage determination in the CNS, there is a clear biomedical need to gain control over cell fate and to be able of directing neuronal differentiation (Grade and Götz, 2017; Ninkovic and Götz, 2013); unfortunately these studies have focused mainly on NSC from the brain and we believe the spinal cord population should also be characterized. Data generated in this study shows that mechanisms that had been described for telencephalic NSC might be different in the spinal cord.

The relevance of gene expression for neurogenesis has been established by transcriptional profiling telencephalic NSC (Azim et al., 2018;

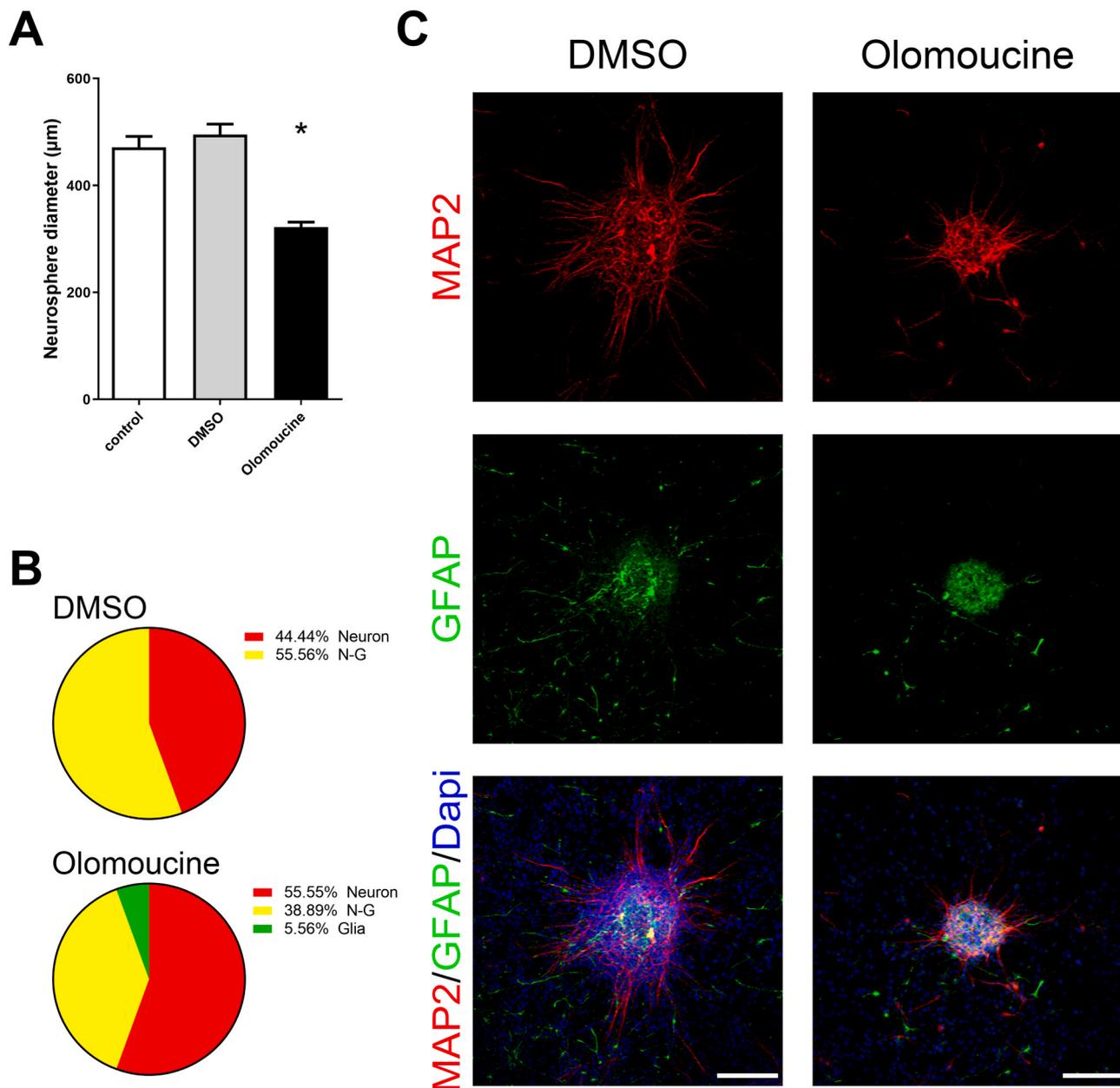


Fig. 4. Olomoucine effect on proliferation and differentiation. A) Bar graph displaying the average diameter of untreated, DMSO-exposed and Olomoucine treated E11 neurospheres. Data are presented as mean + SEM. * $p = 0.0001$ Control = $471.3 + 20.37$ ($n = 68$); DMSO = $495.4 + 19.48$ ($n = 58$); Olomoucine = $322 + 9.665$ ($n = 63$). B) Quantification of the proportion of neurospheres that were formed mostly by neurons, mostly by astrocytes or by a mixed population of neurons and astrocytes. C) Fluorescence photomicrographs showing DMSO exposed or Olomoucine treated E11 neurospheres stained for MAP2 and GFAP, and counterstained with DAPI. Scale bar: 100 μm.

Jones and Connor, 2016) but some studies have also suggested the existence of an association between the restriction of the differentiation potential and the molecular machinery that controls the cell cycle progression and length. For instance, chromatin remodeling ongoing during cell cycle progression influences cell fate (Ma et al., 2015). Also, the shortening of the G1 phase and thus a faster proliferation rate, both restrict pluripotency of embryonic stem cells (Coronado et al., 2013). Our results in embryonic spinal cord NSC, however, suggest otherwise. We found that the loss of NSC neurogenic potential during the neurogenic to gliogenic transition phase is independent from the reduction of NSC proliferation rate, the latter being inferred by the observed increments of the expression of cell cycle regulators, known to decrease it, and the reduction of the BrdU cumulative labeling. Further support to our conclusion comes from the fact that Olomoucine

treated-neurospheres showed reduced proliferation rates and sizes, without losing their neurogenic potential.

The proliferation kinetics of NSC isolated from the spinal cord are not easy to compare to the ones from telencephalic cells; cell cycle parameters that have been used for cortical cells (Takahashi et al., 1993) are not possible to calculate given that the quantification of BrdU accumulation does not reach the curve plateau in 24 h; this feature resemble the BrdU labeling of telencephalic neurospheres from 480-days old mice (Kippin et al., 2005); nevertheless, the analysis within the 24-h window is sufficient to show that neurogenic cells divide faster than those generating glia. We also found cell cycle regulators in our spinal cord model that have not been shown in telencephalic models; for example, in telencephalic NSC, p16^{INK4A} has been described as effector of the Bmi1 transcription factor to regulate cell self-renewal (Molofsky et al., 2003);

we were not able to measure this molecule consistently and, instead, we found the other Bmi1 regulated molecule, p19^{ARF}, significantly increased in P1 spinal cord neurospheres. All this strengthens the idea that it is necessary to go further on the spinal cord characterization.

Previous studies suggest that lengthening or shortening the cell cycle of telencephalic NSC delays or onwards neurogenesis (Calegari and Huttner, 2003; Lange et al., 2009). It is presumed that a lengthier cell cycle makes susceptible NSC to extracellular influences. In contrast, our results support that this might not be the case on NSC going through the neurogenic/gliogenic transition phase. Since Olomoucine did reduce NSC proliferation rates, thus shortening cell cycle length, without altering NSC neurogenic potential, our observations support that NSC coursing through the neurogenic/gliogenic transition phase may be less susceptible to be modulated by extrinsic signals. This possibility agrees with data that highlights the relevance of intrinsic differences between subpopulations of NSC that affect their neurogenic potential (Seaberg et al., 2005).

The ultimate restriction of stem cells' differentiation potential is commonly associated to cell cycle arrest and senescence, even though stem cells display a variety of mechanisms to evade them for some time (reviewed by Schultz and Sinclair (2016)). That stem cells senesce is clearly shown by a variety of indicators among of which the accumulation of cell cycle inhibitors as senescence markers, like p16^{INK4A}, are paramount. The expression of cell cycle inhibitors and the lengthening of the cell cycle observed in embryonic spinal cord NSC in our experimental series suggest that senescence might also be part of the ontogeny of the nervous system, as suggested for other embryonic tissues (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). If this was the case, the irreversibility of the changes in the cellular homeostasis associated with the senescence establishment, might be the explanation to the loss of the neurogenic potential of NSC. Estimating telomere length and beta-galactosidase activity during the transition from neurogenesis to gliogenesis could shed light into this important matter.

Funding

Financial support was provided by the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and project IMPULSA 02 from Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Nacional Autónoma de México. LOC received fellowship 210327 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico.

Compliance with Ethical Standards

We further confirm that any aspect of the work covered in this manuscript that has involved experimental animals has been conducted with the ethical approval of the Animal Rights Committee at Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Author contributions

Conceptualization and design of the study: LOC, GGO. Acquisition of data: LOC, JRS. Analysis and interpretation of data: All authors. Drafting of the manuscript: LOC and GGO. Critical review of manuscript: All authors. Approval of final manuscript: All authors.

CRedit authorship contribution statement

Leonora Olivos-Cisneros: Conceptualization. **Gabriel Gutiérrez-Ospina:** Conceptualization.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no known conflicts of interest

associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Acknowledgments

Authors thank Miguel Tapia-Rodríguez and Georgina Diaz-Herrera for technical support. Leonora Olivos-Cisneros is a Ph.D. student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; the work reported in this manuscript is part of her doctoral dissertation.

References

- Azim, K., Akkermann, R., Cantone, M., Vera, J., Jadasz, J.J., Küry, P., 2018. Transcriptional profiling of ligand expression in cell specific populations of the adult mouse forebrain that regulates neurogenesis. *Front. Neurosci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00220>.
- Bottari, N.B., Schetinger, M.R.C., Pillat, M.M., Palma, T.V., Ulrich, H., Alves, M.S., Morsch, V.M., Melazzo, C., de Barros, L.D., Garcia, J.L., Da Silva, A.S., 2019. Resveratrol as a therapy to restore neurobiogenesis of neural progenitor cells infected by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Neurobiol.* 56, 2328–2338. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1180-z>.
- Calegari, F., Huttner, W.B., 2003. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J. Cell Sci.* 116, 4947–4955. <https://doi.org/10.1242/jcs.00825>.
- Christie, K.J., Emery, B., Denham, M., Bujalka, H., Cate, H.S., Turnley, A.M., 2013. Transcriptional regulation and specification of neural stem cells. *Transcr. Transl. Regul. Stem Cells* 129–155. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6621-8_8.
- Coronado, D., Godet, M., Bourillot, P.-Y., Taponnier, Y., Bernat, A., Petit, M., Afanassieff, M., Markossian, S., Malashicheva, A., Iacone, R., Anastassiadis, K., Savatier, P., 2013. A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Res.* 10, 118–131. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.10.004>.
- Fracasso, M., Pillat, M.M., Bottari, N.B., da Silva, A.D., Grando, T.H., Matos, A.F.I.M., Petry, L.S., Ulrich, H., de Andrade, C.M., Monteiro, S.G., Da Silva, A.S., 2019. Trypanosoma evansi impacts on embryonic neural progenitor cell functions. *Microb. Pathog.* 136, 103703. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103703>.
- Grade, S., Götz, M., 2017. Neuronal replacement therapy: previous achievements and challenges ahead. *npj Regen. Med.* 2. <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0033-0>.
- Gui, H., Li, S., Matisse, M.P., 2007. A cell-autonomous requirement for Cip/Kip cyclin-kinase inhibitors in regulating neuronal cell cycle exit but not differentiation in the developing spinal cord. *Dev. Biol.* 301, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.035>.
- He, S., Iwashita, T., Buchstaller, J., Molofsky, A.V., Thomas, D., Morrison, S.J., 2009. Bmi-1 over-expression in neural stem/progenitor cells increases proliferation and neurogenesis in culture but has little effect on these functions in vivo. *Dev. Biol.* 328, 257–272. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.01.020>.
- Jones, K.S., Connor, B.J., 2016. The effect of pro-neurogenic gene expression on adult subventricular zone precursor cell recruitment and fate determination after excitotoxic brain injury. *J. Stem Cells Regen. Med.* 12, P25–P35.
- Kicheva, A., Bollenbach, T., Ribeiro, A., Valle, H.P., Lovell-Badge, R., Episkopou, V., Briscoe, J., 2014. Coordination of progenitor specification and growth in mouse and chick spinal cord. *Science* 345, 1254927. <https://doi.org/10.1126/science.1254927>.
- Kippin, T.E., Martens, D.J., Van Der Kooy, D., 2005. P21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev.* 19, 756–767. <https://doi.org/10.1101/gad.1272305>.
- Lange, C., Huttner, W.B., Calegari, F., 2009. Cdk4/CyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* 5, 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.026>.
- Ma, Y., Kanakousaki, K., Buttitta, L., 2015. How the cell cycle impacts chromatin architecture and influences cell fate. *Front. Genet.* 5, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00019>.
- Martens, D.J., Seaberg, R.M., Van Der Kooy, D., 2002. In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1045–1057. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02181.x>.
- Miller, F.D., Gauthier, A.S., 2007. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54, 357–369. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.019>.
- Molofsky, A.V., Pardoll, R., Iwashita, T., Park, I.-K., Clarke, M.F., Morrison, S.J., 2003. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425, 962–967. <https://doi.org/10.1038/nature02060>.
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., Serrano, M., 2013. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>.
- Nagao, M., Campbell, K., Burns, K., Kuan, C.-Y., Trumpp, A., Nakafuku, M., 2008. Coordinated control of self-renewal and differentiation of neural stem cells by Myc

- and the p19 ARF –p53 pathway. *J. Cell Biol.* 183, 1243–1257. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807130>.
- Ninkovic, J., Götz, M., 2013. Fate specification in the adult brain - lessons for eliciting neurogenesis from glial cells. *BioEssays* 35, 242–252. <https://doi.org/10.1002/bies.201200108>.
- Nornes, H.O., Carry, M., 1978. Neurogenesis in spinal cord of mouse: an autoradiographic analysis. *Brain Res.* 159, 1–16. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90105-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90105-1).
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., Temple, S., 2000. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69–80.
- Ruddy, R.M., Morshead, C.M., 2018. Home sweet home: the neural stem cell niche throughout development and after injury. *Cell Tissue Res.* 371, 125–141. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2658-0>.
- Schultz, M.B., Sinclair, D.A., 2016. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development* 143, 3–14. <https://doi.org/10.1242/dev.130633>.
- Seaberg, R.M., Smukler, S.R., Van Der Kooy, D., 2005. Intrinsic differences distinguish transiently neurogenic progenitors from neural stem cells in the early postnatal brain. *Dev. Biol.* 278, 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.10.017>.
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., Keyes, W.M., 2013. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155, 1119–1130. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>.
- Suslov, O.N., Kukekov, V.G., Ignatova, T.N., Steindler, D.A., 2002. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14506–14511. <https://doi.org/10.1073/pnas.212525299>.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., 1993. Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J. Neurosci.* 13, 820–833. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-02-00820.1993>.
- Temple, S., 2006. Defining neural stem cells and their role in normal development of the nervous system. In: Rao, Mahendra S. (Ed.), *Neural Development and Stem Cells*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1–28. <https://doi.org/10.1385/1-59259-914-1:001>.
- Whittemore, S.R., Morassutti, D.J., Walters, W.M., Liu, R.H., Magnuson, D.S.K., 1999. Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations. *Exp. Cell Res.* 252, 75–95. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4621>.

REFERENCIAS

- Alvarez-Buylla, A., and Lim, D. a (2004). For the Long Run Maintaining Germinal Niches in the Adult Brain. *Neuron* 41, 683–686.
- Alvarez-Buylla, a, García-Verdugo, J.M., and Tramontin, a D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 287–293.
- Armesilla-Díaz, A., Bragado, P., del Valle, I., Cuevas, E., Lazaro, I., Martín, C., Cigudosa, J.C., and Silva, A. (2009). P53 Regulates the Self-Renewal and Differentiation of Neural Precursors. *Neuroscience* 158, 1378–1389.
- Barnabé-Heider, F., Wasylnka, J.A., Fernandes, K.J.L., Porsche, C., Sendtner, M., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2005). Evidence that Embryonic Neurons Regulate the Onset of Cortical Gliogenesis via Cardiotrophin-1. *Neuron* 48, 253–265.
- Blasco, M., Martín-Rivera, L., Herrera, E., and Albar, J.P. (1998). Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10471–10476.
- Blomen, V.A., and Boonstra, J. (2007). Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 3084–3104.
- Borrell, V., and Calegari, F. (2014). Mechanisms of brain evolution: Regulation of neural progenitor cell diversity and cell cycle length. *Neurosci. Res.* 86, 14–24.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 122, 947–956.
- Brazel, C.Y., Limke, T.L., Osborne, J.K., Miura, T., Cai, J., Pevny, L., and Rao, M.S. (2005). Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* 4, 197–207.
- Calegari, F. (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J. Cell Sci.* 116, 4947–4955.
- Calegari, F. (2005). Selective Lengthening of the Cell Cycle in the Neurogenic Subpopulation of Neural Progenitor Cells during Mouse Brain Development. *J. Neurosci.* 25, 6533–6538.
- Campbell, K.H.S., McWhir, J., Ritchie, W.A., and Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, 64–66.
- Campisi, J., and D'Adda Di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.
- Caporaso, G.L., Lim, D.A., Alvarez-Buylla, A., and Chao, M. V. (2003). Telomerase activity in the subventricular zone of adult mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 693–702.
- Chan, S.R.W.L., and Blackburn, E.H. (2004). Telomeres and telomerase. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 359, 109–122.
- Cheng, A., Shin-ya, K., Wan, R., Tang, S. -c., Miura, T., Tang, H., Khatri, R., Gleichman, M., Ouyang, X., Liu, D., et al. (2007). Telomere Protection Mechanisms Change during Neurogenesis and Neuronal Maturation: Newly Generated Neurons Are Hypersensitive to Telomere and DNA Damage. *J. Neurosci.* 27, 3722–3733.
- Christie, K.J., Emery, B., Denham, M., Bujalka, H., Cate, H.S., and Turnley, A.M. (2013). Transcriptional Regulation and Specification of Neural Stem Cells. In *Transcriptional and Translational Regulation of Stem Cells*, pp. 129–155.
- Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* 130, 223–233.
- Coskun, V., and Luskin, M.B. (2001). The expression pattern of the cell cycle inhibitor p19(INK4d) by progenitor cells of the rat embryonic telencephalon and neonatal anterior subventricular zone. *J. Neurosci.* 21, 3092–3103.
- Deneen, B., Ho, R., Lukaszewicz, A., Hochstim, C.J., Gronostajski, R.M., and Anderson, D.J. (2006). The Transcription Factor NFIA Controls the Onset of Gliogenesis in the Developing Spinal Cord. *Neuron* 52, 953–968.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, a (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 17, 5046–5061.
- Domínguez-Bautista, J.A., Acevo-Rodríguez, P.S., and Castro-Obregón, S. (2021). Programmed Cell

Senescence in the Mouse Developing Spinal Cord and Notochord. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1–15.

Ellis, P., Fagan, B.M., Magness, S.T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M., and Pevny, L. (2004). SOX2, a Persistent Marker for Multipotential Neural Stem Cells Derived from Embryonic Stem Cells, the Embryo or the Adult. *Dev. Neurosci.* 26, 148–165.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.

Fan, G. (2005). DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* 132, 3345–3356.

Ferron, S. (2004). Telomere shortening and chromosomal instability abrogates proliferation of adult but not embryonic neural stem cells. *Development* 131, 4059–4070.

Ferron, S.R., Marques-Torrejon, M.A., Mira, H., Flores, I., Taylor, K., Blasco, M.A., and Farinas, I. (2009). Telomere Shortening in Neural Stem Cells Disrupts Neuronal Differentiation and Neurogenesis. *J. Neurosci.* 29, 14394–14407.

Fuentealba, L.C., Obernier, K., and Alvarez-Buylla, A. (2012). Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell* 10, 698–708.

Gage, F.H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287, 1433–1438.

García-Verdugo, J.M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (1998). Architecture and cell types of the adult subventricular zone: In search of the stem cells. *J. Neurobiol.* 36, 234–248.

Gilbert, S.F. (2013). *Developmental Biology* (Sinauer Associates, Inc.).

González-Suárez, E., Samper, E., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2000). Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat. Genet.* 26, 114–117.

Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788.

Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749–765.

Gui, H., Li, S., and Matise, M.P. (2007). A cell-autonomous requirement for Cip/Kip cyclin-kinase inhibitors in regulating neuronal cell cycle exit but not differentiation in the developing spinal cord. *Dev. Biol.* 301, 14–26.

Gurdon, J.B. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Development* 10, 622–640.

Gurok, U. (2004). Gene Expression Changes in the Course of Neural Progenitor Cell Differentiation. *J. Neurosci.* 24, 5982–6002.

Hagg, T. (2005). Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: An integrated view. *Trends Neurosci.* 28, 589–595.

Haïk, S., Gauthier, L.R., Granotier, C., Peyrin, J.-M., Lages, C.S., Dormont, D., and Boussin, F.D. (2000). Fibroblast growth factor 2 up regulates telomerase activity in neural precursor cells. *Oncogene* 19, 2957–2966.

He, F., Ge, W., Martinowich, K., Becker-Catania, S., Coskun, V., Zhu, W., Wu, H., Castro, D., Guillemot, F., Fan, G., et al. (2005). A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis. *Nat. Neurosci.* 8, 616–625.

Helms, A.W., and Johnson, J.E. (2003). Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 42–49.

Horner, P.J., Power, A.E., Kempermann, G., Kuhn, H.G., Palmer, T.D., Winkler, J., Thal, L.J., and Gage, F.H. (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 20, 2218–2228.

Hsieh, J., and Gage, F.H. (2004). Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 461–469.

Hsu, C.-P., Lee, L.-W., Tang, S.-C., Hsin, I.-L., Lin, Y.-W., and Ko, J.-L. (2015). Epidermal growth factor activates telomerase activity by direct binding of Ets-2 to hTERT promoter in lung cancer cells. *Tumor Biol.* 36, 5389–5398.

Ibrayeva, A., Bay, M., Pu, E., Jörg, D.J., Peng, L., Jun, H., Zhang, N., Aaron, D., Lin, C., Resler, G., et al. (2021). Early stem cell aging in the mature brain. *Cell Stem Cell* 28, 955–966.e7.

Israels, E.D., and Israels, L.G. (2001). The Cell Cycle. *Stem Cells* 19, 88–91.

Jaskelioff, M., Muller, F.L., Paik, J.H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A.C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., et al. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 469, 102–107.

Jessell, T.M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.* 1, 20–29.

Johansson, C., Momma, S., and Clarke, D. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult

mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25–34.

Jones, D.L., and Rando, T.A. (2011). Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nat. Cell Biol.* 13, 506–512.

Jones, D.L., and Wagers, A.J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 11–21.

Kalamakis, G., Brüne, D., Ravichandran, S., Bolz, J., Fan, W., Ziebell, F., Stiehl, T., Catalá-Martinez, F., Kupke, J., Zhao, S., et al. (2019). Quiescence Modulates Stem Cell Maintenance and Regenerative Capacity in the Aging Brain. *Cell* 176, 1407-1419.e14.

Kempermann, G. (2016). Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a018986.

Kempermann, G., Song, H., and Gage, F.H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a018812.

Kintner, C. (2002). Neurogenesis in Embryos and in Adult Neural Stem Cells. *J. Neurosci.* 22, 639–643.

Kippin, T.E., Martens, D.J., and Van Der Kooy, D. (2005). P21 Loss Compromises the Relative Quiescence of Forebrain Stem Cell Proliferation Leading To Exhaustion of Their Proliferation Capacity. *Genes Dev.* 19, 756–767.

Kirn, J.R., Alvarez-Buylla, A., and Nottebohm, F. (1991). Production and survival of projection neurons in a forebrain vocal center of adult male canaries. *J. Neurosci.* 11, 1756–1762.

Klapper, W., Shin, T., and Mattson, M.P. (2001). Differential regulation of telomerase activity and TERT expression during brain development in mice. *J. Neurosci. Res.* 64, 252–260.

Komitova, M., and Eriksson, P.S. (2004). Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci. Lett.* 369, 24–27.

Kriegstein, A., and Alvarez-buylla, A. (2011). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 149–184.

Lange, C., Huttner, W.B., and Calegari, F. (2009). Cdk4/CyclinD1 Overexpression in Neural Stem Cells Shortens G1, Delays Neurogenesis, and Promotes the Generation and Expansion of Basal Progenitors. *Cell Stem Cell* 5, 320–331.

Lee, H.W., Blasco, M.A., Gottlieb, G.J., Horner, J.W., Greider, C.W., and DePinho, R.A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392, 569–574.

Lee, J.C., Mayer-Proschel, M., and Rao, M.S. (2000). Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30, 105–121.

Li, L., and Xie, T. (2005). STEM CELL NICHE: Structure and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 605–631.

Lim, D.A., Suárez-Fariñas, M., Naef, F., Hacker, C.R., Menn, B., Takebayashi, H., Magnasco, M., Patil, N., and Alvarez-Buylla, A. (2006). In vivo transcriptional profile analysis reveals RNA splicing and chromatin remodeling as prominent processes for adult neurogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 131–148.

Lim, D.A., Huang, Y.-C., Swigut, T., Mirick, A.L., Garcia-Verdugo, J.M., Wysocka, J., Ernst, P., and Alvarez-Buylla, A. (2009). Chromatin remodelling factor Mll1 is essential for neurogenesis from postnatal neural stem cells. *Nature* 458, 529–533.

Liu, Y., Wu, Y., Lee, J.C., Xue, H., Pevny, L.H., Kaprielian, Z., and Rao, M.S. (2002). Oligodendrocyte and astrocyte development in rodents: An in situ and immunohistological analysis during embryonic development. *Glia* 40, 25–43.

Luo, J., Daniels, S.B., Lenington, J.B., Notti, R.Q., and Conover, J.C. (2006). The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* 5, 139–152.

Ma, D.K., Ming, G.L., and Song, H. (2005). Glial influences on neural stem cell development: Cellular niches for adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 514–520.

Ma, D.K., Marchetto, M.C., Guo, J.U., Ming, G., Gage, F.H., and Song, H. (2010). Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.* 13, 1338–1344.

Ma, L., Sun, B., Hood, L., and Tian, Q. (2007). Molecular profiling of stem cells. *Clin. Chim. Acta* 378, 24–32.

Martens, D.J., Seaberg, R.M., and Van Der Kooy, D. (2002). In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1045–1057.

Mayani, H. (2003). A Glance into Somatic Stem Cell Biology. *Arch. Med. Res.* 34, 3–15.

Miller, F.D., and Gauthier, A.S. (2007). Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron* 54, 357–369.

Ming, G., and Song, H. (2005). Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 223–250.

Mizrak, D., Levitin, H.M., Delgado, A.C., Crotet, V., Yuan, J., Chaker, Z., Silva-Vargas, V., Sims, P.A.,

and Doetsch, F. (2019). Single-Cell Analysis of Regional Differences in Adult V-SVZ Neural Stem Cell Lineages. *Cell Rep.* 26, 394-406.e5.

Molina, A., and Pituello, F. (2017). Playing with the cell cycle to build the spinal cord. *Dev. Biol.* 432, 14–23.

Molofsky, A. V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.-K., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425, 962–967.

Molofsky, A. V., Slutsky, S.G., Joseph, N.M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N.E., and Morrison, S.J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 443, 448–452.

Morgan, D.O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of control* (New Science Press).

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell* 155, 1104–1118.

Nagao, M., Campbell, K., Burns, K., Kuan, C.-Y., Trumpp, A., and Nakafuku, M. (2008). Coordinated control of self-renewal and differentiation of neural stem cells by Myc and the p19^{ARF}-p53 pathway. *J. Cell Biol.* 183, 1243–1257.

Nornes, H.O., and Carry, M. (1978). Neurogenesis in spinal cord of mouse: an autoradiographic analysis. *Brain Res.* 159, 1–16.

Nottebohm, F. (2004). The Road We Travelled: Discovery, Choreography, and Significance of Brain Replaceable Neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1016, 628–658.

O’Sullivan, R.J., and Karlseder, J. (2010). Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 171–181.

Obernier, K., and Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: Origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Dev.* 146.

Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, J.I., Anderson, R., Guinto, C., Rodas Rodríguez, J., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2018). Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* 22, 221-234.e8.

Okano, H. (2002). Stem cell biology of the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 69, 698–707.

Okano, H., and Temple, S. (2009). Cell types to order: temporal specification of CNS stem cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 112–119.

Olivera-Martinez, I., and Storey, K.G. (2007). Wnt signals provide a timing mechanism for the FGF-retinoid differentiation switch during vertebrate body axis extension. *Development* 134, 2125–2135.

Ozair, M.Z., Kintner, C., and Brivanlou, A.H. (2013). Neural induction and early patterning in vertebrates. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2, 479–498.

Ozturk, S., Sozen, B., and Demir, N. (2014). Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. *Mol. Hum. Reprod.* 20, 15–30.

Prozorovski, T., Schulze-Topphoff, U., Glumm, R., Baumgart, J., Schröter, F., Ninnemann, O., Siegert, E., Bendix, I., Brüstle, O., Nitsch, R., et al. (2008). Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nat. Cell Biol.* 10, 385–394.

Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, a, Davis, a a, and Temple, S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69–80.

Rao, M.S., and Mattson, M.P. (2001). Stem cells and aging: Expanding the possibilities. *Mech. Ageing Dev.* 122, 713–734.

Ravin, R., Hoepfner, D.J., Munno, D.M., Carmel, L., Sullivan, J., Levitt, D.L., Miller, J.L., Athaide, C., Panchision, D.M., and McKay, R.D.G. (2008). Potency and Fate Specification in CNS Stem Cell Populations In Vitro. *Cell Stem Cell* 3, 670–680.

Reynolds, B., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, 1707–1710.

Salomoni, P., and Calegari, F. (2010). Cell cycle control of mammalian neural stem cells: Putting a speed limit on G1. *Trends Cell Biol.* 20, 233–243.

Sauvageot, C.M., and Stiles, C.D. (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 244–249.

Schneider, J., Karpf, J., and Beckervordersandforth, R. (2019). Role of astrocytes in the neurogenic niches. *Methods Mol. Biol.* 1938, 19–33.

Schultz, M.B., and Sinclair, D.A. (2016). When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development* 143, 3–14.

Schutte, B., Nieland, L., Van Engeland, M., Henfling, M.E.R., Meijer, L., and Ramaekers, F.C.S. (1997).

The effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine on cell cycle kinetics. *Exp. Cell Res.* 236, 4–15.

Seaberg, R.M., and van der Kooy, D. (2002). Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J. Neurosci.* 22, 1784–1793.

Seaberg, R.M., Smukler, S.R., and Van Der Kooy, D. (2005). Intrinsic differences distinguish transiently neurogenic progenitors from neural stem cells in the early postnatal brain. *Dev. Biol.* 278, 71–85.

Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J.T., Fasano, C.A., Phoenix, T.N., Lemischka, I.R., Ivanova, N.B., Stifani, S., Morrisey, E.E., and Temple, S. (2006). The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat. Neurosci.* 9, 743–751.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.

Shi, Y., Zhao, X., Hsieh, J., Wichterle, H., Impey, S., Banerjee, S., Neveu, P., and Kosik, K.S. (2010). MicroRNA Regulation of Neural Stem Cells and Neurogenesis. *J. Neurosci.* 30, 14931–14936.

Signer, R.A.J., and Morrison, S.J. (2013). Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell Stem Cell* 12, 152–165.

Smith, C.M., and Luskin, M.B. (1998). Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream. *Dev. Dyn.* 213, 220–227.

Stolt, C.C., Lommes, P., Sock, E., Chaboissier, M.C., Schedl, A., and Wegner, M. (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev.* 17, 1677–1689.

Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., et al. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155, 1119–1130.

Sugimori, M., Nagao, M., Bertrand, N., Parras, C.M., Guillemot, F., and Nakafuku, M. (2007). Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord. *Development* 134, 1617–1629.

Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., and Greenberg, M.E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365–376.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.

Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112–117.

Thomson, J.A. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282, 1145–1147.

Tropepe, V., Sibilia, M., Ciruna, B.G., Rossant, J., Wagner, E.F., and Van Der Kooy, D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev. Biol.* 208, 166–188.

Vasconcelos, F.F., and Castro, D.S. (2014). Transcriptional control of vertebrate neurogenesis by the proneural factor *Ascl1*. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 1–6.

Velasco, S., Kedaigle, A.J., Simmons, S.K., Nash, A., Rocha, M., Quadrato, G., Paulsen, B., Nguyen, L., Adiconis, X., Regev, A., et al. (2019). Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature* 570, 523–527.

Vidal, A., and Koff, A. (2000). Cell-cycle inhibitors: Three families united by a common cause. *Gene* 247, 1–15.

Wegner, M., and Stolt, C.C. (2005). From stem cells to neurons and glia: A Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* 28, 583–588.

Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., and Reynolds, B.A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci.* 16, 7599–7609.

Zencak, D. (2005). *Bmi1* Loss Produces an Increase in Astroglial Cells and a Decrease in Neural Stem Cell Population and Proliferation. *J. Neurosci.* 25, 5774–5783.

Zhang, P., Furukawa, K., Opresko, P.L., Xu, X., Bohr, V.A., and Mattson, M.P. (2006). TRF2 dysfunction elicits DNA damage responses associated with senescence in proliferating neural cells and differentiation of neurons. *J. Neurochem.* 97, 567–581.