



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES
EMBRIONARIAS A NEURONAS DOPAMINÉRGICAS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

MAYRA FURLAN MAGARIL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES.



2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVIDENCIA DE
MILLENIO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Diferenciación de células troncales embrionarias a neuronas dopaminérgicas"
realizado por Mayra Furlan Magaril

con número de cuenta 09954869-4 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Propietario

Dr. Julio Alejandro Prieto Sagredo

Propietario

Dr. Iván Velasco Velázquez

Suplente

Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop

Suplente

Dr. Jean Louis Charli Casalonga

Luis Robles
Julio Prieto
Iván Velasco
Martha Vázquez

Jean Louis Casalonga

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

A mi padre, mi madre y mi hermanita...
porque a pesar de los terremotos individuales y conjuntos
siempre encontramos la forma de reinos de nosotros mismos.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Mayra Furlan

Magaril

FECHA: 2. AGO. 04

FIRMA: Magaril

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer al doctor Luis Covarrubias Robles por permitirme realizar bajo su asesoría un primer acercamiento a la investigación científica y enseñarme a observar de manera profunda y crítica los fenómenos involucrados en la biología del desarrollo... porque cada discusión fue enriquecedora y su visión siempre deslumbrante.

Quisiera agradecer también a mis sinodales: al doctor Iván Velasco por su apoyo a lo largo del establecimiento del protocolo de diferenciación neuronal y por los valiosos comentarios que realizó con respecto a este trabajo. Al doctor Julio Prieto por haberme enseñado a formular preguntas y por haber dejado en mí la huella que sólo dejan los grandes maestros: las ganas de seguir asombrándome ante la naturaleza. Al doctor Jean Louis Charli y a la doctora Martha Vázquez por su lectura y revisión de esta tesis y por sus importantes observaciones.

A la Universidad Nacional Autónoma de México le agradezco por ser el espacio en donde toda esta gran gente puede reunirse, aprender y enseñar. También agradezco al programa de becas Probetel por haberme apoyado económicamente durante la realización de la tesis.

Agradezco a los cuasi doctores Manuel Baizabal y David Hernández que me enseñaron a trabajar dentro del laboratorio y cuarto de cultivo; por su colaboración, consejo, asesoría y amistad durante estos meses.

Mi agradecimiento a todos los miembros del laboratorio, ratones y moscas incluidos, por hacer del "lab" un espacio de trabajo divertido y motivante. En particular mi agradecimiento a Rayo, Chío, Yuri, Charis y Cristina por hacer del pequeño cuadrante de trabajo un lugar en donde compartir.

Agradezco también a mis compañeras del camino cuernavaquense Eria e Ingrid, por haber construido un espacio cálido al cual nombrar "casita" (aunque GEO).

Y de éste lado de la carretera...

Agradezco a mi madre por ser la fuerza que erige este hogar, por ser los pasos que siempre llegan a intentar que todo esté dentro de su cauce, por su amor incondicional,

por su eterna "madrecitud". A mi padre, porque su mirada conmovida ante la vida me ha enseñado a recorrer caminos con ganas de aprender, porque espero se aferre a la inherente belleza de las pequeñas cosas del mundo y nunca las olvide... porque estas neuronitas y todos sus colores son para él. A Laura, mi hermanita querida, porque es en su palabra que encuentro la mía y en sus dos grandes ojos donde veo mi mejor reflejo... lunga, gracias ché.

Quiero agradecer también y con todo el corazón a mi familia, la familia que por suerte y por los serpenteos del camino es la mía: A Jorge, Hilda, Ana, Checho, Fer, Sebas y Lalo... a Susi y a Sole... por compartir los ires, venires y zambullidas, porque sin ellos ningún domingo de asado tendría sentido.

Agradezco ahora y con fuerza a mis grandes amigos... porque es una elección estar juntos en el camino y compartimos. A Helena, por llenar el espacio de luz y vivir la vida con la intensidad del canto que contagia... porque sin ella mi diálogo sería sordo y mis palabras aire. A la Truchi, mi compañera, mi hermana... porque al final del día siempre está nuestra risa que junta aniquila toda oscuridad. A Julieta, porque es en su amistad plena que siento a la vida, porque el baile siempre estará de nuestro lado. A Nadia, porque su forma de sentir es mi inspiración... porque sigo después de tantos años admirando cada salto, cada giro. A Julita, porque su voz y dulzura me transmiten lo hermoso, lo nítido, lo que vale. A Santi (Brayan), porque el lazo que nos une es irrompible y a pesar del tiempo, el espacio y los vuelcos de la vida, es en su compañía que la amistad significa y sueña. A Juli Pozas, porque siempre podremos reír y sabernos vivos. A Andre, porque aun desde lejos su brillo impregna de ganas a los días. A Javi, por su sensatez y cariño que siempre me aterrizan. A Mariano, por acompañarnos dulcemente en un tramo del camino y ayudarme a abrir un quizás.

A todos y cada uno mi más profundo agradecimiento.

ÍNDICE.

Agradecimientos.....	3
Lista de abreviaturas.....	8
Introducción.....	10
1) Desarrollo del sistema nervioso central (SNC).....	10
2) La frontera entre el mesencéfalo-metaencéfalo: El istmo.....	13
<i>Patrón de expresión de genes en el istmo:</i>	
- Los factores de transcripción "orthodenticle homologue 2" (Otx2) y "gastrulation brain homeobox 2" (Gbx2)	15
- Los genes "paired box" (Pax).....	16
- La familia de glicoproteínas Wnt y los factores de transcripción "engrailed" (En)	16
- El factor de crecimiento fibroblástico 8 (Fgf8).....	17
3) Neuronas dopaminérgicas (DA).....	18
<i>Genes involucrados en el desarrollo de las neuronas DA:</i>	
- Shh y Fgf8	18
- El receptor nuclear huérfano Nurr1.....	20
- El factor de transcripción "pituitary homeobox 3" (Ptx3).....	22
- El factor de transcripción con homeodominio Lim 1B (Lmx1b).....	22
- Los factores de transcripción con homeodominio En1 y En2.....	22
- La aldehído deshidrogenasa 1 (Aldh1).....	23
4) Células troncales neurales.....	25
5) Células troncales embrionarias (ES).....	30
- Diferenciación neural a partir de células ES.....	32
- Generación de neuronas dopaminérgicas a partir de células ES.....	35
6) Los factores Shh y Fgf8 en proliferación y supervivencia.....	37
Justificación.....	41
Hipótesis.....	43
Objetivos.....	43
Métodos.....	44
1) Protocolo de diferenciación neuronal dopamérgica a partir de células ES.....	44

- <i>Etapa 1: Expansión de células ES indiferenciadas</i>	48
- <i>Etapa 2: Formación del cuerpos embrionarios</i>	52
- <i>Etapa 3: Selección de células positivas para nestina</i>	53
- <i>Etapa 4: Expansión de células positivas para nestina</i>	53
- <i>Etapa 5: Diferenciación de neuronas dopaminérgicas</i>	55
2) Inmunocitoquímica y TUNEL.....	55
3) Análisis de resultados.....	57
Resultados	58
1) Establecimiento del protocolo de diferenciación de neuronas dopaminérgicas a partir de células ES.....	58
2) Efecto de Shh y Fgf8 sobre el precursor dopaminérgico.....	63
3) Optimización del protocolo de diferenciación.....	70
Discusión	73
1) Establecimiento del protocolo de diferenciación de neuronas dopaminérgicas a partir de células ES.....	73
2) Mecanismos de acción de Shh y Fgf8 durante la especificación dopaminérgica a partir de células ES.....	74
- <i>Efectos generales de Shh y Fgf8</i>	74
- <i>Identificación de células precursoras neurales expandibles</i>	75
- <i>Efecto de Shh y Fgf8 sobre el número de precursores expandibles</i>	77
- <i>Efecto de Shh y Fgf8 en la supervivencia de los precursores</i>	77
3) Optimización del protocolo de diferenciación neuronal dopaminérgica.....	78
- <i>Explantes embrionarios</i>	78
- <i>Aplicación del protocolo de diferenciación sobre la línea Ab2.2 C2</i>	82
Conclusiones	85
- <i>Establecimiento del protocolo de diferenciación neuronal dopaminérgica a partir de células ES</i>	85
- <i>Efectos generales de Shh y Fgf8</i>	85
- <i>Pérdida de la expresión de la GFP durante el protocolo de diferenciación</i>	85
- <i>Optimización del protocolo de diferenciación dopaminérgica</i>	85
- <i>Explantes embrionarios</i>	85

Perspectivas.....	86
- <i>Identificación de precursores neurales únicos.....</i>	<i>86</i>
- <i>Sobre el mecanismo de acción de Shh y Fgf8.....</i>	<i>86</i>
- <i>Optimización del protocolo de diferenciación dopaminérgica.....</i>	<i>87</i>
- <i>Impacto en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.....</i>	<i>88</i>
Bibliografía.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS.

Aldh1, aldehido deshidrogenasa 1
AP, eje antero-posterior
AR, ácido retinóico
Bmps, "bone morphogenetic proteins"
DA, neuronas dopaminérgicas
DBH, dopamina-B-hidroxilasa
DV, eje dorso-ventral
EBs, cuerpos embrionarios
Egf, factor de crecimiento epidérmico
En, "engrailed"
ES, células troncales embrionarias
Fgfs, factores de crecimiento fibroblásticos
Fgf8, factor de crecimiento fibroblástico 8
GABA, ácido gamma-aminobutírico
Gbx2, "gastrulation brain homologue 2"
GFP, proteína verde fluorescente
hES, células troncales embrionarias humanas
IsO, el organizador ístmico
LIF, "leukaemia inhibitory factor"
Mes, mesencéfalo
Mes-met, frontera mesencéfalo-metaencéfalo
Met, metaencéfalo
NeuN, neurofilamento
Nurr1, receptor nuclear huérfano 1
Otx2, "orthodenticle homologue 2"
Pax, "paired box"
Ptc, "patched"
Ptx3, "pituitary homeobox 3"
SNC, sistema nervioso central

Shh, "sonic hedgehog"

Tgf- β , factor transformante β

TH, tirosina hidroxilasa

Tu- β III, tubulina β III.

INTRODUCCIÓN

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).

Muy temprano en el desarrollo embrionario de los mamíferos, las células internas de la mórula dan lugar a la masa celular interna de donde se deriva el epiblasto embrionario. Posteriormente durante la gastrulación, el nodo induce la formación en el embrión de una capa interna endodérmica, una media mesodérmica y un ectodermo externo. El mesodermo dorsal, dirige al ectodermo por encima de éste promoviendo su neuralización. La inducción neural en vertebrados está dada por la interacción compleja entre las cascadas de señalización de los factores de crecimiento fibroblásticos (Fgfs), las proteínas pertenecientes a la superfamilia de los factores transformantes β (Tgf- β) llamadas "bone morphogenetic proteins" (Bmps) y la familia de proteínas Wnt. El modelo más aceptado de inducción neural es aquel en el que moléculas que secuestran a las Bmps tales como "noggin" y "chordin", permiten la neuralización evitando la inducción epidermal del ectodermo por parte de las Bmps.

Inicialmente, señales pertenecientes a los Fgfs demarcan una frontera entre el epiblasto dorsal competente y no competente a neuralizar. Diversos estudios realizados en pollo y en *Xenopus laevis* muestran que la vía de señalización de los Fgfs media la disminución en la expresión de los Bmps en el ectodermo. De manera similar la señalización por la vía de Wnt se ha vinculado con la adquisición de destinos neurales del ectodermo a través de la regulación transcripcional de los Bmps. En *Xenopus laevis*, la señalización por Wnts activa correpresores transcripcionales que disminuyen la expresión de *Bmp4* induciendo destinos neurales. En el pollo sin embargo, la señalización por Wnts disminuye la expresión de *Fgf3* lo cual aumenta la expresión de Bmps promoviendo destinos epidérmicos (revisado en Muñoz-Sanjuán y Brivanlou, 2002).

La neurulación comienza cuando las células del ectodermo se empiezan a pseudoestratificar y a expresar marcadores específicos dando lugar a la placa neural. Inmediatamente, ésta sufre una serie de cambios morfológicos que resultan de la combinación de fuerzas intrínsecas (de las células en la placa neural) y extrínsecas (de

tejidos adyacentes a la placa neural como la epidermis) que finalmente dan lugar a la formación del tubo neural (revisado en Smith y Schoenwolf, 1997).

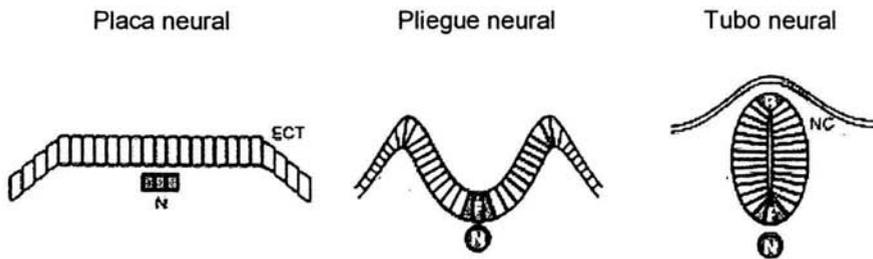
Al tiempo que la formación del tubo neural se está llevando a cabo en las regiones posteriores del embrión, en las partes anteriores está ocurriendo la formación de las vesículas primarias; el prosencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo. De éstas surgen, posteriormente, las vesículas secundarias. Del prosencéfalo surgen el telencéfalo y el diencéfalo a partir de los cuales se forman todas las estructuras correspondientes al cerebro anterior. A partir del mesencéfalo (mes) se forma una sola vesícula del mismo nombre y del romboencéfalo surgen el metaencéfalo (met) y el mielencéfalo que conformarán al cerebelo y al puente el primero, y a la médula espinal el segundo (Gilbert, 2003).

El patrón de formación de la placa neural en etapas más tardías es también un proceso altamente regulado en el que intervienen diferentes señales. La especificación de regiones a lo largo del eje dorso-ventral (DV) está dada por la acción de dos centros de señalización opuestos. Por un lado, la notocorda y posteriormente la placa del piso ventralizan al tubo neural por medio de la producción de "noggin", "chordin" y la proteína "sonic hedgehog" (Shh). Esta última, pertenece a la familia de proteínas de secreción hedgehog y lleva a cabo diversas funciones durante el desarrollo de los vertebrados. En el tubo neural, Shh contribuye en la adquisición de diversos destinos celulares de manera dosis dependiente (revisado en Ho y Scott, 2002).

Del lado opuesto, la epidermis dorsal y posteriormente la placa del techo generan señales de secreción que pertenecen a la familia de proteínas Wnt (Wnt1 y Wnt3a) y a la superfamilia de Tgf- β (Bmp2, Bmp4 y Bmp7) que confieren también en forma dependiente de la dosis, identidad dorsal al tubo neural.

La exposición a la combinación de las señales ventrales y dorsales en concentraciones variables, establece regiones de expresión de factores de transcripción con homeodominio que especifican identidades celulares a lo largo de eje DV (figura 1) (revisado en Wesseley y De Robertis, 2002).

A.Etapas del Desarrollo



B.Señales Inductivas

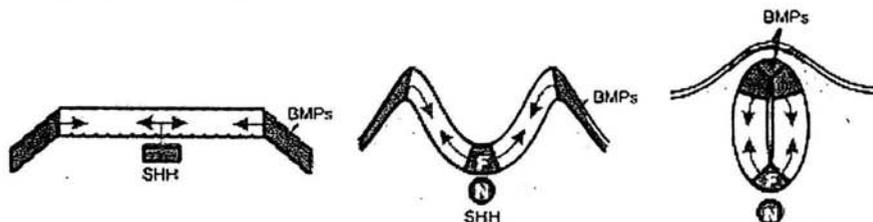


FIGURA1. Señales inductivas durante el desarrollo del tubo neural. A. Etapas del desarrollo del tubo neural: La placa neural se genera como un epitelio columnar al que subyacen células del mesodermo axial de la notocorda (N) y flanquea el ectodermo epidérmico (ECT). Durante la neurulación, la placa neural se invagina por la línea media conformando a los pliegues neurales y a la placa del piso (F). El tubo neural se forma por medio de la fusión de las puntas dorsales de los pliegues neurales, generando a la placa del techo en su línea media dorsal (R) y a células de la cresta neural (NC), quienes emigran desde el tubo neural dorsal. B. Shh proveniente de la notocorda y de la placa del piso del tubo neural interactúa con los Bmps que surgen del ectodermo epidérmico y de la placa del techo, estableciendo gradientes que instruyen a las células neuroepiteliales hacia linajes neuronales ubicados en distintos niveles del eje dorso-ventral (modificada de Tanabe *et al.*, 1996).

La especificación de regiones a lo largo del eje antero-posterior (AP) durante la neurulación, se encuentra mediada por interacciones entre el tubo neural y células del mesodermo a través de factores secretables como los Fgfs y el ácido retinóico (AR), los cuales, caudalizan al neuroectodermo. La concentración de AR a lo largo del eje AP regula la expresión de genes pertenecientes a la familia de *Hox*, quienes especifican identidades rostro-caudales desde la frontera anterior del cerebro posterior, hasta la punta de la médula espinal. Además de estas señales, existen otras moléculas como *Lim -1*, *Otx2* y *cerberus* que especifican la inducción de las estructuras que conforman la cabeza (prosencéfalo, mesencéfalo y la región anterior del cerebro posterior)(Gilbert, 2003).

A continuación se detallará la especificación de la región mesencefálica y metaencefálica.

LA FRONTERA MESENCÉFALO-METAENCÉFALO: EL ISTMO

La especificación de dominios locales a lo largo del eje AP en la placa neural, es un proceso que aun no se comprende con claridad. Sin embargo, en la última década se han identificado centros de señalización que parecen organizar al tejido circundante. Uno de ellos llamado Risco Neural Anterior, se encuentra en la unión entre el prosencéfalo y el ectodermo anterior y parece estar involucrado en mantener la identidad anterior del cerebro. Otro de los organizadores reconocidos hasta el momento se encuentra en la frontera entre el mesencéfalo y el metaencéfalo y se denomina Organizador Istmico (IsO) (figura 2).

La actividad organizadora del IsO se identificó inicialmente en embriones de pollo y se ha extendido al resto de los vertebrados estudiados hasta el momento.

Uno de los primeros experimentos realizados muestra que, al transplantar la región que abarca a la frontera entre mes-met (el IsO) a sitios neurales ectópicos en el estadio de 10 somitas, se inducen destinos correspondientes a esta región en los tejidos hospederos en el sitio de contacto con el tejido transplantado. El cambio de destino en estos experimentos ocurre sin importar la identidad inicial del tejido hospedero (diencefálica o romboencefálica). De manera contraria, experimentos en donde se transplantó tejido prosencefálico a la región del IsO mostraron que éste adquiere un destino correspondiente a la frontera mes-met y la expresión de genes característicos de la región. Adicionalmente, estos experimentos evidencian la capacidad del IsO para polarizar al tejido hospedero, es decir, que la frontera mes-met inducida, muestra una disposición rostro-caudal similar a la endógena. Otros experimentos que indicaron la actividad organizadora del IsO se obtuvieron realizando ablaciones bilaterales de partes o de toda la región ístmica. La remoción completa del IsO tuvo como consecuencia la pérdida total del mesencéfalo y metaencéfalo. Todos estos resultados muestran como dicho organizador es necesario y suficiente para formar y especificar rostro-caudalmente a todo el territorio mesencefálico y metaencefálico (revisado en Wurst y Bally-Cuif, 2001).

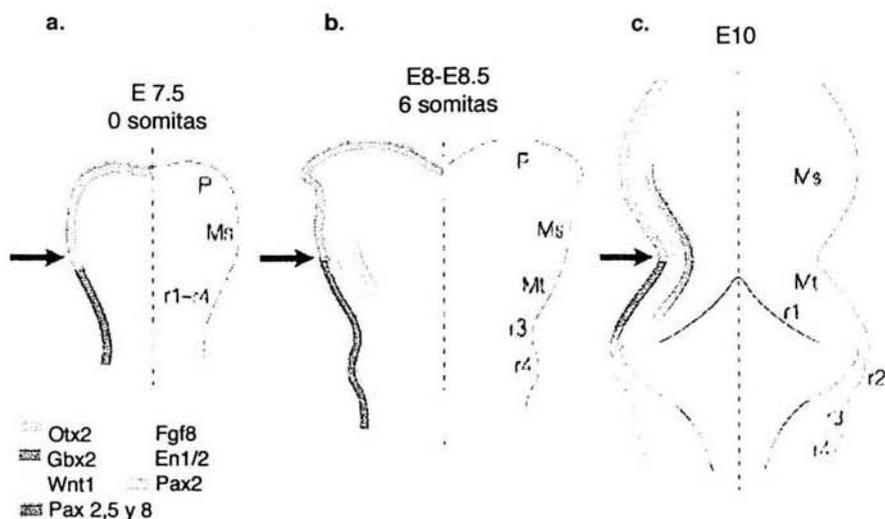


FIGURA 2. Patrón de expresión de los genes en el Istmo. Imágenes dorsales de la placa neural embrionaria del ratón en el estadio de (a) 0 somitas, (b) 6 somitas y (c) E10, con el extremo anterior en la parte superior. (a) Al final de la gastrulación (0 somitas), la placa neural se divide en dos grandes dominios, el anterior expresa *Otx2* y el posterior expresa *Gbx2*. La expresión de estos genes se encuentra en el sitio en donde se ubicará la frontera mes-met y forma gradientes decrecientes en direcciones opuestas. (b) En el estadio de 6 somitas tanto el extremo posterior de expresión de *Otx2* como el anterior de *Gbx2* se angostan y entran en contacto, la expresión de *Wnt1* comienza en el mesencéfalo, y *En1* (seguido de *En2*) y *Pax2* empiezan a expresarse a través del dominio *Otx2-Gbx2*. Un poco más tarde se inicia la expresión de *Fgf8*, la cual se restringe al lado caudal del dominio *Otx2-Gbx2*.

(c) En estadio E10 el punto de encuentro entre *Otx2-Gbx2* identifica a la frontera mesencéfalo-metaencéfalo. A cada lado de la frontera mes-met, la expresión de *Wnt1* y *Fgf8* se ha restringido a anillos angostos que rodean el tubo neural. Los dominios de expresión de *En1* y *Pax2* se angostan, mientras que, *En2*, *Pax5* y *Pax8* se expresan en casi todo lo largo del dominio mes-met. (*En*, "engrailed"; *Fgf8*, factor de crecimiento fibroblástico 8; *Gbx2* "gastrulation brain homeobox 2"; *Otx2*, "orthodenticle homologue 2"; *Pax*, "paired box"; Ms, mesencéfalo; Mt, metencefalo; P, prosencefalo; r, rombómeros; línea punteada, eje de simetría.) La flecha a la izquierda de cada pánel indica la posición de la frontera entre mesencéfalo y metaencéfalo (modificada de Wurst y Bally-Cuif, 2001).

Patrón de expresión de los genes del istmo.

Los factores de transcripción "orthodenticle homologue 2" (Otx2) y "gastrulation brain homeobox 2" (Gbx2)

Existen varios genes que se expresan en la frontera mes-met en un patrón espacio temporal particular que parece estar muy conservado en la evolución de los vertebrados (revisado en Rhinn y Brand, 2001).

En el ratón, a los 7.5 días embrionarios (E7.5) los genes "orthodenticle homologue 2" (Otx2) y "gastrulation brain homeobox 2" (Gbx2) se expresan en territorios complementarios en la región anterior y posterior del epiblasto respectivamente (figura 2). El análisis de los ratones *Otx1* *-/-*; *Otx2* *-/+* u *Otx1* *-/+*; *Otx2* *-/+*, muestra un fenotipo en donde el metaencéfalo se encuentra extendido y el mesencéfalo está ausente. Adicionalmente, la relación en la expresión de los marcadores de la frontera mes-met se mantiene normal pero se encuentra movida rostralmente hacia el diencéfalo (revisado en Joyner *et al.*, 2000).

De manera contraria, el ratón nulo para *Gbx2* muestra un mesencéfalo posterior extendido de manera caudal y ausencia de metaencéfalo. Por otro lado, la expresión de diferentes marcadores del IsO se encuentra corrida caudalmente pero mantiene su relación posicional. Estas evidencias han mostrado que *Otx2* y *Gbx2* se requieren para definir a las estructuras del mesencéfalo y metaencéfalo respectivamente, y que el punto en donde los territorios de expresión de ambos genes se encuentran, demarca la posición de formación del IsO (revisado en Wurst y Bally-Cuif, 2001).

En el estadio E8, el factor de transcripción *Pax2* y la molécula de secreción *Wnt1* se expresan en dominios sobrelapantes (figura 2). La expresión de *Wnt1* se encuentra restringida en su mayoría al territorio de expresión de *Otx2* mientras que *Pax2* cruza la frontera *Otx2*-*Gbx2*.

Poco tiempo después se expresa el factor de transcripción "engrailed 1" (*En-1*) y más tarde en el estadio E8-8.5 se expresan "engrailed 2" (*En-2*), *Pax5* y finalmente *Pax8*. La expresión de todos estos genes se extiende anterior y posteriormente a la frontera entre *Otx2*-*Gbx2* (figura 2).

Los genes “paired box” (Pax)

Los genes *Pax2*, *Pax5* y *Pax8* provienen de un evento de duplicación al inicio de la evolución de los vertebrados y las proteínas para las que codifican poseen actividades bioquímicas similares. La severidad en los fenotipos que se observan en el mesencéfalo y cerebelo de los ratones nulos para estos genes, va aumentando conforme más temprana es la expresión del gen. El fenotipo que presenta el ratón *Pax2*^{-/-} varía mucho dependiendo del fondo genético que se utilice y va desde la ausencia total del mesencéfalo posterior y el cerebelo, hasta un desarrollo prácticamente normal de todas las estructuras que dependen del organizador ístmico. El ratón *Pax5*^{-/-} presenta defectos en el colículo inferior y en el cerebelo anterior y el ratón *Pax8*^{-/-} no presenta ninguna anomalía en la región del IsO. En contraste, el doble mutante *Pax2*^{-/-}; *Pax5*^{-/-} presenta un fenotipo consistente de ausencia del mesencéfalo posterior y el cerebelo, sin importar el fondo genético.

Estudios posteriores han demostrado que *Pax2* regula la expresión de *Pax5* mediante su interacción con un amplificador o “enhancer” en este gen (Pfeffer *et al.*, 2000). Sin embargo, la función de ambas proteínas parece ser equivalente ya que al expresar a *Pax5* bajo los elementos de regulación génica de *Pax2*, el fenotipo mutante de *Pax2* en donde no hay mesencéfalo posterior y cerebelo se rescata completamente (Boucharde *et al.*, 2000).

La familia de glicoproteínas Wnt y los factores de transcripción “engrailed” (En)

La familia de glicoproteínas de secreción Wnt está involucrada en varios procesos dentro del desarrollo como son la proliferación celular y la diferenciación. El fenotipo de los ratones nulos para *Wnt1* muestra la pérdida del mesencéfalo y del cerebelo. Al introducir un transgen que expresa a *En-1* bajo el promotor de *Wnt1* en estos mutantes el fenotipo se rescata, por lo que se ha sugerido que un papel de *Wnt1* es mantener la expresión de *En-1* (revisado en Rhinn y Brand 2001). Adicionalmente, se observa la pérdida de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (ver abajo) (revisado en Castelo-Branco *et al.*, 2003).

“Engrailed” es un factor de transcripción que juega un papel importante en el desarrollo de los insectos estableciendo el plan corporal de manera temprana y posteriormente la identidad neuronal (revisado en Simon *et al.*, 2001).

En-1 y *En-2*, los homólogos de "engrailed" en vertebrados, son otros de los genes expresados en la frontera mes-met. Los ratones con deleciones específicas de estos genes muestran la importancia de *En-1* y *En-2* para mantener las estructuras que se originan a partir de sus dominios de expresión. Los mutantes en *En-1* mueren al nacer y no poseen cerebelo ni colículo inferior (Wurst *et al.*, 1994). Los mutantes en *En-2* sin embargo, son viables y fértiles y presentan defectos menores en la foliación del cerebelo (Joyner *et al.*, 1991). Además de estas funciones, los genes *En-1* y *2* poseen un papel importante en el mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas (ver abajo).

La expresión de *En-1* es inducida inicialmente de manera directa o indirecta por el factor de crecimiento fibroblástico 4 (*Fgf4*) proveniente del mesodermo axial (notocorda) y parece depender también de *Pax2*. A su vez, la expresión ectópica de *En-1* es capaz de inducir la expresión del factor de crecimiento fibroblástico 8 (*Fgf8*) (Shamim *et al.*, 1999).

El factor de crecimiento fibroblástico 8 (Fgf8)

La expresión de *Fgf8* se enciende durante el estadio de 3 a 5 somitas justo antes de la expresión de *En-2* y se encuentra restringida a la región caudal correspondiente al territorio de *Gbx2* (figura 2). Posteriormente (E10), los límites de expresión de cada gene se refinan. *Wnt1* se restringe a un anillo que rodea al tubo neural en la región inmediata rostral de la frontera mes-met y en forma especular, la expresión de *Fgf8* se limita a un anillo angosto que define el límite rostral de la expresión de *Gbx2*.

Diversos experimentos muestran que *Fgf8* es capaz de imitar la actividad inductora del IsO por sí solo. Al igual que en los experimentos de trasplante de la frontera mes-met, al implantar perlas cubiertas de *Fgf8* en el diencéfalo, mesencéfalo o romboencéfalo se induce la expresión ectópica de diversos marcadores del IsO además del desarrollo posterior de estructuras mesencefálicas y metaencefálicas alrededor de las perlas.

En estos experimentos los eventos de inducción observados a partir de la acción de *Fgf8*, muestran una secuencia temporal que aporta información para entender los mecanismos de regulación dentro del IsO. Cuando *Fgf8* se coloca en el territorio de *Otx2*, induce a *Gbx2*, reduce la expresión de *Otx2* e induce a *Wnt1* y a sí mismo. De la misma forma se observa la inducción de los genes *Pax* y *En*. Estos resultados muestran

que el papel de *Fgf8* es mantener (pero no inducir inicialmente) la expresión de los marcadores del IsO y su actividad y permiten proponer modelos en donde la regulación en la expresión de *Fgf8* está dada en gran medida por una asa de retroalimentación positiva con *Wnt1*, *Pax* y *En* (ya que su expresión *in vivo* es posterior a dichos genes y sin embargo es capaz de inducirlos ectópicamente).

Por otro lado, *Fgf8* induce a "*Sprouty*", molécula inhibidora de la señalización por Fgfs, en el territorio mes-metaencefálico. Se propone que esta molécula es suficiente para inhibir a *Fgf8* en determinadas concentraciones, de manera que *Fgf8* parece contribuir también en una asa de retroalimentación negativa para restringir el territorio y la actividad organizadora del IsO.

Las señales provenientes del IsO interactúan con señales que emanan de organizadores dorso-ventrales y así especifican destinos celulares en el mesencéfalo y el metaencéfalo (revisado en Wurst y Bally-Cuif, 2001).

NEURONAS DOPAMINÉRGICAS (DA)

En los vertebrados existen varios grupos de neuronas dopaminérgicas ubicados en diferentes zonas del cerebro tales como el bulbo olfatorio, la retina, el hipotálamo y el mesencéfalo. La formación más grande de neuronas dopaminérgicas se ubica en el mesencéfalo ventral dentro de la *substancia nigra* y la zona tegmental ventral. En el desarrollo del ratón, las primeras neuronas DA se detectan alrededor del estadio E10-10.5 y aparecen en la porción rostral de la frontera mes-met.

Genes involucrados en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas.

Shh y Fgf8

La especificación del fenotipo dopaminérgico depende de la interacción entre *Fgf8* proveniente del IsO y *Shh* que es emitido desde la placa del piso del tubo neural. Estos dos morfógenos son suficientes y necesarios para inducir la diferenciación dopaminérgica en explantes del mesencéfalo dorsal y el telencéfalo. *Fgf8* localiza a las neuronas DA a lo largo del eje AP mientras que *Shh*, localiza a la neuronas DA a lo largo del eje DV, y es en la intersección de ambas moléculas secretables que se genera el nicho apropiado de diferenciación dopaminérgica (figura 3). Sin embargo, el

mecanismo a través del cual actúan estas moléculas todavía no se comprende con claridad (Ye *et al.*, 1998).

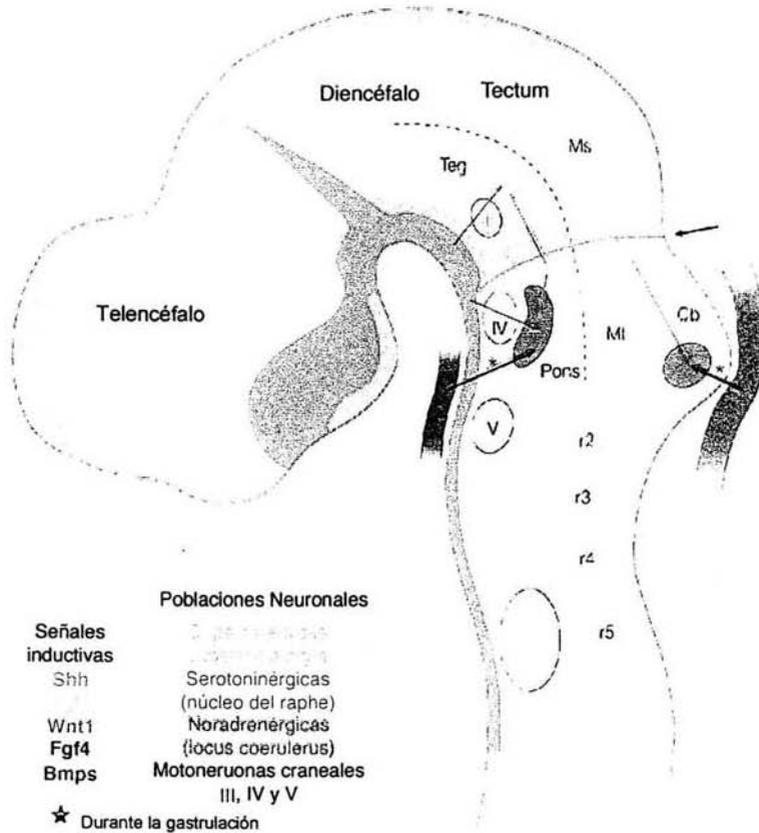


FIGURA 3. La interacción entre señales anteroposteriores y dorsoventrales especifica identidades neuronales en la frontera mes-met. Visión sagital de un ratón en el estadio E11 con el extremo anterior a la izquierda. Las señales inductivas (representadas por flechas) se originan de la placa neural a nivel de la frontera mes-met (Fgf8) y de la placa del piso (Shh), al igual que de tejidos no neurales durante la gastrulación (Fgf4 y Bmps). Las neuronas dopaminérgicas en el *tegmentum* requieren de una combinación de Shh y Fgf8. Las neuronas serotoninérgicas en el puente, responden a Fgf4 y posteriormente a Fgf8 y Shh. Las neuronas noradrenérgicas en el *locus coeruleus* requieren de Fgf8 y Bmp4. La flecha negra indica la frontera mes-met. (Bmp, "bone morphogenetic protein"; Fgf, factor de crecimiento fibroblástico; Shh, "sonic hedgehog"; Cb, cerebelo; Ms, mesencéfalo; Mt, metaencéfalo; r, rombómeros; Teg, *tegmentum*) (modificada de Wurst y Bally-Cuif, 2001).

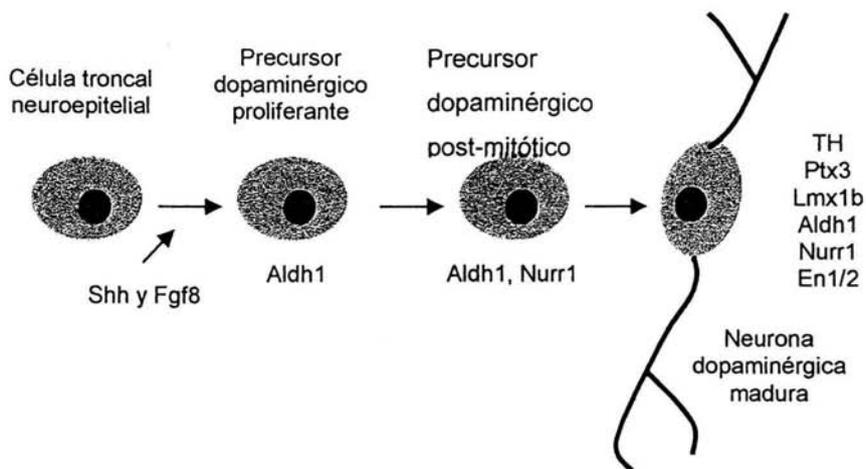
Una vez inducido el destino dopaminérgico por parte de *Shh* y *Fgf8*, se requiere la acción de diversos reguladores transcripcionales para mantener y especificar la maduración de las neuronas DA del mesencéfalo (figura 4).

El receptor nuclear huérfano Nurr1

Nurr1 pertenece a la familia de receptores nucleares huérfanos y fue el primer regulador transcripcional estudiado, cuya ausencia da como resultado la pérdida de las neuronas DA, y de la expresión de la enzima limitante en la biosíntesis de la dopamina la tirosina hidroxilasa (*TH*) en el cerebro medio del ratón. *Nurr1* se expresa a partir del estadio E10.5 en las neuronas DA post-mitóticas todavía inmaduras mientras que la *TH* aparece en el estadio E11. Un análisis detallado de los mutantes nulos para *Nurr1* mostró que las neuronas DA nacen y expresan marcadores dopaminérgicos tales como *Ptx3* y *Lmx1b*; sin embargo, nunca expresan *TH* perdiendo el fenotipo terminal aun cuando son neuronas (revisado en Wallén y Perlman, 2003). Posteriormente otros estudios mostraron que *Nurr1* activa transcripcionalmente al *TH* por medio de unirse a un elemento de respuesta en su promotor, requerido para la expresión mesencefálica de la enzima y que esta molécula es capaz de inducir la expresión de *TH* cuando se la expresa en una línea de células progenitoras del hipocampo (Sakurada *et al.*, 1999).

Adicionalmente, las neuronas DA de los mutantes para *Nurr1* no expresan otros factores vinculados con el transporte axonal, el almacenamiento, la liberación y la recaptura de la dopamina tales como la decarboxilasa de aminoácidos aromáticos, el transportador vesicular asociado a membrana y el transportador de dopamina (revisado en Simon *et al.*, 2003), por lo cual la función de *Nurr1* no parece restringirse a la activación del *TH*. Otra evidencia con respecto a lo anterior se encuentra en el ratón nulo para *TH*, en el cual las neuronas dopaminérgicas se desarrollan normalmente aún cuando carecen de neurotransmisor (revisado en Goridis y Rohrer, 2002).

A.



B.

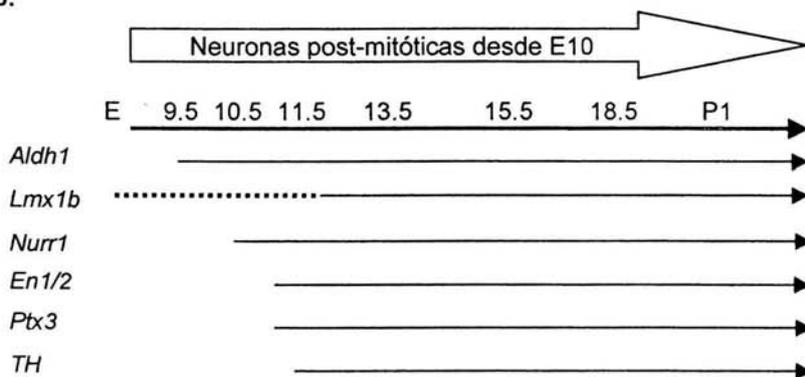


FIGURA 4. (A) Desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo del ratón. Shh y Fgf8 especifican a la célula precursora dopaminérgica proliferante que expresa a la Aldh1. Cuando estas células se convierten en post-mitóticas se induce la expresión de *Nurr1* seguida de *En1* y *En2*. **(B)** Representación de la secuencia de inducción génica en las células DA en desarrollo. La expresión de *Lmx1b* en el mesencéfalo empieza en el estadio E7.5; sin embargo, no se sabe si ésta se restringe a células precursoras dopaminérgicas (línea punteada). En etapas más tardías, *Lmx1b* se expresa específicamente en las neuronas dopaminérgicas. E, estadio embrionario y P, estadio posnatal (modificada de Wallén y Perlmann, 2003).

El factor de transcripción "pituitary homeobox 3" (Ptx3)

El gene " *pituitary homeobox 3* " (*Ptx3*) codifica para un factor de transcripción que se expresa a partir de E11.5 específicamente en las células TH positivas del mesencéfalo. No todas las células TH positivas expresan *Ptx3*; sin embargo, el análisis del ratón deficiente en esta molécula muestra un fenotipo interesante en el cual el subgrupo de neuronas DA que normalmente expresarían *Ptx3* muere y genera un fenotipo fisiológico e histológico similar al observado en la enfermedad de Parkinson. Este fenotipo confiere a *Ptx3* un papel importante en el mantenimiento y sobrevivencia de una proporción de las neuronas DA y muestra como existe heterogeneidad dentro de las neuronas DA del mesencéfalo (van den Munckhof *et al.*, 2003).

El factor de transcripción con homeodominio Lim 1B (Lmx1b)

El factor de transcripción con homeodominio Lim 1B (*Lmx1b*) se expresa en el tubo neural en el estadio E7.5 incluyendo a la región del cerebro medio ventral en donde se formarán las neuronas DA. En los ratones con deleciones en *Lmx1b*, las neuronas TH positivas surgen y expresan *Nurr1*; sin embargo, no logran expresar a *Ptx3* y mueren posteriormente a lo largo del desarrollo (Smidt *et al.*, 2000).

Los factores de transcripción con homeodominio En1 y En2

Los genes "*engrailed 1*" y "*engrailed 2*" (*En1* y *En2*) tienen un papel importante en diferentes momentos del desarrollo, tal como la especificación de la frontera mes-met como se mencionó anteriormente. En las neuronas DA su expresión aparece entre E11 y E12 y continúa a lo largo de la vida de dichas células. En los ratones que presentan una deficiencia en ambos genes, las neuronas del mesencéfalo ventral surgen y comienzan a expresar TH; sin embargo, no consiguen diferenciar terminalmente y para el estadio E14 ya no son detectadas. El destino de las células faltantes no es claro ya que éstas no pueden visualizarse mediante técnicas de detección de apoptosis como el TUNEL. A pesar de que sería necesario corroborar el destino de las neuronas DA en estos mutantes, los autores sugieren que *En1* y *En2* juegan un papel importante en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.

Por otro lado, los mutantes de *En1* y *En2* muestran una reducción significativa en la proteína sinucleína alfa, la cual se expresa en el estadio E12 en el sistema

dopaminérgico mesencefálico y ha sido vinculada con la enfermedad de Parkinson familiar (Simon *et al*, 2001).

La aldehído deshidrogenasa 1 (Aldh1)

Otro de los marcadores que se expresa a partir de E9.5 en el mesencéfalo ventral es la aldehído deshidrogenasa 1 (Aldh1, AHD2 o Raldh1), enzima capaz de metabolizar el retinaldehído en ácido retinóico. Esta molécula se encuentra dentro del cerebro, en el neuroepitelio mesencefálico en proliferación y posteriormente en las neuronas post-mitóticas que expresan TH (revisado en Wallén y Perlman, 2003).

El vínculo entre la Aldh1 y la especificación dopaminérgica todavía no se ha establecido con claridad. No obstante, se ha observado que Nurr1 forma heterodímeros con el receptor al ácido retinóico y se une a promotores en sitios de respuesta al ácido retinóico, lo que sugiere que esta molécula puede tener algún papel durante la diferenciación dopaminérgica (Castro *et al.*, 2001).

Aun cuando el esquema de la diferenciación dopaminérgica no está completo, los datos actuales muestran la existencia de circuitos regulatorios independientes. Uno que controla la especificación de la dopamina y otro, que controla aspectos de la identidad dopaminérgica que todavía no son claros (figura 5).

En la vía de especificación del neurotransmisor (la dopamina), se encuentran involucrados por lo menos Nurr1 y TH. Existen evidencias que indican que Nurr1 transactiva al gen de *TH* y que es capaz de inducir su expresión en líneas celulares del hipocampo de rata mientras que Ptx3 no lo hace. Sin embargo, existen reportes en donde, utilizando un sistema de diferenciación neural en líneas celulares de carcinoma embrionario de ratón, se observa la inducción en la expresión de la *TH* al transfectar a Ptx3 y no a Nurr1. De manera adicional, estos estudios identifican un sitio de unión de alta afinidad a Ptx3 en el promotor de *TH* (Lebel *et al.*, 2001). Si acaso Nurr1 activa al gen de *TH* en algunos casos y Ptx3 en otros o pueden actuar en conjunto todavía no está resuelto y se requerirán más experimentos para distinguir cual de las posibilidades es la correcta.

En la otra vía, Lmx1b y Ptx3 confieren rasgos adicionales a la identidad dopaminérgica mesencefálica de manera independiente de Nurr1 y al parecer, éstos

están involucrados en el mantenimiento de un subconjunto de neuronas dopaminérgicas.

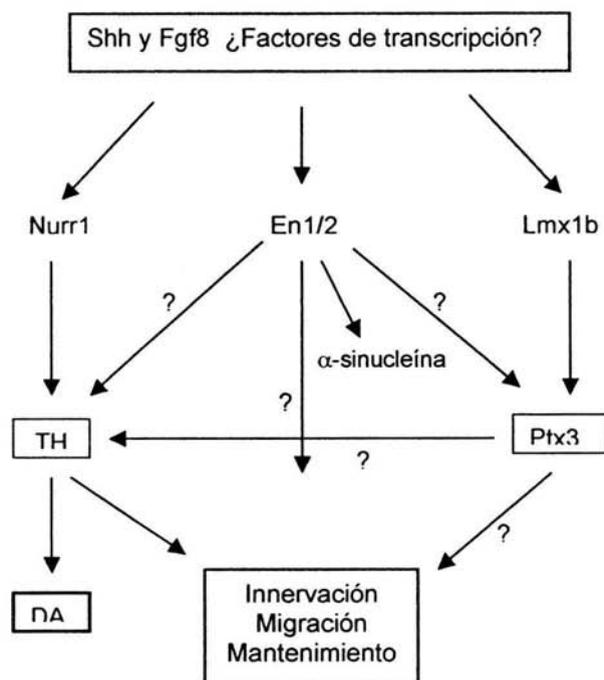


FIGURA 5. Control transcripcional del desarrollo de las neuronas DA. Aun cuando nuestro conocimiento con respecto a las interacciones genéticas en el desarrollo de las neuronas DA sigue fragmentado, existen algunas relaciones que han sido descritas. Se sabe que es en el sitio en donde Shh y Fgf8 coinciden, en donde se genera el nicho necesario para la generación de las neuronas DA, sin embargo, si existen otros factores de transcripción involucrados en la especificación del progenitor dopaminérgico, estos aun no han sido identificados. En las neuronas DA post-mitóticas recién nacidas, Nurr1, En1/2 y Lmx1b juegan un papel en diversos rasgos de su desarrollo. Nurr1 y Lmx1b forman parte de dos cascadas regulatorias diferentes y se expresan de manera independiente. Nurr1 se requiere en procesos como la migración, innervación y mantenimiento de las neuronas DA. Lmx1b induce la expresión de Ptx3 y éste se requiere en la sobrevivencia de un subconjunto de neuronas DA. Por último, En1/2 parecen ser importantes en el mantenimiento de las neuronas DA, por ejemplo, mantienen la expresión de la TH y parecen estar involucrados en la regulación de la α -sinucleína (modificada de Wallén y Perlmann, 2003).

En otras partes del cerebro, existen grupos de neuronas dopaminérgicas que no se encuentran afectados en los mutantes para *Nurr1*, *Ptx3* y *Lmx1b*, por lo cual la regulación ejercida por estos genes especifica la identidad local del sistema dopaminérgico mesencefálico (revisado en Goridis y Roher, 2002). No obstante, aun no se comprende con precisión la compleja combinación de eventos que se llevan

acabo con la participación de estos genes. Algunos de los problemas fundamentales surgen de la falta de un marcador único de los progenitores dopaminérgicos proliferantes que dificulta la evaluación del efecto en ésta población por parte de las señales que inducen este fenotipo. Aunque algunos de los genes identificados se manifiestan en los progenitores en proliferación (Aldh1, Lmx1b), éstos no son exclusivos de los progenitores dopaminérgicos, y el resto de los marcadores que si lo son (Ptx3, Nurr1, TH), se expresan en células ya post-mitóticas.

CÉLULAS TRONCALES NEURALES

La definición de célula troncal neural es funcional y hace referencia a células con la capacidad de autorenovarse en el largo plazo y de generar los tres linajes celulares presentes en el sistema nervioso (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos). Las células troncales neurales adquieren información posicional durante la inducción de la placa neural y la extensión del tubo neural que las dirige hacia destinos celulares particulares. Como se ha mencionado anteriormente, dicha información se genera a través de los gradientes moleculares que perciben las células troncales neurales dependiendo de su relación espacio temporal con los distintos organizadores.

La identidad de las células troncales neurales *in vivo* es controversial tanto en el contexto embrionario como en el adulto, ya que no se conocen marcadores muy específicos que permitan su seguimiento y por lo tanto la corroboración de su multipotencialidad y capacidad de autorenovación. Más aun, se desconoce si las células troncales neurales en el embrión presentan diferencias dependiendo de la región del cerebro en donde se encuentren y si difieren (de haberlas) de las células troncales neurales presentes en la misma región del cerebro adulto (Gage, 2000).

Durante el desarrollo neural temprano se ha identificado la expresión de distintos marcadores. Los genes *Sox1* y *Sox2* son los marcadores más tempranos del neuroectodermo y se expresan en toda la placa neural. Otros marcadores de la placa neural son *Otx2*, *Pax3*, *Pax7* y *Msx1* y *Msx2*. De forma más tardía se expresan la proteína de filamento intermedio nestina y las proteínas de unión a RNA mhashi 1 y 2. La expresión de estas proteínas se mantiene durante todo el desarrollo embrionario y en algunas zonas del cerebro adulto y se utiliza para identificar células troncales

neurales; no obstante, también se expresan en algunos progenitores más comprometidos.

A nivel celular, la población que representa a las células troncales neurales en el embrión no ha sido identificada y distinguirla no es una tarea sencilla, ya que esta población puede modificarse dependiendo del momento en el desarrollo y de la posición del tubo neural que se analice, por lo que conviene denominar precursores neurales a las poblaciones evaluadas hasta el momento (figura 6).

La glia radial posee características que la sugieren como una población de células precursoras neurales importante durante el desarrollo. Esta población aparece en el estadio E12 en el telencéfalo y parece representar la progenie directa de los precursores en el neuroepitelio de la placa neural. La glia radial posee una importante función en la migración neuronal ya que provee, por su estructura bipolar, de una vía para el movimiento en el eje radial del tubo neural de células progenitoras. Por otro lado, la glia radial es capaz de generar células gliales y neuronas *in vivo* e *in vitro* (revisado en Baizabal *et al.*, 2003). Estudios recientes en los cuales se sigue el destino de la glia radial durante el desarrollo muestran cómo de hecho, esta población es progenitora de prácticamente todas las neuronas dentro del SNC (Anthony *et al.*, 2004).

Inicialmente, la identificación de precursores neurales multipotentes se realizó en cultivo a través de evaluar diferentes poblaciones neurales expandidas en presencia de mitógenos tales como Fgf2, el factor de crecimiento epidérmico (Egf) y el factor transformante alfa en su capacidad de derivar los linajes celulares neurales (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) (Santa-Olalla y Covarrubias, 1995 y Reynolds *et al.*, 1996).

El ensayo más utilizado para expandir precursores neurales *in vitro* es aquel en el que a partir de una sola célula en suspensión, se forma un agregado llamado neuroesfera en presencia de mitógenos (tales como Fgf2, Egf o ambos) que contiene una gran cantidad de progenitores transitorios de amplificación rápida. Al remover el factor mitogénico del medio y someter al cultivo a condiciones adherentes, se generan astrocitos (en aproximadamente un 80%), neuronas (aproximadamente 5%) y oligodendrocitos (aproximadamente 2%). En la neuroesfera, la proporción de células precursoras neurales capaces de regenerarla (volver a formar neuroesfera) es baja

(menor al 10%), y existen dudas con respecto a que tanto este precursor expandido preserve las características del precursor neural *in vivo*. Diferentes evidencias apuntan a que las propiedades de los precursores neurales en la neuroesfera se modifican en el proceso de cultivo. Una de ellas se encuentra en el cambio de identidad posicional que se observa en los precursores expandidos en la neuroesfera con respecto a la región del tubo neural de donde ésta se derivó (Santa-Olalla *et al.*, 2003). Por otro lado, los porcentajes obtenidos de los diferentes linajes neurales a partir de los precursores en la neuroesfera se mantienen bastante similares sin importar el mitógeno que se haya utilizado para expandirlos, indicando una posible modificación del potencial durante el proceso de expansión (revisado en Baizabal *et al.*, 2003).

Durante el desarrollo del tubo neural se han identificado dos poblaciones de precursores neurales por medio del análisis de su comportamiento *in vitro*. La más temprana prolifera solo en respuesta a Fgf2 y no forma neuroesfera en condiciones adherentes, mientras que la más tardía, prolifera y forma neuroesfera en respuesta tanto a Egf como a Fgf2. El modelo propuesto hasta ahora plantea que la población temprana que responde a Fgf2 se transforma en la población tardía por medio de regular positivamente la expresión del receptor a Egf (Santa-Olalla y Covarrubias, 1999 y Lillien *et al.*, 2000). Estas dos poblaciones se han identificado a todo lo largo de los ejes AP y DV del tubo neural.

Otras poblaciones de precursores neurales que han sido expandidas *in vitro* provienen del telencéfalo y la médula espinal. Estas poblaciones a diferencia de las neuroesferas solo se expanden en presencia de Fgf2 en forma de monocapas y no de Egf. El potencial de diferenciación que presentan estas poblaciones también difiere del potencial que presentan los precursores en la neuroesfera. Por ejemplo, los precursores derivados de la médula espinal generan una gran variedad de fenotipos neuronales además de, en medio condicionado, generar derivados de la cresta neural. Los precursores de la neuroesfera en cambio presentan una eficiencia menor en la generación de fenotipos neuronales y se encuentran orientados hacia un destino preferentemente glial. Esto muestra como estas poblaciones parecen representar precursores neurales con cualidades distintas.

Es importante considerar que la expansión *in vitro* en presencia de mitógenos puede modificar las cualidades plásticas de las células haciendo que se alejen del perfil que presentan en el organismo vivo. Por otro lado, el papel de dichos precursores neurales en el desarrollo puede depender del entorno espacio-temporal en donde se localicen y ser muy distinto al comportamiento que manifiesten en el cultivo (revisado en Baizabal *et al.*, 2003).

En el adulto, la identificación de células precursoras neurales se ha logrado a través de la detección del destino de las células proliferantes. Esto se ha logrado utilizando estrategias tales como la incorporación de timidina [³H] o bromodeoxiuridina en las células en división. Otra estrategia que se ha utilizado es la infección con retrovirus que llevan un gene reportero y que sólo se integran al DNA en replicación. Existen diversas regiones en el cerebro adulto en donde se ha identificado neurogénesis, tales como, el bulbo olfatorio, el giro dentado del hipocampo y la *substancia nigra* en el mesencéfalo.

La zona de neurogénesis más evidente en el adulto es la que rodea a los ventrículos laterales del cerebro anterior. Los precursores que se han identificado se ubican en la zona subventricular cercana al epéndima (que limita a los ventrículos) y expresan marcadores característicos de astrocitos (Doetsch *et al.*, 1999). Éstos generan progenitores de amplificación transitoria que a su vez producen neuroblastos (progenitores neuronales) que migran al bulbo olfatorio. En el caso del hipocampo, los precursores neurales se ubican en la zona subgranular del giro dentado y migran a la capa de células granulares en donde se diferencian tanto a neuronas como a células gliales (Kuhn *et al.*, 1996).

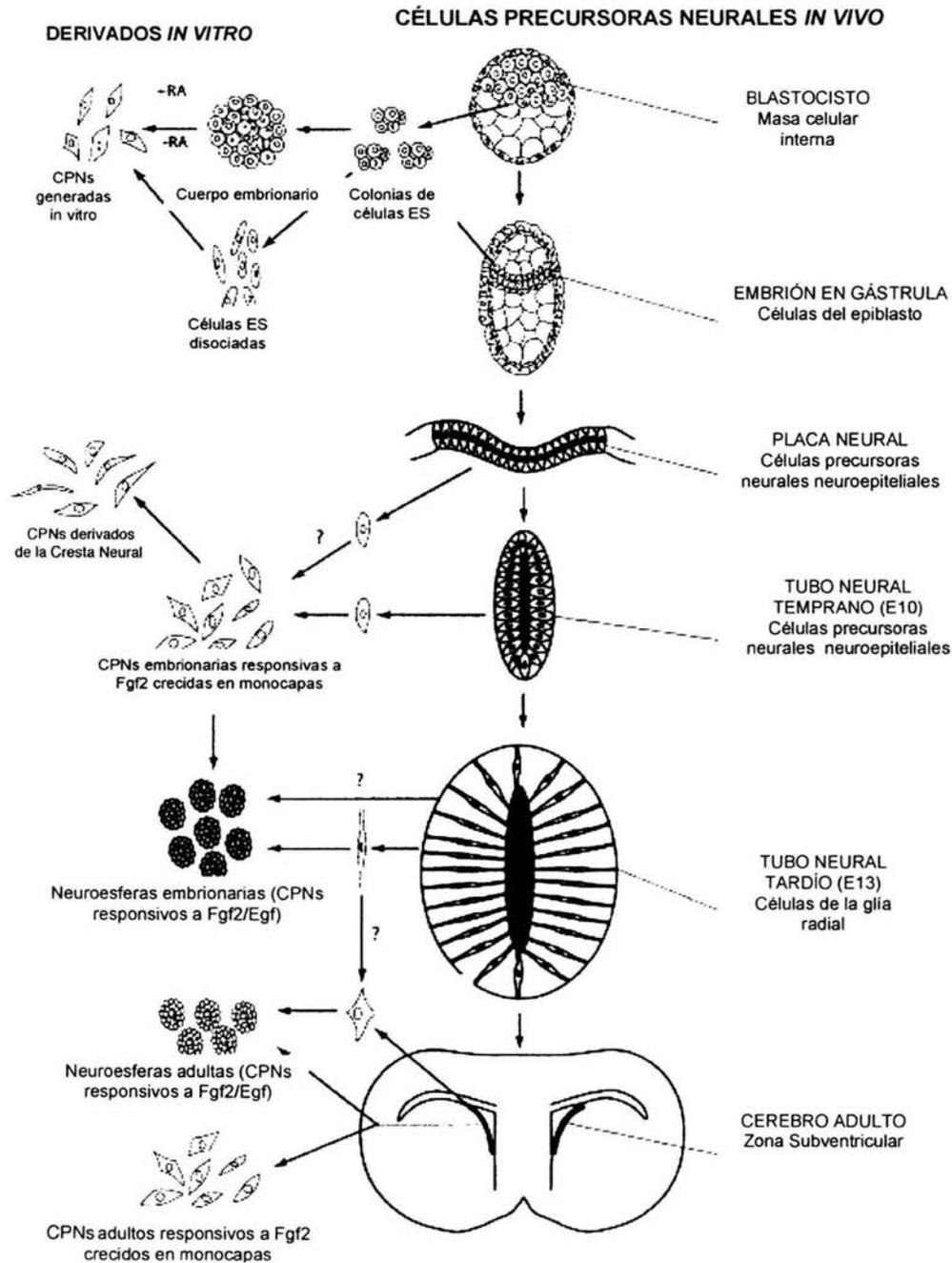


FIGURA 6. El origen de las células precursoras neurales (CPNs) y sus derivados indiferenciados *in vitro*.

Durante la inducción de la placa neural y poco después del cierre del tubo neural, la mayoría de las células son CPNs neuroepiteliales. A medida que procede el desarrollo del tubo neural, las células de la glia radial aparecen y se vuelven la población de CPNs más importante en la mayoría de las regiones del sistema nervioso central. Eventualmente, las células de la glia radial pudieran generar una célula troncal neural con características astrocíticas en el adulto que se ubica en la zona subventricular. Diferentes técnicas de cultivo, permiten expandir CPNs *in vitro* (a la izquierda en el esquema). CPNs multipotentes provenientes de etapas tempranas del tubo neural, responden a Fgf2 y pueden expandirse *in vitro* en condiciones adherentes. CPNs embrionarias que responden a Fgf2 dan lugar, *in vitro*, a CPNs responsivas a Fgf2/Egf que forman neuroesfera. Las CPNs del adulto responden a Fgf2 y pueden expandirse en monocapas o en forma de neuroesferas. Las relaciones de linaje entre CPNs embrionarias y adultas y sus relaciones con sus derivados *in vitro* permanecen inciertas ("?" en el esquema). Finalmente, las CPNs pueden generarse completamente *in vitro* a partir de células pluripotentes, derivadas de la masa celular interna del blastocisto (células ES) (en la parte superior del esquema). Las células ES diferencian a CPNs *in vitro*, a través de la formación de cuerpos embrionarios o en monocapas de células disociadas (modificada de Baizabal *et al.*, 2003).

Existen otras zonas del cerebro adulto en donde existe neurogénesis; no obstante, éstas han sido difícil de identificar dada la lentitud en su tasa de regeneración o la especificidad del ambiente requerido para que ocurra. La *substancia nigra* es uno de éstos casos y recientemente se ha reportado la presencia de neuronas dopaminérgicas recién nacidas y su incremento ante el tratamiento con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un inhibidor del complejo mitocondrial 1 que afecta de manera selectiva a las neuronas DA (Zhao *et al.*, 2003). Este hallazgo reporta en donde, dada la baja frecuencia con la que ocurre en comparación con otras zonas, la neurogénesis en la *substancia nigra* no había podido ser identificada *in vivo*. Por otro lado, otro reporte corroboró el potencial neurogénico *in vitro* de estos precursores, que inicialmente se creía exclusivamente gliogénico, mostrando la importancia de los factores ambientales en la restricción del destino de los precursores neurales (Lie *et al.*, 2002).

CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS

Las células troncales embrionarias (ES) son líneas celulares pluripotentes que se derivan de la masa celular interna del blastocisto antes de su implantación (figura 6). En el desarrollo, las células de la masa celular interna darán lugar al embrión. *In vitro*, las ES murinas mantienen su estado indiferenciado dividiéndose en presencia de citocinas tales como el "leukaemia inhibitory factor" (LIF) o sobre una capa de células fibroblásticas alimentadoras mitóticamente inactivadas en presencia de suero. Si el

estímulo que mantiene indiferenciadas a las ES es removido, éstas rápidamente comienzan a diferenciar dando lugar a células que expresan marcadores de las tres capas germinales embrionarias.

Una de las características más relevantes de las células ES reside en su habilidad para reintegrarse al embrión en desarrollo y contribuir a todos los linajes celulares incluyendo a la línea germinal. Los ratones quiméricos (conformados por células derivadas de las ES y células hospederas) que se generan al introducir a las células ES al embrión en desarrollo, tienen descendencia viable y fértil que posee la contribución genética derivada de las células ES. Esto muestra la "normalidad" genética de estas células y su capacidad para derivar tipos celulares adultos funcionalmente maduros. Otras características relevantes de las células ES incluyen: un potencial de proliferación indefinido, un cariotipo diploide estable, clonalidad y la capacidad de diferenciar a múltiples tipos celulares *in vitro*. Otro rasgo de las células ES es que, al ser transplantadas ectópicamente, son capaces de generar tumores multidiferenciados o teratomas, lo que se considera una seria desventaja en su utilización terapéutica (revisado en Svendsen y Smith, 1999).

Las células ES humanas (hES) presentan características similares a las murinas; sin embargo, existen algunas diferencias importantes: Las células ES humanas no requieren de LIF para mantenerse en un estado indiferenciado y la señal que actúa en este caso todavía no ha sido identificada pero, tanto las células alimentadoras murinas como las humanas son capaces de mantener a las células hES indiferenciadas. Por otro lado, las células hES a diferencia de las murinas, requieren de Fgf2 para crecer en cultivo y su tasa de crecimiento es más lenta. Otra diferencia entre las células ES murinas y las hES es que, a partir de éstas últimas, es posible derivar tejido trofoectodérmico mientras que de las células ES murinas no lo es. Por último, las restricciones éticas implicadas en la utilización experimental de las células hES han hecho más difícil acceder a las hES por lo que la investigación en ellas se ha desarrollado más lentamente (revisado en Brivanlou *et al.*, 2003 y Draper y Fox, 2003). Resultará esencial conocer los requerimientos específicos de las células hES y su comportamiento en cultivo, para adaptar correctamente la información obtenida a partir de las células ES murinas.

La capacidad de derivar todos los tipos celulares presentes en el embrión en desarrollo a partir de las células ES ha hecho de éstas un buen modelo para introducir alteraciones genéticas específicas en animales y para estudiar la función de genes particulares durante el proceso de diferenciación *in vitro*. Un mecanismo común para inducir la diferenciación de las células ES consiste en formar agregados celulares en suspensión denominados cuerpos embrionarios (EBs). Dichas estructuras no presentan la organización morfológica propia del embrión; no obstante, sí inician un proceso de diferenciación similar para dar lugar a una cavidad proamniótica y a células que expresan marcadores de las tres capas germinales fetales. Cuando los EBs se adhieren a un substrato, la diferenciación continúa y se observa la expansión de células a partir del cuerpo embrionario. El espectro de células que se obtienen varía dependiendo de parámetros tales como la presencia de factores de crecimiento y de agentes inductores. Algunos de los tipos celulares que se obtienen incluyen cardiomiocitos, mioblastos esqueléticos, diversos tipos celulares del sistema hematopoyético, células endoteliales, adipocitos y células epidermales. La obtención tanto de neuronas como de células gliales también se ha observado y documentado y se revisará a continuación (revisado en Svendsen y Smith, 1999).

Diferenciación neural a partir de células ES.

La generación de células neurales a partir de ES se ha conseguido a través de diversos protocolos de diferenciación que parten, en su mayoría, de la formación de EBs. En los primeros trabajos, los EB's eran tratados con ácido retinóico en diferentes momentos y cultivados en gelatina, laminina o cajas para cultivo de tejidos. Después de un tiempo en este tratamiento, es posible observar células con un morfología y expresión de genes tanto neuronal como glial (revisado en Stavridis y Smith, 2003).

Otro de los protocolos utilizados en la actualidad a través del cual es posible obtener una población enriquecida en precursores neuroepiteliales (alrededor del 70%) es el desarrollado por el grupo de McKay en 1996. Este protocolo se desarrolla a partir de la adhesión de EBs en un medio sin suero, generando precursores que posteriormente tienen la capacidad de proliferar en presencia de Fgf2 y expresan al marcador de precursores neurales, nestina. Al remover el factor de crecimiento, esta población diferencia tanto a neuronas como a células gliales. Dichas células generan conexiones

sinápticas excitatorias e inhibitorias y expresan una amplia gama de genes neuronales. El patrón de expresión de éstos marcadores muestra que en el cultivo están presentes tipos celulares neuronales que pertenecen a diversas regiones dentro del sistema nervioso central (Okabe *et al.*, 1996).

Otro protocolo a partir del cual se derivan porcentajes similares de precursores del neuroectodermo a partir de células ES, consta de realizar un monocultivo adherente de estas células a densidades relativamente bajas ($0.5-1.5 \times 10^4$ cel/cm²), en un medio neural definido. La selección de dichos precursores se realizó identificando la expresión de un gen reportero bajo el promotor de *Sox1* y su amplificación se realizó cultivándolos en presencia de *Fgf2* (Ying *et al.*, 2003).

Varios estudios han establecido que el destino que adquieren por omisión o "default" las células del polo animal en *Xenopus laevis*, correspondientes a las células del epiblasto en mamíferos, es el neural. Como se ha mencionado anteriormente, la diferenciación neural se encuentra reprimida por la acción de *Bmp4* y proteínas que secuestran a los *Bmps* tales como "noggin" liberan a las células de dicha represión permitiendo su neuralización. Diversos grupos han reportado que la formación de precursores neurales a partir de células ES se desarrolla también por omisión a través de la inhibición de los *Bmps*, lo que explica la aparición de precursores neurales a partir de cultivos de células ES en ausencia de factores externos y de suero (Tropepe *et al.*, 2001). Recientemente, otro reporte ha mostrado que *Bmp4* en combinación con LIF son suficientes para mantener a las ES en estado indiferenciado sin necesidad de células alimentadoras o suero. Estos datos refuerzan la hipótesis de la adquisición del destino neural por omisión o "default" en las ES (Ying *et al.*, 2003).

Los estudios anteriores han llevado a distintos grupos a buscar la manera de obtener poblaciones neurales particulares. Esta es una meta que sigue vigente ya que, aun cuando se ha podido enriquecer a los cultivos con cierta población neuronal, éstos siguen siendo sumamente heterogéneos.

Una de las poblaciones neuronales que parece generarse de forma enriquecida (casi el 50% de las neuronas generadas) a partir de la aplicación de los protocolos de diferenciación en ES, sin necesidad de agregar agentes inductores adicionales, se refiere a neuronas positivas para el ácido gama-aminobutírico (GABA). Un reporte

mostró la aparición de marcadores específicos de neuronas GABAérgicas tales como los genes que codifican a la glutamato decarboxilasa *Gad1* y *Gad2* necesarios en la síntesis de GABA, así como el gen que codifica para el inhibidor vesicular del transportador requerido en el empaquetamiento vesicular de GABA, en neuronas generadas a partir de ES en ausencia de suero y LIF (Westmoreland *et al.*, 2001). De la misma forma, posteriormente se reportó la aparición de neuronas preferentemente GABAérgicas a partir de un monocultivo de células ES (Ying *et al.*, 2003).

El conocimiento de las señales que *in vivo* están participando en la especificación de destinos neurales ha permitido amplificar poblaciones de interés en los cultivos generados a partir de ES. Un ejemplo lo encontramos en el protocolo de diferenciación que utiliza a las señales que operan a lo largo de los ejes rostrocaudal y dorsoventral, involucrados en la generación de células progenitoras espinales y subsecuentemente neuronas motoras *in vivo* (Wichterle *et al.*, 2002).

El tratamiento utilizado en este protocolo consiste en caudalizar a un perfil espinal a las células neuralizadas provenientes de ES, que poseen un carácter inicial de cerebro medio, a través de su exposición al AR. Posteriormente dicha población se ventraliza añadiendo Shh, dando como resultado la generación de un 20 a 30% de neuronas motoras post-mitóticas que expresan HB9, una proteína con homeodominio que se encuentra selectiva y persistentemente en las motoneuronas somáticas (revisado en Wichterle *et al.*, 2002).

El comportamiento de estas neuronas al ser introducidas a la médula espinal *in vivo* coincide con el comportamiento endógeno de las motoneuronas, es decir, que después de su implantación las motoneuronas producidas *in vitro* se encuentran en posición ventrolateral, son capaces de poblar a distintos niveles del cordón espinal y proyectan sus axones a lo largo de las principales rutas periféricas seleccionadas por las neuronas motoras somáticas *in vivo*.

Generación de neuronas DA a partir de células ES.

La generación de neuronas dopaminérgicas a partir de células ES ha sido uno de los objetivos de mayor interés dado su potencial uso en el tratamiento de pacientes con mal de Parkinson en los cuales se manifiesta una pérdida de este tipo neuronal en la *substancia nigra* (revisado en Mansergh *et al.*, 2000).

El grupo de McKay en el 2000, demostró la obtención de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas a partir del tratamiento de los precursores neurales provenientes de las células ES, con Shh y Fgf8. La intersección de estas señales, como se mencionó anteriormente, promueve la adquisición de destinos de cerebro medio ventral en la placa neural, en particular el dopaminérgico. Aplicando este protocolo, los autores obtienen alrededor de un 20% de neuronas dopaminérgicas que expresan a la enzima limitante en la biosíntesis de la dopamina, la tirosina hidroxilasa (TH) (figura 7). Esta enzima es requerida en la síntesis de todas las catecolaminas (la dopamina, la adrenalina y la noradrenalina); sin embargo se requiere de la enzima dopamina -B-hidroxilasa (DBH), para la conversión de la dopamina en noradrenalina. Las células positivas para la TH obtenidas de este protocolo son negativas para la DBH, mostrando su clara identidad dopaminérgica. Por otro lado, el comportamiento electrofisiológico de las neuronas dopaminérgicas generadas corresponde al que se observa en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas *in vivo* (Lee *et al.*, 2000).

Más adelante, el mismo grupo analizó la capacidad de las neuronas dopaminérgicas generadas a partir de células ES para funcionar en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. El protocolo de diferenciación establecido se aplicó a una línea de células ES que expresa a *Nurr1* bajo el promotor de citomegalovirus (pCMV), un promotor constitutivo. *Nurr1*, como se mencionó anteriormente, es un receptor nuclear huérfano que se expresa en los precursores dopaminérgicos y, además de conferir distintas características bioquímicas del fenotipo dopaminérgico, activa transcripcionalmente al gene que codifica para la TH. La aplicación del protocolo de diferenciación a esta línea enriquece la obtención de neuronas dopaminérgicas hasta un 78% de las células neuronales. Posteriormente, dichas neuronas se transplantaron a roedores previamente lesionados con 6-hidroxidopamina (6-OH-DA), droga que mata a las neuronas dopaminérgicas que proyectan al estriado generando un modelo del mal de Parkinson. Los resultados de este estudio muestran la habilidad de las neuronas DA obtenidas para sobrevivir, integrarse y funcionar en los animales hospederos y responder a la estimulación por drogas de manera similar a las neuronas mesencefálicas, resaltando su gran potencial terapéutico (Kim *et al.*, 2002).

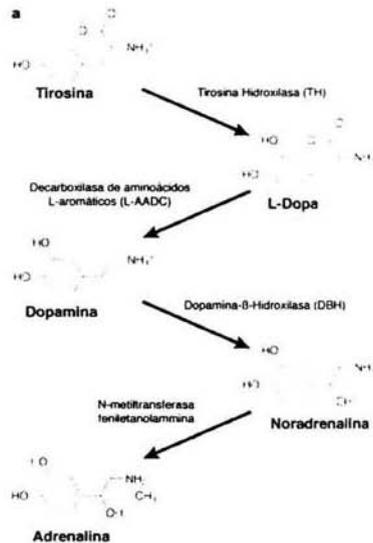


FIGURA 7. Vía enzimática en la síntesis de catecolaminas.

Otro protocolo a partir del cual se obtuvieron alrededor de un 20% de neuronas dopaminérgicas además de porcentajes menores de otros tipos neurales, es el desarrollado por el grupo de Sasai, *et al.* en el 2000. A diferencia de los protocolos anteriores, este sistema de diferenciación de células ES no requiere de la formación de cuerpos embrionarios ni de agregar señales tales como AR, Shh ó Fgf8. Las células ES son co-cultivadas en monocapas de células estromales derivadas de la médula ósea (células PA-6) y éstas producen señales solubles aún no determinadas que dirigen la diferenciación neural de las ES hacia un destino dopaminérgico. El tratamiento de estos cultivos con Bmp4 inhibe la neuralización inducida por la línea estromal PA-6; sin embargo, diversas evidencias sugieren que el antagonismo de estas señales no parece ser el único mecanismo a partir del cual dicha línea induce la diferenciación dopaminérgica (Kawasaki *et al.*, 2000).

Estos protocolos de diferenciación neuronal, proveen de una herramienta poderosa de estudio *in vitro* de los distintos procesos celulares que ocurren a lo largo del desarrollo del sistema nervioso.

LOS FACTORES Shh y Fgf8 EN PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA

Como se mencionó anteriormente, Shh y Fgf8 juegan un papel en la diferenciación dopaminérgica mesencefálica. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales actúan en este proceso no son claros. Existen diversas evidencias que muestran que estas moléculas promueven la proliferación y la sobrevivencia de distintas poblaciones de precursores neurales durante el desarrollo embrionario.

Por ejemplo, Shh promueve la proliferación y sobrevivencia de precursores de oligodendrocitos y de células tanto del tubo como de la cresta neural (revisado en Ho y Scott, 2002). También, Shh promueve la proliferación de células granulares provenientes del cerebelo y de la neocorteza y es relevante para la determinación del tamaño del cerebro (revisado en Ruiz i Altaba *et al.*, 2003). Por otro lado, se sabe que Shh promueve la proliferación tanto *in vivo* como *in vitro* de precursores neurales del hipocampo del cerebro adulto de la rata (Lai *et al.*, 2003).

Se sabe también que Shh juega un papel antiapoptótico durante la organogénesis temprana del sistema nervioso. Durante el desarrollo, existen zonas en el tubo neural en donde se lleva a cabo muerte celular programada. La prevención de la formación de la notocorda y la placa del piso del tubo neural por medio de la escisión de la bisagra axial-paraxial, promueve de manera abundante el aumento de esta muerte celular. Si después de la escisión se transplanta a la notocorda y a la placa del piso en la vecindad del tejido, la muerte se previene. De la misma forma, la administración de Shh evita esta muerte celular programada lo que muestra la capacidad de esta molécula de prevenir la muerte, contribuyendo en la morfogénesis del sistema nervioso (Charrier *et al.*, 2001). Por otro lado, Shh inhibe la apoptosis del neuroepitelio mediada por "patched" (Ptc), su receptor transmembranal (figura 8). Ptc es un supresor de tumores que pertenece a la familia de receptores de dependencia, es decir que en ausencia de ligando, induce muerte celular programada. Experimentos de sobre-expresión de Ptc en células 293HEK muestran la inducción de muerte celular programada en los cultivos y que ésta se previene al añadir Shh en forma dosis dependiente (Thibert *et al.*, 2003).

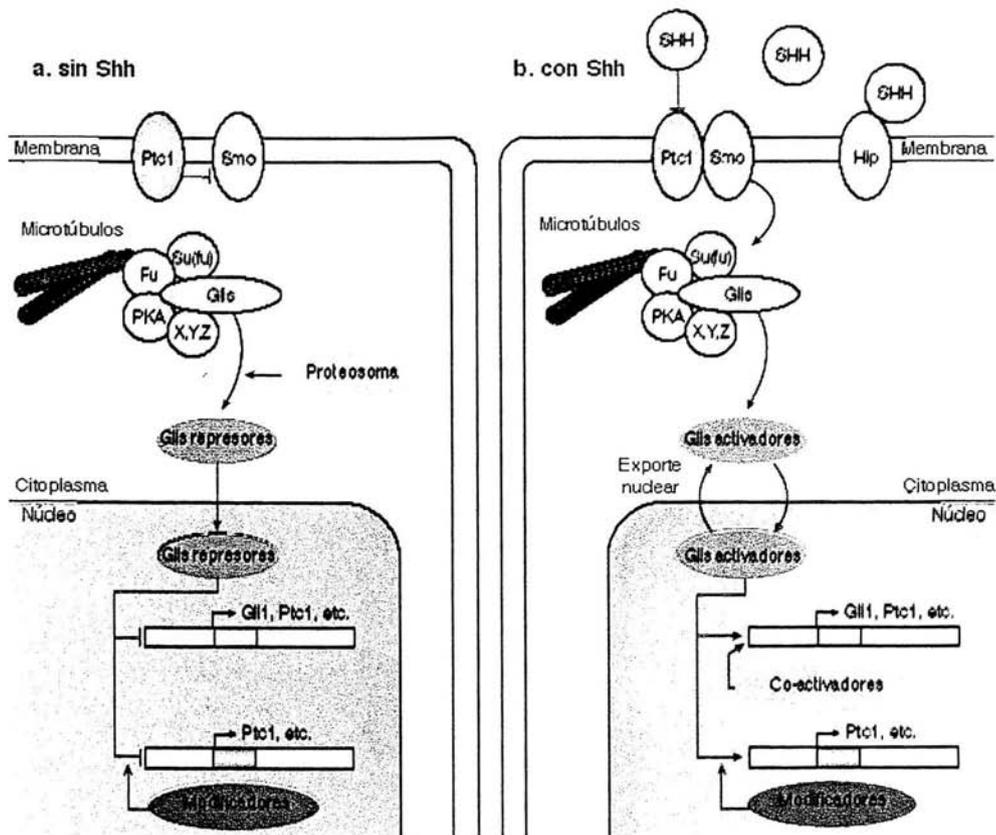


FIGURA 8. Señalización intracelular de Shh. (a) En ausencia de Shh, Patched 1 (Ptc1) inhibe a Smoothed (Smo) bloqueando la cascada de transducción río abajo e induciendo (en el neuroepitelio), la muerte celular programada (no se indica en el esquema). Las proteínas Gli se fosforilan por la protein cinasa A (PKA), dirigiendo su corte por el proteosoma, formando así represores transcripcionales de Gli3 que poseen los extremos carboxilos terminales truncados. Éstos se traslocan al núcleo e impiden la activación transcripcional de genes blanco de los Glis. (b) Cuando Shh se une al receptor Ptc-Smo, un complejo macromolecular que incluye a diversas proteínas, actúa produciendo activadores lábiles de Gli3. Éstos se traslocan al núcleo y transactivan genes (modificado de Ruiz i Altaba *et al.*, 2002).

De la misma forma que Shh, diversas evidencias muestran el papel de Fgf8 en relación a la proliferación y sobrevivencia celular durante el desarrollo en diferentes zonas del organismo como las extremidades y el sistema nervioso. En el cerebro, la acción de Fgf8 se ha estudiado en los sitios en donde se expresa de manera importante como el cerebro anterior y la frontera mes-met. Distintos experimentos en donde se inhibe la vía de señalización de los Fgfs o se cambian los niveles de expresión de Fgf8 muestran que éste es un regulador importante en la formación del cerebro anterior. Un

estudio reciente en el cual se eleva o disminuye artificialmente la expresión de Fgf8 en el telencéfalo sugiere que Fgf8 determina la sobrevivencia celular en forma negativa o positiva en esta región del cerebro, dependiendo de su concentración. Esta regulación está mediada a través de la producción dependiente de la dosis de Fgf8 de moléculas inhibitoras de su propia señalización (Storm *et al.*, 2003).

Con respecto a la frontera mes-met, se sabe que Fgf8 promueve la proliferación de las células de esta región. Por otro lado, un estudio reciente en el cual se inactiva condicionalmente la expresión de Fgf8 en esta zona, muestra un incremento en la muerte celular programada lo que sugiere que Fgf8, además de mantener la actividad del IsO como se revisó anteriormente, juega un papel en la sobrevivencia de las células que lo conforman (Chi *et al.*, 2003). Por último, Fgf8 pertenece la familia de los Fgfs y comparte su vía de señalización (figura 9). Se sabe que los Fgfs tienen una función mitogénica sobre diferentes poblaciones de precursores, lo cual concuerda con el papel de Fgf8 como inductor de la proliferación celular en diferentes escenarios durante desarrollo.

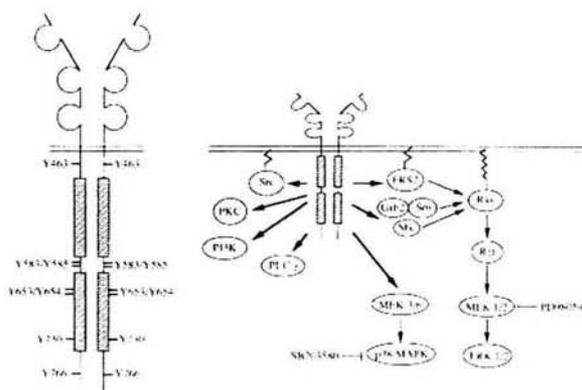


FIGURA 9. Vía de señalización de los Fgfs. La unión de los Fgfs a su receptor membranal induce su dimerización y la activación de tirosina cinasas que autofosforilan sus dominios citoplásmicos. Esto induce la activación de una cascada de señales diversas en donde están incluidas las moléculas Ras y Mek que conlleva a distintos eventos celulares como, por ejemplo, la proliferación. A la izquierda: La dimerización de los receptores (Fgfr) con sitios de fosforilación en tirosinas. A la derecha: Moléculas transductoras de la señalización por Fgfs. PD98059 y SB203580 son inhibidores específicos de Mek 1/2 y p38 MAP cinasa respectivamente (modificada de Boilly B *et al.*, 2000).

Las evidencias anteriores con respecto a la acción de Shh y Fgf8, hace interesante intentar discernir el efecto que presentan a nivel celular durante la diferenciación dopaminérgica.

JUSTIFICACIÓN

La eficiencia a través de la cual diferentes señales convierten a las ES en neuronas de un tipo en particular, hacen de estas células una opción interesante para ser utilizadas como modelo para promover y analizar el proceso de adquisición de destinos celulares dentro del sistema nervioso.

En particular, el estudio del proceso de diferenciación dopaminérgica a partir de células ES, resulta de gran interés por varias razones. Por un lado, se conocen varias de las señales (i.e. Shh y Fgf8) que tanto *in vivo* como en los cultivos de células ES (en el protocolo desarrollado por Lee *et al.*, 2000), tienen un papel en conferir dicho destino a los precursores mesencefálicos. Sin embargo, no se conocen los mecanismos a través de los cuales esto ocurre y si las señales actúan de manera selectiva o inductiva a nivel del precursor neural. Dado el bajo porcentaje que representan las neuronas dopaminérgicas en el tejido mesencefálico y la ineficiente diferenciación *in vitro* de los precursores neurales obtenidos del feto resulta muy atractivo aprovechar al sistema de cultivo de células ES para abordar preguntas relacionadas con este proceso. Como se ha discutido anteriormente, la identificación del precursor dopaminérgico en proliferación resulta complicada, dada la poca especificidad de los marcadores encontrados en esta población. Utilizando el sistema de diferenciación *in vitro* a partir de células ES se pueden realizar ensayos clonales que muestren el efecto de los factores (Shh y Fgf8) en la especificación dopaminérgica.

Además de la importancia que representa tener un sistema de fácil manejo en cultivo en donde poder estudiar fenómenos relacionados con el desarrollo del sistema nervioso, la diferenciación de las células ES genera precursores que pueden ser de gran utilidad en el diseño de terapias de trasplantes en enfermedades neurodegenerativas como el mal de Parkinson. Conocer y manipular las diferentes señales que definen el destino dopaminérgico a partir de ES posibilita la optimización de los protocolos de diferenciación y la definición de las características particulares de la población requerida para uso terapéutico. Es decir, es probable que en el adulto ya no existan todas las señales necesarias para inducir la diferenciación de cierto tipo de precursor neural; sin embargo, si conocemos dichos requerimientos, podemos definir el perfil de precursor que requerimos y generarla *in vitro* para su posterior trasplante. Por

otro lado, el conocimiento que se desprende de este tipo de estudios puede ser valioso para explorar la utilidad de diferentes factores en promover la regeneración a partir de los precursores neurales presentes en el cerebro adulto.

HIPÓTESIS

Shh y Fgf8 promueven la diferenciación dopaminérgica a través de modular la sobrevivencia o proliferación de células precursoras neurales específicas derivadas de células ES.

OBJETIVOS

- 1) Reproducir uno de los protocolos de diferenciación de neuronas dopaminérgicas a partir de líneas de células ES de ratón (Lee *et al.*, 2000).
- 2) Determinar el efecto de Shh y Fgf8 en la proliferación o sobrevivencia de los precursores neurales derivados de las células ES.
- 3) Determinar el número de precursores con potencial dopaminérgico en presencia o ausencia de Shh y Fgf8.
- 4) Una vez cumplido el objetivo 1, hacer más eficiente la obtención de neuronas DA a partir de células ES.

MÉTODOS.

1) PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS A PARTIR DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS.

Líneas de células utilizadas:

- Línea de fibroblastos de ratón STO
- Línea de células ES de ratón Ab2.2
- Línea de células ES de ratón Ab2.2 C2 (CMV-actina-catalasa citosólica)
- Línea de células ES de ratón R1
- Línea de células ES de ratón R1B5 (CMV-actina-GFP)

Medios y Soluciones:

1) Dulbecco Modified Eagle Medium. **DMEM (Gibco 12100-046)**

Para 1l:

1. Disolver el medio en polvo en aproximadamente 800 ml de H₂O grado cultivo en un vaso de precipitado de 1l mediante agitación suave.
2. Enjuagar el paquete que contenía al medio para limpiar las trazas de medio adheridas al sobre.
3. Añadir 3.7 g de NaHCO₃
4. Agitar hasta disolver (no mezclar en exceso).
5. Ya en campana, ajustar el pH a 6.9, entre 0.2 y 0.3 unidades de pH por debajo del requerido durante las condiciones de trabajo ya que usualmente incrementan entre 0.1 y 0.3 con la filtración; se recomienda utilizar HCl 1N en agua de cultivo (adicionar lentamente agitando el medio, 120 gotas aprox.)
6. Ajustar a 1l en un matraz volumétrico. Sellar con parafilm y mezclar por inversión.
7. Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µM.
8. Guardar a 4°C y utilizar en un periodo de máximo 2 meses.

2) Suero Bovino Fetal. **SBF (Gibco 16000-044)**

1. Inactivar el suero calentándolo a 56°C por 30 min.

2. Alicuotar y almacenar a -20°C . Para usarse descongelar alícuota y mantener a 4°C hasta por 1 mes.

3) β -Mercaptoetanol. β -MeOH (Gibco 21985-023)

Para 100 ml de solución 100X (10 mM):

1. Llevar 72 μl de β -MeOH 14 M a 100 ml con PBS, mezclar bien y filtrar a través de una membrana de 0.22 μm .
2. Almacenar a 4°C hasta por 2 meses.

4) Glutamina- Penicilina - Estreptomina (GPS). Gluta-Max (Gibco 35050-061)

Para una solución 100X:

1. Descongelar un frasco de 100 ml de Gluta-Max (200 mM) almacenado a -20°C .
2. Transferir 10 ml de solución a un tubo falcon de 15 ml; agregar la penicilina (300 mg) y la estreptomina (500 mg) y mezclar hasta que se disuelva.
3. Esterilizar la solución de GPS por filtración con membrana de 0.22 μm y agregarla al restante del contenido del Gluta-Max. Mezclar homogéneamente.
4. Alicuotar en tubos de 15 ml y guardar a -20°C . Descongelar para utilizar y mantener a 4°C hasta por 1 mes.

5) Piruvato de Sodio 100X (Gibco 11360-070)

6) Aminácidos no esenciales 100X (Gibco 11140-050)

7) PBS

Para 1l de solución 1X:

1. Agregar 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 0.2 g de KH_2PO_4 y 0.815 g de Na_2HPO_4 anhidro a 1l de agua grado cultivo. Disolver agitando suavemente y esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 μm .
2. Almacenar a temperatura ambiente hasta por 2 meses.

8) Gelatina (1%)

Para 300 ml:

1. Agregar 3 g de gelatina en polvo en 300 ml de H_2O grado cultivo.
2. Calentar en micro ondas hasta que se disuelva cuidando que no se derrame.
3. Esterilizar en autoclave.
4. Almacenar a temperatura ambiente hasta por 2 meses.
5. Llevar a una solución al 0.1% en H_2O grado cultivo para utilizarse.

9) **Tripsina (0.25% ó 0.05%) (Gibco 15090-046)**

1. Hacer un stock de alícuotas de tripsina al 2.5% en agua grado cultivo y almacenar a -20°C.
2. Descongelar la alícuota a 4°C y diluir en **Verseno (Gibco15040-066)** llevándola a 0.25% o 0.05%. Almacenar a 4°C hasta por 1 mes.

10) **Mitomicina (C. Roche 107409).**

Para preparar un stock 50X:

1. UTILIZAR GUANTES Y CUBREBOCAS PORQUE ES MUY TÓXICA.
2. Tomar 0.5 ml de PBS 1 X con jeringa de 1 ml y clavarlo en la tapa de plástico del frasco de mitomicina (2 mg) para despresurizar e inyectar el PBS para empezar a disolver.
3. Verificar que se esté disolviendo antes de sacar la tapa.
4. Destapar con cuidado y tomar el contenido con la jeringa tratando de tomar todo sin que queden trazas en las paredes del frasco.
5. Agregarlo al resto del PBS (3.5 ml) en un tubo falcon de 15 ml.
6. Almacenar a 4°C en oscuridad (cubrir el tubo con aluminio) hasta por 1 mes. La solución debe verse azul-violeta.

11) **Medio M15.**

Para 500 ml:

1. Añadir 75 ml SBF (final 15%)
2. 5 ml de β -Me 100X (final 1X)
3. 5 ml de GPS 100X (final 1X)
4. 5 ml de aminoácidos no esenciales 100X (final 1X)
5. 5 ml de piruvato de sodio 100X (final 1X)
6. Llevar a 500 ml con DMEM
7. Almacenar a 4°C hasta por 2 semanas. Equilibrar en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂ por 20 min antes de usarse.

12) **Medio para cultivo de células STO.**

Para 500 ml:

1. Añadir 35 ml de SBF (final 7%)
2. 5 ml de GPS 100X (final 1X)

3. Llevar a 500 ml con DMEM
4. Almacenar a 4°C hasta por 2 semanas. Equilibrar en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂ por 20 min antes de usarse.

13) Medio de Congelación 2X

Para 25 ml:

1. 15 ml de DMEM (final 60%)
2. 5 ml de DMSO grado cultivo (**SIGMA D2650**) (final 20%)
3. 5 ml de SBF (final 20%)

14) Medio ITSFn

- Insulina (5 µg/ml). (**Gibco 13007-018**)
 - Transferrina (50 µg/ml). (**Gibco 13008-016**)
 - Selenito de sodio (30 nM)
 - Fibronectina (5 µg/ml). (**Gibco 33016-015**)
 - GPS 1X
1. Agregar los ingredientes anteriores a medio DMEM/F12 sin HEPES (**Gibco 12500-039**) (preparar igual que el medio DMEM pero agregando 2.438 g de NaHCO₃).
 2. Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.
 3. Almacenar a 4°C hasta por 1 semana. Equilibrar en incubadora a 37°C y 5% de CO₂ por 20 min antes de usarse.

15) Medio de Expansión de precursores neurales.

Agregar:

- Suplemento N2 1X (**Gibco 17502-048**)
 - GPS 1X.
 - Laminina (1µg/ml) (**Gibco 680-3017IV**)
1. Añadir lo anterior a DMEM/F12 sin HEPES. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 µm.
 2. Almacenar a 4°C hasta por 1 semana en la oscuridad (tapado con aluminio).
 3. Para utilizarse agregar: Fgf2 (10 ng/ml) (**Gibco 13256-029**), Fgf8 (100 ng/ml) (**Peptotech 100-25**) y Shh (500 ng/ml) (**Peptotech 100-45, R and D Systems 461-SH**).

4. Equilibrar a 37° C y 5% de CO₂ por 20 min antes de usarse.
5. Las alícuotas de los factores Fgf2, Fgf8 y Shh deben prepararse en medio DMEM/F12 sin HEPES y albúmina 1mg/ml en un volumen tal que no se agregue más del 10% del volumen final al utilizarlas.
6. Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm y almacenar a 4°C hasta por 1 semana.

16) Medio de diferenciación:

- Suplemento N2 1X (**Gibco 17502-048**)

- GPS 1X.

- Ácido ascórbico (100 µM) (**Sigma A-4544**)

- Laminina (1µg/ml)

1. Añadir lo anterior a DMEM/F12 sin HEPES. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 µm.
2. Almacenar a 4°C hasta por 1 semana. Equilibrar antes de usarse en incubadora a 37 °C y 5% de CO₂.

DESARROLLO DEL PROTOCOLO:

ETAPA 1: Expansión de células ES indiferenciadas.

1) Congelación y descongelación de células.

Descongelación:

1. Sacar el vial de congelación de las células requeridas del tanque de nitrógeno líquido y transferirlo inmediatamente a un baño de agua de cultivo a 37°C.
2. Esperar a que el vial se descongele (de 1 a 2 minutos) y transferir la suspensión celular a un tubo estéril de 15 ml. Agregar 5 ml del medio que corresponda muy lentamente por la pared del tubo. Mezclar por inversión.
3. Centrifugar las células a 220 x g por 5 min.

Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en el medio apropiado y a la densidad requerida (al menos 500,000 células STO en un plato de 6 cm de diámetro previamente gelatinizado ó al menos 1X10⁶ células ES en un plato de feeders de 6 cm de diámetro).

Congelación:

1. Tripsinizar a las células en forma habitual.
2. Tomar una alícuota y contar en la cámara de Neubauer.
3. Centrifugar a 220 x g por 5 min.
4. Etiquetar con el nombre de la línea, número de pase, cantidad de células y fecha.
5. Resuspender en la mitad del volumen requerido para obtener una densidad de 5-10 X10⁶ células /ml.
6. Agregar gradualmente (muy lentamente por la pared o por goteo) un volumen de medio para congelar 2X agitando constantemente el tubo.
7. Alicuotar rápidamente en viales de congelación. Agregar 0.5 ml de la suspensión celular por vial.
8. Transferir los viales de congelación a -70°C por 24 h y posteriormente almacenar en el tanque de nitrógeno líquido.

2) Cultivo de células STO.

Las células ES crecen sobre una capa de células alimentadoras o "feeders" que son células STO mitóticamente inactivadas. A continuación se explica el mantenimiento de estas células y la preparación de la capa de células alimentadoras.

Para subcultivar las células:

1. Aspirar el medio sin raspar las células.
2. Lavar 2 veces con PBS.
3. Agregar 0.5 ml de tripsina 0.25% a una caja de 6 cm de diámetro. Repartir la tripsina por toda la superficie moviendo la caja.
4. Cuando las células comiencen a desprenderse (se observa como se levanta una capita opaca) agregar al menos un volumen de medio STO para inactivar la tripsina y dispersar las células pipeteando suavemente.
5. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml.
6. Centrifugar a 220 x g por 5 min.
7. Aspirar el sobrenadante cuidando de no llevarse la pastilla de células al final del tubo.

8. Resuspender en una cantidad de medio STO fresco tal que las células queden a una concentración de aproximadamente 1×10^6 células/ml (5 ml de medio). Tomar una alícuota y contar en la **cámara de Neubauer** de la siguiente forma:
 - a. Limpiar la cámara y el cubreobjetos con un papel con etanol al 70% con cuidado de no rayar la región en donde se ubica la cuadrícula.
 - b. Colocar la cámara en el microscopio y el cubreobjetos sobre de ella de manera que este cubra homogéneamente la superficie semiplataada.
 - c. Tomar una alícuota de 10 μ l de una suspensión celular homogénea a una concentración de 1×10^6 células/ml y agregarla a otros 10 μ l de **azul de tripano (GIBCO 15250-061)** en un tubo ependorf.
 - d. Tomar las células con una pipeta de 20 μ l subiendo y bajando la suspensión un par de veces.
 - e. Colocar los 10 μ l de mezcla de células y azul de tripano inmediatamente en el receptáculo de la cámara permitiendo que la suspensión se deslice hacia el interior de la cámara por capilaridad.
 - f. Seleccionar el objetivo de 10X y contar las células en la cuadrícula central que se encuentra delimitada por tres líneas.
 - g. Las células deben ser más de 100 para que el conteo sea preciso. Si son menos de 100 es necesario contar las cuadrículas alrededor de la central para realizar un promedio.
 - h. El número de células en la cuadrícula central (de 1 mm^2) corresponde a el número de células en 0.1 μ l de la suspensión celular por lo tanto, al multiplicar el número de células en la cuadrícula por 20,000 (tenemos 10 μ l de suspensión celular y 10 μ l de azul tripano), obtendremos el número de células por ml de la suspensión celular inicial. Para obtener el número total de células en la suspensión, debemos multiplicar el valor obtenido por el número de ml que conforman la suspensión celular de interés.
 9. Sembrar alrededor de 400,000 células en una caja de 10 cm de diámetro.
- Para preparar la monocapa de células alimentadoras o "feeders":
1. Cubrir las cajas de cultivo (de 6 o 10 cm de diámetro) con gelatina 0.1%.
 2. Esparcir bien la gelatina por toda la superficie de la caja.

3. Incubar a temperatura ambiente al menos por 2 horas.
4. Aspirar la gelatina antes de sembrar las células.
5. Crecer las células STO a subconfluencia en cajas de 10 cm de diámetro con 10 ml de medio.
6. UTILIZAR GUANTES Y CUBREBOCAS: Agregar 1/50 de volumen (200 μ l) de mitomicina a 0.5 mg/ml para inactivarlas mitóticamente. Incubar 2 horas con la droga a 37°C.
7. Aspirar el medio y lavar 2 veces con PBS para eliminar la mitomicina.
8. Tripsinizar y contar las células en la cámara de Neubauer.
9. Resuspender las células en el volumen de medio STO adecuado para obtener una suspensión de 2.5×10^5 células/ml y sembrar las células en la siguiente proporción:
 - 12 ml para caja de 10 cm de diámetro
 - 4 ml para caja de 6 cm de diámetro
 - 2 ml para caja de 3 cm de diámetro
 - 0.5 ml para cada de 0.63 cm de diámetro (24 pozos)
10. Incubar toda la noche para que las células se adhieran antes de usarse.
11. Cambiar el medio para eliminar las células muertas.
12. Pueden mantenerse hasta por 1 semana en la incubadora pero deben inspeccionarse bajo el microscopio para verificar que la monocapa esté intacta antes de usarse.

3) Cultivo de células ES.

Para subcultivar las células:

1. Cambiar el medio de 2 a 3 h antes de subcultivar las células.
2. Aspirar el medio y lavar 2 veces con PBS.
3. Añadir 0.5 ml de tripsina al 0.25% a caja de 6 cm de diámetro y repartir por toda la caja moviéndola suavemente. Incubar a 37°C por 10 min.
4. Agregar al menos un volumen de medio M15 para inactivar la tripsina y dispersar las células pipeteando.
5. Transferir a un tubo estéril de 15 ml y centrifugar a $220 \times g$ por 5 min.

6. Resuspender las células en aproximadamente 1×10^6 células/ml. Tomar una alícuota y contar en el cámara de Neubauer. (Ir a conteo de células en la cámara de Neubauer).
7. Sembrar aproximadamente 1×10^6 células en una caja de feeders de 6 cm de diámetro en 4 ml de medio M15.
8. Cambiar el medio diariamente sin dejar que se acidifique (se torna color amarillo) hasta que el cultivo llegue a semiconfluencia.

ETAPA 2: Formación de los cuerpos embrionarios (EBs).

1. Subcultivar las células ES a una densidad de 3×10^6 células en una caja de 10 cm de diámetro previamente gelatinizado sin "feeders".
2. Agregar medio M15 suplementado con 1000 U de LIF (**Peptotech 300-05**).
3. Cultivar las células por 3-4 días cambiando el medio diariamente.
4. Aspirar el medio y lavar dos veces con PBS.
5. Agregar 1ml de tripsina al 0.25% e incubar a 37°C por 10 min.
6. Inactivar la tripsina con al menos un volumen de medio M15 y transferir a un tubo de 15 ml.
7. Centrifugar a $220 \times g$ por 5 min. Resuspender las células en 5 ml de medio M15.
8. Tomar una alícuota y contar en la cámara de Neubauer. Se esperan aproximadamente 15×10^6 células por plato de 10 cm de diámetro.
9. Sembrar 2×10^6 por plato bacteriológico de 10 cm de diámetro en 10 ml de medio M15.
10. Cultivar las células por 4 días a 37°C , 5% de CO_2 . Cambiar el medio en el día 2 de la siguiente manera:
 - a. Transferir los EBs a un tubo de 15 ml con una pipeta de 25 ml para que no se dañen los EBs.
 - b. Dejar que se asienten en el fondo del tubo (aproximadamente 5 min).
 - c. Aspirar el medio y resuspender en 10 ml de medio M15 fresco.
11. Transferir gentilmente los EBs con pipeta de 25 ml a la caja de 10 cm de diámetro original.
12. En el día 4 pasar a la etapa 3.

ETAPA 3: Selección de células positivas para nestina.

1. A los 4 días de la etapa anterior, transferir los EBs a un tubo de 15 ml con una pipeta de 25 ml.
2. Permitir que se asienten al fondo del tubo (aproximadamente 5 min).
3. Aspirar el medio y añadir 10 ml de medio M15 fresco.
4. Transferir los EBs a una caja de 10 cm de diámetro previamente gelatinizada. Incubar por 24 h a 37°C y 5% de CO₂ (Este tiempo es suficiente para que los EBs se adhieran al plato de cultivo).
5. Cambiar el medio M15 por 10 ml de medio ITSFn.
6. Cultivar los EBs por 7 días cambiando el medio ITSFn cada 2 días y al séptimo día pasar a la etapa 4.

ETAPA 4: Expansión de células positivas para nestina.

Preparación de las cajas para expansión:

1. Cubrir los pozos (caja de 24 pozos (2 cm²/pozo) Corning 3524, Nunc 177437) con 0.5 ml de Poly-D-Lysina (10 µg/ml en H₂O grado cultivo estéril por filtración a través de membrana de 0.22 µm) (Sigma P7886) Incubar toda la noche a 37°C.
2. Lavar 3 veces con PBS.
3. Incubar con 0.5 ml de PBS toda la noche a 37°C.
4. Lavar 1 vez con PBS.
5. Cubrir los pozos con 0.5 ml de fibronectina (1µg/ml en H₂O grado cultivo estéril por filtración a través de membrana de 0.22 µm). Incubar a 37°C al menos por 3 h.
6. Lavar 1 vez con PBS antes de usarse. (Las cajas pueden mantenerse a 4°C en PBS hasta por 1 semana).

Expansión de precursores neurales frescos provenientes de la etapa 3:

1. Aspirar el medio ITSFn.
2. Lavar 2 veces con PBS
3. Agregar 1ml de tripsina al 0.05%
4. Incubar por 5-7 min a 37°C.

5. Inactivar la tripsina con al menos 1 volumen de medio con inhibidor de tripsina (**Gibco 17075-029**) (1mg/ml en medio ITSFn) ó medio M15. Transferir a un tubo y esperar 5 min para permitir que los cuerpos embrionarios se asienten en el fondo del tubo y tomar la suspensión celular restante.
6. Centrifugar a 220 x g por 5 min.
7. Aspirar el medio y resuspender en medio de expansión sin factores para contar en cámara de Neubauer.
8. Centrifugar nuevamente y resuspender en medio de expansión (con Fgf2, Fgf8 y Shh ó sólo Fgf2 según sea el experimento) para obtener una densidad de 1.5-2 X10⁵ células/cm² (300-400,000 células en un pozo de caja de 24). Sembrar en las cajas de 24 pozos pre-tratadas. Incubar a 37°C y 5% de CO₂.
9. Cambiar el medio de expansión al tercer día y diariamente hasta el sexto día.

De precursores congelados:

1. Sacar el vial de congelación del nitrógeno líquido y transferirlo rápidamente en el baño de agua de cultivo a 37°C hasta que se descongele (de 1 a 2 min).
2. Pasar las células del vial a un tubo falcon de 15 ml con la micropipeta de 1 ml.
3. Agregar 3 ml de medio de expansión muy despacio por la orilla del tubo y mezclar suavemente por inversión.
4. Centrifugar a 220 x g por 5 min.
5. Aspirar el medio y resuspender la pastilla de células en medio fresco de expansión sin Shh y Fgf8.
6. Cambiar el medio a las 24 h por medio fresco de expansión con Fgf2 (10 ng/ml), Fgf8 (100 ng/ml) y Shh (500 ng/ml) o con sólo Fgf2 (10 ng/ml) según sea el experimento. Incubar a 37°C y 5% CO₂.
7. Cambiar el medio de expansión con factores al tercer día y diariamente hasta el sexto día.

ETAPA 5: Diferenciación de neuronas dopaminérgicas.

1. Cambiar el medio de expansión por medio de diferenciación e incubar las células a 37° C y 5% de CO₂ por otros 6 días.
2. Cambiar el medio de diferenciación cada dos días.

2) INMUNOCITOQUÍMICA y TUNEL

Inmunocitoquímica

Soluciones

1) Paraformaldehído (PFA) (Sigma P6148-500G) al 4%.

Preparar fresco ó almacenar alícuotas a -70°C.

Para 10 ml:

1. USAR GUANTES Y CUBREBOCAS. Tomar 4 ml de H₂O bidestilada.
2. Agregar 0.4 g de PFA.
3. Calentar entre 60-70°C en campana (no sobrecalentar).
4. Agregar 10 µl de NaOH 10 N y dejar enfriar dentro de la campana.
5. Agregar 5 ml de PBS 2X
6. Ajustar el pH a 7.2 con HCl.
7. Aforar a 10 ml con H₂O bidestilada.
8. Filtrar con membrana de 0.22 µm.

2) Tritón X-100

3) PBS 1X

4) Suero de Oveja (SS)

5) Anticuerpos primarios:

Dilución de uso:

Anticuerpo monoclonal anti-nestina (Chemicon, Temecula CA)	1:100
Anticuerpo monoclonal anti-tubulina-βIII (Chemicon, Temecula, CA)	1: 100
Anticuerpo policlonal anti-tubulina-βIII (Covance, Berkeley,CA)	1:2000
Anticuerpo policlonal anti-TH (Chemicon, Temecula, CA)	1:500
Anticuerpo monoclonal anti-NeuN (Chemicon, Temecula CA)	1:100

6) Anticuerpos secundarios:

- Alexa Fluor 594 α-ratón IgG hecho en cabra (Molecular Probes, Eugene, OR)
- Alexa Fluor 594 α-conejo IgG hecho en cabra (Molecular Probes, Eugene, OR)
- Alexa Fluor 488 α-conejo IgG hecho en cabra (Molecular Probes, Eugene, OR)

TODOS SE USAN EN UNA DILUCIÓN DE 1:1000.

7) **Solución de Montaje:** 50% de glicerol en 0.1M de buffer de carbonato de Sodio pH 9.0. Agregar 0.4 mg/ml de p-fenilendiamina (**Sigma, St Louis, MO**) para evitar el desvanecimiento de la fluorescencia.

8) **DAPI (Molecular Probes)**

Procedimiento

1. Fijar las células en PFA4% por 10 min.
2. Lavar 3 veces con PBS.
3. Bloquear por 30 min en PBS/ 10% de SS/ 0.1% de Tritón X-100.
4. Incubar el anticuerpo primario por 1 h a temperatura ambiente (Se realiza la dilución que corresponda en solución de bloqueo).
5. Lavar 3 veces con PBS.
6. Incubar el anticuerpo secundario por 30 min a temperatura ambiente (se diluye la concentración correspondiente en PBS/ 10% SS/ 1% Tritón X-100).
7. Lavar 3 veces con PBS.
8. Teñir con DAPI por 2 min.
9. Lavar 1 vez con PBS y agregar unas gotas de solución de montaje.

TUNEL (**Boehringer Mannheim GmbH 1772457**)

1. Fijar las células con PFA 4% por 10 minutos.
2. Lavar 3 veces con PBS.
3. Incubar con la solución de permeabilización previamente enfriada (0.1% de Tritón X-100 en 0.1% de citrato de sodio en PBS) por 10 min en hielo.
4. Lavar 2 veces con PBS.
5. Agregar 25 µl de solución de reacción TUNEL (1:10 transferasa:nucleótidos marcados) por pozo de 2 cm². Cubrir con un pedazo de parafilm cada pozo para distribuir homogéneamente la solución en toda la muestra.
6. Incubar en cámara húmeda por 1h y media a 37°C.
7. Lavar 3 veces con PBS.
8. Teñir con DAPI por 2 min.
9. Lavar 1 vez con PBS.
10. Montar.

La señal de TUNEL se detecta en verde.

3) ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Para evaluar los porcentajes de células positivas para nestina (precursores neurales), tubulina- β III (neuronas maduras), TH (neuronas dopaminérgicas) y TUNEL (células apoptóticas) en cada punto del protocolo, se realizaron al menos tres conteos de cultivos independientes por duplicado y se contaron 5 campos por pozo (alrededor de 400 células) por experimento. Los conteos se realizaron sobre imágenes adquiridas con un microscopio invertido (**Nikon Eclipse TE300**) y una cámara fotográfica (**CoolSNAP RS Photometrics**).

El número de células totales en las distintas fases del protocolo se obtuvo a través del conteo de células viables (con azul de tripano) en la cámara de Neubauer. Se realizaron al menos tres conteos de cultivos independientes por duplicado.

El número de agregados celulares al final del protocolo de diferenciación se obtuvo considerando como agregado celular a aquellos de al menos 1 cm en una imagen en un aumento de 4X. Se realizaron tres conteos de cultivos independientes por duplicado.

El número de clonas GFP+ se obtuvo a partir de realizar una dilución de células ES de la línea R1B5 (GFP+) en células de la línea R1 (GFP-) al inicio de la expansión de manera tal que se observara una sola célula verde en más del 90% de los campos de 20X. Se realizaron tres conteos de cultivos independientes por duplicado.

Se calculó la desviación estándar en cada caso considerando a la n como el número de cultivos independientes realizados. Para analizar si existen diferencias significativas en el número de células totales, número de agregados, número de clonas, número de células por clona y número de células TUNEL+ entre una muestra (con Shh, Fgf2 y Fgf8) y otra (sólo Fgf2), se realizó una prueba de t con un $\alpha = 0.05$ a través de la cual se evalúa si existen diferencias entre las medias muestrales.

RESULTADOS

ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS A PARTIR DE CÉLULAS ES.

El primer objetivo de este trabajo fue reproducir en el laboratorio el sistema de diferenciación dopaminérgica desarrollado por el Lee *et al.* a partir de células ES (Lee *et al.*, 2000). El protocolo consta de 5 etapas (figura 10).

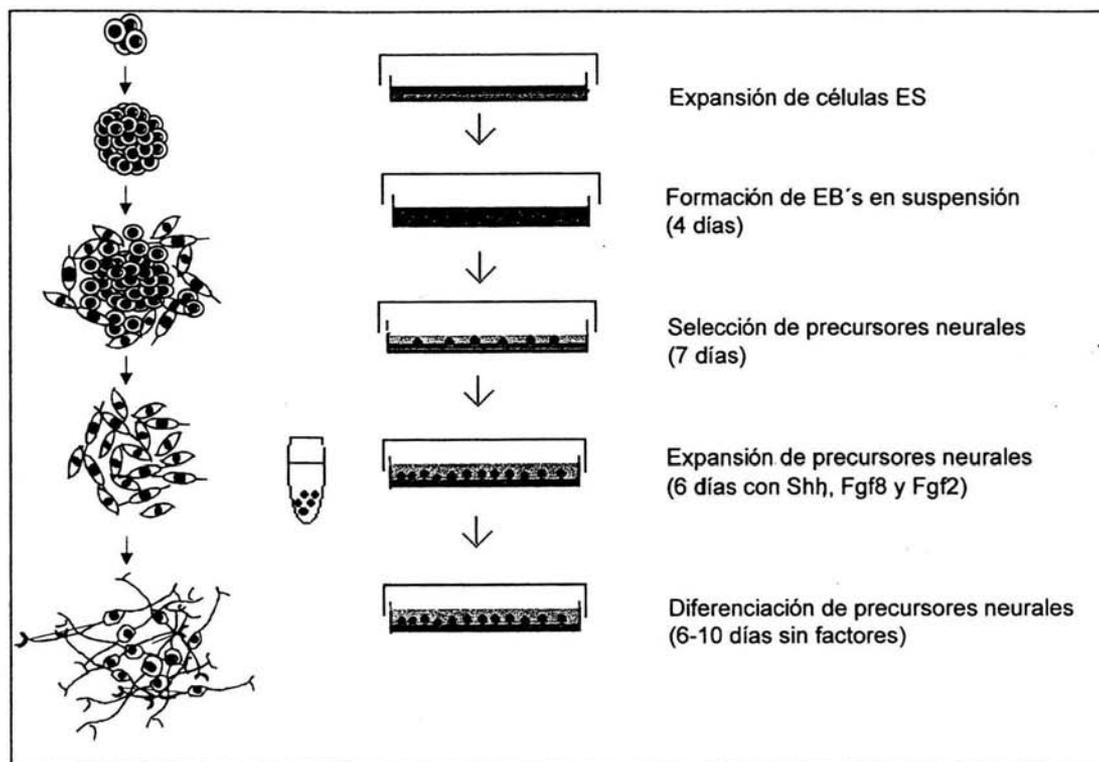


FIGURA 10. Esquema del protocolo de diferenciación dopaminérgica a partir de células ES. Etapa 1: Las células ES se expanden sobre una capa de células alimentadoras mitóticamente inactivas. Etapa 2: Se induce la formación de cuerpos embrionarios en suspensión. Etapa 3: Se seleccionan los precursores neurales adhiriendo los EB's en medio definido (ITSFn). Etapa 4: Se parte de una densidad de $1.5 - 2 \times 10^5$ cel/cm² de células de la selección y se expanden los precursores neurales en presencia de Fgf2, Shh y Fgf8. Etapa 5: Se induce la diferenciación de los precursores neurales removiendo los factores del medio.

La primera consiste en expandir a las células ES indiferenciadas sobre una capa de células alimentadoras o "feeders". En la segunda, se induce la formación de cuerpos

embrionarios en suspensión. La tercera involucra la selección de precursores neurales en medio ITSFn. La cuarta etapa parte de resembrar a los precursores seleccionados durante la etapa anterior a una densidad conocida, y expandirlos en presencia de Fgf2, Shh y Fgf8. Finalmente, la diferenciación de los precursores expandidos durante la cuarta etapa se induce por medio de remover a los factores (Fgf2, Shh y Fgf8) del medio (ver detalles en los métodos).

La línea de células ES que utilizamos para desarrollar el protocolo anterior fue la Ab2.2. Existen reportes en la literatura que muestran una eficiencia de obtención de neuronas dopaminérgicas al aplicar el protocolo de diferenciación sobre esta línea, semejante a la obtenida para la línea R1, en la cual fue establecido el protocolo original (Wakayama *et al.*, 2001). Para ir monitoreando el desarrollo correcto del protocolo, se realizaron conteos del número de células totales y de los porcentajes correspondientes a precursores neurales, neuronas y neuronas dopaminérgicas en las etapas de selección, expansión y diferenciación, a través de la identificación por inmunocitoquímica de células positivas para los marcadores nestina, tubulina- β III y TH, respectivamente. En las etapas anteriores a la selección no se realizaron conteos, ya que la detección de nestina y tubulina- β III es muy baja en el cuerpo embrionario y nula en las colonias de células ES (Lee *et al.*, 2000 y nuestras propias observaciones).

Durante la etapa de selección de precursores neurales, los conteos se realizaron a los 4, 7 y 11 días para identificar en qué punto se cuenta con el máximo número de precursores neurales en el cultivo. El número total de células por pozo fue aumentando con el paso de los días de cultivo partiendo de una densidad de 4-6 cuerpos embrionarios por pozo (4 días = $1.2 \pm 0.6 \times 10^5$, 7 días = $2.3 \pm 0.9 \times 10^5$ y 11 días = $3.6 \pm 1.1 \times 10^5$) (figura 11, e).

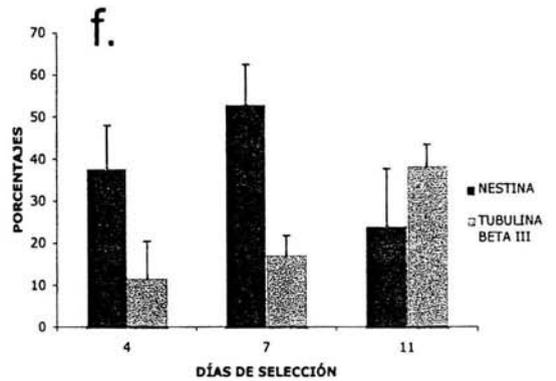
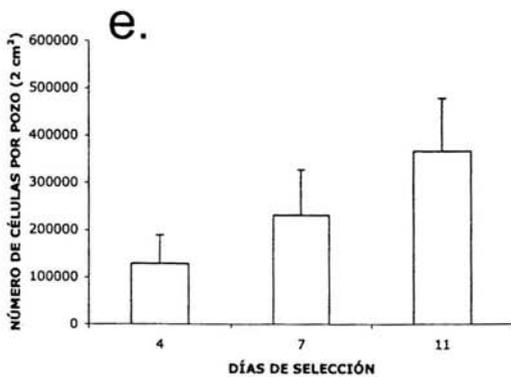
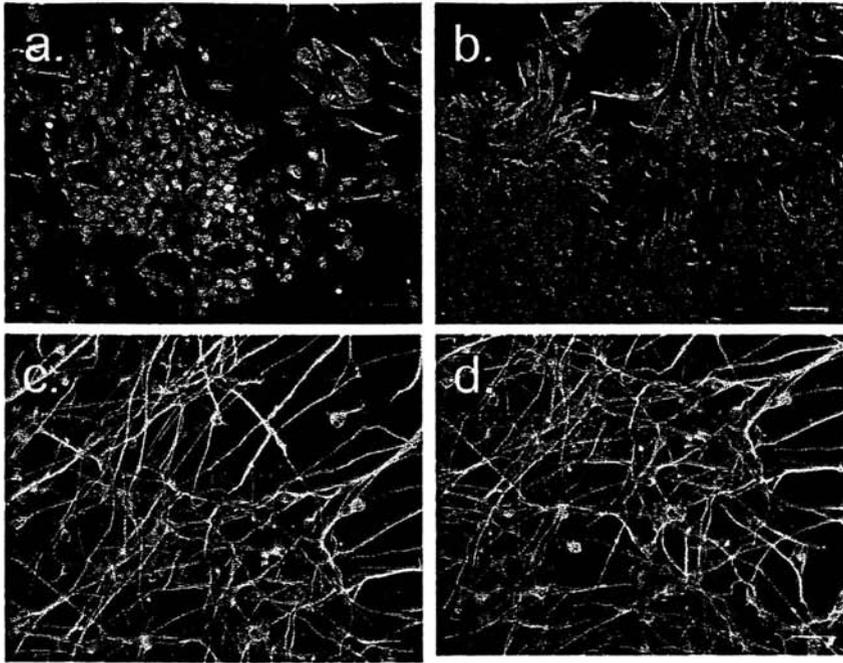


FIGURA 11. Etapa de selección de precursores neurales. (a y b) Células nestina+ a los 4 y 7 días respectivamente. (c y d) Células Tu-βIII+ a los 4 y 7 días respectivamente. (e) Número de células totales. A medida que pasan los días en medio ITSFn, el número de células va aumentando. (f) Porcentajes de células positivas para nestina y Tu-βIII. El pico de nestina se encuentra a los 7 días de cultivo en medio ITSFn. Rojo = nestina, azul = DAPI, verde = Tu-βIII; n = 5; barra de escala = 30 μm.

La cantidad de precursores neurales aumentó mostrando un pico a los 7 días de selección ($53.4 \pm 9.1\%$). Las neuronas fueron aumentando con el paso de los días (4 días = $12 \pm 8.5\%$, 7 días = $17.4 \pm 4.3\%$ y 11 días = $38.6 \pm 7.5\%$) (figura 11 a, b, c, d y f) y no se encontraron células positivas para TH (no mostrado). A partir de los datos anteriores se seleccionó el séptimo día de selección como el óptimo para pasar al siguiente paso del protocolo, la expansión de los precursores neurales.

En el reporte del protocolo de diferenciación presentado por Lee *et al.*, no se especifica la densidad a la cual se adhieren los EB's durante la etapa de selección. La densidad que utilizamos inicialmente la obtuvimos de otro trabajo en donde se lleva a cabo el mismo protocolo de diferenciación (Rolletschek *et al.*, 2001); sin embargo, esta densidad es muy baja y genera poco material para comenzar la expansión. Esto nos llevó a analizar si el aumento en la densidad de EB's (hasta 6 veces más), afecta el porcentaje de precursores neurales que se obtienen. La proporción de células positivas para nestina a los siete días de selección se mantuvo en valores dentro del rango observado en todos los casos (49 – 57%), por lo cual a continuación se procedió a adherir todos los EB's formados a partir de 2 millones de células ES en suspensión en una caja de 10 cm de diámetro (revisar métodos), permitiendo la obtención de un número adecuado de precursores neurales.

La siguiente fase del protocolo, la expansión de los precursores neurales en presencia de Fgf2, Shh y Fgf8, parte de una densidad celular de 1.5 a 2×10^5 células /cm². Las células durante esta etapa proliferan incrementando en casi un orden de magnitud a los 6 días ($2.4 \pm 0.5 \times 10^6$) mientras que los porcentajes de nestina y tubulina-βIII, no se modifican significativamente con respecto al séptimo día de la etapa de selección (figura 12). Durante la expansión de los precursores neurales, tampoco se encontraron células positivas para TH (no mostrado).

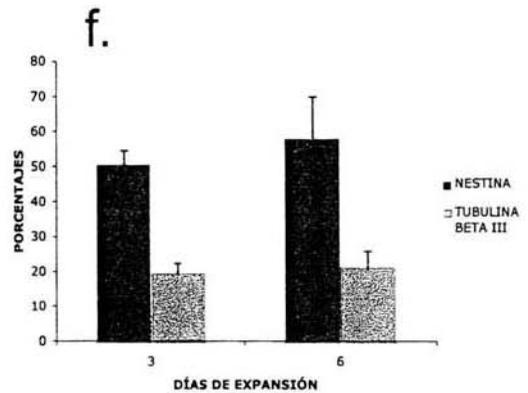
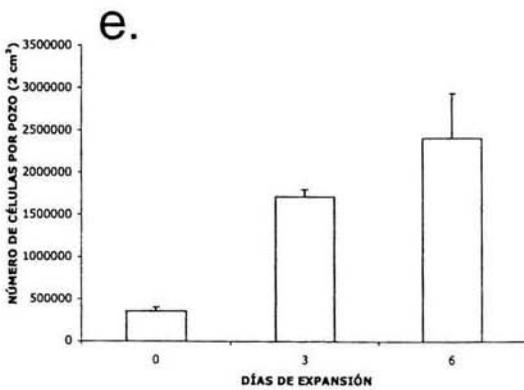
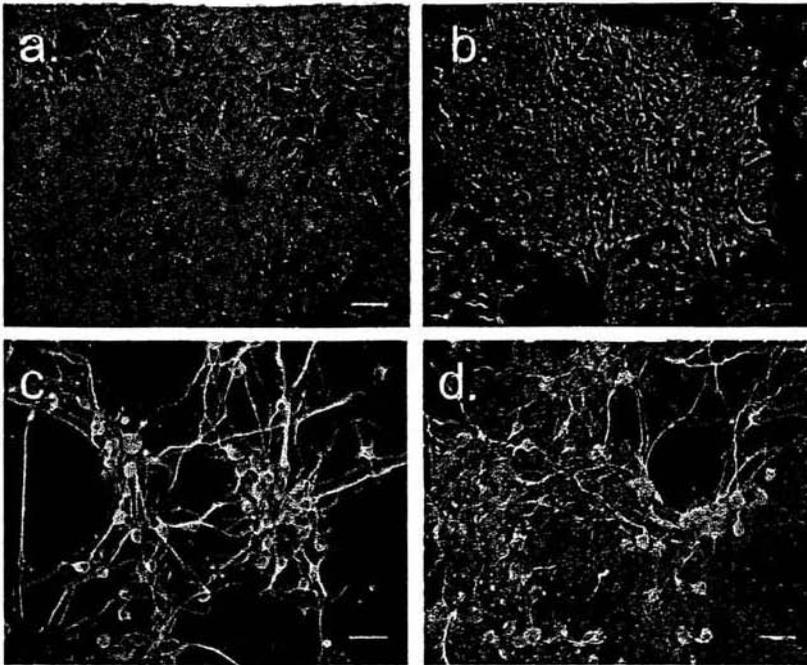


FIGURA 12. Etapa de expansión de células precursoras neurales. (a y b) Células nestina+ a los 3 y 6 días respectivamente. En b se puede apreciar el crecimiento en forma de roseta característico de los precursores neurales. (c y d) Células Tu-βIII+ a los 3 y 6 días respectivamente. (e) Número de células totales. Las células aumentan su número casi un orden de magnitud. (f) Porcentajes de células positivas para nestina y Tu-βIII. La proporción de precursores neurales y neuronas maduras es similar al observado al día 7 de la selección. Rojo = nestina, azul = DAPI, verde = Tu-βIII; n = 5; barra de escala = 30 μm.

En la última etapa del protocolo correspondiente a la diferenciación, el número de células totales se mantiene similar al obtenido al final de la expansión (2 días = $1.9 \pm 0.5 \times 10^6$ y 6 días = $2.3 \pm 0.45 \times 10^6$) (figura 13 d). Sin embargo, la proporción de precursores neurales y neuronas se invierte. Las células positivas para nestina disminuyen (2 días = $29 \pm 5.8\%$ y 6 días = $27.5 \pm 7.5\%$), mientras que las neuronas aumentan (2 días = $48.4 \pm 10.2\%$ y 6 días = $50 \pm 11.4\%$). En esta etapa ya pueden detectarse células positivas para la TH, las cuales llegan al $11.4 \pm 2.6\%$ del total de células a los 6 días de diferenciación (figura 13 a, b, c y e). El porcentaje de neuronas que expresan TH, representa el 22.7% del total de neuronas. Este porcentaje se encuentra dentro del rango reportado, indicando que el protocolo se estableció exitosamente.

EFFECTO DE Shh y Fgf8 SOBRE EL PRECURSOR DOPAMINÉRGICO.

Shh y Fgf8 son las señales que se requieren *in vivo* para establecer el nicho de diferenciación dopaminérgica en el mesencéfalo. Durante el protocolo de diferenciación a partir de células ES, cuando se aplican en la etapa de expansión junto con Fgf2, incrementan a más del doble el porcentaje de neuronas positivas para la TH con respecto al porcentaje total de neuronas (Lee *et al.*, 2000 y nuestras propias observaciones). No obstante, en ambos casos se desconoce si el mecanismo a través del cual actúan sobre los precursores neurales es selectivo o instructivo, es decir, los factores pueden promover la proliferación de los precursores dopaminérgicos, su sobrevivencia o ambos procesos en caso de actuar de manera únicamente selectiva o pueden comprometer a los precursores al destino dopaminérgico sin ningún otro efecto a nivel celular, en el caso de actuar de manera únicamente instructiva. Como se mencionó en la introducción de este trabajo, distintos reportes han mostrado un efecto de estos factores en la proliferación y sobrevivencia de diferentes poblaciones de precursores neurales (Chi *et al.*, 2003, Ruiz i Altaba *et al.*, 2002 entre otros). Estos datos nos llevaron a utilizar nuestro sistema para intentar responder que tipo de efecto tienen Shh y Fgf8 a nivel del precursor dopaminérgico durante el protocolo de diferenciación.

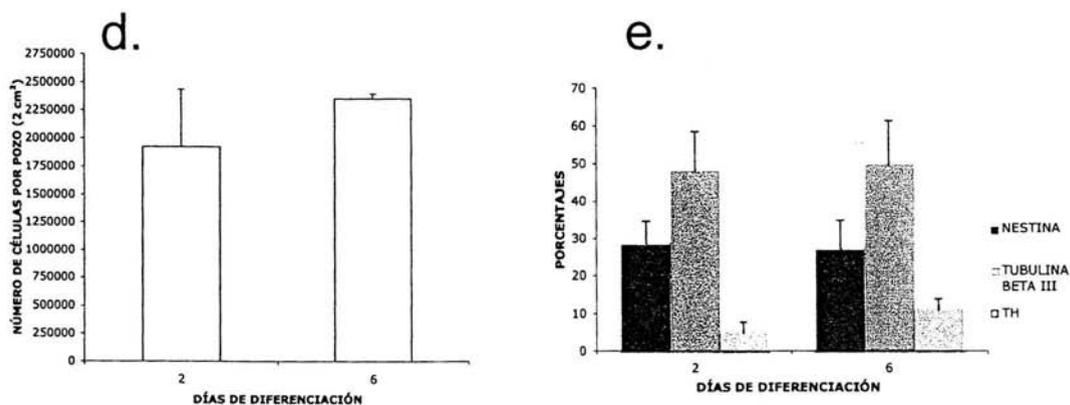
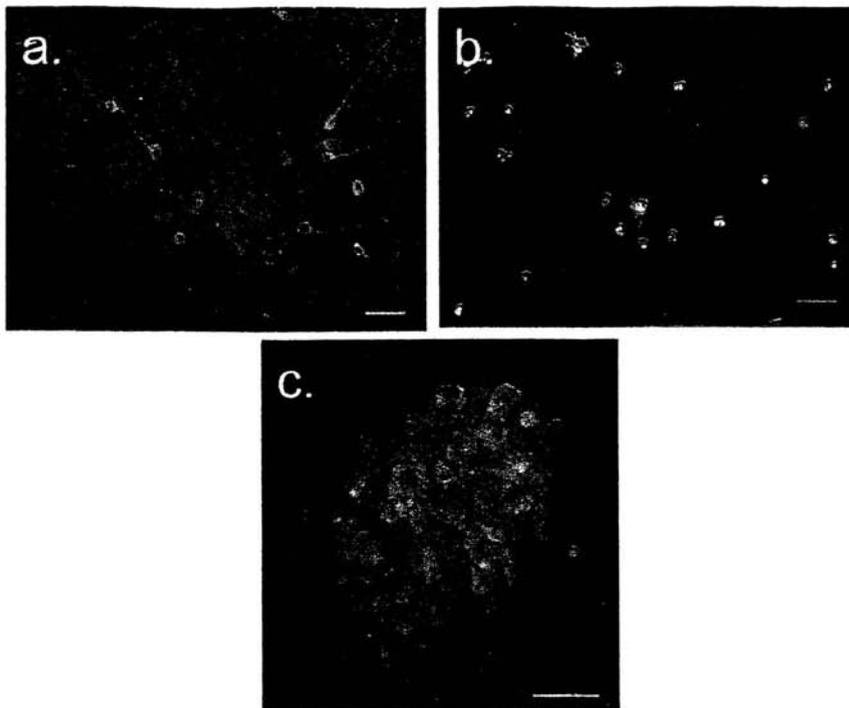


FIGURA 13. Etapa de diferenciación de neuronas dopaminérgicas. (a) Células TH+ a los 6 días de diferenciación en el cultivo intacto. (b) Células TH+ disgregadas para conteo. (c) Agregado de células TH+. (d) Número de células totales. (e) Porcentaje de células positivas para nestina, Tu-βIII y TH a los 2 y 6 días. Rojo = TH, azul = DAPI; n = 3; barra de escala = 30 μm.

Inicialmente, se evaluó si Shh y Fgf8 presentan un efecto en el número celular, para lo cual se realizó una comparación del número total de células obtenidas al final del protocolo en presencia y ausencia de dichos factores. El número total de células en presencia de Fgf2, Shh y Fgf8 aumentó el $22.4 \pm 3.7\%$ con respecto al número total de células en presencia de Fgf2 únicamente (Shh, Fgf8, Fgf2 = $2.5 \pm 0.09 \times 10^6$ y Fgf2 = $1.9 \pm 0.08 \times 10^6$) ($n = 3$, $\alpha = 0.02$) (figura 14, c). El resultado anterior nos muestra como Shh y Fgf8 promueven el incremento del número celular total del cultivo pero no nos da información con respecto al nivel y mecanismo de acción de los factores.

Otra diferencia que observamos al añadir Shh y Fgf8 fue que el cultivo se distribuye de manera diferente. Durante la última etapa de del protocolo, se puede observar la formación de agregados celulares en el plato de cultivo. A continuación, se cuantificaron estos agregados para comparar el número de ellos en presencia y ausencia de factores. La cantidad de agregados por pozo aumentó al doble a los 6 días de diferenciación en presencia de Fgf8, Shh y Fgf2 durante la expansión, en comparación con sólo añadir Fgf2 (Shh, Fgf8, Fgf2 = 343 ± 6.3 y Fgf2 = 170 ± 17.6) ($n = 3$, $\alpha=0.001$). Sin embargo, observamos que el tamaño de los agregados en general, es más grande en presencia de sólo Fgf2 que de los tres factores (figura 14 a, b y c).

La mayoría de las neuronas dopaminérgicas al final de la diferenciación se observan en grupos que parecen surgir de los agregados cuantificados anteriormente. Un conteo de la cantidad de grupos TH+ por pozo en presencia y ausencia de factores, mostró un número mayor en presencia de Fgf2, Shh y Fgf8 que en presencia de sólo Fgf2 (Shh, Fgf8, Fgf2 = 344 y Fgf2 = 144) ($n = 1$) (no mostrado) mientras que de manera cualitativa, el tamaño de los grupos no parece distinto entre una y otra condición.

Las observaciones anteriores muestran un efecto de los factores tanto en la distribución de las células del cultivo (los agregados), como en el número de grupos positivos para la TH. No obstante, desconocemos si estos agregados celulares y los grupos de células TH+ que de ellos provienen representan un evento real de expansión, es decir no podemos considerar a este fenómeno como un efecto de Shh y Fgf8 a nivel de los precursores en el cultivo.

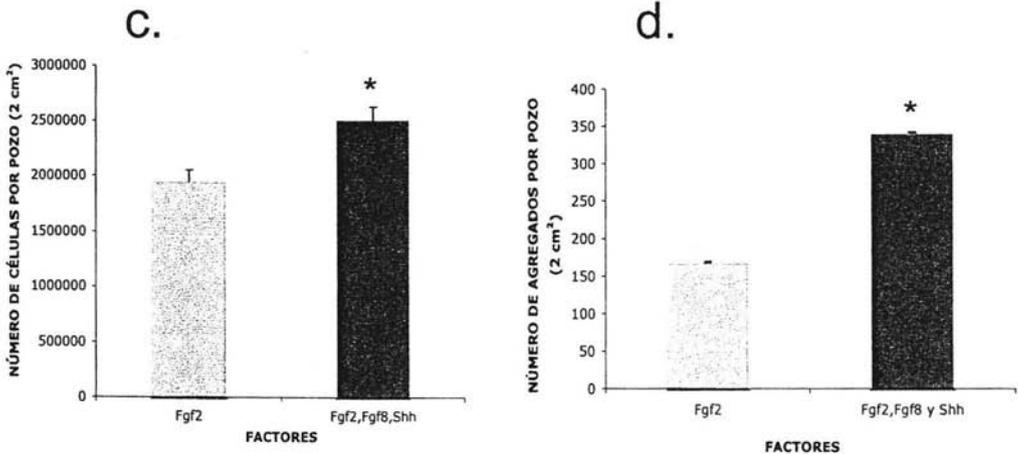
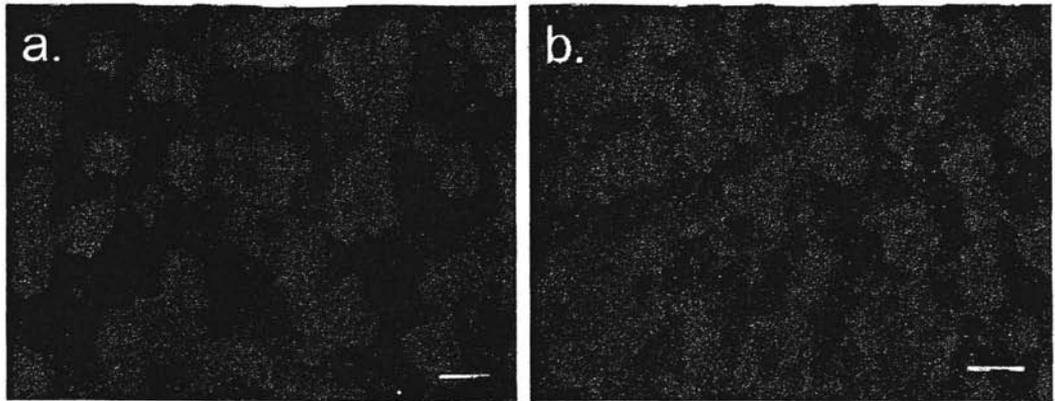


FIGURA 14. Diferencias en el número celular total y en la distribución del cultivo en presencia y ausencia de Shh y Fgf8. (a) Agregados celulares a los 6 días de diferenciación después de expandir en presencia de Fgf2. (b) Agregados celulares a los 6 días de diferenciación después de expandir en presencia de Shh, Fgf8 y Fgf2. Puede distinguirse como hay menos agregados de mayor tamaño en (a) que en (b). (c) Número de células al final del protocolo de diferenciación. En presencia de Shh y Fgf8 el número de células se incrementa en un $22.4 \pm 3.7\%$ ($n = 3$, $\alpha = 0.02$). (d) Número de agregados al final del protocolo diferenciación. En presencia de Shh y Fgf8 se forman un mayor número de agregados ($n = 3$, $\alpha = 0.001$). Azul = DAPI; barra de escala = 300 μm .

A continuación, para poder distinguir si el efecto observado de Shh y Fgf8 reside en la expansión de precursores proliferantes y si éstos coinciden con los precursores dopaminérgicos, decidimos realizar ensayos clonales. Esta estrategia nos permite por un lado, analizar el mecanismo a través del cual los factores promueven el aumento del número celular total del cultivo y por otro, discernir si el efecto de los factores es selectivo sobre el precursor dopaminérgico (i.e. mayor número de clonas con células TH+), instructivo (i.e. igual número de clonas, mayor número de células TH+ por clona) o ambos.

Para realizar los ensayos clonales se utilizó a la línea R1 y a la línea R1B5 de células ES; esta última expresa a la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor constitutivo de citomegalovirus-actina (CMV-actina), es decir que la GFP debe expresarse en todos los linajes celulares incluido el neural.

En primer lugar, se verificó que el porcentaje de células positivas para la TH obtenido a partir de estas líneas se encontrara dentro del rango obtenido para la Ab2.2 (no mostrado). Posteriormente, se procedió a establecer la dilución de células verdes en células normales para poder visualizar clonas individuales al final de la etapa de diferenciación. Es importante aclarar que existe un margen de error en este ensayo ya que no todos los campos analizados al inicio de la expansión tienen una sola célula GFP+ de la cual surge una clona, sin embargo se tomaron en cuenta los pozos en los cuales más de un 90% de los campos de 20X tuvieran 1 célula GFP+.

Desafortunadamente, el análisis anterior no pudo llevarse a cabo ya que, al aplicar el protocolo de diferenciación a la línea de células ES R1B5, la expresión de la GFP se perdió en un alto porcentaje de las células a los 6 días de diferenciación ($79 \pm 7.2\%$) ($n = 3$) (figura 15 a). Esto ocurrió en forma similar tanto en presencia como en ausencia de factores (no mostrado). Dado este fenómeno, el número de células TH+ por clona de células GFP+ fue muy bajo e insuficiente para realizar conteos que permitieran distinguir un efecto de los factores sobre la diferenciación.

A pesar de lo anterior, el número relativo de clonas GFP+ en presencia y ausencia de factores pudo ser estimado mostrando un incremento del $62.7 \pm 26.2\%$ en presencia de Shh, Fgf8 (Shh, Fgf8, Fgf2 = $162.7 \pm 26.2\%$ y Fgf2 = $100 \pm 24.5\%$) ($n = 4$, $\alpha = 0.01$) (figura 15 b, c y d). El número de células por clona GFP+ en presencia y ausencia de

los factores (Shh, Fgf8, Fgf2 = 54.4 ± 10.9 y Fgf2 = 49.1 ± 11.9), no presentó diferencias significativas ($n = 4$, $\alpha = 0.54$) (figura 15 e). Esto nos muestra que efectivamente los factores están permitiendo que se expanda un mayor número de precursores presentes en el cultivo, pero, que el número de divisiones por precursor no parece modificarse descartando un efecto de Shh y Fgf8 en la proliferación de los precursores.

A partir del número de clonas y el número de células por clona pudimos estimar el número mínimo de precursores expandibles en ambas condiciones tomando en cuenta la dilución celular utilizada para realizar el ensayo. Aun cuando este número es relativo ya que no representa el número real de precursores, la diferencia entre una condición y otra puede ser estimada. El número mínimo de precursores que se expanden en presencia de sólo Fgf2 corresponde a 6.7 precursores de cada 1000 células al comienzo de la expansión, mientras que en presencia de Shh, Fgf8 y Fgf2 este número aumenta a 10.9 precursores de cada 1000 células al inicio de la expansión. Lo anterior sugiere que Shh y Fgf8 están actuando en fases tempranas de ésta etapa a través de promover la sobrevivencia de un subconjunto de precursores, o bien de instruirlos hacia un destino particular (quizás el dopaminérgico).

Como se ha mencionado anteriormente, existen evidencias que indican que tanto Shh como Fgf8 actúan como factores de sobrevivencia sobre diferentes poblaciones celulares (Chi *et al.*, 2003 Storm *et al.*, 2003, Thibert *et al.*, 2003 y Charrier *et al.*, 2001), por lo cual decidimos evaluar si existe un efecto de estos factores en la sobrevivencia de los precursores a las 24 h de expansión, detectando células apoptóticas a través de la prueba de TUNEL. No se observaron diferencias significativas en el número de células TUNEL+ entre expandir a los precursores con sólo Fgf2 o con Shh, Fgf8 y Fgf2 por 24 h. (Fgf2 = 23 ± 8.4 y Shh, Fgf8, Fgf2 = 24 ± 14.1) ($n = 3$, $\alpha = 0.94$) (figura 16 a). Sin embargo, de la prueba anterior no puede concluirse que los factores no tengan un efecto en la sobrevivencia de los precursores. El porcentaje de células positivas para TUNEL en presencia o ausencia de factores en esta etapa del protocolo fue de alrededor del 24% y se mantuvo en valores similares al sexto día de la etapa de diferenciación ($19.3 \pm 7.3\%$) ($n = 3$). Ya que el porcentaje de precursores que se expanden por efecto de Shh y Fgf8 representa menos del 1% de la población celular

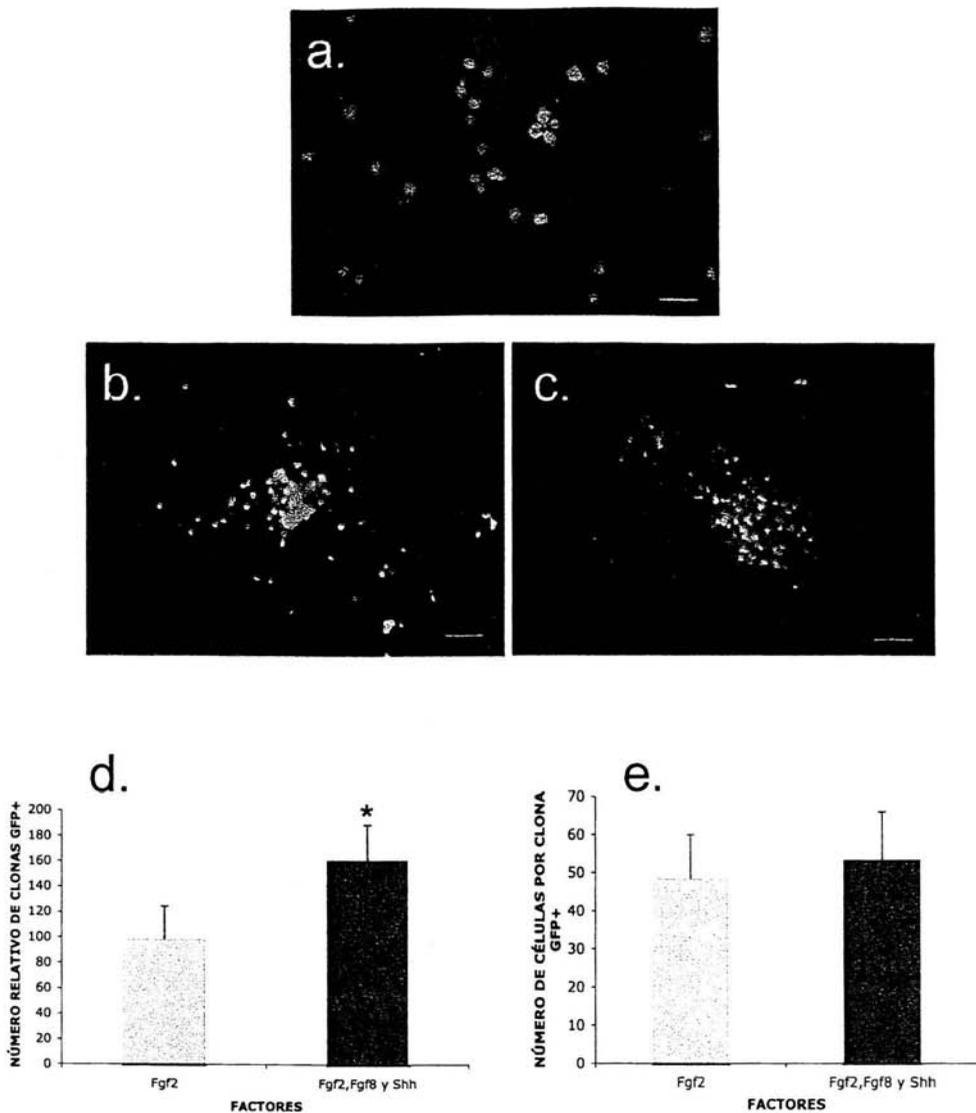


FIGURA 15. Protocolo sobre la línea R1B5 y clonas GFP+. (a) A los 6 días de diferenciación un alto porcentaje de células ($79 \pm 7.2\%$) han perdido la expresión de la GFP, $n = 3$. (b y c) Clonas GFP+ a los 6 días de diferenciación expandiendo con en ausencia y presencia de Shh y Fgf8 respectivamente. (d) Número relativo de clonas GFP+ en presencia y ausencia de Shh y Fgf8. El número de clonas en presencia de Shh y Fgf8 se incrementa en un 62.7% ($n = 4$, $\alpha = 0.01$). (e) Número de células por clona GFP+. No existen diferencias significativas entre una condición y otra ($n = 4$, $\alpha = 0.54$). Azul = DAPI, verde = GFP; barra de escala = $30 \mu\text{m}$.

de partida, la proporción de muerte celular asociada al desarrollo normal del cultivo, impide distinguir si este efecto de los factores reside en promover la sobrevivencia de los precursores al inicio de la expansión.

OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN

Otra de las metas planteadas en este trabajo fue hacer más eficiente la obtención de neuronas dopaminérgicas obtenidas en el protocolo de diferenciación descrito anteriormente. Se sabe que las neuronas dopaminérgicas son susceptibles al estrés oxidativo y que diversos factores antioxidantes, así como las bajas concentraciones de oxígeno, promueven un incremento en el porcentaje de obtención de estas neuronas (Lee *et al.*, 2000 y Studer *et al.*, 2000). Con base en lo anterior, decidimos aplicar el protocolo de diferenciación a una línea de células ES (Ab2.2 C2), que sobreexpresan bajo el promotor constitutivo CMV-actina, a la catalasa citoplasmática; enzima antioxidante que transforma al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

Tanto el porcentaje de neuronas como de neuronas DA que se obtuvieron al final del protocolo, se vieron aumentados en la línea que sobreexpresa la catalasa con respecto a la línea silvestre (silvestre :Tu-βIII = $50 \pm 11.4\%$, TH = $11.4 \pm 2.6\%$ y catalasa: Tu-βIII = 69%, TH = 20%) (figura 16 c, d y e). Estos valores representan un incremento del 20% en el número total de neuronas y del 10% en el número de neuronas dopaminérgicas sobre el total de neuronas. Sin embargo, hay que repetir este experimento para tener un número suficiente de repeticiones que permitan asegurar que estas diferencias son estadísticamente significativas.

Este resultado sugiere que al proteger a las células del estrés oxidativo a través de la sobreexpresión de una enzima antioxidante como la catalasa, la diferenciación neuronal en general y la dopaminérgica en particular se ven favorecidas.

Como se mencionó anteriormente, al realizar la prueba de TUNEL al final del protocolo aplicado sobre la línea silvestre (en presencia de Shh, Fgf8 y Fgf2), se observó un $19.3 \pm 2.3\%$ de células TUNEL+; no obstante, al parecer no existen coincidencias entre la señal de TUNEL y la expresión de TH (figura 16 b), mientras que sí existen coincidencias entre la señal de TUNEL y otros tipos neurales (no mostrado). Esta observación sugiere que, si el efecto de la catalasa reside en proteger de muerte

producida por estrés a una población celular en el cultivo, entonces probablemente esta sea la población precursora y no las neuronas dopaminérgicas ya maduras. Para confirmar lo anterior, sería interesante realizar conteos de TUNEL durante el protocolo desarrollado sobre esta línea y ver si se modifican con respecto a la línea silvestre. Es posible sin embargo, que el efecto de la catalasa no esté vinculado a la muerte celular si no a otros mecanismos como la diferenciación. Esta posibilidad deberá confirmarse mediante experimentos adicionales.

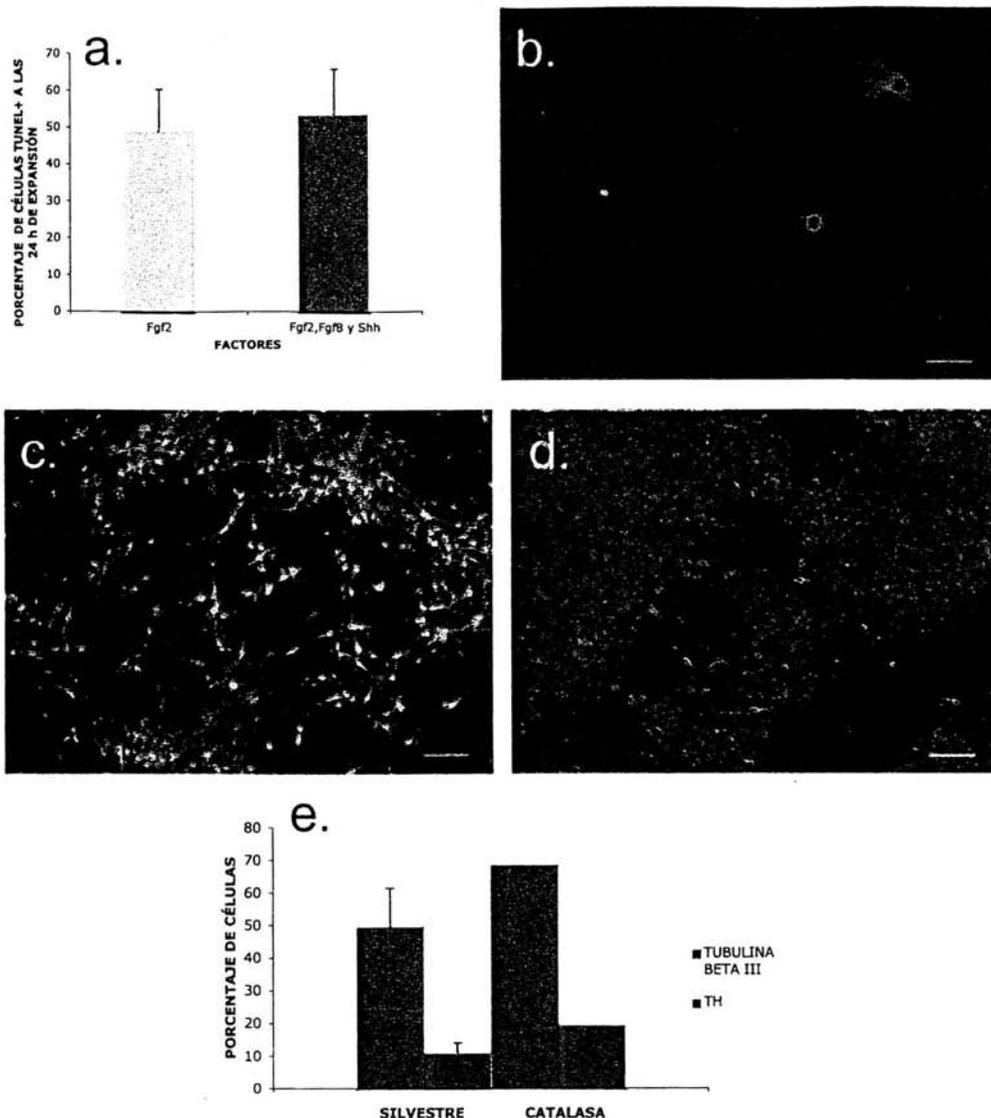


FIGURA 16. Prueba de TUNEL y aplicación del protocolo de diferenciación sobre la línea Ab2.2C2 (a) Número de células TUNEL+ en un campo de 20X en presencia y ausencia de Shh y Fgf8 por 24 h. No se observan diferencias significativas ($n = 3$, $\alpha = 0.94$) (b) Prueba de TUNEL a los 6 días de diferenciación. No existen coincidencias entre la señal de TUNEL (verde) y la de TH (rojo). (c) Células TH+ (verde) obtenidas de la línea de células ES Ab2.2C2 la cual sobreexpresa a la enzima catalasa. (d) Células TH+ (rojo) obtenidas de la línea de células ES Ab2.2. El porcentaje de neuronas TH+ generadas se incrementa ~10% en la línea Ab2.2C2. (e) Porcentaje de células positivas para Tu- β III y TH en la línea Ab2.2 silvestre y la línea Ab2.2C2. Los porcentajes tanto de neuronas como de neuronas dopaminérgicas son más elevados en la línea Ab2.2C2. La falta de desviaciones se debe a que solo se realizaron 2 experimentos independientes sobre esta línea por lo cual es necesario realizar más repeticiones para confirmar estos resultados. Barra de escala = 60 μ m.

DISCUSIÓN.

ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS A PARTIR DE CÉLULAS ES.

Uno de los protocolos de diferenciación de neuronas dopaminérgicas a partir de células ES propuesto en la literatura (Lee *et al.*, 2000) pudo reproducirse exitosamente en el laboratorio sobre la línea Ab2.2. Las poblaciones de precursores neurales (nestina), neuronas maduras (Tu-βIII) y neuronas dopaminérgicas (TH), durante las etapas de selección, expansión y diferenciación, mostraron una cinética similar a la reportada (Okabe *et al.*, 1996 y Lee *et al.*, 2000). Durante la etapa de selección en medio ITSFn, se observó la abundante muerte celular esperada en el cultivo y se obtuvo un buen porcentaje de células positivas para nestina ($53.4 \pm 9.1\%$). Durante esta etapa, se evaluó el efecto de la densidad de EBs adheridos en la obtención de células precursoras neurales mostrando que no existen diferencias significativas en dicho porcentaje al variar la densidad de EBs. Lo anterior nos permitió llevar a cabo la etapa de selección de manera tal que pudiéramos recuperar una gran cantidad de precursores para la siguiente etapa del protocolo. Subsecuentemente, se consiguió la expansión de estos precursores en presencia del mitógeno Fgf2 más Shh y Fgf8 incrementando el número celular del cultivo en casi un orden de magnitud, mientras que, el porcentaje de células positivas para nestina, no incrementó significativamente ($58.6 \pm 11\%$). Finalmente al remover al factor mitogénico y a Shh y Fgf8 para inducir la diferenciación de los precursores expandidos, el porcentaje de neuronas maduras aumentó ($50 \pm 11.4\%$) y se consiguió la obtención de neuronas dopaminérgicas ($11.4 \pm 2.6\%$).

Existe una gran variabilidad en los porcentajes de obtención de neuronas dopaminérgicas reportados dependiendo de la línea de células ES que se utilice. En nuestro caso, la línea Ab2.2 presentó porcentajes menores tanto de células nestina+ como de células Tu-βIII+ en la etapa de expansión y diferenciación, respectivamente, con respecto a las líneas J1 y R1 en las cuales se estableció inicialmente el protocolo de obtención de precursores neuroepiteliales a partir de células ES (Okabe *et al.*, 1996).

Aún cuando el porcentaje de neuronas dopaminérgicas que se obtuvo a partir de la línea Ab2.2, se encuentra dentro del rango reportado para diferentes líneas de células ES (Wakayama *et al.*, 2001), es posible que la limitante para hacer más eficiente la obtención de neuronas dopaminérgicas en esta línea se ubique en la etapa de selección y expansión de los precursores neurales. No obstante, la proporción de las diferentes poblaciones durante el protocolo es la adecuada y el porcentaje de neuronas dopaminérgicas suficiente para abordar preguntas respecto al mecanismo de acción de Shh y Fgf8 en la diferenciación dopaminérgica.

MECANISMOS DE ACCIÓN DE SHH Y FGF8 DURANTE LA ESPECIFICACIÓN DOPAMINÉRGICA A PARTIR DE CÉLULAS ES.

Shh y Fgf8 añadidos en conjunto en la etapa de expansión, promueven un aumento de alrededor del triple en el porcentaje de neuronas dopaminérgicas, sin modificar la proporción de las neuronas en el cultivo (Lee *et al.*, 2000 y nuestras propias observaciones). Esto significa que Shh y Fgf8 no tienen un papel en la neurogénesis general durante el protocolo de diferenciación, sino que, promueven el aumento específico del fenotipo neuronal dopaminérgico. El mecanismo a través del cual actúan estas señales para promover la diferenciación dopaminérgica se desconoce tanto *in vivo* como a partir de las células ES. Existen una serie de evidencias que proponen tanto a Shh como a Fgf8 como factores que regulan la sobrevivencia y proliferación celular en distintos escenarios dentro del SNC, por lo cual nosotros decidimos abordar si acaso eran estos mecanismos los que entraban en acción por parte de Shh y Fgf8 durante la especificación del fenotipo dopaminérgico a partir de células ES.

Efectos generales de Shh y Fgf8.

El primer efecto de Shh y Fgf8 que pudimos observar fue el de aumentar el número total de células al final del protocolo con respecto a utilizar sólo a Fgf2 durante la etapa de expansión de los precursores neurales. Como se ha mostrado en los resultados, el número de células totales aumenta en un $22.4 \pm 3.7\%$ en presencia de Fgf2, Shh y Fgf8. Este incremento en el número celular total no se encuentra contemplado en el reporte en donde se establece el protocolo de diferenciación y muestra un efecto a nivel celular adicional al incremento en el fenotipo dopaminérgico por parte de los factores.

De manera similar, la apariencia del cultivo se ve modificada al expandir a los precursores neurales en presencia de Fgf2, Shh y Fgf8 con respecto a sólo expandir con Fgf2. Al final de la diferenciación, las células se observan en agregados, los cuales se duplican en presencia de los factores pero en general disminuyen de tamaño. El fenómeno anterior, sin embargo, puede deberse a la diferencia en la densidad celular del cultivo entre una condición y otra y no estar asociado a un efecto específico de Shh y Fgf8.

Identificación de células precursoras neurales expandibles.

Los resultados anteriores nos llevaron a plantear un sistema en donde pudiéramos identificar con precisión grupos celulares clonales (derivados de un solo precursor), para verificar si la diferencia tanto en el número celular final como en el de agregados celulares, responde a un efecto de Shh y Fgf8 sobre una subpoblación de precursores en el cultivo. Al distinguir eventos de expansión provenientes de precursores independientes, se puede analizar el efecto de los factores sobre el precursor dopaminérgico proliferante (realizando inmunotinciones contra la TH y cuantificando tanto clonas con al menos una célula TH+, como el número de células TH+ por clona), para el cual no existe un marcador específico.

La estrategia que utilizamos consistió en realizar diluciones de células GFP+ (provenientes de la línea de células ES R1B5 que expresa a la GFP bajo el promotor constitutivo CMV-actina), sobre células R1 silvestres. En ambas líneas el porcentaje de neuronas dopaminérgicas generadas se encuentra dentro del rango obtenido para la línea Ab2.2. Lamentablemente el análisis clonal sólo pudo realizarse parcialmente, ya que de manera inesperada al final de la diferenciación sobre la línea de células R1B5, aproximadamente el 80% de las células resultaron GFP⁻.

Existen distintos hechos que nos hacen pensar que la pérdida en la expresión de la GFP está dada por un cambio epigenético (que no está vinculado a la especificidad del promotor) que ocurre durante la última etapa del protocolo de diferenciación a partir de las células ES: i) La expresión de la GFP en las células ES indiferenciadas se mantiene a pesar del tiempo de cultivo, lo cual muestra su estabilidad en células que proliferan por tiempos prolongados. Al aplicar el protocolo de diferenciación la expresión de la GFP parece ir disminuyendo de manera paulatina y desaparece en un alto porcentaje

de las células en la etapa final del proceso; esto sugiere que algo sucede durante el protocolo que inhibe la expresión de la GFP y que este fenómeno no se debe al tiempo de las células en cultivo. ii) Los precursores neurales derivados *in vitro* a partir de la línea de ES R1B5 han sido utilizados en diversos ensayos en el laboratorio para evaluar su potencial diferenciativo en explantes embrionarios (ver abajo), y en el explante la expresión de la GFP no parece apagarse. Esto indica que existen diferencias importantes entre la diferenciación *in vitro*, y la inducida por el ambiente en el explante embrionario, lo cual debe considerarse cuidadosamente dentro del contexto de la aplicación terapéutica de las células ES y sus derivados. iii) Al aplicar a esta línea el protocolo de diferenciación, el desarrollo del cultivo se observa normal y la proporción de neuronas dopaminérgicas que se obtienen se encuentra dentro del rango esperado, lo que sugiere que la pérdida de la expresión de la GFP no altera de manera significativa la capacidad de responder al protocolo de diferenciación *in vitro* de estas células. iv) Existen reportes que muestran la variación en la estabilidad de diferentes promotores durante el desarrollo del protocolo de diferenciación; tanto el promotor del factor de elongación de cadenas polipeptídicas 1 α (EF1 α) como el promotor de citomegalovirus (CMV) funcionan a nivel de las ES indiferenciadas (con mucha mayor eficiencia el EF1 α que el CMV) y a nivel de los precursores neurales, mientras que ambos se apagan en la neuronas maduras (Zeng *et al.*, 2003). De manera similar, el promotor inducible por tetra- o doxiciclina del sistema Tet se expresa en las ES indiferenciadas y los precursores neurales, pero su expresión se apaga en las neuronas maduras durante la diferenciación (Sonntag *et al.*, 2004). Esta heterogeneidad en la expresión de genes reporteros depende, además de los eventos epigenéticos, de la especificidad del promotor bajo el que se encuentre, es decir de la capacidad de éste para expresarse en tipos celulares diversos. No obstante, el promotor que nosotros utilizamos (CMV-actina) fue seleccionado precisamente por presentar una expresión muy ubicua y robusta, por lo cual conocemos que posee la capacidad de expresarse en prácticamente todos los tipos celulares del organismo. Adicionalmente, la expresión descrita para los distintos promotores (EF1 α , CMV, sistema Tet y CMV-actina) durante el protocolo de diferenciación de las ES presenta un patrón similar disminuyendo en un alto porcentaje de las células en la etapa final del protocolo. Todas las observaciones

descritas anteriormente sugieren que existe una inestabilidad epigenética en la progenie celular (o un subconjunto de ella) de las ES durante la aplicación del protocolo de diferenciación dopaminérgica, lo cual es importante tener en cuenta al evaluar la función de transgenes de interés durante el protocolo.

Efecto de Shh y Fgf8 sobre el número de precursores expandibles.

A pesar de la pérdida en la expresión de la GFP en un alto porcentaje de las células al final de la diferenciación, utilizamos al porcentaje GFP+ restante para realizar una cuantificación del número relativo de clonas en presencia o ausencia de Shh y Fgf8. Es importante considerar que este número no representa un valor real de precursores en el cultivo y por lo tanto, es la diferencia entre una condición y otra la que es significativa. Como se mostró en los resultados, el número relativo de clonas al final de la diferenciación en presencia de Shh y Fgf8 es 62.7% mayor que en presencia de solo Fgf2 mientras que el número de células por clona, no presenta diferencias significativas entre una condición y otra. Los resultados anteriores nos permiten estimar el número mínimo de precursores expandibles en el cultivo resultando que en presencia de Fgf2, representan alrededor de 6 células por cada 1000 sembradas al inicio de la expansión. Al agregar Shh y Fgf8, este número aumenta a alrededor de 10 precursores por cada 1000 células sembradas al inicio de la expansión. Ya que Shh y Fgf8 no presentan un efecto en la proliferación de los precursores (no existen diferencias significativas en el número de células por clona), su acción debe encontrarse al inicio de la expansión y puede consistir en promover la sobrevivencia de este subconjunto de precursores o bien, especificar su destino permitiendo su expansión.

Efecto de Shh y Fgf8 en la sobrevivencia de los precursores.

Para determinar si Shh y Fgf8 promueven la sobrevivencia de los precursores al inicio de la expansión, decidimos realizar una detección de células apoptóticas por medio de TUNEL. a las 24 h en presencia o ausencia de los factores. El porcentaje de células TUNEL+ en ambas condiciones fue de alrededor del 20% y se mantuvo en valores similares a los 2 y 6 días de la diferenciación. Este porcentaje nos impide distinguir si existe un efecto de los factores en la sobrevivencia de los precursores ya que, como se mencionó anteriormente, la proporción de éstos que debería rescatarse por efecto de los factores es muy pequeña y se pierde dentro del fondo.

En el reporte original del protocolo de diferenciación se encuentra especificado que existe una abundante muerte celular durante la etapa de selección de los precursores neurales (Lee *et al.*, 2000); no obstante, no se comenta nada con respecto a la proporción de muerte celular durante la expansión y diferenciación. Los porcentajes de células TUNEL+ que nosotros registramos en estas etapas muestran que existe una proporción de alrededor del 20% de células en apoptosis, aparentemente asociada al desarrollo normal del cultivo. Recientemente, otro grupo ha reportado porcentajes similares de células TUNEL+, confirmando nuestra observación (Shim *et al.*, 2004). El conocimiento de la proporción de células apoptóticas durante el protocolo de diferenciación, es fundamental cuando se pretenden evaluar efectos a nivel de los procesos celulares que se están llevando a cabo durante la diferenciación neuronal dopaminérgica a partir de las ES. En nuestro caso, por ejemplo, este porcentaje dificulta la detección de un posible efecto de Shh y Fgf8 en la sobrevivencia de los precursores que se expanden únicamente en su presencia, por lo cual se requerirán ensayos alternativos para abordar esta pregunta.

OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL DOPAMINÉRGICA A PARTIR DE CÉLULAS ES.

La proporción de neuronas dopaminérgicas que se obtiene a partir del protocolo de diferenciación de células ES descrito anteriormente es relativamente bajo en relación a la cantidad de precursores neurales y neuronas maduras que se generan. Esto sugiere que Shh y Fgf8 no son señales suficientes para inducir al 100% de los precursores neurales presentes en el cultivo al fenotipo dopaminérgico, y que las señales adicionales necesarias para inducir este fenotipo no parecen encontrarse, o por lo menos no en las concentraciones adecuadas, en el sistema de diferenciación *in vitro* a partir de células ES. Otra posibilidad es que los precursores neurales que se generan en estas condiciones tengan un potencial de diferenciación restringido, y que, aun cuando las señales correctas estén presentes, no sean capaces de responder a ellas.

Explantos embrionarios

Un acercamiento que nos permite evaluar el potencial diferenciativo de los precursores neurales generados a partir de células ES y su capacidad de responder a

las señales de un entorno más natural, consiste en implantarlos en tejido embrionario durante los estadios correspondientes al desarrollo del sistema dopaminérgico mesencefálico. Al implantar una población enriquecida en precursores neurales GFP+ (70.7% de células nestina+) (n = 407 células) expandidos en presencia de Fgf2 como se ha descrito anteriormente, en explantes mesencefálicos GFP⁻ (E11.5) y mantenerlos en cultivo por siete días, hemos observado un incremento en la proporción de neuronas (88.8% de células Tu-βIII+) y una disminución del porcentaje de células nestina+ (2.6%), en la población implantada (n = 152 células) (figura 17). La proporción de neuronas maduras GFP+ en el explante es más del 20% mayor a la obtenida *in vitro* durante la etapa de diferenciación, y muestra como los precursores neurales derivados de las células ES son capaces de integrarse al tejido y responder a las señales neurogénicas dando lugar a un alto porcentaje de neuronas (trabajo en proceso de Baizabal *et al.*). A continuación será interesante evaluar la proporción de estas neuronas que adquieren un fenotipo dopaminérgico y compararla con la que surge de la aplicación de Shh y Fgf8 durante el protocolo de diferenciación *in vitro*. Si los precursores generados a partir de las células ES son capaces de responder a las señales en el explante, esperaríamos un aumento significativo en la porcentaje de neuronas dopaminérgicas que de ellos se derivan (figura 17).

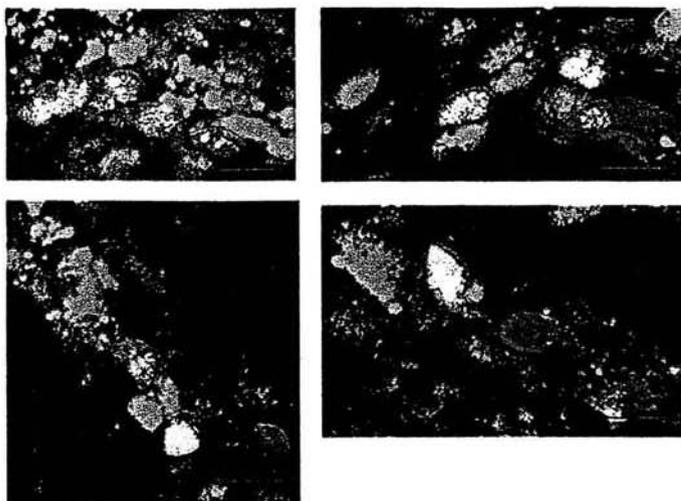


FIGURA 17. Explantes embrionarios. Precursores neurales provenientes de la línea R1B5 fueron implantados en mesencéfalos en E11.5 y muestran diferenciación hacia el linaje neuronal (n = 152 células analizadas). Rojo = GFP, verde = NeuN, amarillo = traslape. Barra de escala = 30 μ m.

En el 2002, la publicación de dos reportes mostró como éste parece ser el caso ya que al aplicar el protocolo de diferenciación (en ausencia de Shh y Fgf8 en la expansión) sobre líneas de células ES que sobreexpresan a Nurr1 (receptor nuclear huérfano involucrado en la activación de la TH) bajo distintos promotores (CMV y EF1 α), la obtención de neuronas dopaminérgicas se incrementa 10 veces en un caso y de 4 a 5 veces en el otro en comparación con la línea silvestre (Kim *et al.*, 2002 y Chung *et al.*, 2002, respectivamente). Al añadir Shh y Fgf8 durante la etapa de expansión sobre estas líneas, en ambos casos las neuronas dopaminérgicas aumentan representando el 82% y el 60% del total de las neuronas respectivamente. Lo anterior muestra como Shh y Fgf8 actúan de manera independiente a Nurr1 ya que ambos incrementan al fenotipo dopaminérgico; no obstante, al combinarse, la población de células que sobreexpresan a Nurr1 ahora es capaz de responder con mayor eficiencia a la señalización por Shh y Fgf8. Estos datos sugieren que al sobreexpresar una señal involucrada en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas *in vivo* como Nurr1, los precursores neurales derivados de las ES son capaces de responder y diferenciar hacia un fenotipo neuronal preferentemente dopaminérgico, lo cual apoya la idea de que los precursores neurales que provienen de las células ES no se encuentran restringidos hacia un destino en particular y responden a las señales que participan en la especificación de fenotipos neuronales durante el desarrollo.

Sin embargo, un reporte reciente muestra que al aplicar el protocolo de diferenciación sobre una línea que sobreexpresa a Nurr1 bajo un promotor inducible (sistema Tet) que no se expresa en neuronas maduras, se obtienen células TH+ no neuronales. Estas células TH+ expresan una serie de genes vinculados con el metabolismo de la dopamina tales como su transportador y la descarboxilasa de L-aminoácidos, entre otros. Estos resultados sugieren que la inducción del fenotipo dopaminérgico por parte de Nurr1 se encuentra desvinculada a la neurogénesis. En el reporte en donde utilizan al promotor CMV para dirigir la expresión de Nurr1, comentan que ésta disminuye notablemente en la última etapa del protocolo en donde se induce la diferenciación neuronal (Kim *et al.*, 2002), lo cual coincide con la noción de que dicho promotor, se apaga en las neuronas maduras provenientes de la diferenciación de las células ES (que representan la mayoría de la población del cultivo en esta etapa), y el mismo caso

se aplicaría para el promotor EF1 α (Zeng *et al*, 2003). Esto significaría que en los tres reportes anteriores, el patrón de expresión de Nurr1 durante el protocolo es similar y será interesante analizar por qué en los primeros casos se obtienen neuronas TH+ mientras que en el otro las células TH+ no son neuronas. Los argumentos anteriores plantean dudas con respecto a la restricción de linaje de los precursores derivados de las células ES ya que al parecer la inducción dopaminérgica (en las neuronas en un caso y en células no neuronales en el otro) por parte de Nurr1 parece ser independiente a la determinación neuronal.

El ensayo en el explante embrionario será una estrategia de gran utilidad para corroborar si realmente los precursores neurales derivados de las células ES pueden responder a señales diversas como las presentes en el explante embrionario, las cuales se encuentran en proporciones más similares a las fisiológicas.

Aplicación del protocolo de diferenciación sobre la línea de células ES Ab2.2-C2.

Además de buscar optimizar el protocolo de diferenciación neuronal dopaminérgica a través del uso de señales directamente involucradas en su determinación y maduración, existen otras maneras de hacer más eficiente su obtención a partir de las células ES. Éstas últimas radican en mejorar las condiciones generales de las células durante el cultivo.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que las neuronas dopaminérgicas son susceptibles al estrés oxidativo y que éste es una de las causas de su degeneración en enfermedades neurodegenerativas tales como el mal de Parkinson (Dawson y Dawson, 2002). Una manera de hacer más eficiente la obtención de neuronas dopaminérgicas a partir de células ES ha consistido en añadir antioxidantes como el ácido ascórbico durante la etapa de diferenciación (Lee *et al.*, 2000). Estos antecedentes nos llevaron a evaluar el protocolo de diferenciación en la línea Ab2.2 C2 de células ES, la cual sobreexpresa a la catalasa (enzima antioxidante que transforma al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua) bajo el promotor constitutivo CMV-actina. Al llevar a cabo el protocolo de diferenciación sobre esta línea, el porcentaje de neuronas dopaminérgicas incrementó al 20% del total de las neuronas y éstas últimas aumentaron alcanzando el 60% del total de células. Estos resultados sugieren (aunque

faltan repeticiones de este experimento) que al sobreexpresar a la catalasa, tanto la obtención de neuronas como de neuronas dopaminérgicas se hace más eficiente.

El mecanismo a través del cual la catalasa promueve el incremento observado en el fenotipo dopaminérgico no lo conocemos; sin embargo, resulta interesante notar que al parecer no existen neuronas dopaminérgicas en apoptosis durante la etapa de diferenciación al aplicar el protocolo a la línea Ab2.2 silvestre, por lo cual si acaso la catalasa promueve la sobrevivencia de algún tipo celular, probablemente se trate de la población de precursores neurales y no de las neuronas dopaminérgicas maduras. Por otro lado, como hemos mencionado anteriormente, la expresión de la GFP bajo el promotor CMV-actina se apaga en un alto porcentaje de las células en la etapa de diferenciación. Si este resulta ser el caso para cualquier gene bajo su regulación, entonces la expresión de la catalasa también se reduciría en esta etapa, lo cual apoyaría la hipótesis de que, en estas condiciones, la catalasa ejerce su mayor efecto sobre la población precursora. Probablemente, si la enzima se expresara de manera más estable durante la diferenciación, el efecto sobre la diferenciación dopaminérgica y neuronal se vería aumentado.

Por último, recientemente se ha reportado el desarrollo del protocolo de diferenciación sobre una línea de células ES que sobreexpresan a *Bcl-XL* bajo el promotor EF1 α . *Bcl-XL* es un antiapoptótico miembro de la familia de *Bcl2*, que se ha asociado a la protección de la muerte celular de varios tipos neuronales. Al aplicar el protocolo de diferenciación a esta línea de células ES, la proporción de células en apoptosis disminuye significativamente sobre todo durante la selección y expansión de los precursores neurales. Por otro lado, la proporción de neuronas y neuronas dopaminérgicas reportada aumenta en relación a la línea silvestre, en porcentajes similares a los que nosotros observamos para la línea Ab2.2C2 (Shim *et al.*, 2004). Esta coincidencia permite plantear la posibilidad de que parte de la muerte celular asociada al desarrollo del protocolo de diferenciación dopaminérgica (que se protege al sobreexpresar a *Bcl-XL*) se produce a causa de estrés oxidativo, por lo cual, al proteger del estrés a las células sobreexpresando la catalasa, los resultados que se obtienen son similares. Será interesante realizar conteos de células en apoptosis durante las distintas etapas del protocolo de diferenciación en esta línea para analizar si existe, al igual que

en la línea que sobreexpresa a Bcl-XL, una reducción en la muerte celular programada. También sería importante realizar ensayos de actividad de catalasa para ver en que poblaciones se mantiene activa durante el protocolo de diferenciación.

Como se mencionó anteriormente, el promotor EF1 α parece expresarse únicamente en la población de precursores neurales y apagarse en las neuronas maduras (Zeng *et al.*, 2003). Si Bcl-XL presenta este patrón de expresión, entonces al igual que lo que puede ocurrir en el caso de la catalasa, ejercería su efecto antiapoptótico sobre la población de precursores neurales y no sobre las neuronas maduras durante el desarrollo del protocolo de diferenciación dopaminérgica.

CONCLUSIONES

Establecimiento del protocolo de diferenciación neuronal.

1) El protocolo de diferenciación neuronal dopaminérgica a partir de las células ES se estableció exitosamente en el laboratorio, obteniendo un porcentaje de estas neuronas que se encuentra dentro del rango reportado.

2) Durante la etapa de selección, la densidad de EBs adheridos no afecta el porcentaje de obtención de precursores neurales.

Efectos generales de Shh y Fgf8.

1) Shh y Fgf8 promueven el incremento del número total de células del cultivo (20%).

2) Shh y Fgf8 contribuyen en la expansión de una proporción de los precursores que no se expanden en presencia de sólo Fgf2.

3) Shh y Fgf8 no tienen un efecto en la proliferación de los precursores identificados mediante el ensayo clonal por lo cual, el mecanismo a través del cual promueven su efecto puede ser: sobrevivencia (no se pudo evaluar con TUNEL) o instrucción durante las fases tempranas de la expansión.

Pérdida de la expresión de la GFP durante el protocolo de diferenciación.

1) Al aplicar el protocolo a la línea R1B5 la expresión de la GFP bajo el promotor CMV-actina se interrumpe durante la etapa de diferenciación en un alto porcentaje de las células (80%).

Optimización del protocolo de diferenciación.

1) Al aplicar el protocolo de diferenciación a la línea Ab2.2C2, el porcentaje de neuronas aumenta en un 20% del número total de células y el porcentaje de neuronas TH+ aumenta en un 10% sobre el número total de neuronas (resultado a confirmar de manera estadística).

Explantos embrionarios

1) Los precursores neurales generados a partir de las células ES son capaces de integrarse al tejido embrionario mesencefálico y diferenciar de manera eficiente hacia el linaje neuronal.

PERSPECTIVAS.

El protocolo de diferenciación neuronal dopaminérgica a partir de células ES establecido como parte de esta tesis provee al laboratorio de una herramienta de gran utilidad que servirá para abordar diversas interrogantes. Algunas de ellas surgen de los resultados obtenidos en este trabajo y se plantean a continuación.

Identificación de precursores neurales únicos.

Con respecto al análisis de los procesos que ocurren a nivel del precursor dopaminérgico, sería interesante buscar otros sistemas en donde puedan llevarse a cabo análisis clonales, como por ejemplo utilizar a la línea de células ES que expresan a LacZ de manera constitutiva y analizar si, a diferencia de la GFP, la expresión del reportero se mantiene a lo largo del protocolo de diferenciación. Esta posibilidad sería útil si el silenciamiento de la GFP se debe a la inestabilidad de la proteína en el cultivo; sin embargo, si la causa de la falta de expresión se debe a un evento epigenético, una solución alternativa consistiría en realizar infecciones transitorias con adenovirus que expresan a la GFP para así evitar las alteraciones que puedan llevarse a cabo en el genoma de las células. Otra estrategia que serviría para estabilizar la expresión de la GFP durante el protocolo consistiría en flanquear al promotor (CMV-actina) y al marco de lectura de la GFP con elementos aisladores o "insulators" que protegieran al transgene de la influencia de elementos externos de regulación.

Una alternativa al ensayo clonal para identificar al precursor dopaminérgico en el cultivo sería realizar una combinación de inmunocitoquímicas durante las etapas de expansión y diferenciación que permitan identificar al precursor proliferante. Como se mencionó anteriormente, en ésta población se expresan marcadores tales como la Aldh1, Lmx1b y En1/2, mientras que tanto en el precursor post-mitótico como en la neurona madura se expresan la TH, Ptx3 y Nurr1. Como los marcadores del precursor proliferante no son exclusivos de los precursores dopaminérgicos, la razón entre ambos serviría para inferir la proporción de precursores afectados por las condiciones de cultivo a las que se sometían (p.ej en presencia o ausencia de Shh y Fgf8).

Sobre el mecanismo de acción de Shh y Fgf8.

En cuanto al papel de Shh y Fgf8 en la determinación dopaminérgica, para distinguir si los factores actúan a través de un mecanismo inductivo o selectivo a nivel del

precursor, pueden aplicarse pulsos cortos de factores al inicio de la expansión. Si los factores actúan de manera únicamente inductiva sobre el precursor dopaminérgico, entonces el resultado del protocolo debe ser similar al obtenido expandiendo con los factores por seis días. En el caso de actuar de manera selectiva, un pulso de los factores al inicio de la expansión sería insuficiente para obtener una proporción de neuronas dopaminérgicas que se encuentre dentro del rango esperado.

Otro acercamiento que permitiría analizar el papel de Shh en el protocolo de diferenciación sería desarrollarlo sobre una línea de células ES que actualmente se está generando en el laboratorio, la cual expresa constitutivamente una forma dominante negativa de Patched (Ptc). Como se comentó en la introducción de este trabajo, Ptc es un receptor membranal de Shh que en ausencia de ligando induce la muerte celular de células neuroepiteliales. En presencia de Shh, Ptc se inactiva y la muerte celular se inhibe; por lo tanto, si Shh juega un papel como factor de sobrevivencia en la determinación dopaminérgica, al desarrollar el protocolo de diferenciación sobre esta línea de células ES en ausencia de Shh, el porcentaje de neuronas dopaminérgicas debería mantenerse dentro del rango reportado.

Todos los ensayos presentados en este trabajo utilizan a Shh y Fgf8 en conjunto; no obstante, una vez establecido alguno de los sistemas de identificación de precursores individuales planteados anteriormente, sería importante analizar el efecto que presentan estos factores por separado en la determinación dopaminérgica, ya que es posible que actúen de manera secuencial y/o que uno de ellos ejerza un mecanismo instructivo y el otro selectivo.

Optimización del protocolo de diferenciación dopaminérgica.

A partir de los resultados del protocolo de diferenciación sobre la línea de células ES que sobreexpresan la catalasa, a continuación sería importante analizar cuidadosamente todas las etapas del protocolo, para así distinguir en que momento y población se está llevando a cabo el efecto que conlleva al aumento de las neuronas, así como de las neuronas dopaminérgicas. Por otro lado, podría evaluarse la proporción de células en apoptosis durante las diferentes fases del protocolo, para así analizar si la protección ante el estrés oxidativo que provee la catalasa promueve la sobrevivencia celular del cultivo. En este mismo sentido, será interesante desarrollar el protocolo de

diferenciación dopaminérgica en otras líneas que sobreexpresan enzimas antioxidantes que actualmente se están estableciendo en el laboratorio.

Por último, será importante proseguir con los experimentos en explantes embrionarios para evaluar el potencial diferenciativo de los precursores neurales generados a partir de células ES. La combinación de ensayos (en el explante e *in vitro*) nos permitirá analizar la plasticidad de los precursores provenientes de las células ES e identificar el tipo de señales que se requieren para hacer más eficiente a la diferenciación dopaminérgica.

Impacto en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

En la actualidad, la clonación terapéutica es una de las estrategias más prometedoras en el tratamiento de enfermedades como el mal de Parkinson; por lo tanto, las células ES y los precursores o neuronas dopaminérgicas que de ellas se derivan poseen un valor clínico muy elevado. La posibilidad de obtener el material celular requerido por un paciente a partir de la generación de su propia línea de células ES y la aplicación de este tipo de protocolos de diferenciación, realza la importancia de conocer a profundidad los eventos que en ellos se llevan a cabo y motiva la búsqueda de los puntos clave que optimizarán la obtención del fenotipo deseado.

A partir de los resultados presentados en este trabajo surgen inquietudes con respecto a la estabilidad genómica de las células generadas durante el protocolo de diferenciación dopaminérgica. Será determinante diagnosticar si los procesos que ocurren *in vitro* alteran el comportamiento de estas células y evaluar cuidadosamente su capacidad de respuesta a las señales de un entorno determinado.

BIBLIOGRAFÍA.

Anthony TD, Chelín C, Fhisell G y Heintz N. 2004. **Radial glia serves as neuronal progenitors of the central nervous system.** *Neuron*, 41: 881-890.

Baizabal JM, Furlan-Magaril M, Santa-Olalla J y Covarrubias L. 2003. **Neural stem cells in development and regenerative medicine.** *Archives of Medical Research*, 34:572-588.

Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V y Le Bourhis X. 2000. **Fgf signals for cell proliferation and migration through different pathways.** *Cytokine Growth Factor*, 11: 295-302.

Bouchard M, Pfeffer P y Busslinger M. 2000. **Functional equivalence of transcription factors Pax2 y Pax5 in mouse development.** *Development*, 127: 3703-3713.

Brivanlou AH, Gage FH, Jaenisch R, Jessel T, Melton D y Rossant J. 2003. **Setting standards for human embryonic stem cells.** *Science*, 300: 913-916.

Castro DS, Hermanson E, Joseph B, Warrén Á, Aarnisalo P, Heller A y Perlmann T. 2001. **Induction of cell cycle arrest and morphological differentiation by Nurr1 and retinoids in dopamine MN9D cells.** *Journal of Biological Chemistry*, 276:43277-43284.

Castelo-Branco G, Wagner J, Rodríguez JF, Kele J, Sousa K, Rawal N, Pasolli HA, Fuchs E, Kitajewski J y Arenas E. 2003. **Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a y Wnt-5a.** *Proceedings of the National Academy of Science*, 100:12747-12752.

Charrier JB, Lapointe F, Le Douarin NM y Teillet MA. 2001. **Anti-apoptotic role of sonic hedgehog protein at early stages of nervous system organogenesis.** *Development*, 128: 4011-4020.

Chi LC, Martinez S, Wurst W y Martín GR. 2003. **The isthmic organizer signal Fgf8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum.** *Development*, 130: 2633-2644.

Chung S, Sonntag KC, Andersson T, Bjorklund LM, Park JJ, Kim DW, Kang UJ, Isacson O y Kim KS. 2002. **Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons.** *The European Journal of Neuroscience*, 16:1829-1838.

- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM y Álvarez-Buylla A. 1999. **Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain.** Cell, 97: 703-716.
- Dawson TM y Dawson VL. 2002. **Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease.** Nature Neuroscience, 5:1058-1061.
- Draper JS y Fox V. 2003. **Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal.** Archives of Medical Research, 34: 558-564.
- Gage FH. 2000. **Mammalian neural stem cells.** Science 287: 1433-1438.
- Gilbert SF. 2003. **Developmental biology.** Sinauer Associates, Inc. Massachussets, 345-464.
- Goridis C y Rohrer H. 2002. **Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons.** Nature Neuroscience, 3: 531-541.
- Ho SC y Scott MP. 2002. **Sonic hedgehog in the nervous system : functions, modifications and mechanisms.** Current Opinion in Neurobiology, 12:57-63.
- Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, David CA y Rossant J. 1991. **Subtle cerebellar phenotype in mice homocygous for a targeted deletion of the *En-2* homeobox.** Science, 251: 1239-1243.
- Joyner AL, Liu A y Millet S. 2000. ***Otx2*, *Gbx2* y *Fgf8* interact to position and mantain a mid-hindbrain organizer.** Current Opinion in Cell Biology, 12: 736-741.
- Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI y Sasai Y. 2000. **Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity.** Neuron, 18: 31-40.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumeisky N, Lee SH, Nguyen J, Sánchez-Pernaute R, Bankiewicz K y McKay R. 2002. **Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease.** Nature, 418: 50-56.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H y Gage FH. 1996. **Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation.** Journal of Neuroscience, 16: 2027-2033.

Label M, Gauthier Y, Moreau A y Drouin J. 2001. **Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site.** Journal of Neurochemistry, 77: 558-567.

Lai K, Kaspar KB, Gage FH y Schaffer DV. 2003. **Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation *in vitro* and *in vivo*.** Nature Neuroscience, 6: 21-27.

Lee SH, Lumeisky N, Studer L, Auerbach JM y McKay RD. 2000. **Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells.** Nature Biotechnology, 18: 675-679.

Lie DC, Dzievczapolski G, Willhoite A, Kaspar B, Shults CW y Gage FH. 2002. **The adult *substantia nigra* contains progenitor cells with neurogenic potential.** Journal of Neuroscience, 22: 6639-6649.

Lillien L y Raphael H. 2000. **Bmp and Fgf regulate the development of Egf-responsive neural progenitor cells.** Development, 127: 4993-5005.

Mansergh FC, Wride MA y Rancourt DE. 2000. **Neurons from stem cells: Implications for understanding nervous system development and repair.** Biochemistry and Cell biology, 78: 613-628.

Muñoz-Sanjuán I y Brivanlou HA. 2002. **Neural induction, the default model and embryonic stem cells.** Nature Neuroscience, 3: 271-280.

Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M y McKay RD. 1996. **Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*.** Mechanisms of Development, 59: 89-102.

Pfeffer PL, Bouchard M y Busslinger M. 2000. **Pax2 and homeodomain proteins cooperatively regulate a 435pb enhancer of the mouse *Pax5* gene at the midbrain-hindbrain boundary.** Development, 127:1017-1028.

Reynolds BA y Weiss S. 1996. **Clonal and population analyses demonstrate that an Egf-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell.** Developmental Biology, 175: 1-13.

Rhinn M y Brand M. 2001. **The midbrain-hindbrain boundary organizer.** Current Opinion in Neurobiology, 11: 34-42.

Ruiz i Altaba A, Palma V y Dahmane N. 2002. **Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain.** Nature, 3: 24-33.

Rollestscek A, Chang H, Guan K, Czyz J, Meyer M y Wobus AM. 2001. **Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors.** Mechanisms of development, 105: 93-104.

Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD y Gage FH. 1999. **Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosin hydroxylase in neural progenitors cells derived from the adult brain.** Development, 126: 4017-4026.

Santa-Olalla J, Baizabal JM, Fregoso M, Cárdenas MC y Covarrubias L. 2003. **The *in vivo* positional identity gene expresión code is not preserved in neural stem cells grown in culture.** European Journal of Neuroscience, 18:1073-1084.

Santa-Olalla J y Covarrubias L. 1995. **Epidermal growth factor (Egf), transforming growth factor alfa (Tgf- α), and basic fibroblast growth factor (bFgF) differentially influence neural precursor cells of mouse embryonic mesencephalon.** Journal of Neuroscience Research, 42:172-183.

Santa-Olalla J y Covarrubias L. 1999. **Basic fibroblast growth factor promotes epidermal growth factor responsiveness and survival of mesencephalic neural precursor cells.** Journal of Neurobiology, 40:14-27.

Shamim H, Mahmood R, Logan C, Doherty P y Lumsden A. 1999. **Sequential roles of Fgf4, En1 y Fgf8 in specification and regionalisation of the midbrain.** Development, 126: 945-959.

Shim JW, Koh HC, Chang MY, Roh E, Choi CY, Oh YJ, Son H, Lee YS, Studer L y Lee SH. 2004. **Enhanced *in vitro* midbrain dopamine neuron differentiation, dopaminergic function, neurite outgrowth and 1-methyl-4-phenylpyridium resistance in mouse embryonic stem cells overexpressing Bcl-XL.** The Journal of Neuroscience, 24: 843-852.

Simon HH, Bhatt L, Gherbassi D, Sgadó P y Alberi L. 2003. **Midbrain dopaminergic neurons: determination of their developmental fate by transcription factors.** Annals of the New York Academy of Science, 991: 36-47.

Simon HH, Saueressig H, Wurst W, Goulding MD y O'Leary DDM. 2001. **Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the *engrailed* genes.** The Journal of Neuroscience, 21: 3126-3134.

- Smidt MP, Asbreuk CHJ, Cox JJ, Chen H, Johnson RL y Burbach PH. 2000. **A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b.** *Nature*, 3: 337-341.
- Smith JL y Schoenwolf GC. 1997. **Neurulation: coming to closure.** *Trends in Neuroscience*, 20: 510-517.
- Sonntag KC, Simantov R, Kim KS e Isacson O. 2004. **Temporally induced Nurr1 can induce a non-neuronal dopaminergic cell type in embryonic stem cell differentiation.** *European Journal of Neuroscience* 19: 1141-1152.
- Stavridis, MP y Smith AG. 2003. **Neural differentiation of mouse embryonic stem cells.** *Biochemical Society Transactions*, 31: 45-49.
- Storm EE, Rubenstein JL y Martín GR. 2003. **Dosage of Fgf8 determines whether cell survival is positively or negatively regulated in the developing forebrain.** *Proceedings of the National Academy of Science*, 100:1757-1762.
- Studer L, Csete M, Sang-Hun Lee, Kabbani N, Walikonis J, Wold B y McKay RD. 2000. **Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen** *The Journal of Neuroscience*, 20: 7377-7383.
- Svendsen CN y Smith AG. 1999. **New prospects for human stem-cell therapy in the nervous system.** *Trends in Neuroscience*, 22: 357-364.
- Tanabe Y y Jessel MT. 1996. **Diversity and pattern in the developing spinal cord.** *Science*, 274: 1115-1123.
- Thibert Ch, Teillet MA, Lapointe F, Mazelin L, Le Douarin NM y Mehlen. 2003. **Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog.** *Science*, 301: 843-301.
- Tropepe T, Hitoshi S, Sirdad C, Mak T Rossant J y van der Kooy D. 2001. **Direct neural fate specification from embryonic stem cells: A primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism.** *Neuron*, 30:65-78.
- Van den Munckhof P, Luk KC, Ste-Marie L, Montgomery J, Blanchet PJ, Sadikot AF y Drouin J. 2003. **Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons.** *Development* , 130: 2535-2542.

- Wakayama T, Tabar V, Rodríguez I, Perry ACF, Studer L, y Mombaerts P. 2001. **Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer.** Science, 292: 740-742.
- Wallén A y Perlmann T. 2003. **Transcriptional control of dopamine neuron development.** Annals of the New York Academy of Science, 991: 48-60.
- Wessely O y De Robertis EM. 2002. **Neural plate patterning by secreted signals.** Neuron, 33: 489-484.
- Westmoreland JJ, Hancock R y Condie BG. 2001. **Neuronal development of embryonic stem cells: A model of GABAergic neuron differentiation.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 284: 672-680.
- Wichterle H, Porter LJ y Jessell TM. 2002. **Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons.** Cell, 110: 385-297.
- Wurst W, Auerbach AB y Joyner AL. 1994. **Multiple developmental defects in engrailed-1 mutant mouse: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum.** Development, 120: 2065-2074.
- Wurst W y Bally-Cuif L. 2001. **Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer.** Nature Neuroscience, 2:99-108.
- Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA y Rosenthal A. 1998. **Fgf y Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate.** Cell, 93: 755-766.
- Ying QL, Nichols J, Chambers I y Smith A. 2003. **Bmp induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with Stat3.** Cell, 115: 281-292.
- Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M y Smith A. 2003. **Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture.** Nature biotechnology, 21:183-186.
- Zeng X, Chen J, Sánchez JF, Coggiano M, Dillon-Carter O, Petersen J y Freed WJ. 2003. **Stable expression of hrGFP by mouse embryonic stem cells: promoter activity in the undifferentiated state and during dopaminergic neural differentiation.** Stem Cells, 21: 647-653.

Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Jasson AM. 2003. **Evidence for neurogenesis in the adult mammalian *substantia nigra***. Proceeding of the National Academy of Science USA, 100: 7925-7930.