



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD CIENCIAS

CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN
QUE CONTIENEN EL GEN DE NEUROGENINA 1
PARA SU SOBREEXPRESIÓN EN CÉLULAS
TRONCALES EMBRIONARIAS

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 :

E R I K A S Á N C H E Z C R U Z



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

DIRECTOR DE TESIS :
DR. JAIME IVAN VELASCOVELÁZQUEZ

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Iván por darme la oportunidad de hacer este proyecto, por enseñarme y asesorarme en todo lo necesario para la realización de esta tesis.

A la Dra. Bertha González Pedrajo, al Dr. Félix Recillas Targa por su asesoría y a la Dra. Diana Escalante Alcalde por la donación del plásmido pcDNA3.1/Hygro.

A mis sinodales, por su apoyo y sus comentarios para esta tesis.

A mis profesores que con sus clases enriquecieron mi mundo y mi pensamiento, porque el conocimiento que me brindaron el cual va a ser transmitido y usado de la mejor manera.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), con el proyecto IN226703 por el apoyo económico para la realización de esta tesis y por la beca que recibí.

GRACIAS . . .

A todos los miembros de mi familia: mis padres que son las primeras personas en darme su amor y cariño, por creer en mi, por apoyarme en todo lo que me he propuesto y he hecho; a mis hermanos: Beto, Yadis, Hugo y Kary, los quiero mucho, por soportarme durante tantos años y porque siempre me han dicho mis virtudes y defectos, ¡nunca dejen de hacerlo!

A todos los miembros del laboratorio AL-101 Iván, Anayansi, Emmanuel, Fabián, Nidia, Philip y Raquel, por ser mis amigos y por ayudarme en todo lo que han podido. Anayansi por tu paciencia, por ser mi amiga y por ser una persona crítica en lo que hago, gracias por todas las revisiones de este trabajo. Emmanuel por todos los buenos momentos, Fabián por tu apoyo y críticas, Nidia por tu amistad y comprensión. Raquel por tu amistad, confianza y apoyo.

A mis amigos de toda la vida: Fco. Carlos, Oscar, David, Mónica, Clementina, Guillermo, Nallely, Azucena, Karla, Sandra, Iván, Genaro, Ángeles, Ángel, Sandra, Karina, Fabiola, Andrea, Roberto, Karina, Sinué, Felipe, Christian, Alex, Roberto, Dianita, Perla, Iriliana, Jorge, Imuris, Jacqueline, Tere, Claudia, Ángel, Norma, Dulce, Eden, ErikaA, Fabiola, Mónica, Rocío, Valentina y René.

A las Amazonas porque gracias a su entrañable amistad la carrera fue más divertida, agradable y sencilla. **DMM**: por brindarme tu amistad, tu confianza y por saber escucharme, **ERF**: por ser una niña muy tierna que tratas de ayudarnos a todas, **EAV**: porque desde el primer día de clases estas conmigo y a lo largo de la carrera nunca dejaste de que se perdiera nuestra amistad desde entonces hemos pasado amenos momentos juntas, **FRG**: por tu inmensa sonrisa que nunca nos dejó además de que nunca perdiste el ritmo ♪, **MEP**: por guardar siempre la calma, por ser una persona objetiva y tierna, **RMR**: por no perder nunca tu esencia, tu alegría y el estar a mi lado apoyándome en todo, **VLP**: porque nunca dejaste de hablar y decir aquí estoy.

Gracias a todos y cada uno de ustedes por llenar mi vida de alegría, de sabiduría, de amistad, de amor y de cariño . . . los quiero mucho y siempre van a estar en mi corazón.

ÍNDICE

Resumen 3
Introducción 4
1. Células troncales 4
2. Células troncales pluripotentes 6
3. Diferenciación neural de células troncales embrionarias 9
4. Células troncales neurales. 10
5. Factores que influyen en la diferenciación de células troncales neurales 12
5.1 Familia de proteínas Hélice Asa Hélice con región básica (bHLH) 14
5.2 Familia de proteínas de las Neurogeninas 18
5.2.1 Neurogenina 1 19
Justificación 22
Objetivo general 23
Objetivos específicos 23
Metodología 24
1. Transformación. 24
2. Extracción de DNA plasmídico por el estuche de <i>QIAGEN (Miniprep)</i> 24
3. Electroforesis en geles de agarosa al 1% 26
4. Secuenciación 26
5. Análisis de vectores 27
6. Restricción enzimática de DNA. 29
7. Extracción de DNA a partir de gel por el estuche de <i>QIAGEN (gel extraction)</i> 30
8. Ligación 31
9. Extracción de DNA en grandes cantidades por el estuche de <i>QIAGEN (Maxiprep)</i> 31
10. Cultivo celular de fibroblastos 33

11. Inactivación de fibroblastos 34
12. Expansión de células troncales embrionarias de ratón de la línea celular R1 35
13. Congelación de células 36
14. Electroporación 36
Resultados 38
1. Amplificación y purificación de DNA 38
2. Análisis de secuencia y de plásmidos 39
3. Restricción enzimática de los plásmidos. 41
4. Extracción de DNA a partir de gel 42
5. Ligación de los diferentes fragmentos de DNA 43
6. Purificación de los vectores: pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA3.1/Hygro-Ngn1 43
7. Digestión de los vectores: pcDNA3.1/Neo-Ngn1, pcDNA 3.1/Hygro-Ngn1 46
8. Extracción de DNA plasmídico en grandes cantidades 48
9. Cultivo celular e inactivación de fibroblastos 49
10. Expansión de células de troncales embrionarias 50
11. Electroporación de vectores en células troncales embrionarias 51
Discusión 52
Conclusiones 55
Perspectivas 56
Apéndice 57
I. Abreviaturas. 57
II. Soluciones 59
Referencias 66

RESUMEN

Los procesos de diferenciación neuronal son indispensables para la formación del sistema nervioso central. La diferenciación de células troncales neurales está influenciada por la expresión de factores transcripcionales que regulan genes importantes para la adquisición de un fenotipo neuronal. El papel de la Neurogenina 1 en la diferenciación neuronal de células troncales neurales multipotentes ha sido establecido recientemente, sin embargo, no se conoce si la expresión de Neurogenina 1 es capaz de diferenciar a células troncales embrionarias (pluripotentes) hacia neuronas.

El objetivo principal de este trabajo consistió en construir vectores para la expresión de Neurogenina 1 (*Ngn1*) en células troncales embrionarias (*ES*, por sus siglas en Inglés), las cuales tienen la característica de autorenovarse y dar lugar a diferentes linajes celulares. Los vectores de expresión que se utilizaron en este proyecto incluyeron genes que confieren resistencia a higromicina o neomicina. Esta característica permitirá seleccionar las células *ES* de la línea R1, al ser transfectadas por electroporación con dichas construcciones que contienen la resistencia, permitiendo la selección de colonias utilizando los antibióticos higromicina o neomicina.

Las enzimas de restricción utilizadas en este proyecto se seleccionaron por estar presentes en los tres tipos de vectores con los que se trabajó, lo anterior con la finalidad de obtener extremos cohesivos compatibles con los vectores para su posterior inserción. Se obtuvieron dos tipos de vectores que contenían la secuencia de *Ngn1*. Estas construcciones se utilizarán en el laboratorio para estudiar el efecto de la sobreexpresión de *Ngn1* en células *ES* para estudiar la identidad de los tipos celulares resultantes.

INTRODUCCIÓN

1. Células troncales

Una célula troncal (*stem cell*, en Inglés) es definida como una célula autorenovable que es capaz de permanecer en estado indiferenciado, pero conserva la capacidad de diferenciarse a uno o más tipos de células especializadas (Morrison *et al.*, 1997; Thomson *et al.*, 1998a, b; Thomson y Marshall, 1998; Thomson y Odorico, 2000; Odorico *et al.*, 2001; Weissman, 2000a, b; Temple, 2001). La autorenovación es un proceso mediante el cual una célula troncal (CT) puede dividirse simétricamente dando lugar a dos células hijas, incrementando así el número de células troncales, o bien se divide asimétricamente para dar lugar a una célula troncal y una célula progenitora. Durante el desarrollo y en el estado adulto, las CT son responsables de crecer y regenerar a los tejidos (Mayani, 2003; Majka *et al.*, 2005). El mantenimiento de nichos que subsisten en regiones restringidas, así como la diferenciación de las CT depende de una mezcla de factores de crecimiento, proteínas de matriz extracelular y de otras células que en su conjunto constituyen un ambiente en el cual las CT pueden proliferar y diferenciarse (Weissman, 2000a, b; Czyz y Wobus, 2001; Moore *et al.*, 2002; Majka *et al.*, 2005). Entre una CT y una célula madura existe una gran diversidad de estados intermedios. Las CT se han clasificado en: 1) células troncales totipotenciales que son las más primitivas (el ovocito fecundado) y tienen la habilidad de dar lugar a todos los tipos celulares del embrión y la parte embrionaria de la placenta, 2) las células troncales pluripotentes como las células troncales embrionarias que originan solamente a células del embrión (células de las tres capas embrionarias: ectodermo, endodermo y mesodermo) y 3) células troncales multipotentes que producen algunos linajes pero no todos los tipos celulares y generalmente se restringen a un tejido particular (Baizabal *et al.*, 2003; Lemoli *et al.*, 2005).

Estas células multipotentes pueden ser aisladas de diferentes órganos de los animales adultos o en desarrollo, como por ejemplo el hígado (Alison *et al.*, 2004), el corazón (Beltrami *et al.*, 2003) y el cerebro (Eriksson *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 1999). En organismos adultos

también existen células troncales para músculo, sangre y piel (Jan y Jan, 1994). En el caso del sistema nervioso, existen CT multipotentes presentes durante el desarrollo de mamíferos y que persisten en regiones restringidas del cerebro adulto (Fig. 1).

POTENCIAL DE LAS CÉLULAS TRONCALES CON DESTINO NEURAL

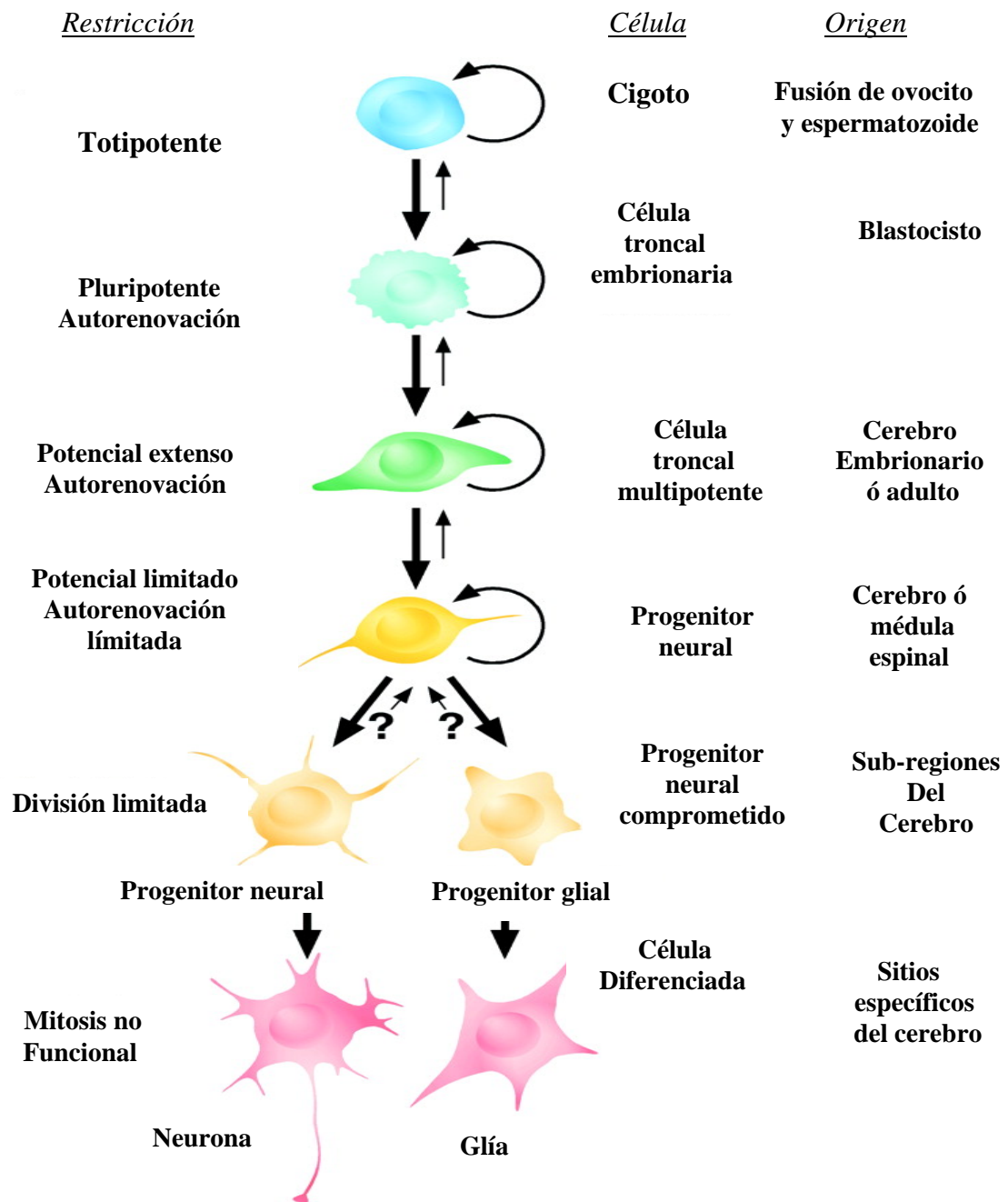


Fig. 1. Clasificación de las células troncales con potencial neural (Tomada de Gage, 2000).

2. Células troncales pluripotentes

Hasta el momento se han aislado tres tipos de CT pluripotentes (Fig. 2): las células troncales embrionarias (ES), las células troncales del carcinoma embrionario (EC) y las células troncales germinales embrionarias (EG).

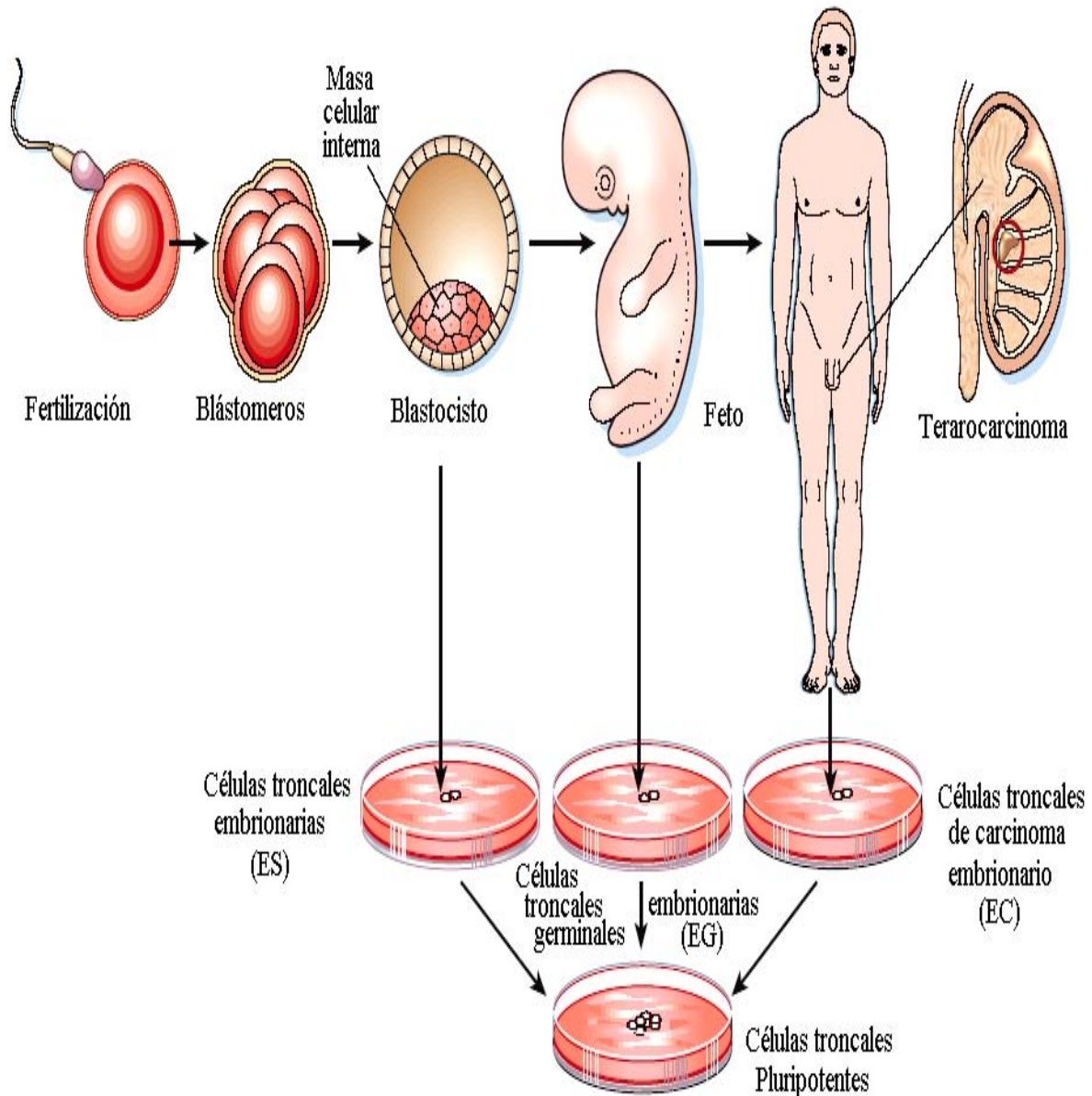


Fig. 2. Obtención de las diferentes células troncales pluripotentes ES, EG, EC, para su posterior estudio in vitro (Tomada de Donovan y Gearhart, 2001).

Hay reportes del establecimiento de diversas líneas de CT en una gran diversidad de organismos, lo que ha facilitado el estudio de estos tipos celulares pluripotenciales (Tabla 1).

Tabla 1. Células troncales pluripotentes de las que se han generado líneas celulares (Modificada de Donovan y Gearhart, 2001).

	Células troncales embrionarias (ES)	Células troncales de carcinoma embrionario (EC)	Células troncales germinales embrionarias (EG)
ORIGEN	Derivadas de la masa celular interna de embriones pre-implantados	Obtenidas de tumores de testículo	Derivadas de primordios germinales (PGC) de embriones post-implantados
CARIOTIPO	Euploide	Heteroploide	Euploide
FORMACIÓN DE QUIMERAS	Células somáticas y germinales	Células somáticas	Células somáticas y germinales
FOSFATASA ALCALINA	+	+	+
ACTIVIDAD DE TELOMERASA	+	+	+
Oct-4	+	+	+
DIFERENCIACIÓN <i>in vitro</i>	+	+	+
REFERENCIAS DE AISLAMIENTO DE DIFERENTES ESPECIES	Evans y Kaufman, 1981 Ratón Martin, 1981 Ratón Thomson, <i>et al.</i> 1995 Primate Thomson, <i>et al.</i> 1998b Humano	Martin, 1981 Ratón Henderson, <i>et al.</i> 2002 Humano	Resnick, <i>et al.</i> 1992 Ratón Shamblott, <i>et al.</i> 1998 Humano

Las células ES son derivadas de la masa celular interna de blastocistos (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981; Brook y Gardner, 1997) y crecen en colonias multicelulares con la capacidad de autorenovarse y diferenciarse en células de las tres capas embrionarias (Martin, 1981; Weissman, 2000a, b; Czyz y Wobus, 2001; Donovan y Gearhart, 2001; Weissman, 2002). Estas propiedades son mantenidas en las líneas celulares permaneciendo en estado indiferenciado en presencia de la citocina LIF (del Inglés, *leukemia inhibitory factor*), la cual activa una vía de señalización que promueve la autorenovación de las células ES de ratón (Rossant, 2001). Otra forma de mantener las

células ES en estado indiferenciado es cultivarlas sobre una monocapa de fibroblastos los cuales han sido inactivados mitóticamente.

Una manera de distinguir las células ES es por la expresión de marcadores específicos, como los antígenos de superficie SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 (del Inglés, *state-specific embryonic antigens*), los antígenos de reconocimiento tumoral (del Inglés, *tumor recognition antigen*) TRA-1-60 y TRA-1-81, de los factores transcripcionales Oct-4 y Nanog (Chambers *et al.*, 2003), por la fosfatasa alcalina (FA), y por su alta actividad de telomerasa (Thomson *et al.*, 1998b; Thomson y Marshall, 1998; Thomson y Odorico, 2000; Donovan y Gearhart, 2001).

Otras características importantes (Shamblott *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 1998a; Thomson y Odorico, 2000; Kim *et al.*, 2002) que presentan estas células son:

- Crecimiento como colonias compactas
- Cariotipo normal
- La capacidad para diferenciarse en cualquiera de los tipos celulares presentes en el embrión
- Proliferación prolongada en estado indiferenciado

Cuando las células ES son cultivadas bajo condiciones apropiadas, se pueden diferenciar en células cardíacas, hematopoyéticas, musculares, epiteliales, adipocitos, condrocitos (Czyz y Wobus, 2001) y células neurales (Bain *et al.*, 1995; Okabe *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 2000). Estas células han sido usadas como un modelo experimental para analizar eventos de diferenciación temprana (Reynolds *et al.*, 1992; Reynolds y Weiss, 1992; Czyz y Wobus, 2001).

Las células EC tienen características morfológicas y bioquímicas comunes con las células ES, por lo que han sido usadas como un modelo *in vitro* para el estudio del desarrollo embrionario (Martin, 1981; Donovan y Gearhart, 2001). Las células EC de ratón también presentan al antígeno SSEA-1 y una fuerte inmunoreactividad para FA, sin embargo la expresión de SSEA-1 disminuye al avanzar en el desarrollo embrionario, mientras que los antígenos SSEA-3 y SSEA-4 aumentan. De manera inversa a las células EC de ratón, las células EC de humano (hEC) expresan SSEA-3,

SSEA-4 y con la diferenciación disminuye la expresión de estos dos antígenos mientras que la de SSEA-1 aumenta (Henderson *et al.*, 2002). Las células hES también expresan SSEA-3 y 4 así como algunos antígenos de reconocimiento tumoral: TRA-1-60, TRA-1-81 y TRA-2-54, los cuales son característicos de células hEC (Henderson *et al.*, 2002). Estas semejanzas se asocian con el estado pluripotencial de las células ES y EC.

Las EG son células derivadas de los primordios germinales (PGC) de embriones post-implantados y comparten características de pluripotencialidad con las células ES y EC (Resnick *et al.*, 1992). Todas estas células troncales pluripotentes han sido objeto de diversos estudios *in vitro*, utilizando factores de crecimiento y técnicas de marcaje de linajes para su posterior selección y estudios de genotipificación, con la finalidad de obtener la diferenciación de un linaje específico (Czyz y Wobus, 2001).

3. Diferenciación neural de células troncales embrionarias

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que las células troncales embrionarias sembradas sobre una monocapa de células estromales son capaces de generar diversos linajes celulares del sistema nervioso, y que cuando son tratadas con diferentes factores de crecimiento pueden generar colonias de células precursoras neurales, las cuales son inmunoreactivas para marcadores de precursores neurales como nestina, moléculas de adhesión celular neural (NCAMs) y Musashi. La exposición temprana de señales epigenéticas como el *Sonic Hedgehog* (Shh) promueve la proliferación y la diferenciación de los tipos celulares neurales (Yeo y Gautier, 2004).

En cuanto a la diferenciación neuronal de las células ES de ratón, se sabe que sustancias como el ácido retinoico, factores de crecimiento fibroblástico (FGF) 4, FGF8 ó bFGF promueven el enriquecimiento de neuronas colinérgicas, serotoninérgicas, dopaminérgicas y gabaérgicas (Barberi *et al.*, 2003). La figura 3 muestra las diferentes condiciones para la obtención de los diferentes linajes neurales tanto en el tiempo como en los tratamientos que se combinaron con la actividad inductora derivada de células estromales (Kawasaki *et al.*, 2000; Barberi *et al.*, 2003).

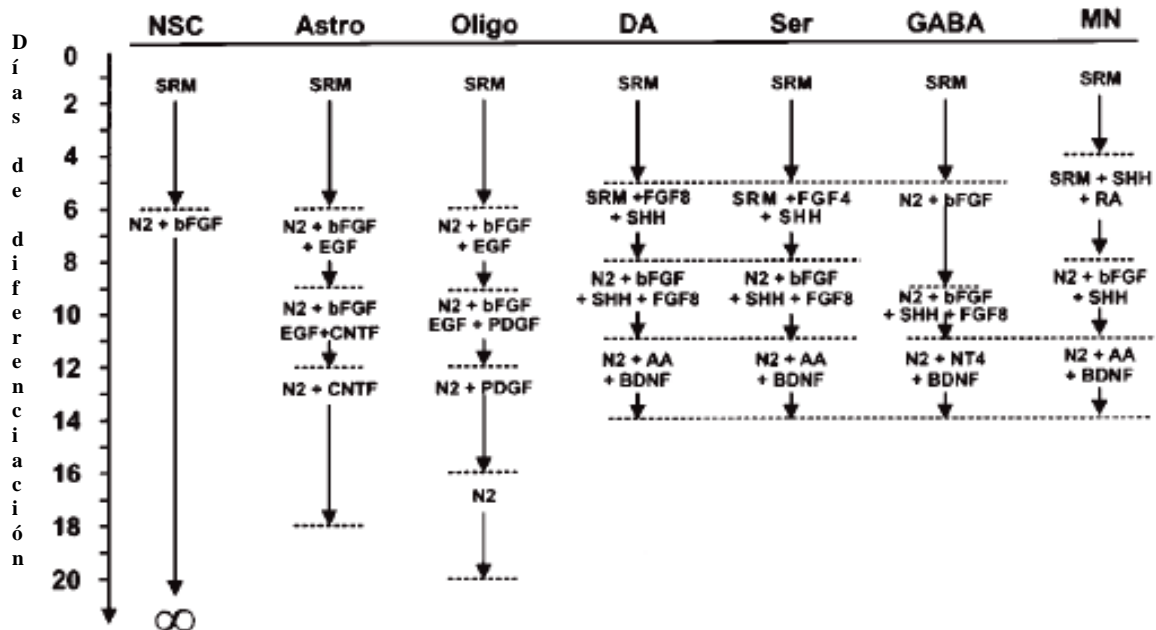


Fig. 3. Obtención de diferentes linajes neurales al diferenciar células ES. NSC: Células troncales neurales (del Inglés, neural stem cells). Astro: Astrocitos. Oligo: Oligodendrocitos. DA: Neuronas dopaminérgicas. Ser: Neuronas serotoninérgicas. GABA: Neuronas gabaérgicas. MN: Neuronas Motoras. SRM: Medio con reemplazo de suero. N2: Medio N2. bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico. EGF: Factor de crecimiento epidermal. CNTF: Factor neurotrófico ciliar. PDGF: Factor derivado de plaquetas. SHH: Sonic Hedgehog. AA: Ácido ascórbico. BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro. NT4: Neurotrofina 4. RA: Ácido retinoico. (Tomada de Barberi *et al.*, 2003).

Estudios recientes han demostrado que las células ES de primate y de ratón tratadas con la proteína morfogénica de hueso 4 (BMP 4) se diferencian hacia células de la cresta neural, y en particular se promueve la diferenciación hacia neuronas autónomas a concentraciones altas de BMPs, mientras que una baja concentración induce la formación de neuronas sensoriales. Además, se ha observado que el Shh induce la diferenciación de células de la placa del piso y el crecimiento axonal, promoviendo así la diferenciación a células con características del sistema nervioso central (SNC) ventral y suprimiendo los fenotipos dorsales (Mizuseki *et al.*, 2003).

4. Células troncales neurales

Como se mencionó antes, existen CT multipotentes específicas para determinado tejido. Las células troncales neurales (CTN) están presentes en el SNC en desarrollo y en regiones del cerebro adulto. Estas CT poseen la habilidad de autorenovarse y mantienen la capacidad de generar los tres tipos celulares del sistema nervioso: astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. Una CTN puede ser

derivada de células primitivas que tienen la capacidad de generar células troncales neurales y de otros tejidos (Fig. 1; Gage, 2000).

Las células troncales neurales aparecen durante la formación de la placa neural y son el tipo celular más abundante en el neuroectodermo temprano (Temple, 2001). Durante el desarrollo del tubo neural y las células troncales neurales llegan a ser menos abundantes y emergen células progenitoras más restringidas en su capacidad para generar los distintos tipos celulares (Baizabal *et al.*, 2003; Santa-Olalla *et al.*, 2003).

Las células del SNC y periférico pueden originar una población multipotente común de CTN durante estados tempranos del desarrollo (Fig. 4; Mujtaba *et al.*, 1999; Temple, 2001) y conforme el desarrollo va avanzando se van tornando más especializadas, lo que hizo suponer que en el adulto no se encontrarían células troncales neurales; sin embargo, se ha demostrado su presencia en zonas del sistema nervioso adulto como son la zona sub-granular (ZSG) del hipocampo y en la zona sub-ventricular (ZSV; Gage, 2000; Alvarez-Buylla *et al.*, 2001). Estas células ya están más comprometidas a producir linajes neurales específicos *in vivo*, además de que pueden aislarse y mantenerse en cultivo. Se ha propuesto que en estas regiones que contienen CT, existen nichos que semejan al ambiente embrionario-fetal y que permiten el mantenimiento de CTN en el adulto (Alvarez-Buylla y Lim, 2004).

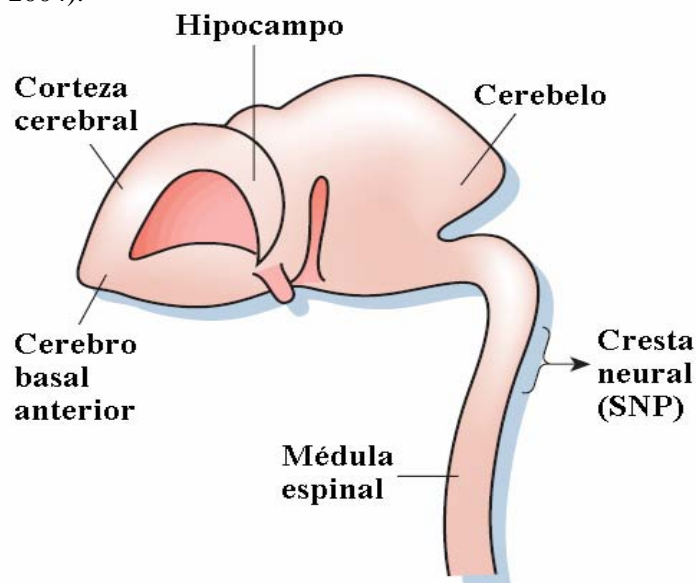


Fig. 4. Zonas de neurogénesis en el sistema nervioso fetal (Tomada de Temple, 2001).

5. Factores que influyen en la diferenciación de CTN

En el SNC, los precursores neurales generan neuronas y macroglía (astrocitos y oligodendrocitos). Estas CT se encuentran en la zona ventricular del tubo neural en desarrollo (Reynolds *et al.*, 1992; Reynolds y Weiss, 1992). Se ha reportado que ciertas moléculas de señalización promueven la proliferación y la diferenciación de las CTN *in vivo* e *in vitro* estas moléculas son: Notch, el factor de crecimiento fibroblástico (por sus siglas en Inglés, FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), BMPs y los factores de transcripción SOX (del Inglés, *SRY related HMG box*; Gajavelli *et al.*, 2004).

Notch es una proteína transmembranal que es activada por los ligandos Delta y Jagged, los cuales son también proteínas transmembranales expresadas por células vecinas (Gaiano *et al.*, 2000). La activación de Notch se da al liberarse el dominio intracelular, el cual es transferido al núcleo y forma un complejo con la proteína RBP-J que se asocia al DNA (Kageyama *et al.*, 2005). RBP-J es un regulador de la transcripción que reprime la expresión de Hes1 y 5 por unión al promotor de estos factores y cuando RBP-J forma un complejo con el dominio intracelular de Notch, este complejo activa la transcripción e induce la expresión de Hes1 y Hes5, indicando que éstos actúan como efectores esenciales de la señal de Notch. Los genes Hes son expresados por las células troncales neurales e inhiben la diferenciación neuronal y mantienen el estado de glía radial (Kageyama *et al.*, 2005).

FGF2 y EGF han sido identificados como factores que son requeridos para la proliferación de las células troncales neurales, además de que las bajas concentraciones de FGFs inducen neurogénesis y que el EGF diferencia las células en astrocitos (Gajavelli *et al.*, 2004).

El CNTF fue identificado primeramente como un factor soluble que ayuda a la supervivencia de neuronas ciliares de ganglios parasimpáticos de pollo, aunque después se mostró que tiene efectos sobre ciertas poblaciones de neuronas en el SNC; otra acción del CNTF es el aumento en la sobrevivencia de las neuronas motoras. El tratamiento *in ovo* con CNTF en los días embrionarios (E) E6 - E9 rescata una parte de las neuronas que normalmente mueren (Nagtegaal *et*

al., 1998). En ratones, la administración *in vivo* de CNTF incrementa la sobrevivencia en una fracción de neuronas motoras. El CNTF no tiene ningún efecto sobre el crecimiento y la diferenciación de motoneuronas espinales. Se conoce que el CNTF es sintetizado en astrocitos, además de que promueve la sobrevivencia y la maduración de cultivos de oligodendrocitos, estimulando la proliferación y la diferenciación de células progenitoras O-2A. Se cree que la diferenciación de los oligodendrocitos ocurre constitutivamente mientras que los astrocitos de tipo 2 requieren de señales extracelulares para la diferenciación. Se ha observado que la sobreexpresión de CNTF en ratones altera el número de oligodendrocitos, sugiriendo que CNTF puede jugar un papel en la diferenciación a oligodendrocitos (Nagtegaal *et al.*, 1998).

Las BMPs son proteínas secretadas que interactúan con receptores específicos. Los efectos de las BMPs sobre las CTN no son tan claros debido a la diferencia en los protocolos de aislamiento de células, edad de los embriones y las diferentes especies de roedores que se han utilizado (Gajavelli *et al.*, 2004). Se sabe que en los días E12 - E13 en la zona ventricular de ratón hay diferenciación neuronal, mientras que en estados tardíos la diferenciación se dirige hacia astrocitos. En cultivos de CTN de ratón de E14 se ha observado que las BMPs actúan sinérgicamente con CNTF promoviendo una diferenciación astrocítica, mientras que en el día E14 de rata, las CTN al diferenciarse dan lugar a una gran variedad de linajes en la cresta neural, a glía periférica e incluso hacia músculo liso, pero no astrocitos (Gajavelli *et al.*, 2004).

Los miembros de la subfamilia de factores transcripcionales *SoxB1* (*Sox1*, *Sox2* y *Sox3*), son coexpresados en el neuroepitelio para mantener el potencial mitótico propio del desarrollo y mantienen la identidad de las CTN. *Sox2* es expresado en el SNC adulto en la ZSV y en la ZSG en el giro dentado del hipocampo y se ha demostrado que en estas regiones *Sox2* es expresado en células precursoras en proliferación (marcadas con bromo deoxiuridina, BrdU), así como también en CTN aisladas del cerebro adulto y en precursores estudiados *in vitro*. Además, *Sox2* es expresado en el telencéfalo, y se ha demostrado que una delección en el potenciador de este gen, reduce su expresión en esta zona. La mutación en un alelo de *Sox2* en humanos está asociada con anoftalmia

(carencia de glóbulo ocular) y apoplejía (interrupción del suministro de sangre a cualquier parte del cerebro, lo que produce daño del tejido cerebral desencadenando problemas motores), mientras que otras mutaciones en un alelo de *Sox9* causan displasia. Se ha demostrado que la inhibición de *Sox2* usando construcciones de dominantes negativos promueve la diferenciación prematura de precursores debido a la salida del ciclo celular, la pérdida en la expresión de proteínas propias de progenitores y la adquisición de marcadores neuronales tempranos (Episkopou, 2005).

5.1. Familia de proteínas Hélice Asa Hélice con región básica (bHLH)

Existe una gran variedad de proteínas que promueven o reprimen la transcripción génica. El DNA se une con proteínas, mediante secuencias consenso de aproximadamente 10-20 pb. Estos sitios de reconocimiento tienen una alta afinidad por algunas proteínas y la interacción requiere de una cierta conformación de estas proteínas para que posteriormente se forme el complejo proteína-DNA y como consecuencia se lleve a cabo el cambio estructural del DNA que permitirá la transcripción (Acosta-Viana y Zavala-Castro, 1996).

Un tipo de proteínas que interacciona con el DNA son las proteínas bHLH que conforman una familia muy grande. Su estructura de unión al DNA está formada por dos α hélices, las cuales constan de 30-40 residuos de aminoácidos y están unidas por un asa. También contienen una región básica que es rica en arginina y lisina la cual consta de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos y esta región es la responsable de unirse al surco mayor del DNA (Pabo y Sauer, 1992; Massari y Murre, 2000). El dominio HLH promueve la dimerización entre proteínas iguales o entre diferentes miembros de la familia para la formación de homodímeros o heterodímeros respectivamente (Johnson *et al.*, 1992; Ledent *et al.*, 2002).

Todos los factores de la familia bHLH comparten un 80% de identidad en el dominio HLH y sus miembros se caracterizan por la presencia de un dominio básico adyacente (Fisher *et al.*, 1992). La región básica y la hélice 1 del dominio bHLH forman una larga α hélice que es conectada por la región del asa a la hélice 2 (Fig. 5; Bertrand *et al.*, 2002).

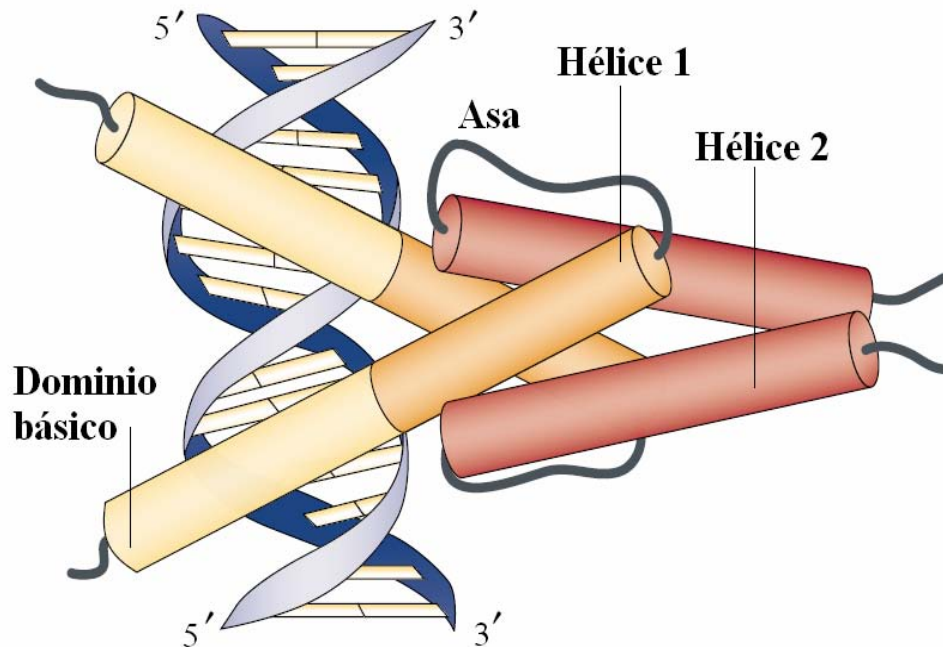


Fig. 5. Conformación de un dímero de una proteína bHLH y su interacción con el DNA. Solamente se señalan los motivos estructurales de una subunidad. (Tomada de Bertrand *et al.*, 2002).

El dominio básico de estas proteínas controla la unión a la secuencia consenso del DNA, la cual contiene seis nucleótidos: citosina, adenina, nucleótido, nucleótido, timina y guanina (CANNTG) y es conocida como la caja E (E-box; Bertrand *et al.*, 2002), y funciona como una secuencia de reconocimiento en los promotores y potenciadores de ciertos genes (Acosta-Viana y Zavala-Castro, 1996).

Para que ocurra la transcripción, es necesaria la interacción de heterodímeros con coactivadores, este proceso es llamado transactivación. En el caso de las bHLH, es mediado por los coactivadores p300/CBP y PCAF que favorecen la acetilación de histonas, facilitando que se desenrolle el DNA en una estructura más accesible para la maquinaria de la transcripción (Ross *et al.*, 2003).

Las proteínas bHLH se encuentran en una gran diversidad de organismos desde las levaduras hasta los humanos. En los mamíferos en etapas críticas del desarrollo juegan un papel importante en la determinación del destino celular de diferentes linajes en los tejidos como los

musculares, hematopoyéticos y en el linaje neural, o bien formando parte integral de algunos procesos como la neurogénesis (Weintraub, 1993; Jan y Jan, 1994; Guillemot, 1995; Ledent *et al.*, 2002; Talikka *et al.*, 2002; Mizuseki *et al.*, 2003; Hjalt, 2004; Jones, 2004).

Hay características que presentan las proteínas bHLH, entre ellas están: 1) El dímero de bHLH está basada en interacciones entre las dos hélices de cada proteína, para formar un conjunto de 4 hélices, según lo muestra la estructura cristalina del dominio bHLH de MyoD, Max y E47. 2) Todas las proteínas bHLH tienen una alta afinidad por las proteínas E (E2A, E12 y E47), sin embargo, pueden competir con proteínas proneurales, formando heterodímeros que no se pueden unir con el DNA. 3) Nueve de los 10 residuos de contacto con el DNA están completamente conservados en las diferentes familias de las proteínas bHLH proneurales y éstas se unen a las bases conservadas de la caja E o a los residuos de fosfato. 4) La especificidad de la unión de las bHLH y la actividad biológica de cada proteína las hace actuar de manera diferente en cada mecanismo involucrado (Bertrand *et al.*, 2002).

La familia de *Hes* está formada por siete miembros de los cuales *Hes1*, *Hes3* y *Hes5* que están altamente expresados por las células troncales neurales, además su expresión en el cerebro embrionario inhibe la diferenciación neuronal y mantiene la glía radial (Kageyama *et al.*, 2005). Los factores *Hes* tienen conservado el dominio bHLH en la región amino terminal, formando un dímero que se une al DNA, con mayor afinidad por la caja N (CACNAG) que por la caja E (CANNTG) de otros factores bHLH. Los factores *Hes* tienen una región menos conservada conocida como el dominio naranja (del Inglés, *orange domain*) el cual le confiere una alta especificidad para la interacción proteína-proteína (Kageyama *et al.*, 2005). Se sabe que *Hes* reprime la expresión de *Mash1* (del Inglés, *mammalian homolog of the Drosophila proneural genes achaete-scute 1*) por la unión directa al promotor, formando un heterodímero no funcional con E47, e inhibe la formación del heterodímero *Mash1*-E47. *Hes* antagoniza a *Mash1* por dos mecanismos: 1) reprimiendo la expresión a nivel transcripcional y 2) inhibiendo la actividad a nivel de la interacción proteína-proteína (Kageyama *et al.*, 2005).

En el telencéfalo dorsal, los progenitores corticales son mantenidos por los factores Id y Hes (Jones, 2004). Id3, es un factor de transcripción de la familia de los HLH, el cual desempeña un papel crucial en la diferenciación celular, inhibiendo la unión al DNA de ciertos factores de la familia HLH, bloqueando así la diferenciación neuronal. Cuando la expresión de Id3 se reduce por efecto del ácido retinoico (AR), se activa una cascada de genes bHLH proneurales, lo cual promueve la diferenciación neuronal (López-Carballo *et al.*, 2002).

Se conocen hasta el momento tres factores bHLH proneurales que se expresan en el telencéfalo (Fig. 6), Neurogenina 1 (Ngn1), Ngn2 y Mash1 (Lo *et al.*, 1991; Guillemot y Joyner, 1993; Guillemot *et al.*, 1993; Anderson, *et al.* 1997; Sommer *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1999; Wilson y Rubenstein, 2000; Jones, 2004). Durante las etapas tempranas del desarrollo, estas proteínas son expresadas en niveles bajos. Los progenitores neurales incrementan la expresión de estos factores dando como resultado la iniciación de la neurogénesis (Ross *et al.*, 2003; Kageyama *et al.*, 2005).

Los genes bHLH *Mash1*, *Math* y *Ngns* son expresados en diferentes neuronas; éstos factores forman heterodímeros con otros factores bHLH, como E47, para su activación por unión a la caja E (Kageyama *et al.*, 2005).

En vertebrados, durante el desarrollo del telencéfalo en la parte ventral (subpallium) y dorsal (pallium) se conoce cuál es la localización de los factores proneurales: Ngn1, Ngn2 y Mash1, así como el patrón de diferenciación neuronal (Fig. 6). En mamíferos, el pallium dará lugar a la corteza cerebral, mientras que el subpallium consistirá en las elevaciones gangliónicas medias (MGE del Inglés, *Medial ganglionic eminence*) y las elevaciones gangliónicas laterales (LGE del Inglés, *Lateral ganglionic eminence*) que después formarán el estriado y el globo pálido, los cuales son componentes de los ganglios basales (Wilson y Rubenstein, 2000).

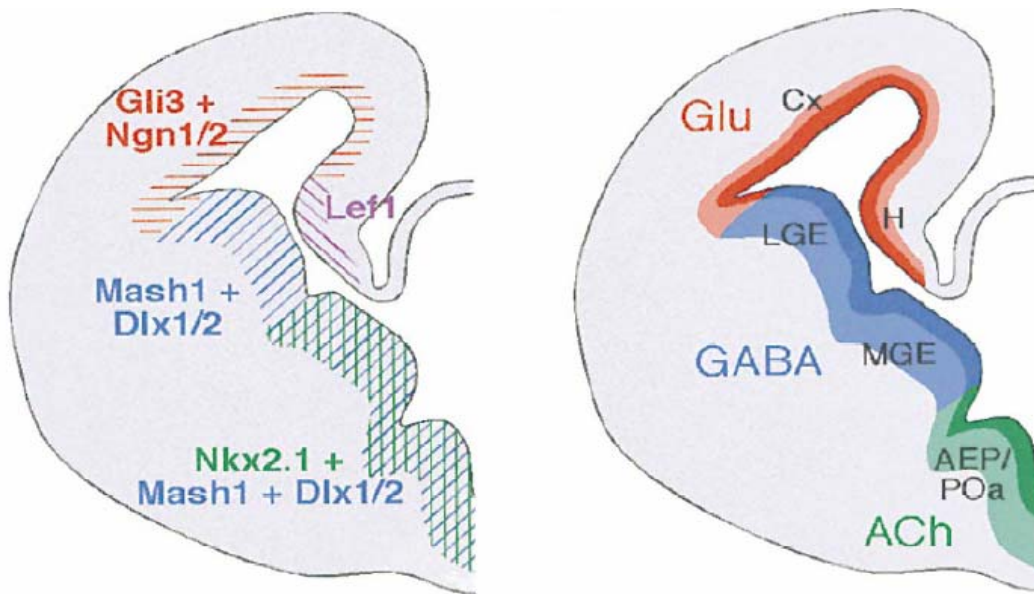


Fig. 6. Esquema representando el hemisferio derecho del telencéfalo durante el desarrollo en el ratón (E14). Localización de los factores proneurales: Ngn1, Ngn2 y Mash1, así como el patrón de diferenciación neuronal. Gli3: Del Inglés *Greig cephalopolysyndactyly syndrome*. Ngn 1/2: Neurogenina 1 y 2. Mash1: Homólogo de achaete scute en mamíferos 1. Dlx1/2: del Inglés *distal-less homeobox 1 y 2*. Nkx2.1: también llamado *thyroid transcription factor 1*. Lef1: Factor de unión al enhancer en linfoides 1. Glu: Glutamato. GABA: Ácido gama-amino-butírico. ACh: Acetilcolina. Cx: Corteza. LGE: Elevaciones gangliónicas laterales. MGE: Elevaciones gangliónicas mediales. AEP: Área entopeduncular anterior. POa: Área preóptica anterior. H: Hipocampo (Tomada de Wilson y Rubenstein, 2000).

5.2. Familia de proteínas de las Neurogeninas

Hasta el momento se conocen dos categorías de factores bHLH que participan en la neurogénesis: 1) los factores proneurales como las Neurogeninas y Mash1, que están involucrados en la neurogénesis inicial y 2) los factores de diferenciación neuronal (NeuroD) involucrados en la diferenciación terminal (Lo *et al.*, 1997; Bertrand *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2003). Estos genes proneurales y de diferenciación neuronal, actúan como heterodímeros con las proteínas E (Bertrand *et al.*, 2002).

La familia de las Neurogeninas está compuesta por tres proteínas: Ngn1, Ngn2 y Ngn3, las cuales tienen diferencias importantes en el patrón de expresión. Las Ngns 1 y 2 muestran heterogeneidad en la expresión en los diversos precursores del SNC y del sistema nervioso periférico (SNP). En algunas partes del SNP y SNC en desarrollo, la expresión de las Ngn1, Ngn2 y

Ngn3 pueden presentar o no el mismo patrón. Por ejemplo, las Ngns 1 y 2 se expresan fuertemente en la zona ventricular (ZV) del tubo neural ventral y en un área limitada del tubo neural dorsal cerca de la placa del techo neural (Sommer *et al.*, 1996). Además, Ngn1 se expresa en una parte lateral de la ZV y Ngn2 es detectada en la parte lateral y en la medial de la ZV. Por otro lado, el RNA mensajero que codifica para la Ngn3 se expresa fuertemente en una región restringida de la médula espinal, justo en la parte dorsal de la placa del piso neural (Sommer *et al.*, 1996). En el neuroepitelio cortical del cerebro, el RNA mensajero de Ngn2 se ha detectado en altos niveles y el de Ngn1 en muy bajos niveles. Una expresión similar se presenta en una región del diencefalo (Sommer *et al.*, 1996). Se tiene evidencia de que Ngn3 se expresa junto con NeuroD en el hipotálamo y en el páncreas en desarrollo, proponiéndose que la vía de diferenciación por Ngns activa a NeuroD (Sommer *et al.*, 1996). Es importante mencionar que existe una relación entre la expresión de NeuroD y las Ngns, ya que algunas áreas siguen un mismo patrón de expresión (Sommer *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1996). Las Ngns son expresadas en el telencéfalo dorsal participando en la formación de neuronas glutamatérgicas, mientras que Mash1 es predominantemente expresado en el telencéfalo ventral, jugando un papel importante en la generación de neuronas gabaérgicas y colinérgicas (Fig. 5; Wilson y Rubenstein, 2000; Watanabe *et al.*, 2005).

5.2.1. Neurogenina 1

Es del interés del laboratorio del Dr. Velasco estudiar el papel que juega la Ngn1 en la diferenciación neural a partir de células pluripotentes, por esta razón se profundizará más sobre los aspectos conocidos de esta proteína, sin que esto signifique que los otros miembros de esta familia sean menos importantes.

La identificación del gen de *Ngn1* se logró al seleccionar secuencias conservadas de *Mash1* y *NeuroD*, con las que se diseñaron los oligonucleótidos utilizados en la obtención de cDNA por la

técnica de RT-PCR (del Inglés, *reverse transcription-polymerase chain reaction*), a partir de muestras de ganglios de la raíz dorsal (GRD) de fetos de rata E13.5 (Ma *et al.*, 1996).

Los productos derivados del RT-PCR revelaron un nuevo cDNA de 1.7 kb, el cual codifica para una proteína de 244 residuos de aminoácidos. La Neurogenina 1 muestra un 67% de similitud con NeuroD y está relacionada con otros miembros de la familia bHLH incluyendo MATH2/Nex-1, KW y MATH1 (Ma *et al.*, 1996).

Existe un cDNA en *Xenopus* que muestra un gran parecido con la *Ngn1* murina, por lo que este cDNA fue llamado *gen relacionado con Ngn1 de Xenopus (X-ngnr-1)*, el cual codifica para un polipéptido de 215 aminoácidos con un 82% de identidad con la secuencia de *Ngn1* de la rata en el dominio bHLH. Algunos experimentos indicaron que al micro-inyectar el RNA mensajero de *Ngn1* en embriones de *Xenopus* se promueve la neurogénesis (Ma *et al.*, 1996).

Ahora se sabe que durante la neurogénesis, la *Ngn1* es expresada en los ganglios craneales y ganglios sensoriales espinales, en las regiones dorsales y ventrales de la médula espinal, en el epitelio olfatorio, el telencéfalo dorsal y en regiones específicas en el cerebro medio y anterior (Sommer *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1996,1997; Lee, 1997; Cau *et al.*, 2002; Nakada *et al.*, 2004). La expresión de *Ngn1* y de otros genes está regulada durante el desarrollo, por lo que se piensa que estos genes participan en los mecanismos moleculares involucrados en la generación del número correcto y el tipo de neuronas que se tendrán después del nacimiento y en el adulto (Nakada *et al.*, 2004). Entre estos aspectos moleculares se incluye que la *Ngn1*, *Ngn2* y *Mash1* tienen secuencias consenso que corresponden a sitios de fosforilación por GSK3 (del Inglés, *Glycogen Synthase Kinase 3*), sugiriendo que esto puede representar un mecanismo común para regular la actividad de estos factores bHLH (Moore *et al.*, 2002; Jones, 2004).

La *Ngn1* induce diferenciación neuronal en células progenitoras de la corteza cerebral (Sun *et al.*, 2001), en células de carcinoma embrionario (Farah *et al.*, 2000) y en el tubo neural de pollo, de *Xenopus* y del pez cebra (Ma *et al.*, 1996; Gowan *et al.*, 2001). Además de inducir la

diferenciación neuronal, Ngn1 participa en un fenómeno que determina el subtipo neuronal en el sistema nervioso periférico y en el tubo neural dorsal (Pérez *et al.*, 1999; Gowan *et al.*, 2001).

El gen de la *GFAP* (del Inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*), es específico de la astroglia, siendo regulado por STAT1/3 y Smad1; y al unirse con el coactivador p300 induce la expresión de la propia GFAP, lo que indica diferenciación glial. La Ngn1 induce la diferenciación neuronal, secuestrando al complejo p300-Smad1 de los promotores gliales y de este modo se inhibe la diferenciación hacia glía (Sun *et al.*, 2001; Kageyama *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2005).

Además de la Ngn1, la Ngn2 es requerida durante diferentes fases de la neurogénesis en particular en la generación de diferentes tipos de neuronas sensoriales. Durante la etapa temprana (E12) se requiere de Ngn2 y cuando su expresión disminuye se da entonces la aparición de Ngn1, en cambio la Ngn1 es requerida exclusivamente durante la fase tardía del desarrollo de los GRD, lo cual fue demostrado mediante el estudio de dobles mutantes para estos dos factores de transcripción, en donde se observó la ausencia de ganglios (Moore *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 1999).

Estudios recientes muestran una interacción entre *Brg1*, *Ngn1* y *NeuroD*, los cuales juegan un papel esencial en la neurogénesis de vertebrados como *Xenopus*, ya que las células que tienen bloqueado el gen de *Brg1* muestran una pérdida significativa de la diferenciación neuronal (Seo *et al.*, 2005).

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, las células troncales embrionarias han sido objeto de diversos estudios dirigidos hacia la generación de tipos celulares específicos *in vitro*, para su posterior utilización en la reparación de tejidos dañados. Por ejemplo, un gran número de grupos de investigación están interesados en la generación eficiente de neuronas dopaminérgicas para la creación de terapias celulares en la enfermedad de Parkinson.

Como se mencionó en la introducción, la Neurogenina 1 forma parte de la familia de las proteínas con dominio bHLH y juegan un papel primordial en el desarrollo del sistema nervioso, en particular del telencéfalo. El gen murino de *Ngn1* fue clonado en 1996 por el equipo del Dr. Quifu Ma y esta clona nos fue donada en el vector pcS2MT-Ngn1, el cual no es adecuado para su uso en células de mamífero.

Este trabajo se enfocó en el diseño y construcción de vectores de expresión para células de mamífero, por lo que el gen de *Ngn1* del vector pcS2MT-Ngn1 se subclonó en los plásmidos pcDNA3.1/Neo y pcDNA3.1/Hygro mediante técnicas de Biología molecular. Estas construcciones contienen el gen de *Ngn1* etiquetado con el epítotope *myc* y un gen de resistencia a un antibiótico que es utilizado para seleccionar las células eucariontes transfectadas.

El objetivo es contar con vectores que posean un gen de resistencia, los que se introducirán mediante electroporación en células ES de ratón de la línea R1, con la finalidad de estudiar el efecto de la sobreexpresión de *Ngn1* en células que no están comprometidas con un linaje neural como las ES, evaluando los efectos en la proliferación y la identidad de los tipos celulares neuronales que se obtendrán al realizar dicha manipulación.

OBJETIVO GENERAL

Propagar y transferir la clona de *Ngn1* a los vectores de expresión: pcDNA3.1/Neo y pcDNA3.1/Hygro, que serán útiles para sobreexpresar *Ngn1* en células ES, bajo el control del promotor constitutivamente activo de citomegalovirus (CMV), permitiéndonos distinguir la expresión transgénica de *Ngn 1* de la expresión endógena.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I.** Transformar bacterias *Escherichia coli* para la propagación de los plásmidos: pcS2MT-Ngn1, pcDNA3.1/Neo y pcDNA3.1/Hygro.
- II.** Extraer el DNA plasmídico de las bacterias transformadas para la obtención de los plásmidos puros.
- III.** Realizar la restricción enzimática de los vectores para la obtención de extremos cohesivos compatibles.
- IV.** Llevar a cabo la ligación de los vectores de expresión con la secuencia codificante para el gen de *Ngn1*, para la obtención de colonias con las siguientes construcciones: pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA3.1/Hygro-Ngn1
- V.** Poner en práctica las técnicas para el cultivo y propagación de células ES de ratón de la línea celular R1.

METODOLOGÍA

1. Transformación

Para la transformación se utilizaron bacterias competentes de *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen). En un tubo estéril de 1.5 ml se agregaron 10 µl de células, se añadió 1 µg de DNA plasmídico de una concentración 1 µg/µl, se incubó en hielo por 30 minutos y después se dio un choque térmico a 42°C por 30 segundos, provocando con ello que se introdujera el DNA a las células y se colocaron inmediatamente en hielo para que las células se conservaran en buen estado.

Posteriormente se agregaron 250 µl de medio S.O.C. (del Inglés, *Super Optimal Catabolite*, para ver la composición del medio ver el Apéndice II.20) para que las células que sobrevivieron pudieran mantenerse. Los tubos se agitaron a 250 revoluciones por minuto (rpm) a una temperatura de 37°C por una hora para permitir que la duplicación de las células.

Después de transcurrido el tiempo, se agregó todo el volumen de las células transformadas a una caja de petri con medio *Luria base* (LB, composición Apéndice II.19) con agar y con ampicilina a una concentración de 50 µg/ml. Este antibiótico permitirá seleccionar las células que incorporaron el plásmido. Las células se mantuvieron en incubación toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente se sacaron de la incubadora y se almacenaron a 4°C hasta su utilización (máximo un mes en refrigeración). Las colonias que crecieron en la caja son las portadoras del plásmido de interés, por lo tanto son las que se usaron posteriormente.

2. Extracción de DNA plasmídico por el estuche de *QIAGEN* (*Miniprep*)

De las colonias resultantes de la selección mediante el antibiótico ampicilina, se escogieron las colonias que estaban aisladas y después se recuperaron en tubos de 50 ml que contenían 5 ml de medio LB y antibiótico (ampicilina, 50 µg/ml) para su posterior crecimiento.

Se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante de 250 rpm y a la mañana siguiente se agregó un mililitro de células en un tubo de 1.5 ml, posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 13 200 rpm para obtener un agregado de células, se retiró el sobrenadante y posteriormente se agregaron 250 µl de amortiguador P1 o de resuspensión (veáse Apéndice II.4) el cual contiene RNasa que ayuda a eliminar al RNA evitando la contaminación del DNA, se resuspendió el botón de bacterias por agitación con un *vórtex* para resuspender las células, después se agregaron 250 µl de amortiguador P2 en el que se lleva a cabo la lisis, ya que contiene detergentes que degradan la membrana celular permitiendo que se libere el DNA, se agitó por inversión, se adicionaron 350 µl de amortiguador N3 para neutralizar la solución, se invirtió el tubo y se centrifugó por 10 minutos a 13 200 rpm. Posteriormente se transfirieron 750 µl del sobrenadante, el cual posee el DNA plasmídico, a una columna *QIAprep*, se centrifugó 1 minuto a 13 000 rpm. Con este paso se asegura que el DNA se queda adherido por carga a la membrana. Posteriormente se desechó el eluido, se lavó la columna con 500 µl de amortiguador PB mediante centrifugación 1 minuto a 13 000 rpm y se eliminan las nucleasas, después se descarta el sobrenadante.

Se lava nuevamente la columna por centrifugación agregando 750 µl de amortiguador PE que contienen etanol con el cual se remueven completamente las sales adheridas al DNA, se centrifugó 1 minuto y se desechó el eluido, a continuación se centrifugó un minuto más a 13 000 rpm, para asegurar la eliminación del líquido restante de la columna.

Se colocó la columna en un tubo de 1.5 ml limpio y para eluir el DNA se utilizaron 15 µl de agua desionizada (*MilliQ*) y se centrifugó por 1 minuto a 13 000 rpm, lo cual permite que el DNA que está adherido a la membrana se desprege. Posteriormente se añadieron 15 µl de agua *MilliQ* y se centrifugó 1 minuto a 13 000 rpm, con el objetivo de que todo el DNA unido a la columna se eluyera. El DNA se almacenó a – 20° C hasta que se usó.

Con la finalidad de conocer la pureza y la concentración del DNA, se añadió a un tubo estéril 1 µl de la solución con DNA, se le agregaron 59 µl de agua *MilliQ* y se mezcló. La muestra

se colocó en celdas de cuarzo para medir la absorbancia a $\lambda 260$ nm y $\lambda 280$ nm en un espectrofotómetro *Beckman DU_600*.

La cuantificación del DNA (en luz UV del espectrofotómetro) se obtuvo mediante la siguiente fórmula: $\lambda 260 * \text{Factor de dilución} * 50\mu\text{g/ml} = X \mu\text{g/ml}$. El grado de pureza se calculó con la siguiente fórmula: $\lambda 260 / \lambda 280 = Y$ (si este valor oscila entre 1.5 – 1.9, el DNA obtenido se encuentra libre de contaminantes celulares, mientras que valores por debajo de 1.5, indican contaminación con proteínas o fracciones de membranas).

3. Electroforesis en geles de agarosa al 1%

Los geles de agarosa se prepararon al 1 %, ya que este porcentaje permite observar con claridad los diferentes tamaños de los plásmidos, además de permitir discriminar los fragmentos de DNA menores a 1000 pb, que se obtendrán al digerir los plásmidos con las endonucleasas. Los geles se colocaron dentro de una cámara de electroforesis con amortiguador TBE 1X (ver Apéndice II.13). Para correr las muestras se usó el amortiguador de corrida de DNA 5X (*Quality Biological Inc.* 351-028-031) y los marcadores *1Kb Plus DNA Ladder* (*Invitrogen*, 12308-011), *2-Long DNA Ladder* (*New England biolabs*, N3200S), *MassRuler™ DNA Ladders* (*Fermentas*, SM0393). Una vez que se colocaron las muestras, se corrió el gel 1 hora y 30 minutos a 75 Volts, y posteriormente se incubó el gel por 10 minutos con bromuro de etidio (BrEt, [0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$]), se analizó el DNA mediante luz ultravioleta en un transiluminador y finalmente se realizó el registro fotográfico.

4. Secuenciación

La secuenciación del DNA se realizó por el método automático, donde las diferentes bases están marcadas con diferentes moléculas fluorescentes. Este sistema permite leer las nuevas cadenas de DNA al mismo tiempo que se van sintetizando en cada una de las mezclas. Con el empleo de los nuevos y diferentes fluorocromos se pueden combinar entre si y el resultado de las cuatro reacciones se coloca en un mismo carril del gel en donde el color de la banda corresponde al

dideoxinucleótido3'-terminal, el sistema de localización de cada par de base se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, de manera que se observan las bandas que van pasando por el láser detectando su color. La información se registra en la computadora donde se procesan los datos dando la interpretación final del fragmento secuenciado.

La secuenciación es un método que permitió verificar que el fragmento de DNA del vector pcS2MT contiene el gen de *Ngn1*. Una vez que se obtuvo la secuencia, se comparó por medio del algoritmo **BLAST** en la base de datos *GenBank* para confirmar que era la secuencia codificante para *Ngn1* de ratón. Posteriormente se realizaron las digestiones de los vectores.

5. Análisis de vectores

Se analizaron los vectores antes de iniciar los experimentos para saber cuales eran los extremos cohesivos compatibles entre los plásmidos pcS2MT-Ngn1, pcDNA3.1/Hygro y pcDNA3.1/Neo, y se encontró que en los sitios de clonación de los vectores aceptores (pcDNA3.1/Hygro y pcDNA3.1/Neo) estaban presentes las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción: *BamHI*, *XbaI* y *XhoI*, en el sitio de clonación y en el vector que contenía el gen de *Neurogenina1*, pcS2MT-Ngn1, tenía la secuencia de corte para *BamHI* al inicio de los epítopes de *Myc*, mientras que la secuencia de reconocimiento de *XbaI* y *XhoI* están en un sitio cercano al final del gen de *Ngn1* de acuerdo al mapa proporcionado por el Dr. Ma (Fig. 7).

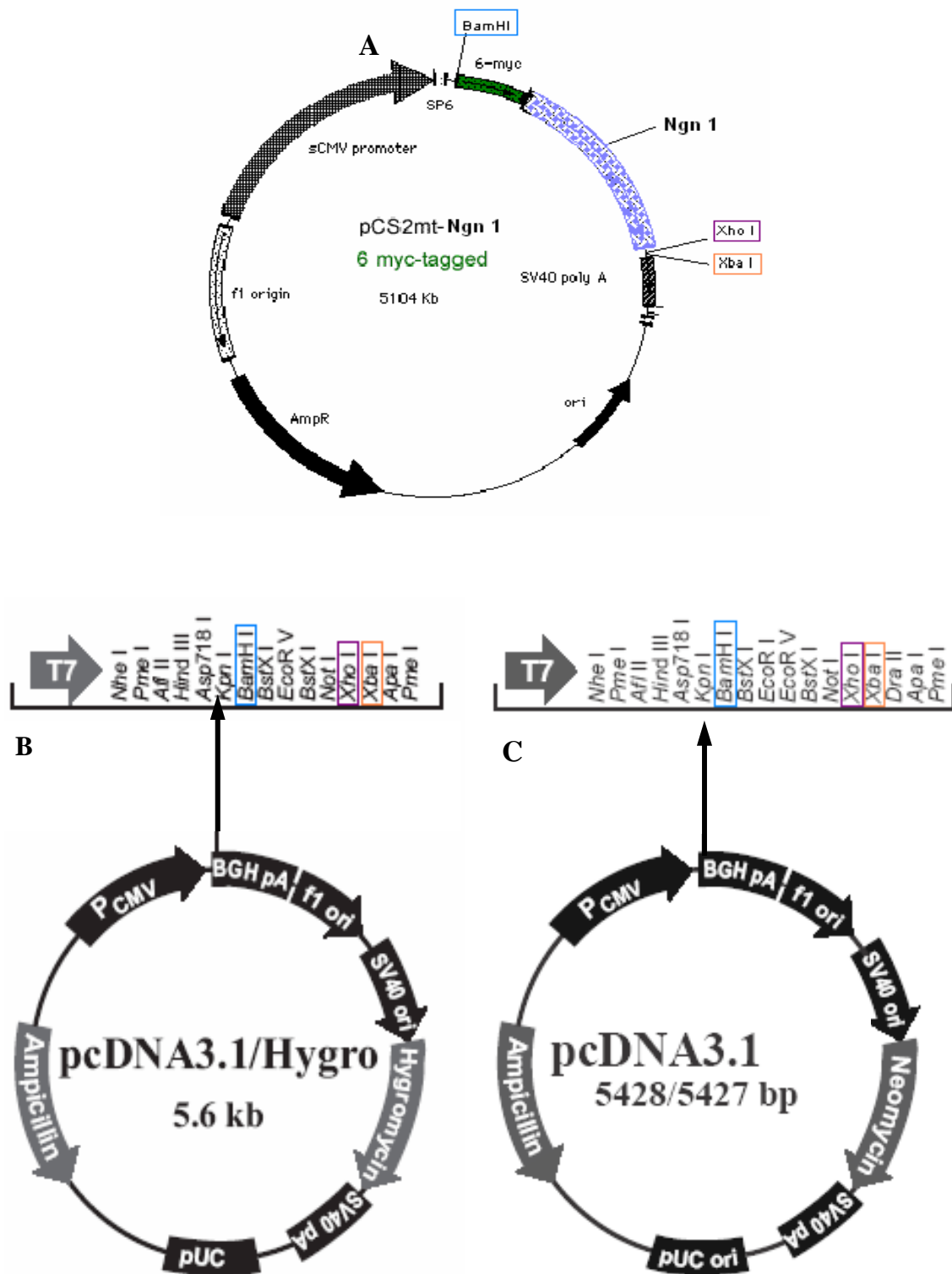


Fig. 7. Mapas mostrando los sitios de corte con *Bam*HI, *Xba*I y *Xho*I en los plásmidos usados. A) pcS2MT-Ngn1. B) pcDNA3.1/Hygro. C) pcDNA3.1/Neo.

6. Restricción enzimática de DNA

Con el propósito de obtener extremos cohesivos compatibles en los vectores pcDNA3.1/Neo y pcDNA3.1/Hygro, así como tener el gen de *Ngn1*, se utilizaron las enzimas de restricción *BamHI*, *XbaI*, *XhoI* de la marca *New England biolabs (NEB)*, para su posterior ligación y la obtención de clonas que se denominaron pcDNA3.1/Neo-*Ngn1* y pcDNA3.1/Hygro-*Ngn1*.

Para hacer las digestiones, se colocó la cantidad correspondiente a 5 µg de DNA a un tubo de 500 µl estéril, se agregó 2 µl de amortiguador de digestión 2, se añadió 1 µl de cada enzima como se indica en la tabla 2 y se aforó a 20 µl con agua *MilliQ*. Se incubó a 37°C por 2 horas.

Tabla 2. Diferentes condiciones de las digestiones (plásmidos y enzimas utilizadas).

Plásmido	10µl pcS2MT- <i>Ngn1</i>	10µl pcS2MT- <i>Ngn1</i>	5µl pcDNA 3.1/Neo	5µl pcDNA 3.1/Neo	5µl pcDNA 3.1/Hygro	5µl pcDNA 3.1/Hygro
Amortiguador	2 µl amortiguador 2 (NEB)	2 µl amortiguador 2 (NEB)	2 µl amortiguador 2 (NEB)	2 µl amortiguador 2 (NEB)	2 µl amortiguador 2 (NEB)	2 µl amortiguador 2 (NEB)
Enzima Restric.1	1 µl <i>BamH I</i> (20000U/ml)	1 µl <i>BamH I</i> (20000U/ml)	1 µl <i>BamH I</i> (20000U/ml)	1 µl <i>BamH I</i> (20000U/ml)	1 µl <i>BamH I</i> (20000U/ml)	1 µl <i>BamH I</i> (20000U/ml)
Enzima Restric.2	1 µl <i>Xba I</i> (20000U/ml)	1 µl <i>Xho I</i> (20000U/ml)	1 µl <i>Xba I</i> (20000U/ml)	1 µl <i>Xho I</i> (20000U/ml)	1 µl <i>Xba I</i> (20000U/ml)	1 µl <i>Xho I</i> (20000U/ml)
Agua	6 µl	6 µl	11 µl	11 µl	11 µl	11 µl
Vol. final	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Tamaño de fragmentos esperados	pcS2MT = 4.0 Kb <i>Ngn1</i> =1.1 Kb	pcS2MT = 4.0 Kb <i>Ngn1</i> =1.1 Kb	pcDNA 3.1/Neo = 5.4 Kb	pcDNA 3.1/Neo = 5.4 Kb	pcDNA 3.1/Hygro = 5.6 Kb	pcDNA 3.1/Hygro = 5.6 Kb

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% como ya se describió, con la finalidad de verificar que las digestiones de los plásmidos correspondían a los pesos moleculares reportados. El peso molecular de los plásmidos pcS2MT-*Ngn1*, pcDNA3.1/Neo y pcDNA3.1/Hygro es de 5100 pares de bases (pb), 5400 pb y 5600 pb respectivamente.

7. Extracción de DNA a partir de gel por el estuche de *QIAGEN* (*gel extraction*)

Para la purificación de los fragmentos de interés para el proyecto, se preparó un gel de agarosa al 1 % con carriles continuos para colocar todo el DNA que se digirió, se corrió y se tiñó con BrEt y se observó en luz UV de baja longitud, se cortó la banda de interés con una navaja tratando que fuera el menor tamaño posible (Fig. 8). Una vez separado el fragmento de gel con el DNA, se colocó en un tubo de 1.5 ml y se pesó en una balanza analítica *Ohaus* NOB110-2A1.

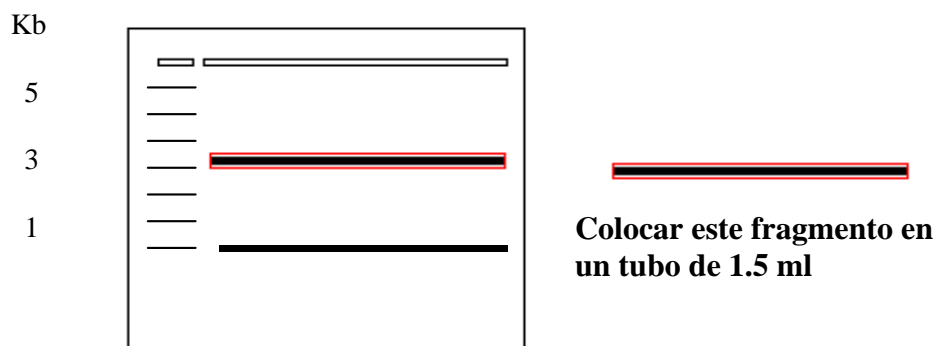


Fig. 8. Forma en que se extrae el DNA de interés de un gel.

Una vez pesado el gel, se le agregaron 3 volúmenes de amortiguador QG (ver Apéndice II.11) a un volumen de gel, se incubó por 10 minutos a 50°C, con agitación en el *vórtex* cada 3 minutos durante este proceso. Después se agregó el equivalente del gel de isopropanol, para aumentar el rendimiento de fragmentos grandes y pequeños.

La mezcla se colocó en una columna *QIAprep* (volumen máximo de la columna 750 μ l) y se centrifugó por 1 minuto a 13 000 rpm, para que el DNA se adhiriera por carga al filtro de la columna; posteriormente se retiró el eluido y a la columna se le agregaron 500 μ l de amortiguador QG para lavar el DNA y se centrifugó 1 minuto a 13 000 rpm.

Se retiró el eluido y se añadieron 750 μ l de amortiguador PE a la columna para remover las sales, prosiguiendo con la centrifugación 1 minuto a 13 000 rpm; después de quitar el eluido se centrifugó 1 minuto adicional para desechar todo el líquido de la columna.

Para separar el DNA que se encuentra adherido a la columna, ésta se colocó en un tubo estéril de 1.5 ml, se le agregaron 15 μ l de agua *MilliQ*, y se centrifugó 1 minuto a 13 000 rpm, repitiendo este paso para obtener un volumen final de 30 μ l. El DNA se guardó a -20°C hasta que se usó.

Para evaluar si las muestras obtenidas están en buen estado, se realizó la electroforesis analítica con la cual era posible confirmar el tamaño de los fragmentos purificados, además de que se midió la concentración y la pureza del DNA en el espectrofotómetro por los métodos antes descritos.

8. Ligación

De los fragmentos de DNA que se purificaron por medio del estuche de *QIAGEN* se colocó una relación equimolar de 1: 4 (vector: inserto), en un tubo estéril de 0.5 ml, se agregaron 10 ng de vector, 40 ng de inserto, se añadió 1 μ l de amortiguador de ligación 10X, y 1 μ l de T4-DNA ligasa de *NEB* y se aforó a 10 μ l con agua *MilliQ*.

Las muestras se incubaron por 18 horas a 4°C , después se continuó la incubación por 4 horas más a temperatura ambiente. Se hizo la transformación en bacterias *E.coli* competentes con todo el DNA ligado para obtener colonias con las construcciones pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA3.1/Hygro-Ngn1, que teóricamente tenían insertado el fragmento de *Ngn1*. Para comprobar la presencia de *Ngn1* en los vectores se realizó una digestión verificando el peso molecular de cada fragmento separado.

9. Extracción de DNA en grandes cantidades por el estuche de *QIAGEN* (*Maxiprep*)

Una vez identificados los plásmidos con el gen de *Ngn1*, se hizo una extracción del DNA de manera que se obtuviera una cantidad suficiente para continuar con experimentos posteriores.

Se colocaron los cultivos de las colonias que contenían el fragmento de Ngn1, en tubos de 50 ml, los cuales contenían 5 ml de medio LB líquido, se le adicionaron 5 µl de ampicilina, para tener una concentración final de 50 µg/ml, se incubó durante 7 horas a 37°C con una agitación constante de 300 rpm. Una vez transcurrido el tiempo, los cultivos incubados se colocaron en un matraz que contenía 95 ml de medio LB líquido con Ampicilina y posteriormente se incubaron por 16 horas a 37°C agitándose a 300 rpm.

Después de este tiempo, los cultivos se centrifugaron usando el rotor *Sorvall* RC-5B a 6 000 rpm, por 15 minutos a 4°C, para obtener un botón de células bacterianas, este botón se resuspendió en 10 ml de amortiguador P1 y se agitó con el *vórtex*, inmediatamente se le agregaron 10 ml de amortiguador P2 para lisar las células, después se invirtió suavemente el tubo, incubándose 5 minutos a temperatura ambiente.

Subsecuentemente se le añadieron 10 ml de amortiguador P3 (composición en Apéndice II.6), para neutralizar la solución anterior invirtiendo rápidamente el tubo y se colocó en hielo por 20 minutos. La suspensión se centrifugó a 13 000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, el cual contiene el DNA plasmídico y nuevamente se centrifugó a 13 000 rpm por 15 minutos a 4°C para obtener el sobrenadante con el DNA.

A la columna *QIAGEN- Tip* se le agregaron 10 ml de amortiguador QBT (amortiguador de equilibrio, ver composición en Apéndice II.9), el cual reduce la tensión superficial y se esperó a que el líquido bajara por gravedad, después a la columna se le agregó el sobrenadante centrifugado, permitiendo que bajara. Posteriormente se lavó la columna por gravedad con 20 ml de amortiguador de lavado QC, para eliminar todos los contaminantes y se le agregaron 15 ml de amortiguador de elusión QF al filtro de la columna, el cual ayuda a despegar y eluir el DNA. Anteriormente se colocó un tubo limpio de centrifugación para que el contenido caiga dentro del mismo. El DNA se precipitó con 10.5 ml de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y se centrifugó a 11 000 rpm a 4°C por 30 minutos. Después cuidadosamente se retiró el sobrenadante para evitar llevarse el botón de DNA.

El DNA se lavó con 5 ml de etanol al 70 % a temperatura ambiente, se centrifugó a 11 000 rpm por 10 minutos a 4°C, se quitó el sobrenadante para dejar solamente la pastilla de DNA que se dejó secando a temperatura ambiente y hasta que estuvo completamente seco, se resuspendió el DNA en el volumen deseado con agua *MilliQ*. El DNA en solución se almacenó a – 20°C hasta su uso. Antes de congelar el DNA, se guardó una muestra para que posteriormente se cuantificara la pureza y la concentración en el espectrofotómetro; además se observó el estado del DNA en el gel de agarosa al 1%.

10. Cultivo celular de fibroblastos

El cultivo de las líneas celulares STO y STO neo^R (resistentes a neomicina) permitieron expandir estas células para mantener tubos con células congeladas y posteriormente ser inactivados mitóticamente y obtener un soporte en el cual las células ES de la línea R1 puedan crecer adecuadamente.

Las células se mantuvieron en nitrógeno líquido, y estaban en una solución de dimetil sulfoxido (DMSO) al 10 % en el medio de cultivo DMEM (del Inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, ver Apéndice II.15 para su composición). Se sacó un vial del tanque de nitrógeno y se descongelaron las células en un baño María que estaba previamente ajustado a 37°C. Una vez descongelado el vial, se transfirió la suspensión a un tubo estéril de 15 ml, se agregaron 5 ml de medio DMEM y se centrifugó a 1 000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón de células en 1 ml de medio DMEM. En una caja de cultivo estéril se agregaron 6 ml de DMEM y se añadió el mililitro de células previamente centrifugadas con medio DMEM, después se introdujo la caja a la incubadora a 37°C con 5 % CO₂.

Para su mantenimiento, se les cambió el medio de cultivo dos veces por semana (martes y viernes). Una vez que los fibroblastos estuvieron confluentes (aproximadamente dos días) al 80 % de la capacidad de la caja de cultivo, se retiró el medio y se agregaron 5 ml de PBS 1X tres veces y se retiró el PBS (Apéndice II.12). Se agregó 1 ml de Tripsina al 0.25 % con EDTA 2.65 mM, se

incubó por 5 minutos a 37°C con 5 % CO₂ y a la caja se le agregaron 5 ml de medio DMEM con suero fetal bovino (SFB) al 10 %. Posteriormente se retiraron las células despegadas, se pasaron a un tubo de 15 ml para centrifugarlas por 5 minutos a 1 000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1 ml de medio DMEM.

Las células se contaron en un hemocitómetro y se aplicó la siguiente fórmula: [# total de células / # cuadrantes contados] * factor de dilución * volumen en el que se resuspendieron las células * 10 000 = X células / ml. Se sembraron en cajas de 10 cm de diámetro colocando $2.5 \cdot 10^6$ células y se le agregaron 7 ml de medio DMEM.

11. Inactivación de fibroblastos

Para este paso es necesario utilizar un reactivo llamado mitomicina C, el cual inactiva el ciclo celular de las células, evitando su crecimiento y las cuales servirán como soporte para las células ES.

Después de lavar las células que deben de tener la confluencia deseada (80-90 %) se agregaron 7 ml de DMEM + 10 % SFB y 70 µl Mitomicina C (*stock* 1 mg/ml), para tener una concentración final de 10 µg/ml. Se incubó por tres horas a 37°C con una atmósfera al 5 % de CO₂. Una vez que transcurrió el tiempo, se le retiró el medio con mitomicina, se agregaron 5 ml de PBS por tres veces para eliminar por completo la mitomicina, se retiró el PBS, se agregó 1 ml de Tripsina al 0.25% con EDTA 2.65 mM y se incubó por 5 minutos a 37° C con 5 % CO₂. Después se le agregaron 5 ml de medio DMEM, se retiraron las células despegadas, se pasaron a un tubo de 15 ml y se centrifugaron por 5 minutos a 1 000 rpm.

Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml DMEM, para poder hacer el conteo celular como ya se describió. Las cajas fueron tratadas previamente con gelatina a 0.1 % (ver Apéndice II.14), durante 30 minutos para que los fibroblastos se pudieran adherir al sustrato de la caja evitando que se despeguen, este tiempo es suficiente pero se pueden dejar más tiempo. Las células se sembraron en cajas de 10 cm agregando un promedio de $2.5 \cdot 10^6$ células y se aforó a un

volumen de 7 ml de medio DMEM por caja. Después del tratamiento con mitomicina, los fibroblastos se pueden congelar como se describe más adelante. Si se resiembra en cajas con 6 pozos, colocar 0.3×10^6 células, aforando a 2 ml de volumen final. Hasta que se usen, se les cambia medio como de costumbre (martes y viernes). Se deben usar hasta una semana después del tratamiento con mitomicina para así evitar que las células se deterioren.

12. Expansión de células troncales embrionarias de ratón de la línea celular R1

De las cajas de cultivo previamente sembradas con fibroblastos inactivos, se les quitó el medio DMEM y se agregaron 7 ml de medio KO-ES (del Inglés, *KNOCKOUT DMEM*, su composición se describió en el Apéndice II.16); se les cambió el medio una hora antes de sembrar las células ES. La línea celular R1 de células troncales embrionarias se encontraba en nitrógeno líquido, se tomó un vial de células y se colocó inmediatamente en un baño María a 37°C.

Una vez que las células se descongelaron, se colocaron en una caja de cultivo cubierta con fibroblastos inactivos confluentes, a los cuales se les cambió el medio previamente. Se les quitó el medio y se agregaron 6 ml de medio KO-ES, se dejaron incubando por 2 horas a 37°C y 5 % CO₂. Una vez transcurrido el tiempo se cambió el medio, se agregaron 7 ml de KO-ES y 7 µl del factor inhibitorio de la leucemia (LIF; *stock* 10⁶ U/ml, concentración final 1 000 U/ml).

Todos los días se les cambió el medio y se les agregó LIF, se vigiló la forma de las colonias para así monitorear la diferenciación espontánea debida a la alta densidad. A la caja con células ES, se le quitó el medio, se lavó con PBS por tres veces y se le agregó 1 ml de Tripsina al 0.05 % con EDTA 0.53 mM y se incubó por 5 minutos a 37°C con 5 % CO₂.

Las células que se despegaron se pasaron a un tubo de 15 ml para que posteriormente se centrifugaran a 1 000 rpm a 4°C por 5 minutos, se le retiró el sobrenadante y se agregaron 2 ml de medio KO-ES, después se hizo el conteo celular. Una vez que se obtuvo el número de células, se sembraron nuevamente sobre una caja de fibroblastos inactivos y/o se congelaron para su posterior uso.

13. Congelación de células

El almacenamiento de células en nitrógeno líquido durante largos períodos de tiempo es una forma de mantener a las células sin deterioro celular apreciable. Una vez que se tuvo una caja de cultivo cercana al 80 % de confluencia, se le retiró el medio y se les agregó 1 ml de tripsina-EDTA (al 0.25 % o al 0.05 % según el tipo celular del que se trate). Se incubó por 5 minutos a 37° C a 5 % CO₂. Posteriormente se les agregó 5 ml de medio, se les colocó en un tubo de 15 ml y se centrifugó a 1 000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo. Se hizo el conteo celular y una vez que se obtuvo el número celular final, se les agregó medio de cultivo con suero y DMSO al 10 % final, para tener $2.5 \cdot 10^6$ células en un criovial.

Todos los crioviales se colocaron en hielo inmediatamente después de que se cerró el tubo, posteriormente se les colocó en un congelador a -80°C por 1 día y después se les llevó al tanque de nitrógeno para ser introducidos ahí hasta su posterior uso. Si se van a utilizar constantemente se les puede mantener en el congelador a -80° C.

14. Electroporación

Una vez que las células se despegaron mediante la tripsinización se pasaron a un tubo estéril de 15 ml para que posteriormente se centrifugaron, se agregó 1 ml de PSB 1X, posteriormente se hizo el conteo celular. Una vez que se obtuvo el número de células, se colocaron aproximadamente $5 \cdot 10^6$ células ESR1 en 500 µl de PBS, en una celda estéril de 0.4 cm (*BIO-RAD* 165-2088) y se agregaron 10 µg del vector deseado linearizado (D ó E), se trasladaron en hielo hacia el electroporador. Se colocaron las condiciones 0.25 KV, 500 µF y se dio el choque eléctrico para que se introdujera el DNA a las células, se colocaron inmediatamente en hielo y se incubaron por 15 minutos para que las células se conservaran en buen estado.

A cajas de 10 cm previamente tratadas con gelatina 0.1 % se agregaron 7 ml de medio KO-ES y después de la incubación se colocaron aproximadamente $2.5 \cdot 10^6$ células electroporadas y se

mantuvieron a 37°C con 5 % de CO₂. Se les cambio el medio a diario añadiendo LIF y 7 µl de G418 (antibiótico análogo de neomicina), el cual permitirá seleccionar las células que incorporaron el plásmido. Las células se mantuvieron en selección durante cinco días, las colonias que crecieron en la caja son las portadoras del plásmido de interés y posteriormente se pasaron a cajas multipozos para establecer las nuevas líneas celulares que se usarán en un futuro.

RESULTADOS

1. Amplificación y purificación de DNA

Una vez obtenido el DNA de las bacterias que se transformaron con los plásmidos: pcS2MT-Ngn 1, pcDNA3.1/Neo y pcDNA3.1/Hygro, se corrió una muestra en el gel de agarosa, donde se puede observar que el DNA extraído está en buenas condiciones (Fig. 9A). Se observaron las diferentes bandas características de plásmidos no digeridos. En la cuantificación que se hizo por medio del espectrofotómetro, se obtuvieron las cantidades de DNA plasmídico, las cuales oscilaron: para pcS2MT-Ngn1 = 0.2 - 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, en pcDNA3.1/Hygro = 0.07 - 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y para pcDNA3.1/Neo = 0.09 - 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, mientras que el cociente $\lambda_{260} / \lambda_{280}$, indicativo de la pureza estuvo en un rango de 1.5-1.7 en los tres plásmidos purificados.

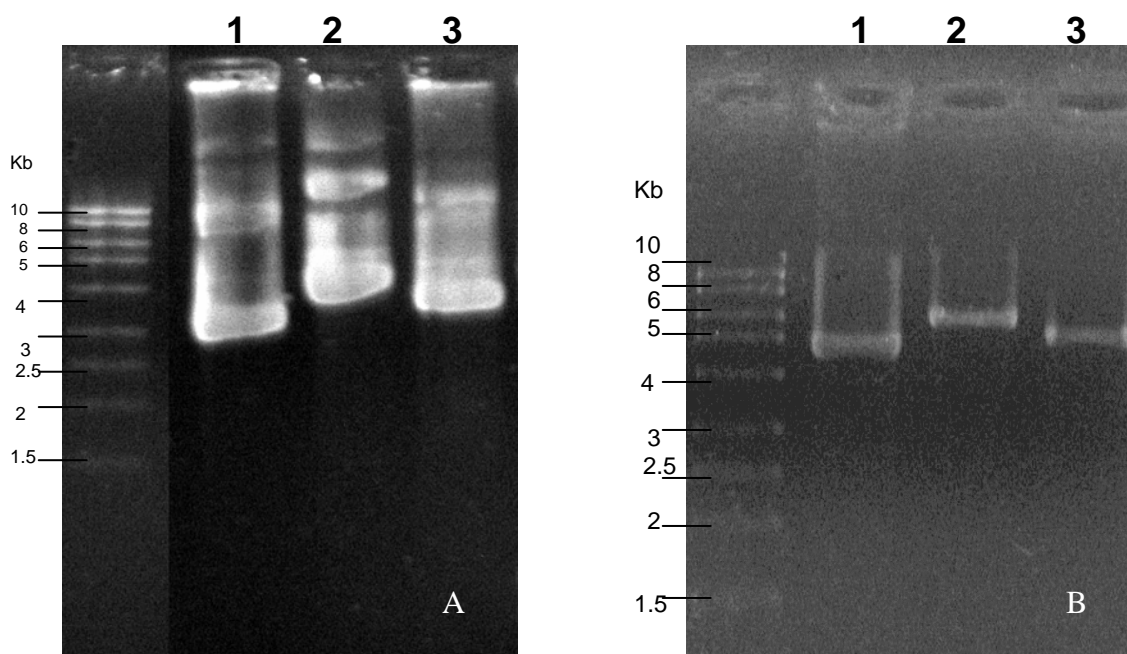


Fig. 9. DNA plasmídico sometido a electroforesis. A) Plásmidos no digeridos. Se observan dos formas de los plásmidos (enrollado y superenrollado). B) Plásmidos linealizados con *Bam*HI en donde se observa una banda. pcS2MT-Ngn 1 en el carril 1 de ambos paneles, pcDNA3.1/Hygro en el carril 2 y pcDNA3.1/Neo en el carril 3. Ambos son geles de agarosa al 1 %.

Con la linearización de los vectores hecha por la digestión con *Bam*HI se corroboró el tamaño de los vectores (Fig. 9B). Estos resultados confirmaron los pesos moleculares reportados en la literatura, los cuales son de ~5.1 Kb de pcS2MT-Ngn1, ~5.6 Kb pcDNA3.1/Hygro y ~5.4 Kb pcDNA3.1/Neo.

2. Análisis de secuencia y de plásmidos

El gen *Ngn1* está marcado con un epítoto *Myc* (utilizado para la identificación del transgen), el cual está integrado después de sitio de inicio de la transcripción y antes de la secuencia codificante para *Ngn1* (Fig. 10). Esta secuencia del gen de *Ngn1* de ratón permitió analizar los posibles sitios de corte cercanos a *Ngn1*, respetando el marcaje del epítoto *Myc*.

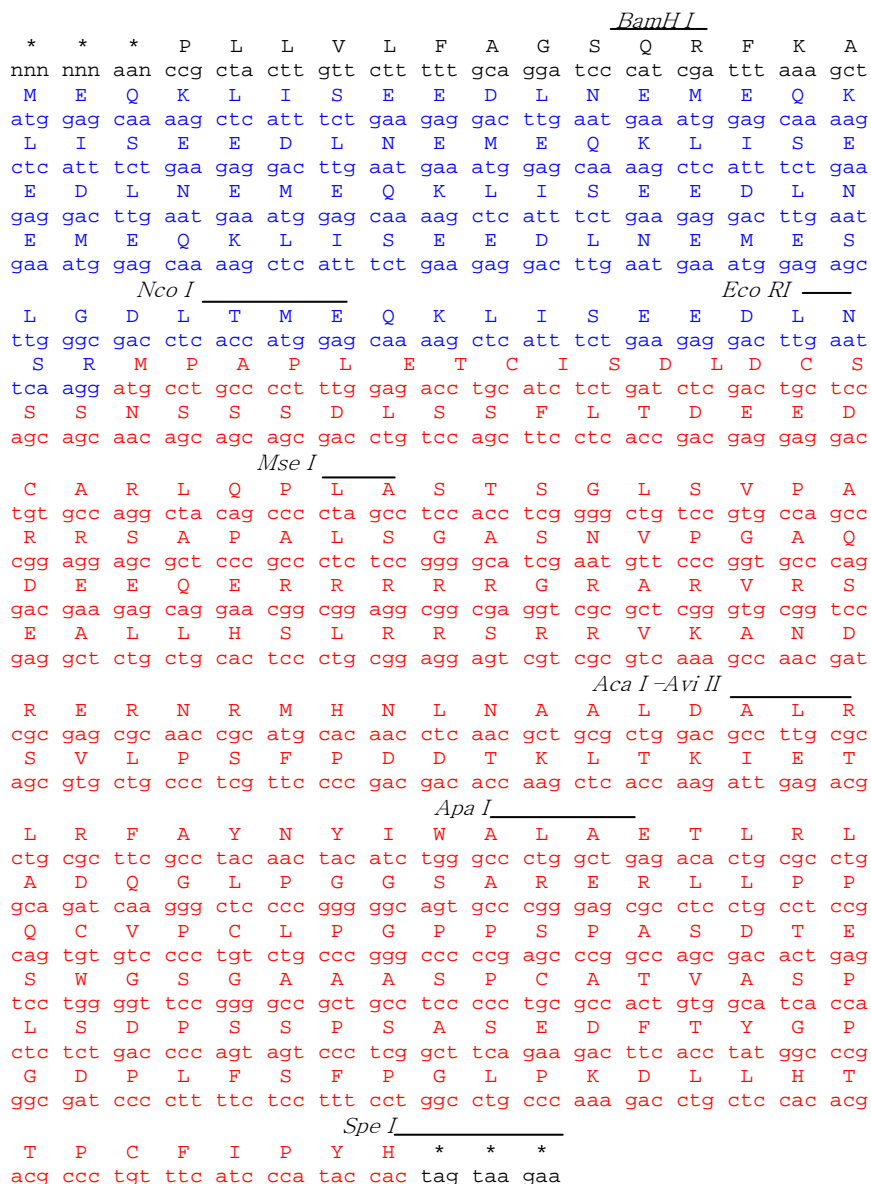


Fig. 10. Mapa de la secuencia de *Ngn1* en el vector pcS2MT. Secuencia de *Ngn1* y aminoácidos a los que codifica. Azul: Sitio del epítoto *Myc*. Rojo: secuencia codificante para *Ngn1*.

Después se hizo una ligación teórica en la cual se insertó el gen de Ngn1 en los vectores pcDNA3.1/Hygro y pcDNA3.1/Neo, para obtener las construcciones finales: pcDNA3.1/Neo Ngn1 y pcDNA3.1/Hygro-Ngn1.

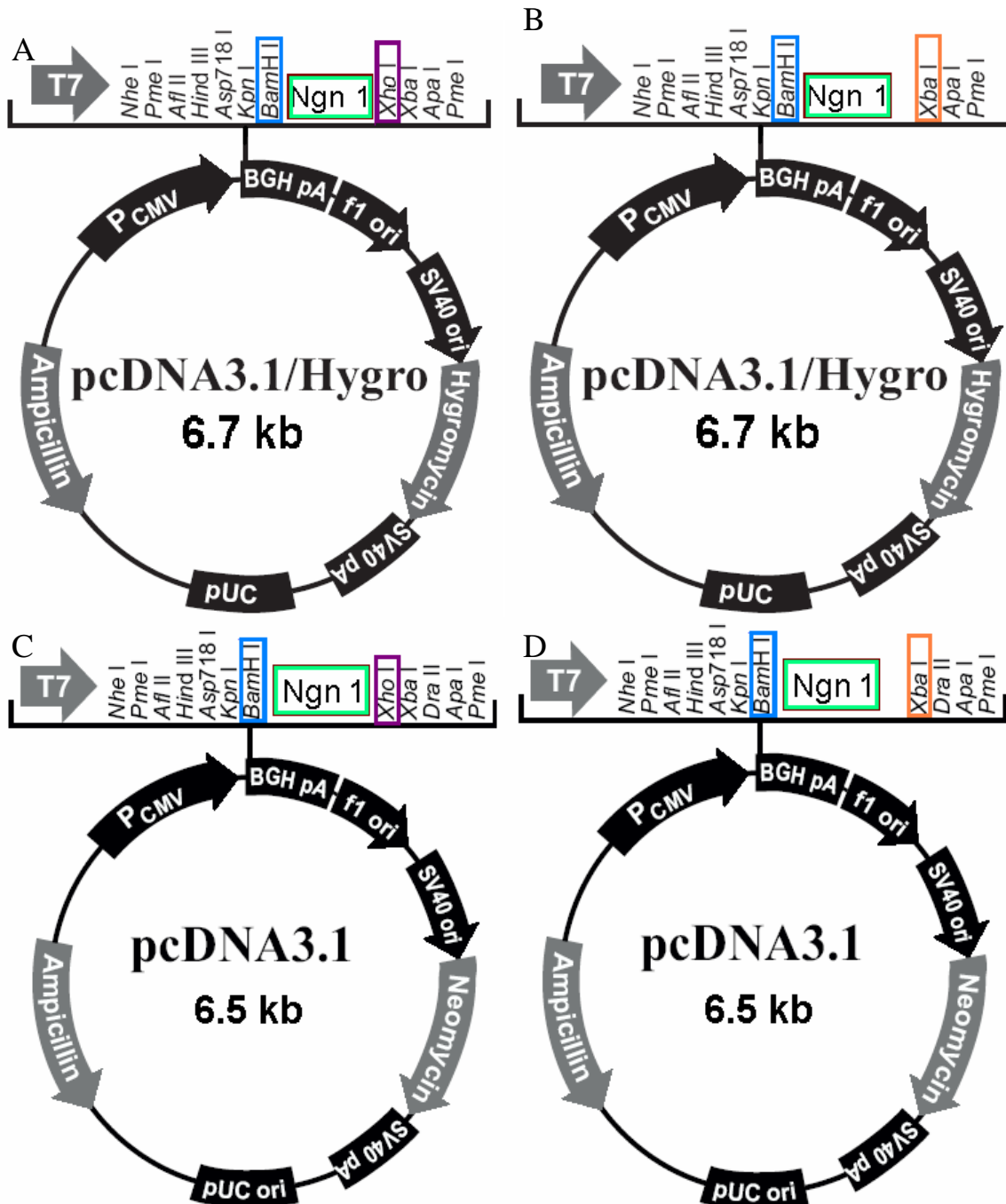


Fig. 11. Sitios teóricos de inserción de Ngn1. A) Inserción de Ngn1 en pcDNA3.1/Hygro en los sitios *BamHI-XhoI*. B) Ligación del plásmido pcDNA3.1/Hygro en los sitios para *BamHI-XbaI*. C) Mapas de pcDNA3.1/Neo mostrando los sitios de inserción de Ngn1 en *BamHI-XhoI*. D) Ligación del fragmento de Ngn1 en *BamHI-XbaI* en el vector pcDNA3.1/Neo. De este modo obtendremos las construcciones: pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA3.1/Hygro-Ngn1.

3. Restricción enzimática de los plásmidos

Una vez que se tuvo claro el procedimiento, se realizaron los cortes en el DNA con las enzimas correspondientes. Se hizo una doble digestión, debido a que existían amortiguadores que permitían tener una actividad adecuada con ambas enzimas. La digestión daría como resultado vectores de ~5.4Kb (pcDNA3.1/Neo) y ~5.6Kb (pcDNA3.1/Hygro). Dado que uno de los fragmentos que se liberaba en esta digestión es muy pequeño para detectarlo en un gel de agarosa, se observaron con mayor claridad los tamaños de los vectores cercanos a 5 Kb. Para el vector pcS2MT-Ngn1 se esperaba obtener un fragmento de aproximadamente 1.1 Kb, cuya secuencia codifica para Ngn1 y la otra parte del vector sería de ~ 4 Kb. Se digirieron 5-10µg de cada plásmido, por dos horas a 37°C. Se corrió un gel de agarosa con las digestiones (Fig. 12).

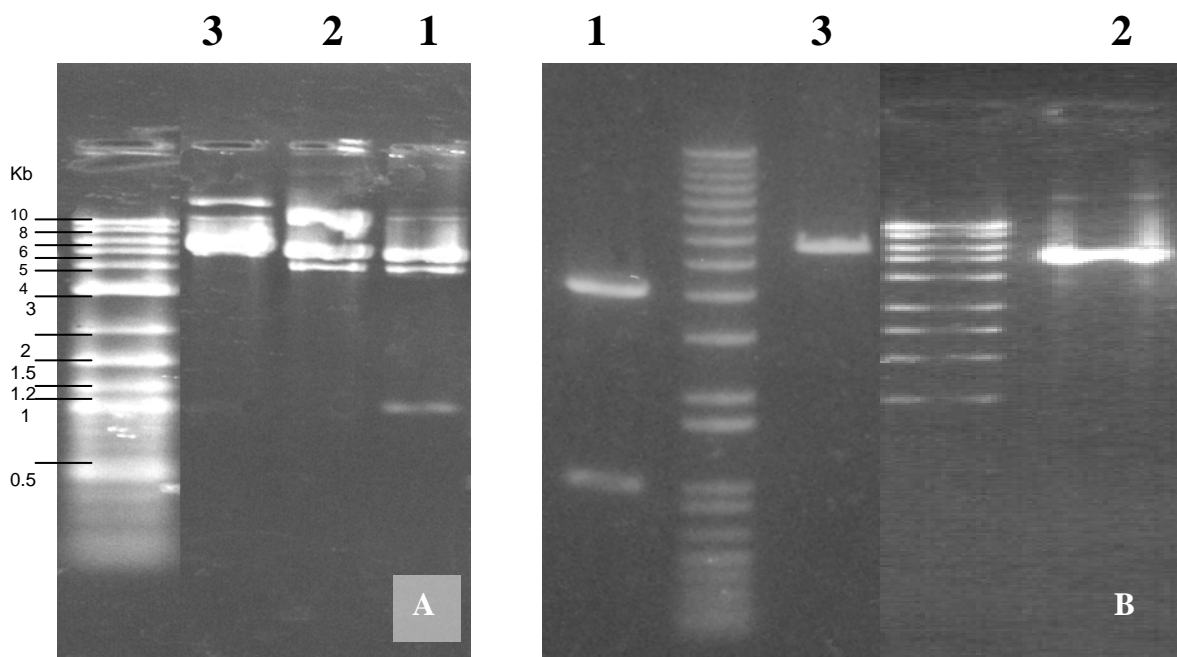


Fig. 12. Digestión de vectores. A) Digestiones con *Bam*HI y *Xba*I. B) Digestiones con *Bam*HI y *Xho*I. Los carriles marcados con 1 corresponden a pcS2MT- Ngn1 en donde se observan 2 fragmentos de ~1.1 kb y ~4 kb. Los carriles 2 corresponden a la digestión de pcDNA3.1/Neo (~5.4 Kb) y los carriles 3 a pcDNA3.1/Hygro (~5.6 Kb). Geles de agarosa al 1 %.

Los resultados confirmaron las predicciones hechas acerca de los pesos moleculares esperados como se observa en las figuras 12A y 12B, por lo cual se prosiguió con el trabajo experimental con las ligaciones.

4. Extracción de DNA a partir de gel

Una vez que se observó el patrón de restricción de los plásmidos en el gel analítico, se procedió a hacer un gel preparativo con agarosa al 1%, en el cual los carriles son continuos para colocar toda la muestra con un exceso de amortiguador de corrida para que se pueda compactar perfectamente el DNA. Se agregaron las muestras al gel y se aplicó el campo eléctrico. Se incubó en solución con BrEt y finalmente se observó con luz UV.

En el gel se logró obtener una banda muy compacta que posteriormente se cortó y a partir de la cual se siguió el protocolo del estuche de *QIAGEN (gel extraction)*. Después de obtener el DNA puro, se cuantificó por los dos métodos, por espectrofotometría en donde se midió la concentración de DNA, y por la estimación en un gel de agarosa para verificar si las muestras tenían una pureza aceptable para continuar con la ligación. Los fragmentos después de la extracción se analizaron en geles de agarosa al 1 % (Fig. 13).

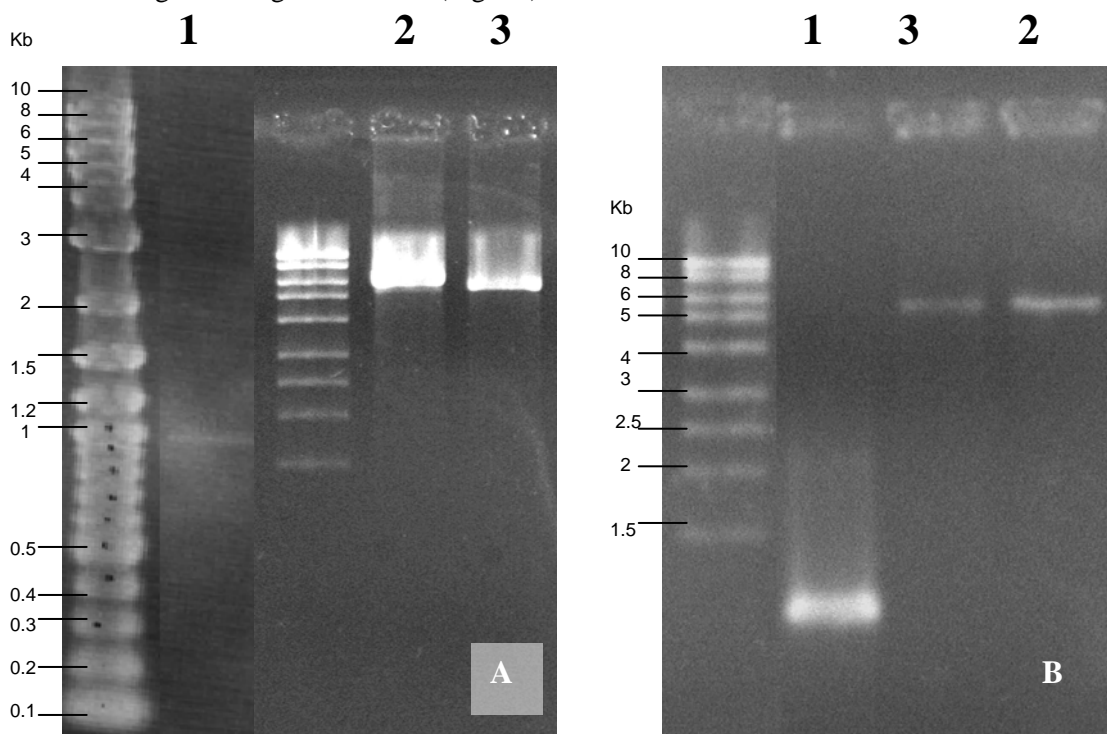


Fig. 13. Análisis de fragmentos digeridos después de la extracción. A) Digestiones con *BamHI* y *XbaI*. B) Digestiones con *BamHI* y *XhoI*. Los pesos moleculares aproximados son: Ngn1~1.1 Kb, pcDNA3.1/Neo ~5.4 Kb y pcDNA3.1/Hygro~5.6 Kb. (1) pcS2MT-Ngn1, (2) pcDNA3.1/Hygro, (3) pcDNA3.1/Neo. Geles de agarosa 1 %.

Las concentraciones de DNA obtenidas después de la extracción con los plásmidos que fueron digeridos con *BamHI* y *XhoI* fueron: Ngn1= 60-400 ng/μl, pcDNA3.1/Hygro= 80-500 ng/μl y pcDNA3.1/Neo = 70-150 ng/μl. Para los extractos de DNA de los plásmidos digeridos con *BamHI* y *XbaI* los datos son los siguientes: Ngn1= 40-100 ng/μl, pcDNA3.1/Hygro= 50-600 ng/μl y para el vector pcDNA3.1/Neo = 80-500 ng/μl. La relación $\lambda_{260} / \lambda_{280}$ estuvo en un rango de 1.5-1.8 en todas las condiciones.

5. Ligación de los diferentes fragmentos de DNA

Como los resultados mostraron fragmentos purificados de un tamaño adecuado, se procedió a hacer las ligaciones donde se colocó la proporción de vector: inserto indicada en el apartado de métodos. La incubación más favorable fue la que se hizo a 4°C. Se colocaron 45-400 ng/μl de vector y 135-1200 ng/μl de inserto. La incubación se hizo durante toda la noche para que la reacción fuera más eficiente.

Las ligaciones fueron hechas por cuadruplicado. Después de transformar las bacterias con el producto de las ligaciones, se obtuvieron un promedio de 3 colonias por caja transformada con las construcciones: pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA 3.1/Hygro-Ngn1. Se realizó la replicación de estas colonias a las cuales se les extrajo el DNA con el protocolo de miniprep de *QIAGEN* para posteriormente verificar cuál de ellas tenía el inserto.

6. Purificación de los vectores: pcDNA3.1/Neo -Ngn1 y pcDNA3.1/Hygro-Ngn1

Una vez que se obtuvieron las colonias transformantes, se llevo a cabo la expansión y almacenamiento de una cantidad suficiente de DNA. Las colonias que se obtuvieron de las ligaciones, fueron nombradas con las letras A-L, cada letra fue asignada teniendo en cuenta cuales fueron las enzimas que se usaron para cortar en un principio (*BamHI*, *XbaI*, *XhoI*), así como el tipo de vector al que fue insertado pcDNA3.1/Neo ó pcDNA3.1/Hygro (Tabla 3).

Tabla. 3. Nomenclatura de las colonias obtenidas después de la ligación. Se muestran las enzimas que se emplearon para digerir a los vectores aceptores y el tipo de vector.

NOMBRE	ENZIMAS	VECTOR
A	<i>XhoI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Hygro
B	<i>XhoI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Hygro
C	<i>XbaI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Neo
D	<i>XbaI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Neo
E	<i>XbaI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Neo
F	<i>XhoI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Neo
G	<i>XhoI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Neo
H	<i>XhoI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Neo
I	<i>XhoI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Neo
J	<i>XbaI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Hygro
K	<i>XbaI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Hygro
L	<i>XbaI –BamHI</i>	pcDNA3.1/Hygro

Después de la amplificación, se extrajo el DNA plasmídico y se corrió un gel de agarosa al 1 %, en el cual se verificó que existía suficiente DNA en buen estado (Figura 14A-D). Se cuantificó el DNA en el espectrofotómetro y se encontró que la cantidad oscilaba 0.24-1.52 µg/µl en todos los vectores, mientras que la pureza fue de 1.5- 1.7.

En la figura 14 (A-D) se muestran los diferentes plásmidos obtenidos, donde se puede observar diferentes corrimientos de estos vectores en los geles de agarosa, esto no daba indicio de cual de los vectores contenía el inserto por lo que se decidió hacer digestiones para saber cual de los vectores construidos poseía el inserto de Ngn1.

En función de que se debían obtener vectores cuyos pesos moleculares sean de 6.5 kb para el vector pcDNA3.1-Ngn1 y 6.7 kb en pcDNA3.1/Hygro-Ngn1, y considerando que se pueden dar diferentes rearrreglos en la estructura del DNA ligado, fue necesario hacer digestiones para verificar cuál de los vectores tenía el inserto.

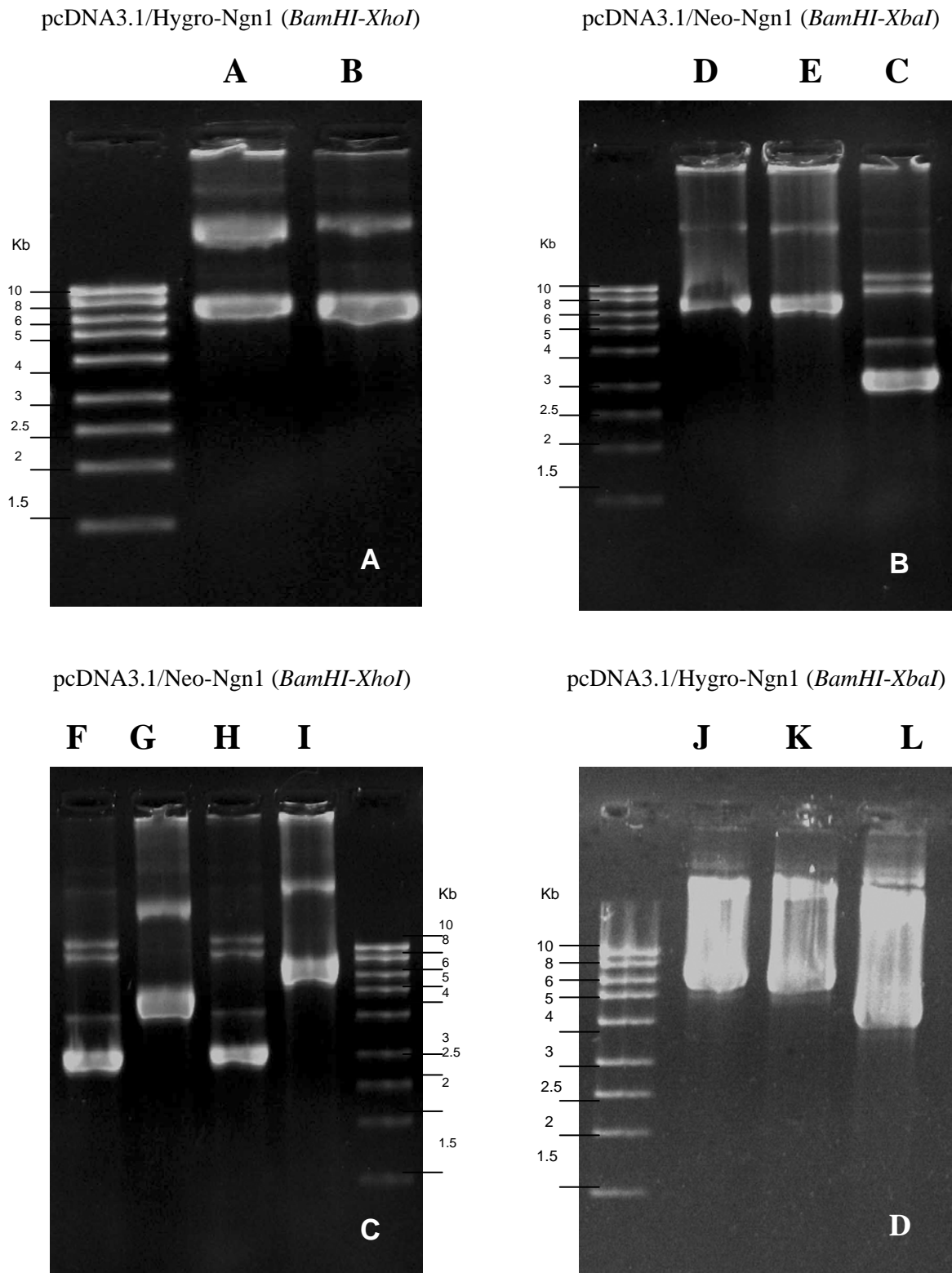


Fig. 14. Purificación y corrimiento electroforético del DNA obtenido de las ligaciones.
 A) pcDNA3.1/Hygro-Ngn1 ligado en los sitios *Bam*HI y *Xho*I (vectores A y B). B) pcDNA3.1/Neo-Ngn1 ligado en *Bam*HI y *Xba*I (plásmidos C-E). C) pcDNA3.1/Neo-Ngn1 ligado en *Bam*HI y *Xho*I (vectores F-I). D) pcDNA3.1/Hygro-Ngn1 insertado en los sitios *Bam*HI y *Xba*I (plásmidos J-L).

7. Digestión del DNA con las construcciones: pcDNA3.1/Neo-Ngn1, pcDNA 3.1/Hygro-Ngn1

Una vez que se purificaron los vectores, se procedió a digerirlos con las diferentes enzimas de restricción para verificar cuál de las colonias tenía el inserto que se requería. Las enzimas usadas fueron de las que inicialmente se obtuvieron extremos cohesivos compatibles en los vectores pcDNA3.1/Neo y pcDNA3.1/Hygro. Las digestiones de verificación fueron hechas de la misma manera que la de las digestiones iniciales (ver tabla 2).

Se tomaron 5 µg del DNA, se realizaron dobles digestiones con *BamHI* y *XbaI* ó *XhoI*, según el protocolo, después se colocaron las muestras para observar cuales de los vectores tenía el inserto. Para las construcciones: pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA 3.1/Hygro-Ngn1 se esperaba un peso molecular de: 5.4 kb para pcDNA3.1/Neo, 5.6 kb para pcDNA3.1/Hygro y 1.1 kb para *Ngn1*.

Con estas digestiones se esperaba que alguno de los vectores tuviera la construcción para usarla con los experimentos posteriores. La figura 15 muestra los diferentes cortes que se realizaron mediante las dobles digestiones. Únicamente las colonias D, E, J y K fueron las que liberaron el fragmento de *Ngn1* (Fig.15), lo que indicaba que sólo en estas colonias se había insertado correctamente la secuencia de *Ngn1*. Los demás vectores muestran fragmentos de diferentes tamaños que no corresponden al peso molecular de *Ngn1*. De los vectores (D, E, J y K) se extrajeron grandes cantidades de DNA para experimentos posteriores y para su almacenamiento.

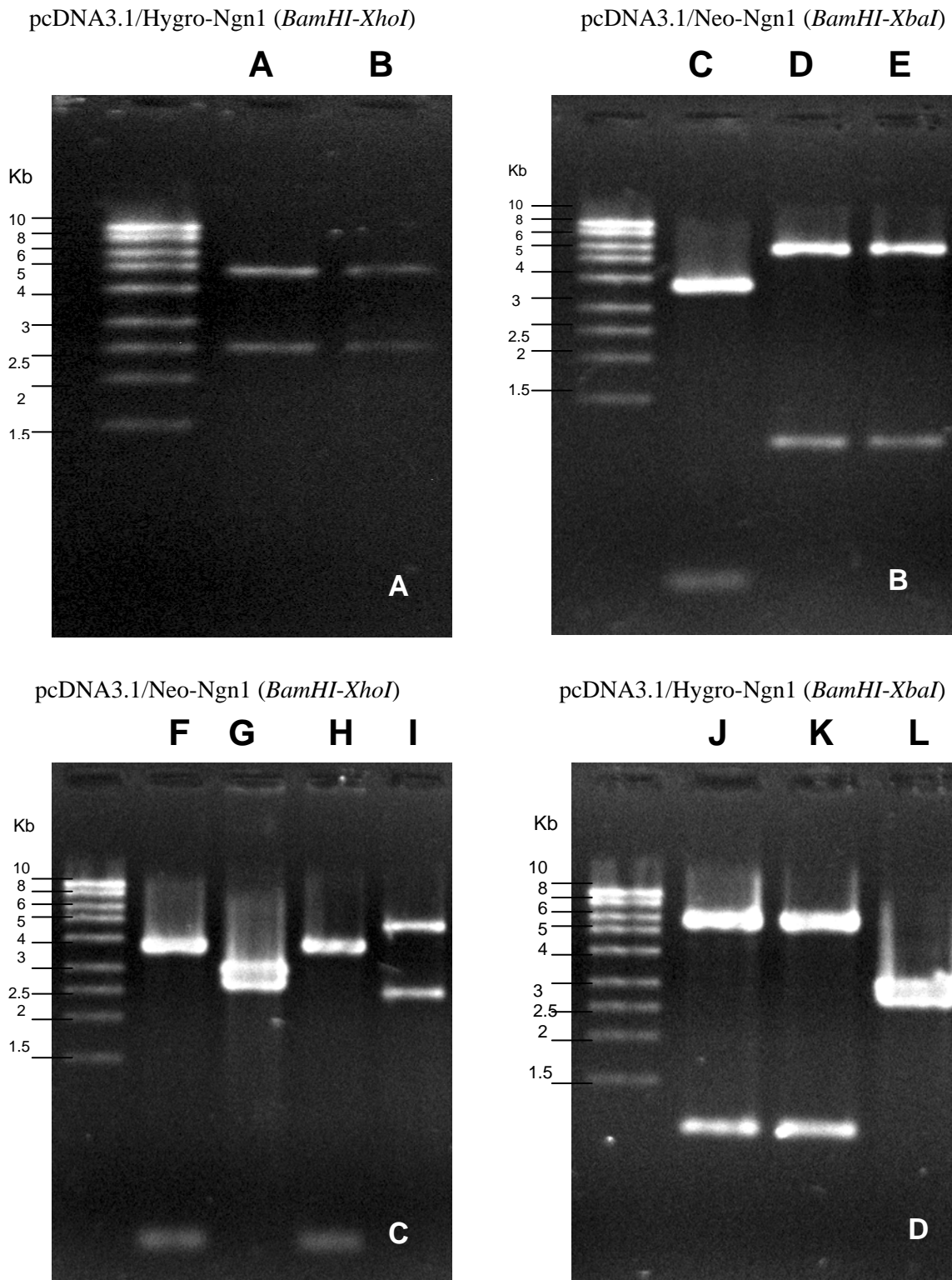


Fig. 15. Verificación de inserción en las construcciones pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA3.1/Hygro-Ngn1. A) Plásmidos A y B digeridos en los sitios *Bam*HI y *Xho*I. B) Digestiones de los plásmidos C-E en *Bam*HI y *Xba*I. C) Digestión en los sitios *Bam*HI y *Xho*I de los plásmidos F- I. D) Digestión de los plásmidos J-L en los sitios *Bam*HI y *Xba*I.

8. Extracción de DNA en grandes cantidades (*Maxiprep*)

De las colonias que mostraron que tenían el fragmento de Neurogenina 1, se realizaron cultivos bacterianos para poder obtener el DNA de las colonias D, E, J y K, de las cuales se obtuvieron 250 μl de DNA que después de la lectura en el espectrofotómetro mostraron concentraciones de: D = 38.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, E = 29.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, J = 18.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y K = 17.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cada vector. El DNA obtenido se colocó en un gel para observar que estuviera en buen estado y libre de contaminantes (Fig.16A).

Para corroborar el peso molecular de los diferentes plásmidos se hizo una digestión con *Bam*HI, corte que sólo lineariza los plásmidos y permite observar los tamaños esperados para el pcDNA3.1/Neo-Ngn1 (6.5 kb) y para pcDNA3.1/Hygro-Ngn1 (6.7 kb; Fig. 16B).

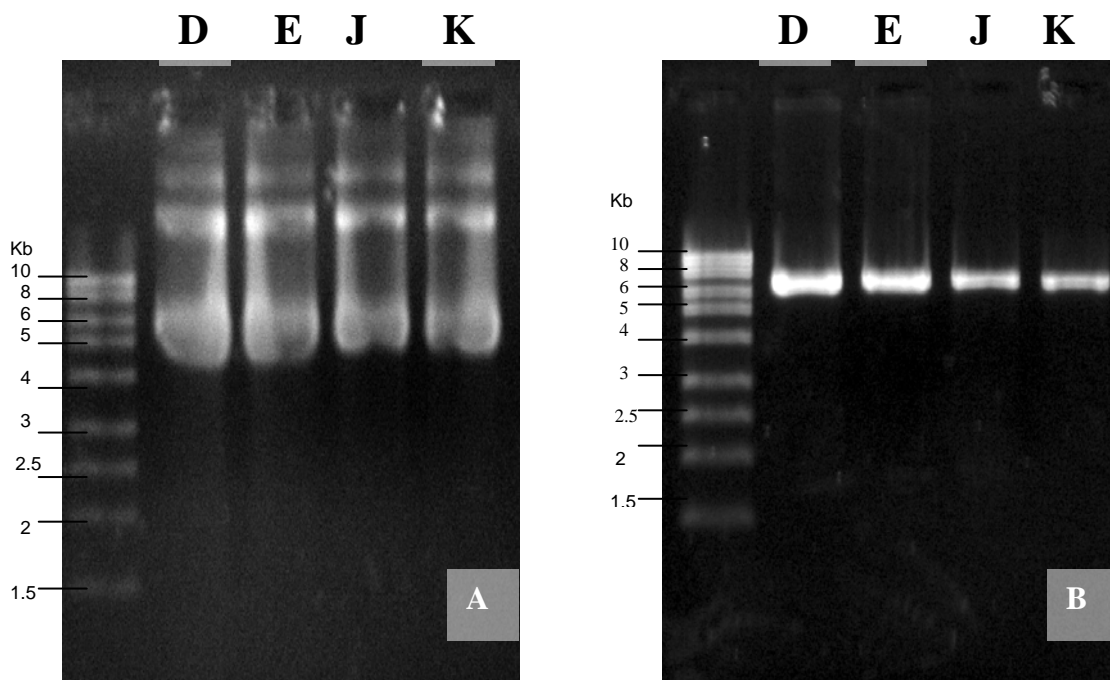


Fig. 16. Extracción a gran escala de los plásmidos D, E, J y K que contienen a Ngn1. A) Plásmidos no digeridos con las construcciones pcDNA3.1/Neo-Ngn1 (D, E) y pcDNA3.1/Hygro (J, K). B) Plásmidos linearizados con *Bam*HI, peso molecular de ~6.5 kb para pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y de ~6.7 kb para pcDNA3.1/Hygro-Ngn1.

En paralelo a la construcción de los vectores, se iniciaron los cultivos de fibroblastos para poder tener lotes grandes y para así poder crecer las células troncales embrionarias de ratón de la línea celular R1.

9. Cultivo celular e inactivación de fibroblastos

El cultivo de fibroblastos es un paso previo para empezar a crecer las células ES. Los fibroblastos fueron crecidos en condiciones de esterilidad para evitar la contaminación por microorganismos. Después de tener los fibroblastos en cultivo de las líneas celulares STO y STONeo-R (resistentes a neomicina y G418), se crecieron a gran escala.

Los fibroblastos STO que se crecieron en el laboratorio a una densidad del 80% se inactivaron con mitomicina C en las condiciones descritas en la metodología.

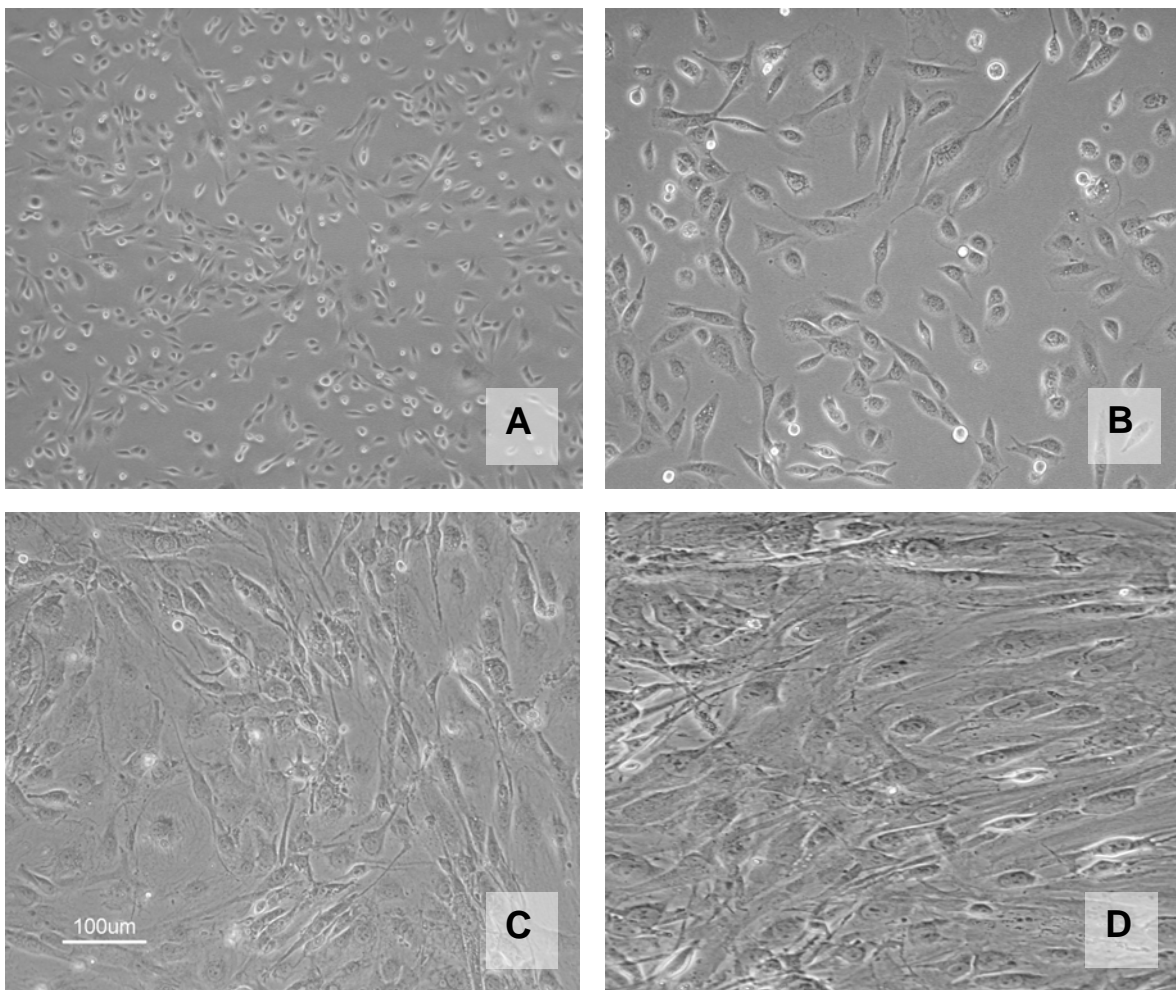


Fig. 17. Cultivos de fibroblastos. A y B) Cultivo de fibroblastos en proliferación, aumento 10X. C y D) Fibroblastos inactivos con Mitomicina C, aumento 20X. Todas las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando contraste de fases.

La figura 17 muestra cultivos de fibroblastos STO en crecimiento (A y B) y fibroblastos después del tratamiento con mitomicina C (C y D).

10. Expansión de células de troncales embrionarias

Una vez que los fibroblastos estuvieron con las condiciones adecuadas (inactivos mitóticamente) para el cultivo de las células troncales embrionarias de ratón de la línea celular R1 (ESR1), se iniciaron los cultivos con la finalidad de tener grandes lotes de este tipo celular. Las células ESR1 se mantuvieron indiferenciadas mediante la adición al medio de LIF.

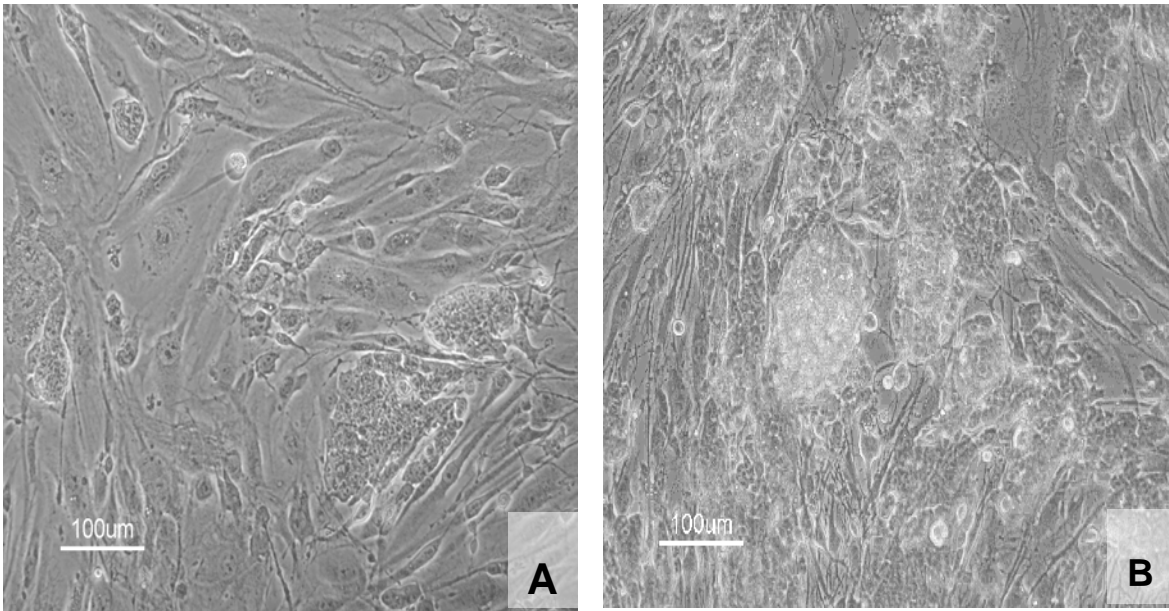


Fig. 18. Células troncales embrionarias de ratón. A y B) Aumento 10X. Todas las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando contraste de fases.

La figura 18A muestra el crecimiento en colonias de las células ESR1. En la figura 18B se muestra un campo en el cual las células troncales están a una mayor densidad, aunque conservan su estado indiferenciado al mantenerse en colonias compactas y con bordes bien diferenciados. Estas células fueron resembradas a otras cajas y congeladas. Con estas células criopreservadas se pretenden hacer electroporaciones con los vectores que se construyeron para el establecimiento de las líneas celulares transgénicas de ESR1, las que se seleccionarán con el antibiótico correspondiente (G418, análogo de neomicina, o bien higromicina).

11. Electroporación de vectores en células troncales embrionarias

En algunos experimentos preliminares utilizamos a los vectores D y E, que se linearizaron con la enzima *BglIII*, y posteriormente se introdujeron en las células ESR1 mediante electroporación como se describió en la sección de metodología.

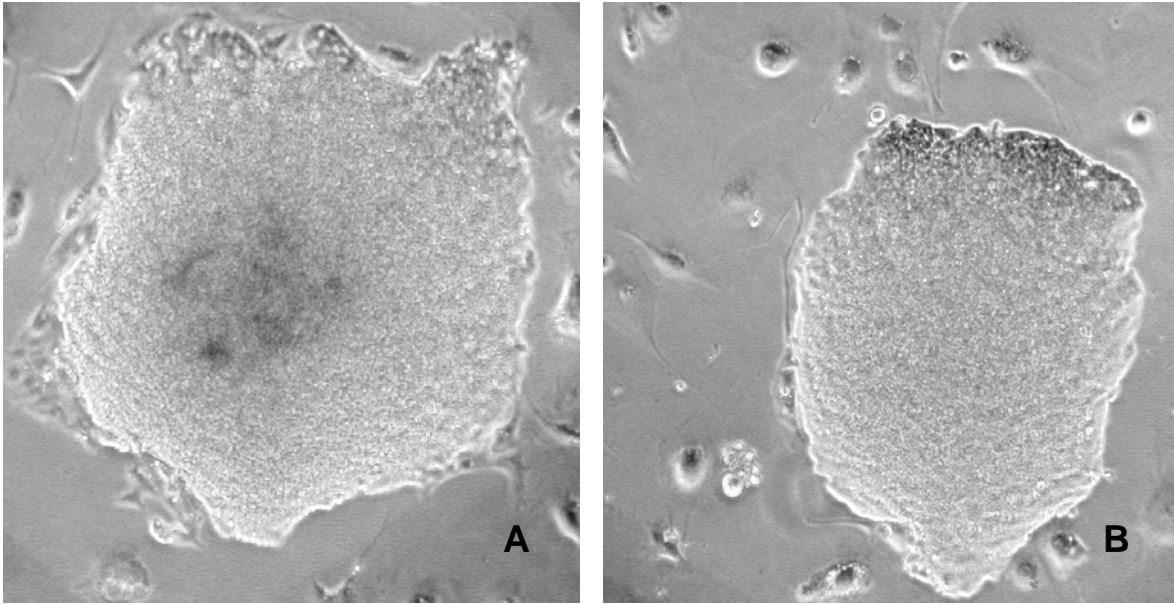


Fig. 19. Células ESR1 electroporadas con el vector pcDNA3.1/Neo-Ngn1. Morfología de las ESR1 después de la electroporación y de la selección con G 418. A y B) Dos colonias distintas obtenidas después del tratamiento de las células con antibiótico durante 7 días. Aumento 10X. Las fotografías se tomaron en un microscopio invertido usando contraste de fases.

Hasta el momento sólo se han llevado a cabo dos electroporaciones para los vectores D y E, cuya resistencia es neomicina (pcDNA3.1/Neo-Ngn1), y se obtuvieron algunas colonias de células ESR1 resistentes a G418. Las figuras 19A y 19B muestran las diferentes morfologías de las células troncales embrionarias crecidas después de la electroporación y del tratamiento con G418.

Después del tratamiento, se aislaron 36 colonias de ESR1 transgénicas, las cuales están en criopreservación y de las que posteriormente se harán cultivos para probar las diferentes condiciones de diferenciación.

DISCUSIÓN

En experimentos preliminares a la realización de esta tesis, se comenzó con la detección de Ngn1 mediante la técnica de *Western Blot*, en células ES que ya se habían electroporado con un vector utilizado para la preparación de lentivirus. En estos experimentos no se encontró ningún indicio de la proteína Ngn1 mediante la detección de la etiqueta de *myc*, por lo que se decidió comenzar con la construcción de los vectores que tuvieran la secuencia de Ngn1.

Con el análisis de los vectores: pcS2MT-Ngn1, pcDNA3.1/Neo y pcDNA3.1/Hygro, se localizaron secuencias de reconocimiento de las enzimas *BamHI*, *XbaI* y *XhoI*, cuyos extremos cohesivos eran compatibles entre los diferentes plásmidos. Con estos datos se consideró pertinente continuar con la verificación de los pesos moleculares de los vectores puros (Fig. 9B), lo que llevó a la linearización de los vectores con la enzima de restricción *BamHI*. Los resultados confirmaron los pesos moleculares esperados de: ~5.1 kb de pcS2MT-Ngn1, ~5.4 kb de pcDNA3.1/Neo y ~5.6 kb para pcDNA3.1/Hygro.

Como los resultados ratificaron los pesos moleculares, se prosiguió a hacer las digestiones de los tres plásmidos con las enzimas *BamHI* - *XbaI* y *BamHI* - *XhoI*, donde se esperaban dos fragmentos de DNA para el vector pcS2MT-Ngn1, cuyos pesos fueran de aproximadamente 1.1 kb, (secuencia que codifica para Ngn1) y la parte pcS2MT de ~4.0 kb del vector. Para los vectores pcDNA3.1/Neo se obtuvo una banda de ~5.4 kb y para pcDNA3.1/Hygro otra de ~5.6 kb (Fig. 12).

Para las ligaciones de los fragmentos fue necesario tener todos los vectores bien digeridos por lo que se corrieron los geles analíticos para verificar que éste era el caso (Fig. 12), y para obtener sólo la parte deseada, se continuó con la extracción de los fragmentos de DNA de los pesos moleculares antes descritos para los vectores aceptores, así como para Ngn1 (Fig. 13), una vez que se comprobó que las muestras estaban listas se realizó la ligación de los extremos cohesivos compatibles de los diferentes plásmidos.

Las ligaciones se efectuaron a una temperatura de 4°C durante toda la noche. Con el producto de estas ligaciones se transformaron las bacterias para poder obtener colonias con las

construcciones pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA3.1/Hygro-Ngn1. Este punto fue de vital importancia para que se alcanzara el objetivo final de obtener plásmidos con resistencia para células de mamífero con el gen de Ngn1.

De las colonias obtenidas mediante la transformación se expandieron y se les extrajo el DNA plasmídico que teóricamente tenía las construcciones esperadas (Fig. 14 A-D) y para saber cuál de las subclonas tenían el inserto se decidió hacer digestiones de prueba con las diferentes enzimas de restricción usadas (Fig. 15 A-D).

Una vez que se analizaron los geles con los vectores digeridos, se confirmó que sólo los plásmidos E, D, J y K (Fig. 15. B y D) poseían la secuencia de Ngn1, por lo que se realizó una extracción de DNA a gran escala para obtener una reserva de estos plásmidos y utilizarlos en experimentos posteriores. Los productos de esta extracción fueron verificados por los diferentes métodos de análisis de DNA así como la confirmación del peso molecular de cada uno de los vectores (6.5 kb para D y E, cuyo vector aceptor es pcDNA3.1/Neo y 6.7 kb para J y K que tenían a pcDNA3.1/Hygro como vector aceptor) mediante la linearización con la enzima *BamHI* (Fig. 16B).

A pesar de que se obtuvieron dos tipos de vectores que contenían la secuencia de *Ngn1* no se ha podido determinar cual fue la razón por la que sólo se obtuvieran subclonas que fueran cortadas con *XbaI* y no con *XhoI*.

Además, de realizar la construcción de los vectores aquí descritos se intentó construir una proteína de fusión la cual contuviera a Ngn1 y a la proteína verde fluorescente (GFP) para que al electroporar se observará con mayor claridad cuales eran las células ES que poseían el inserto. Sin embargo, el vector pEGFP-N1 fue difícil de digerir por lo que se decidió posponer estos experimentos.

En paralelo a los últimos experimentos de Biología molecular, se inició el crecimiento y expansión de fibroblastos para que posteriormente fueran tratados con mitomicina C, un inactivador del ciclo celular (Fig. 17), con el propósito de que no proliferaran y compitieran con las células

ESR1 (Fig. 18). Estas células ESR1 se utilizarán en experimentos posteriores en donde se sobreexpresará Ngn1.

En los diferentes experimentos en donde los vectores D y E fueron electroporados en células ESR1, se realizó la selección de colonias mediante el tratamiento con G418 (Fig. 19), obteniendo 36 colonias transgénicas aisladas que están en criopreservación.

La fase experimental para establecer todas líneas de ESR1 de ratón está incompleta, por lo que se pretende seguir con el cultivo de las células ES, para electroporarlas con el vector resistente a higromicina que nos hace falta.

Con la obtención de las primeras líneas celulares resistentes a neomicina se iniciará una serie de experimentos para verificar la presencia del transgen. Las células que sobreexpresen Ngn1 se colocarán en diferentes condiciones como una concentración baja de oxígeno, tratamiento con citocinas o diferentes condiciones de medios de cultivo, estableciendo si estas variantes favorecen la diferenciación y supervivencia neuronal.

CONCLUSIONES

Las diversas técnicas de Biología molecular empleadas fueron útiles para lograr la inserción del fragmento de Neurogenina 1 en los vectores pcDNA3.1/Neo y pcDNA3.1/Hygro. Fue factible la extracción de los plásmidos con las construcciones pcDNA3.1/Neo-Ngn1 y pcDNA3.1/Hygro-Ngn1, que poseen un gen de resistencia para neomicina e higromicina, los cuales servirán para la posterior selección de colonias de células troncales embrionarias.

Con la amplificación del gen de *Ngn1* en estos vectores y con las técnicas de cultivo usadas para la expansión de las células troncales, se tiene en perspectiva que una vez que se introduzcan todos los vectores se podrá estudiar el efecto de la sobreexpresión de Ngn1 en células ES pluripotentes de ratón de la línea R1, donde se evaluarán los efectos de este factor de transcripción en la proliferación e identidad de los tipos celulares en donde se espera obtener diversos tipos neurales que serán evaluados mediante diversas técnicas.

PERSPECTIVAS

- 1) Se pretende construir vectores con un sistema inducible para poder manipular más precisamente la sobreexpresión de Ngn1.
- 2) Es de interés el cultivo de las líneas de células ES transgénicas en una concentración baja de oxígeno para establecer si en estas condiciones se favorece la diferenciación y supervivencia neuronal.
- 3) Se considera importante estudiar qué tipo(s) de neuronal(es) se generan al expresar ectópicamente Ngn1, mediante la amplificación de los RNA mensajeros por RT-PCR y estudios de inmunocitoquímica, en esta última parte se utilizarán enzimas biosintéticas de neurotransmisores (descarboxilasa del glutamato, colin acetil transferasa, tirosina hidroxilasa), o bien moléculas acarreadoras de glutamato, dopamina o GABA para la determinación del tipo neuronal obtenido.

APENDICE I: Abreviaturas

AA: Ácido ascórbico

ACh: Acetilcolina

AEP: Área entopeduncular anterior

Astro: Astrocitos

bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico

BMP: Proteínas morfogénicas de hueso

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CNTF: Factor neurotrófico ciliar

CT: Células troncales

CTN: Células troncales neurales

Cx: Corteza

DA: Dopamina

Dlx1/2: Gen homeobox less distal 1/ 2

EC: Células troncales del carcinoma embrionario

EG: Células troncales germinales embrionarias

EGF: Factor de crecimiento epidermal

ES: Células troncales embrionarias

GABA: Ácido gama-amino butírico

Gli3: Del Inglés Greig cephalopolysyndactyly syndrome

Glu: Glutamato

H: Hipocampo

Lef1: Factor de unión al enhancer en linfoides1

LGE: Elevación gangliónica lateral

LIF: Factor inhibidor de leucemia

Mash1: Homólogo de *achaete-scute* en mamíferos 1

MGE: Elevación gangliónica medial

MN: Neuronas Motoras

N2: Medio DMEM/ F12 con suplemento N2

NCAMs: Moléculas de adhesión celular neural

Ngn: Neurogenina

NT4: Neurotrofina 4

Oligo: Oligodendrocitos

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGC: Células de primordios germinales

POa: Área preóptica anterior

RA: Ácido retinoico

rpm: revoluciones por minuto

Ser: Serotonina

SFB: Suero fetal bovino

Shh: Sonic Hedgehog

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

SOX: Factores de transcripción relacionada con SRY en la caja HMG

SRM: Medio con reemplazo de suero

SSEA: Antígenos embrionarios estado específicos

ZSG: Zona sub-granular

ZSV: Zona sub-ventricular

APENDICE II: Soluciones

II.1 Amortiguador de digestión (*NEB*)

Tris-HCl (pH=8)	25 mM
Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Agua destilada aforar a	1 L
Esterilizar en autoclave	

II.2 Amortiguador de ligación 1X (*NEB*)

Tris-HCl	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	10 mM
ATP	1 mM
BSA	25 µg/ ml
Ajustar el pH a 7.5 a 25 °C	

II.3 Amortiguador N3, 100 ml

Acetato de potasio 5 mM	60 ml
Ácido acético glacial	11.5 ml
Agua destilada aforar a	100 ml
Esterilizar en autoclave	

II.4 Amortiguador P1, 1L

Tris-base	6.06 g
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	3.72 g
Agua destilada aforar a	1 L
Esterilizar en autoclave, agregar	
RNasa	100 mg
Ajustar el pH a 8.0 con HCl	

II.5 Amortiguador P2, 1L

NaOH	8 g
SDS (20 %)	50 ml
Agua destilada aforar a	1 L

II.6 Amortiguador P3, 1L

Acetato de potasio	294.5 g
Disolverlo en:	
Agua destilada	500 ml
Ajustar el pH a 5.5 con:	
Ácido acético glacial	~110 ml
Agua destilada aforar a	1 L
Esterilizar en autoclave	

II.7 Amortiguador PB, 100 ml

Isopropanol	100 ml
Endonucleasas	100 mg/ml
Filtrar	

II.8 Amortiguador PE, 100 ml

Etanol	80 ml
Agua destilada aforar a	100 ml
Filtrar	

II.9 Amortiguador QBT, 1L

NaCl	43.83 g
NaOH	50 mM
EDTA	10 mM
Agua destilada aforar a	1 L
Calentar y filtrar ó esterilizar en autoclave	

II.10 Amortiguador QC, 1L

Tris- HCl (pH=8)	25 mM
Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Agua destilada aforar a	1 L
Calentar y filtrar ó esterilizar en autoclave	

II.11 Amortiguador QG, 1L

Tris- HCl (pH=8)	25 mM
Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Agua destilada aforar a	1 L

Calentar y filtrar ó esterilizar en autoclave

II.12 Amortiguador PBS (de sales fosfato) 10X, 1L

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	27.07 g
NaH ₂ PO ₄	2.4 g
Agua destilada aforar a	1 L

Calentar y filtrar ó esterilizar en autoclave

II.13 Amortiguador TBE 5X, 1L

Tris Base	54.0 g
Ácido Bórico	27.5 g
EDTA 0.5	20 ml
Agua destilada aforar a	1 L
Ajustar el pH a 8.0	

II.14 Gelatina al 0.1%, 1L

Gelatina (Sigma G-2500)	1 g
Agua destilada aforar a	1 L
Calentar y filtrar ó esterilizar en autoclave	

II.15 Medio DMEM

DMEM (Gibco 11995-040)	1000 ml
SFB (Gibco 16000-044)	100 ml
Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Gibco 15070-063)	10 ml

II.16 Medio KO-ES

Knock-DMEM (Gibco 10829-018)	425 ml
SFB (ES cell Qualified, Gibco 16141-061)	75 ml
MEM Non-Essential amino acid solution. (Gibco 11140-050)	5 ml
Penicillin-Streptomycin-Glutamin (Gibco 15070-063)	5 ml
2-mercaptoetanol (Gibco 21985-023)	0.5 ml

II.17 Medio Luria Base - Ampicilina Agar, 1L

NaCl	10 g
Peptona-Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar	15 g
Ampicilina	50 µg/ ml final
Agua destilada aforar a	1 L
Ajustar el pH a 7.0	

II.18 Medio Luria Base (LB), 1L

NaCl	10 g
Peptona-Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada aforar a	1 L
Ajustar el pH a 7.0	

II.19 Medio Luria Base Agar (LB), 1L

NaCl	10 g
Peptona-Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar	15 g
Agua destilada aforar a	1 L
Ajustar el pH a 7.0	

II.20 Medio S. O. C. (Invitrogen 15544-034)

Peptona	2 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl ₂ .	5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM

II.21 Penicilina- Estreptomina (Gibco 15070-063), 100 ml

Penicilina	5 000 U/ ml
Estreptomina	5 000 U/ ml
en solución salina al 0.85 %	

II.22 Tripsina al 0.05 % (Gibco 25300-054), 100 ml

Tripsina (1: 250)	0.5 g
EDTA (0.53 mM)	0.2 g
en HBSS sin Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺	

II.23 Tripsina al 0.25 % (Gibco 25200-056), 100 ml

Tripsina	2.5 g
EDTA (2.65 mM)	0.38 g
en HBSS sin Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺	

REFERENCIAS

- Alison MR, Poulson R, Otto WR, Vig P, Brittan M, Direkze NC, Lovell M, Fang TC, Preston SL, Wright NA (2004) Recipes for adult stem cell plasticity: fusion cuisine or readymade? *J Clin Pathol* **57**:113-120.
- Acosta-Viana KY, Zavala-Castro JE (1996) Proteínas de unión a DNA. *Rev. Biomed.* Jul-Sep; **7**:163-172.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**:683-686.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* **2**:287-293.
- Anderson DJ, Groves A, Lo L, Ma Q, Rao M, Shah NM, Sommer L (1997) Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**:493-504.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* **168**:342-357.
- Baizabal JM, Furlan-Magaril M, Santa-Olalla J, Covarrubias L (2003) Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Arch Med Res* **34**:572-588.
- Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* **21**:1200-1207.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**:763-776.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**:517-530.
- Brook FA, Gardner RL (1997) The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:5709-5712.
- Cau E, Casarosa S, Guillemot F (2002) Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* **129**:1871-1880.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**:643-655.
- Czyz J, Wobus A (2001) Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors. *Differentiation* **68**:167-174.
- Donovan PJ, Gearhart J (2001) The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* **414**:92-97.
- Episkopou V (2005) SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci* **28**:219-221.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**:1313-1317.

- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**:154-156.
- Farah MH, Olson JM, Sucic HB, Hume RI, Tapscott SJ, Turner DL (2000) Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* **127**:693-702.
- Fisher DE, Parent LA, Sharp PA (1992) Myc/Max and other helix-loop-helix/leucine zipper proteins bend DNA toward the minor groove. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:11779-11783.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* **287**:1433-1438.
- Gaiano N, Nye JS, Fishell G (2000) Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* **26**:395-404.
- Gajavelli S, Wood PM, Pennica D, Whittemore SR, Tsoulfas P (2004) BMP signaling initiates a neural crest differentiation program in embryonic rat CNS stem cells. *Exp Neurol* **188**:205-223.
- Gowan K, Helms AW, Hunsaker TL, Collisson T, Ebert PJ, Odom R, Johnson JE (2001) Crossinhibitory activities of Ngn1 and Math1 allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* **31**:219-232.
- Guillemot F (1995) Analysis of the role of basic-helix-loop-helix transcription factors in the development of neural lineages in the mouse. *Biol Cell* **84**:3-6.
- Guillemot F, Joyner AL (1993) Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech Dev* **42**:171-185.
- Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* **75**:463-476.
- Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, Andrews PW (2002) Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* **20**:329-337.
- Hjalt T (2004) Basic helix-loop-helix proteins expressed during early embryonic organogenesis. *Int Rev Cytol* **236**:251-280.
- Jan YN, Jan LY (1994) Neuronal cell fate specification in Drosophila. *Curr Opin Neurobiol* **4**:8-13.
- Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisen J (1999) Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res* **253**:733-736.
- Johnson JE, Birren SJ, Saito T, Anderson DJ (1992) DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:3596-3600.
- Jones S (2004) An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol* **5**:226.
- Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R (2005) Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* **306**:343-348.
- Kawasaki H, Mizuseki K, Sasai Y (2002) Selective neural induction from ES cells by stromal cell-derived inducing activity and its potential therapeutic application in Parkinson's disease. *Methods Mol Biol* **185**:217-227.

- Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y (2000) Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28**:31-40.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**:50-56.
- Ledent V, Paquet O, Vervoort M (2002) Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol* **3**:RESEARCH0030.
- Lee JE (1997) Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* **7**:13-20.
- Lemoli RM, Bertolini F, Cancedda R, De Luca M, Del Santo A, Ferrari G, Ferrari S, Martino G, Mavilio F, Tura S (2005) Stem cell plasticity: time for a reappraisal? *Haematologica* **90**:360-381.
- Lo L, Sommer L, Anderson DJ (1997) MASH1 maintains competence for BMP2-induced neuronal differentiation in post-migratory neural crest cells. *Curr Biol* **7**:440-450.
- Lo LC, Johnson JE, Wuenschell CW, Saito T, Anderson DJ (1991) Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev* **5**:1524-1537.
- Lopez-Carballo G, Moreno L, Masia S, Perez P, Baretino D (2002) Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **277**:25297-25304.
- Ma Q, Kintner C, Anderson DJ (1996) Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* **87**:43-52.
- Ma Q, Sommer L, Cserjesi P, Anderson DJ (1997) Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J Neurosci* **17**:3644-3652.
- Ma Q, Fode C, Guillemot F, Anderson DJ (1999) Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev* **13**:1717-1728.
- Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ (2005) Stem cell biology - a never ending quest for understanding. *Acta Biochim Pol* **52**:353-358.
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:7634-7638.
- Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**:429-440.
- Mayani H (2003) A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res* **34**:3-15.
- Mizuseki K, Sakamoto T, Watanabe K, Muguruma K, Ikeya M, Nishiyama A, Arakawa A, Suemori H, Nakatsuji N, Kawasaki H, Murakami F, Sasai Y (2003) Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5828-5833.
- Moore KB, Schneider ML, Vetter ML (2002) Posttranslational mechanisms control the timing of bHLH function and regulate retinal cell fate. *Neuron* **34**:183-195.

- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ (1997) Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* **88**:287-298.
- Mujtaba T, Piper DR, Kalyani A, Groves AK, Lucero MT, Rao MS (1999) Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. *Dev Biol* **214**:113-127.
- Nagtegaal ID, Lakke EA, Marani E (1998) Trophic and tropic factors in the development of the central nervous system. *Arch Physiol Biochem* **106**:161-202.
- Nakada Y, Hunsaker TL, Henke RM, Johnson JE (2004) Distinct domains within Mash1 and Math1 are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification. *Development* **131**:1319-1330.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA (2001) Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* **19**:193-204.
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* **59**:89-102.
- Pabo CO, Sauer RT (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* **61**:1053-1095.
- Perez SE, Rebelo S, Anderson DJ (1999) Early specification of sensory neuron fate revealed by expression and function of neurogenins in the chick embryo. *Development* **126**:1715-1728.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ (1992) Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* **359**:550-551.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**:1707-1710.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* **12**:4565-4574.
- Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD (2003) Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* **39**:13-25.
- Rossant J (2001) Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* **19**:477-482.
- Santa-Olalla J, Baizabal JM, Fregoso M, del Carmen Cardenas M, Covarrubias L (2003) The in vivo positional identity gene expression code is not preserved in neural stem cells grown in culture. *Eur J Neurosci* **18**:1073-1084.
- Seo S, Richardson GA, Kroll KL (2005) The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* **132**:105-115.
- Shablott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13726-13731.
- Sommer L, Ma Q, Anderson DJ (1996) neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* **8**:221-241.

- Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X, Fan G, Greenberg ME (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* **104**:365-376.
- Talikka M, Perez SE, Zimmerman K (2002) Distinct patterns of downstream target activation are specified by the helix-loop-helix domain of proneural basic helix-loop-helix transcription factors. *Dev Biol* **247**:137-148.
- Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* **414**:112-117.
- Thomson JA, Marshall VS (1998) Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* **38**:133-165.
- Thomson JA, Odorico JS (2000) Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends Biotechnol* **18**:53-57.
- Thomson JA, Marshall VS, Trojanowski JQ (1998a) Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells. *Apmis* **106**:149-156; discussion 156-147.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7844-7848.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998b) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145-1147.
- Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, Watanabe Y, Mizuseki K, Sasai Y (2005) Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* **8**:288-296.
- Weintraub H (1993) The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* **75**:1241-1244.
- Weissman IL (2000a) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* **287**:1442-1446.
- Weissman IL (2000b) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**:157-168.
- Weissman IL (2002) Stem cells--scientific, medical, and political issues. *N Engl J Med* **346**:1576-1579.
- Wilson SW, Rubenstein JL (2000) Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* **28**:641-651.
- Yeo W, Gautier J (2004) Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev Biol* **274**:233-244.