



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS
TRONCALES EMBRIONARIAS DE
RATÓN A NEURONAS MOTORAS

T E S I S

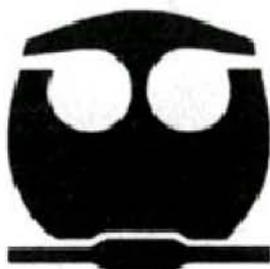
QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE :

**MAESTRA EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A:

**PHILIP JULIAN KNUCKLES
DÍAZ**

Tutor: DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ



MÉXICO, D. F.

Marzo, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Diferenciación de células troncales embrionarias de ratón a neuronas motoras

Philip Julian Knuckles Díaz
Instituto de Fisiología Celular
Tutor: Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Vocal	Dr. Julio Morán Andrade
Secretario	Dra. Diana EscalanteAlcalde
Suplente	Dr. Jorge Vázquez Ramos
Suplente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

El proyecto y la tesis para el grado de maestría se elaboraron en el Instituto de Fisiología Celular en el laboratorio del Dr. Iván Velasco Velázquez. Este trabajo recibió apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN226703 y complemento de beca de maestría) y CONACYT (beca de maestría). Este trabajo también fue apoyado por la Dra. Anayansi Molina Hernández.

Agradecimientos

Hay tantas personas que aportaron de alguna u otra manera a este proyecto lo que hace muy difícil hacerles mención a todos dentro de un espacio razonable. Aquí va mi mejor intento:

A mi madre y padre por el amor, cariño y apoyo incondicional que me han brindado toda la vida. A mi pequeño hermano, que será pequeño hasta que seamos viejos los dos, por hacer la vida más interesante y graciosa.

A mi jefe, maestro y amigo Iván Velasco por su infinita paciencia y confianza. A mis compañeros de laboratorio: Nidia, Erika, Anayansi, Emmanuel, Rodrigo, Fabián y Raquel por su ayuda y amistad estos dos años. Estoy convencido de que no pude haber hecho mi tesis en un mejor laboratorio con gente más capaz y cooperativa.

Al Dr. Hynek Wychterle por la donación de las células HBG3, por sus invaluable consejos en cuestiones metodológicas y por su cálido recibimiento al visitarlo. A la Dra. Diana Escalante por su apoyo durante dos años, especialmente al principio de la maestría cuando apenas se formaba este laboratorio. A mi comité tutorial formado por los doctores Ignacio Camacho y Alfredo Varela por la crítica y orientación que como fruto dió la conclusión de este proyecto. Al Dr. Luís Covarrubias y a su estudiante Sandra por anticuerpos y el protocolo para la detección de Islet1.

Al la Dra. Laura Escobar y a su maravilloso equipo de trabajo: Carolina, Rolando, Ivonne y Noe, con quien tuve la oportunidad de empezar mis estudios de maestría.

A mis estimadísimos amigos de Fisiología Celular Juan Carlos, Alberto, Ilse y Perla que encarnan el brillante porvenir de la ciencia en México. Gracias Gaby por tu cariño y apoyo en estas etapas finales. A mis amigos de toda la vida en las buenas y las malas, Mike, Burgs, Elaine, Lalo, Lasla, Brian, Aldo, Iván, Ale, Elly, Moy, Pieter, Marianne, Lau y Clau.

A todos ustedes mis más sinceras gracias, nunca lo pude haber hecho sin ustedes.

Índice

	Página
Resumen.....	7
Lista de abreviaturas.....	8
Introducción.....	9
Las células troncales.....	9
Las células troncales pluripotenciales.....	10
Cultivo en estado indiferenciado de las células pluripotenciales.....	14
El desarrollo del sistema nervioso central.....	17
El sistema nervioso central se forma a partir del ectodermo.....	17
Desarrollo de la Médula Espinal.....	21
Papel del ácido retinoico en la formación del SNC.....	21
Diferenciación dorsoventral en el tubo neural.....	24
Sonic Hedgehog como morfógeno ventral.....	25
Desarrollo de las motoneuronas	29
Factores transcripcionales necesarios en el desarrollo de las motoneuronas.....	29
El papel de Olig2 y Ngn2 en la diferenciación de MNs.....	33
Los genes Hox en la especificación de la organización columnar de MNs.....	35
La utilidad de generar neuronas motoras de manera	

ilimitada <i>in vitro</i>	37
El trasplante celular como terapia para lesiones de la Médula espinal.....	37
Transplantes de células diferenciadas.....	40
Justificación.....	42
Objetivos.....	44
General.....	44
Particulares.....	44
Métodos.....	45
Protocolo para la generación de motoneuronas a partir de células troncales embrionarias.....	45
1. Expansión de células troncales embrionarias sobre células nodriza y congelación.....	45
3. Congelación de células.....	46
4. Descongelación de células troncales embrionarias.....	46
5. Expansión de células troncales embrionarias.....	47
6. Generación de cuerpos embrionarios	48
7. Disociación de cuerpos embrionarios.....	49
8. Protocolo de inmunotinción.....	52
9. Separación de células mediante citometría de flujo.....	52
Resultados.....	54
Inmunotinciones de células troncales embrionarias sometidas al proceso de diferenciación.....	54
Selección de motoneuronas mediante expresión de la proteína	

verde fluorescente como molécula reportera.....	57
Células HBG3.....	59
Cuantificación de células GFP positivas.....	62
Citofluorometría.....	64
Cuantificación y separación de células utilizando el citómetro de flujo FACSaria.....	66
Discusión.....	69
Conclusión.....	73
Perspectivas.....	74
Apéndice.....	76
Referencias.....	78

Resumen

En las últimas décadas el estudio de las células troncales se ha incrementado exponencialmente. Este hecho puede deberse a la posibilidad de que en un futuro algunas de las enfermedades más devastadoras y comunes que afligen a la humanidad, puedan paliarse con dichas células. Aunque falta mucho por entender aspectos básicos de la biología de las células troncales, ya existen protocolos *in vitro* que permiten manipular la capacidad de diferenciación de células pluripotenciales. De esta forma, se pueden generar tipos celulares sumamente especializados en grandes números, lo que podría ser útil para el tratamiento de algunas patologías mediante trasplantes encaminados a revertir el daño por lesión o enfermedad.

El objetivo del proyecto de investigación de Maestría fue el estandarizar y adaptar un método para generar neuronas motoras partiendo de células troncales embrionarias (CTE) de ratón. Dichas células se obtiene de la masa interna celular del embrión pre-implantación y tienen la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular del adulto. Previamente se ha reportado la diferenciación neural empezando con CTE para obtener neuronas dopaminérgicas, interneuronas de la médula espinal y motoneuronas. En este último caso, se ha observado que las motoneuronas generadas *in vitro* tienen las propiedades electrofisiológicas necesarias para un funcionamiento normal.

En este trabajo, cultivamos CTE de ratón para exponerlas a morfógenos que se sabe están involucrados en el desarrollo de la médula espinal. Utilizando cuerpos embrionarios, realizamos incubaciones con ácido retinoico y probamos distintas concentraciones de la proteína Sonic Hedgehog, para generar motoneuronas, que identificamos con distintos marcadores neuronales (tubulina beta III, Map2 y NeuN) y factores transcripcionales (Islet1 y Lim 1/2). Posteriormente, utilizamos una línea de CTE de ratón que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de los elementos reguladores del gen *Hb9*. Esta proteína se expresa selectivamente en motoneuronas postmitóticas, por lo que la expresión de la GFP se utilizó para cuantificar el número de motoneuronas generadas. Finalmente, utilizando equipos de citofluorimetría que permiten la separación de células fluorescentes se pudieron aislar cultivos puros de motoneuronas.

Lista de abreviaturas

AR	Ácido retinoico	ALS	Esclerosis lateral amiotrófica
BBB	Beattie, Basso y Bresnahan	BMP	Proteínas morfogénicas de hueso
ChAT	Colina acetil transferasa	CT	Columna de Terni
CE	Carcinoma embrionario	CTA	Células troncales adultas
CTE	Células troncales embrionarias	CTN	Células troncales neurales
DMSO	Dimetil sulfóxido	DSHB	Banco de hibridomas del desarrollo
EB	Cuerpo Embrionario	ERK	Cinasas de regulación extracelular
FACS	Separación celular por fluorescencia	FALS	ALS familiar
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico	GE	Germinal embrionaria
GDNF	Factor neurotrófico derivado de glía	GFP	Proteína verde fluorescente
JAKs	Cinasas Janus	LIF	Factor inhibidor de leucemia
LMC	Columna lateral motora	MN	Motoneurona
ME	Médula espinal	Ptch	Patched
Raldh2	Retinaldehído deshidrogenasa 2	RAR	Elementos de respuesta a AR
Rpm	Revoluciones por minuto	RXR	Receptores a retinoides X
Shh	Sonic Hedgehog	Smo	Smoothened
SNC	Sistema nervioso central	SNP	Sistema nervioso periférico
SOD1	Superóxido dismutasa 1	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Introducción

Las células troncales

A una célula que tiene la habilidad de auto-replicarse por períodos indefinidos de tiempo, en algunos casos durante la vida entera de un organismo, se le llama célula madre o célula troncal. Bajo las condiciones propicias y con las señales adecuadas, las células troncales tienen la capacidad de diferenciarse a uno o diversos tipos celulares (Kirschstein y Skirboll, 2001). Dicho de otra manera, las células troncales tienen la habilidad de auto-regenerarse y, a la vez, producir células maduras y especializadas esenciales en el funcionamiento del organismo completo.

No todas las células troncales tienen la misma capacidad en cuanto a la cantidad de tipos celulares que pueden producir. Las células que se diferencian a los precursores de los espermatozoides son células troncales unipotentes; se auto-repican y producen un solo tipo de célula especializada. Las células troncales hematopoyéticas, por el contrario, producen todas las poblaciones celulares que constituyen la sangre y, por lo tanto, se les denomina multipotentes. Una última categoría para denominar a las células troncales partiendo de su capacidad de diferenciación son aquellas células designadas pluripotentes (Fig. 1). Dichas células pueden, en teoría, diferenciarse a cualquier tipo celular del organismo de donde se extraen con excepción de las estructuras extraembrionarias (Kirschstein y Kirschstein y Skirboll, 2001).

La clasificación de las células según su potencial de diferenciación no es la única manera de hacer distinciones entre células troncales. Otro modo de categorizarlas es en términos de la fuente de donde se derivan. A *grosso* modo, las células troncales se pueden dividir en dos grupos: adultas (células troncales adultas, CTA) y embrionarias (células troncales embrionarias, CTE). Existen diferencias en términos de potencialidad y habilidad proliferativa entre las dos. La mayor diferencia entre las CTE y CTA está en el número de diferentes células especializadas que pueden producir. Muchos grupos han demostrado que las CTE tienen un mayor poder de diferenciación en términos de los distintos linajes que pueden producir. Dicho esto, hay trabajos recientes que cuestionan esta perspectiva. Para dar un par de ejemplos, se han podido diferenciar células progenitoras neurales a células de

músculo esquelético (Galli *et al.*, 2000). Otro ejemplo emplea células mesenquimales, las cuales han producido neuronas, glia, músculo liso y adipocitos (Jiang *et al.*, 2002).

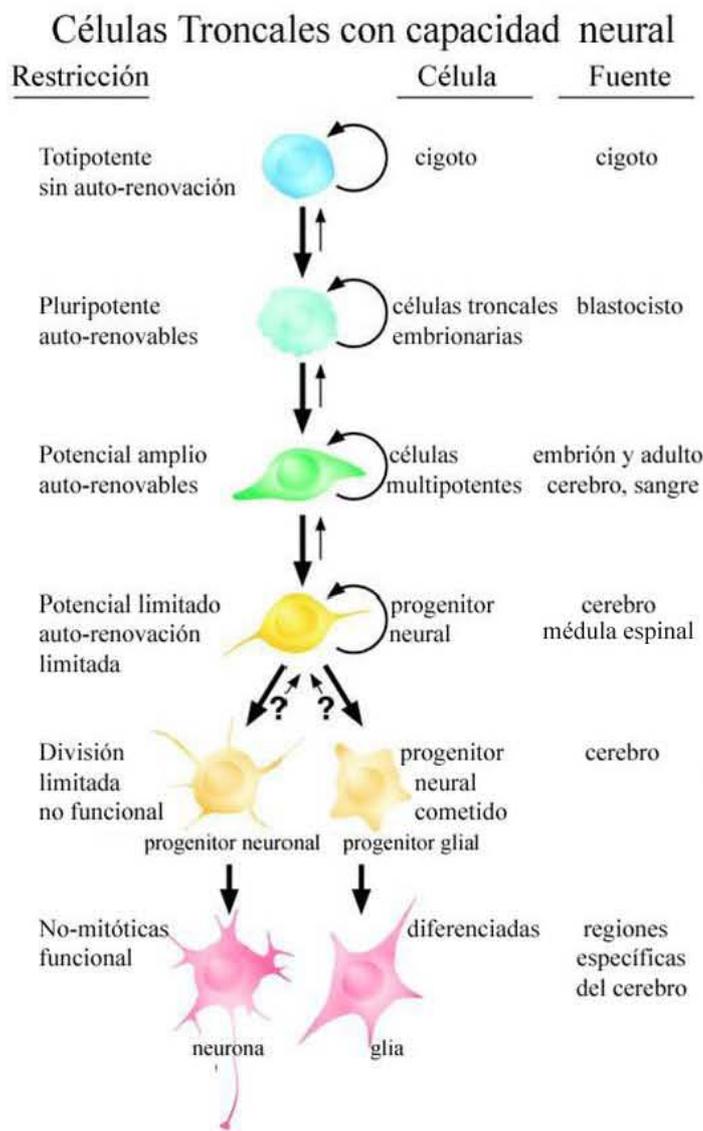


Fig. 1. Esquema jerárquico empezando con las células más primitivas y con potencial más amplio, avanzando a progenitores progresivamente más restringidos. Se muestra también la fuente de las diferentes células troncales. Las flechas curvadas sugieren autorrenovación ilimitada, mientras que las flechas pequeñas indican la posibilidad de desdiferenciación (Gage, 2000).

Las células troncales pluripotenciales

Es necesaria una discusión más detallada sobre las células troncales pluripotenciales, ya que este proyecto se enfoca al uso de líneas celulares de este tipo. Las células pluripotenciales se derivaron por primera vez de teratocarcinomas por el grupo de Leroy Stevens a finales de la década de los 1960s (Stevens, 1967). En dichos tumores,

extraídos de gónadas de adulto, se encontró una extensa variedad de tejidos de las tres capas primarias germinales del embrión (endodermo, mesodermo y ectodermo; Fig. 2). A las células que dan lugar a esta variedad de tumores se les nombran células de carcinoma embrionario (CE; Fig. 3). Por su enorme capacidad de diferenciación, inicialmente se pensó que estas células pluripotentes podrían diferenciarse a linajes especializados y eventualmente ser fuente de células para reemplazar aquellos tejidos dañados por enfermedad o lesión. Sin embargo, esta idea se abandonó al observarse que las células de CE frecuentemente eran aneuploides (poseían un número anormal de cromosomas) y por el hecho de que provenían de tumores.

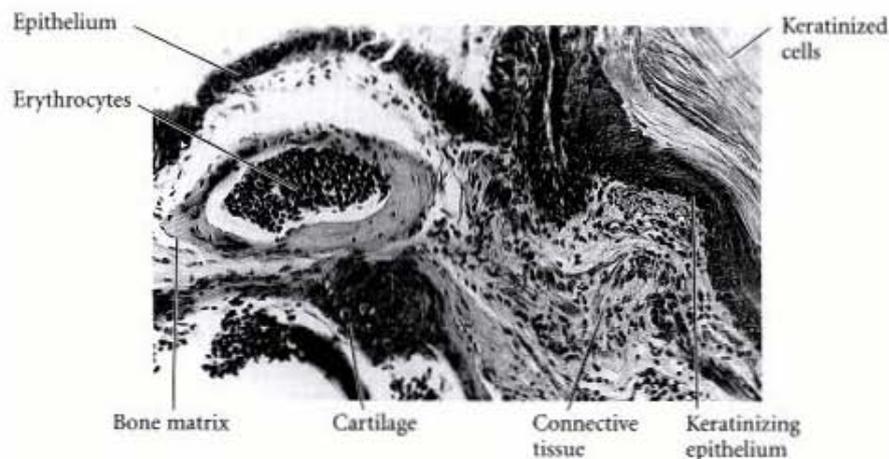


Fig. 2. Fotomicrografía de una sección de un teratocarcinoma mostrando diferentes tipos celulares diferenciados (eg. cartílago, células queratinizadas, tejido conectivo y eritrocitos).

Las CTE se obtienen de la masa interna celular de una etapa de pre-implantación del embrión llamada blastocisto. Esta estructura consta de no más de 150 células en el ratón (Fig. 3). Los estudios de CTE derivadas de ratón empezaron hace más de 20 años con el establecimiento de técnicas que permiten los cultivos de dichas células *ex vivo* (Martin, 1981). Una línea de CTE debe llenar ciertos criterios para que se le pueda denominar de esta manera. Los estudios de Austin Smith (Heath *et al.*, 1990), (Smith, 2001) han contribuido enormemente al campo de estudio de las CTE. En ellos se ha compilado una lista de características para identificar a una línea de CTE:

1. Derivadas de la masa interna del blastocisto.
2. Capaces de dividirse de manera simétrica ilimitadamente sin diferenciarse.
3. Mantienen un cariotipo normal.

4. Pluripotencialidad, ésto es, capaces de diferenciarse a tipos celulares de las tres capas embrionarias.
5. Deben ser capaces de integrarse a todos los tejidos fetales durante el desarrollo, incluyendo la línea germinal, diferenciándose finalmente a espermatozoides y ovocitos.
6. Son clonogénicas, es decir, que una sola célula puede producir una colonia de células genéticamente idénticas o clonas que tienen las mismas propiedades de la célula original.
7. Expresan el factor de transcripción Oct-4, que se piensa mantiene a las células en un estado indiferenciado y proliferativo.
8. Se pueden inducir a diferenciarse a distintos linajes celulares o mantenerse indiferenciadas.
9. Permanecen la mayoría del tiempo en fase S del ciclo celular y carecen de los “checkpoints” de G1.
10. No muestran la inactivación del cromosoma X.
11. Tienen alta actividad de la enzima telomerasa.
12. Expresan una isoforma específica de la fosfatasa alcalina.

Existen por lo menos tres experimentos clásicos para establecer la pluripotencialidad de una línea de CTE que se ha mantenido en cultivo. El primero consta en inyectar las células en la cavidad (blastocelo) de un blastocisto en desarrollo. Si las células tienen la capacidad de contribuir a todos los tipos celulares de un organismo nuevo, ahora quimérico, se les considera pluripotenciales. Cabe mencionar que las células CE también son capaces de colonizar todos los linajes embrionarios con excepción de la línea germinal (Donovan y Gearhart, 2001). Esta observación probablemente se deba a su cariotipo anormal. La segunda prueba consta de inyectar las células en un individuo adulto inmunodeficiente, para prevenir que el tejido sea rechazado. Las células pluripotentes forman tumores benignos llamados teratomas. Cuando se examinan con más detalles, estos tumores constan de células de las tres capas embrionarias (Fig. 2). Un tercer método de demostrar la pluripotencialidad de una línea celular es demostrar que se diferencie en células del endo, meso y ectodermo *in vitro*. Esto se puede hacer variando las condiciones

de cultivo, por ejemplo, para diferenciar CTE murinas basta con sembrarlas sin una capa de células nodrizas y sin el factor inhibidor de leucemia (cuyas acciones se detallan más adelante).

Una tercera línea de células pluripotenciales se aisló a partir de células primordiales germinales derivadas de las gónadas de embriones en fases post-implantación (Donovan y Gearhart, 2001; Fig. 3). A esta variedad de células se les conoce como GE (germinal embrionaria). Estas células se pueden aislar directamente de la gónada embrionaria y sembrarse sobre una capa de células nodrizas. En presencia de suero y ciertos factores de crecimiento, forman colonias con una morfología y un comportamiento indistinguible de las células de CE y de las CTE.

Dos de las tres líneas pluripotenciales mencionadas (CTE y GE) se han obtenido de embriones humanos descartados. Para algunas sociedades este hecho representa un enorme problema ético. El uso de CT humanas de origen embrionario se ha convertido en un tema polémico. Aunque se ha descrito el potencial terapéutico de las CTE en modelos animales de enfermedades, los gobiernos de varios países, incluyendo EU y Alemania, han decidido limitar drásticamente los fondos gubernamentales destinados a la investigación utilizando dichas líneas.

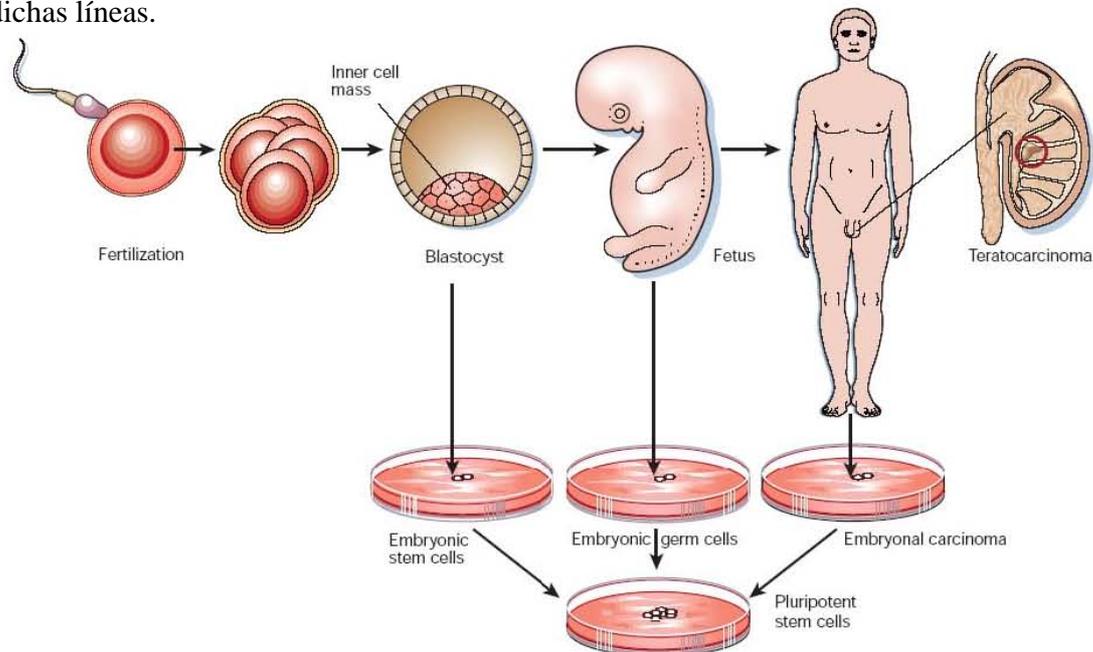


Fig. 3. El origen de las células troncales pluripotentes. Las CTE se derivan de la masa interna (inner cell mass) del blastocisto. Las células externas del embrión conforman el trofoctodermo y formarán la parte fetal de la placenta. Las células GE se extraen de la línea germinal de la gónada embrionaria. Las células de CE se derivan de tumores testiculares en adultos (Donovan y Gearhart, 2001).

Cultivo en estado indiferenciado de las células pluripotenciales

Uno de los obstáculos más grandes en el cultivo, expansión y diferenciación de las células troncales embrionarias es su mantención en un estado pluripotente e indiferenciado. Las CTE de ratón se pueden mantener en un estado indiferenciado y de alta proliferación mediante el co-cultivo con fibroblastos embrionarios de ratón. Alternativamente, se puede adicionar el factor inhibidor de leucemia (LIF) al medio de cultivo (Williams *et al.*, 1988). El LIF inhibe la diferenciación y mantiene la alta proliferación en cultivos *in vitro*. LIF se une a un complejo receptor de dos partes que consiste del receptor a LIF propiamente y el receptor gp130. La unión del ligando al receptor dispara la activación del factor de transcripción STAT3, a través de la vía de señalización JAK/STAT. En más detalle, la unión del ligando, LIF en este caso, tiene el efecto de dimerizar a los dos receptores. Las subunidades que forman el receptor tienen cinasas llamadas JAKs (Janus kinases) acopladas a ciertas regiones citoplasmáticas. La dimerización activa a las JAKs propiciando la fosforilación de los propios receptores en varios sitios. Al fosforilarse los receptores, su actividad de cinasa se enciende y permite la fosforilación de STAT3 causando su activación, dimerización y translocación al núcleo, donde actúa como factor de transcripción.

La capacidad de autorenovación de las CTE en ratones es también influenciada directamente por SHP-2 y ERK (extracellular signal regulated kinase). Ambas proteínas son componentes de una vía de señalización que parece antagonizar el efecto proliferativo de la activación de STAT3. SHP-2 es una fosfatasa de tirosinas la cual se ha demostrado que interacciona con la región intracelular amino terminal del co-receptor gp130. La activación de ERK es normalmente necesaria para la progresión del ciclo celular a través del *checkpoint* de G1 dependiente de ciclina D/CDK. Sin embargo, estos *checkpoints* no son funcionales en las CTE. La activación de ERK más bien parece estar implicada en el disparo a la diferenciación en las CTE, idea apoyada por la observación de que la inhibición de la enzima activadora de ERK, MEK, tiene el efecto de amplificar la auto renovación y proliferación de dichas células (Smith, 2001).

En el caso de las CTE una manera de atenuar la activación de vías de señalización que promueven la diferenciación es la expresión específica de proteínas adaptadoras que pudieran regular estas vías. Por ejemplo, las CTE de ratón expresan altos niveles de una

forma alterada de la proteína de andamiaje Gab1. A pesar de que existan altos niveles de ERK en las CTE que pudieran promover la diferenciación, Gab1 parece suprimir la interacción de ciertos receptores a la vía de ERK. Apoyando esta idea, está la observación de que Gab1 parece estar regulada por el factor de transcripción Oct4, el cual está implicado en la manutención de las propiedades autorenovables y pluripotenciales de las CTE (Kirschstein y Kirschstein y Skirboll, 2001).

Aunque LIF sea suficiente para mantener el estado de autorenovación en las CTE de ratón, este factor no tiene el mismo efecto de manutención cuando se adiciona a cultivos de CTE de humano. Esto sugiere que la activación de la vía de STAT3 tal vez no sea la única necesaria para mantener el estado pluripotente y de auto renovación. En un trabajo reciente (Sato *et al.*, 2004) se investigó el efecto de un fármaco inhibidor de la cinasa de glucógeno sintetasa 3, el cual tiene un efecto equivalente a la activación de la vía de señalización canónica de Wnt sobre la capacidad autorenovación de CTE de humano. Se demostró que la activación de Wnt es suficiente para mantener la expresión de marcadores de pluripotencia y auto renovación como son Oct4 y Nanog.

En resumen, la capacidad de auto-renovarse de las células troncales parece depender del balance de varias vías contrapuestas. Si este balance se perturba, el resultado es la diferenciación (Fig. 4).

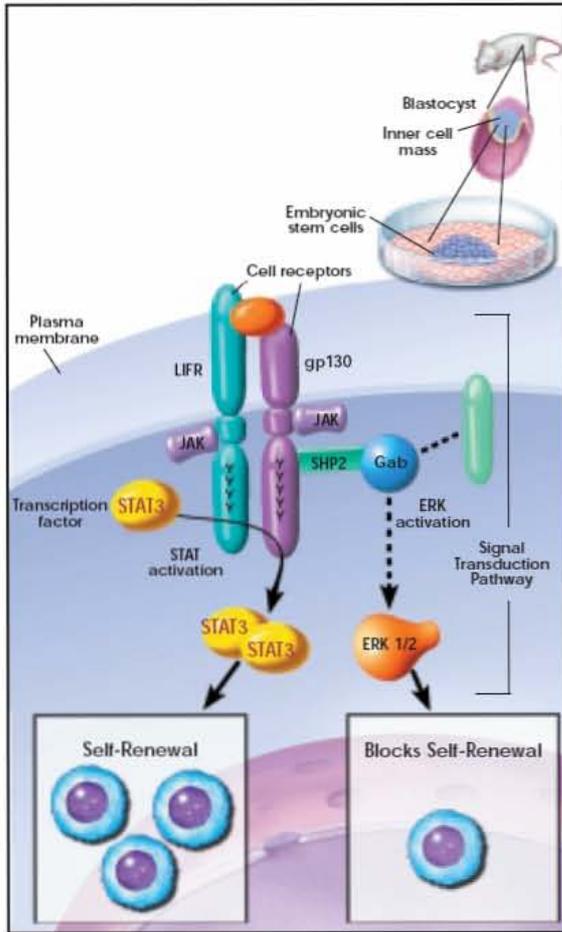


Fig. 4. Diagrama esquematizando la interacción de varias vías de señalización, incluyendo LIF/STAT3, que mantiene el estado de autorrenovación de las CTE y la vía de RAS/ERK, que al activarse en ausencia de reguladores específicos de células pluripotenciales como Gab1, inducen la diferenciación (Kirschstein y Skirboll, 2001).

El desarrollo del sistema nervioso central

El objetivo principal de este proyecto es investigar si se puede reproducir *in vitro* el desarrollo de un tipo especializado de células a partir de una población indiferenciada y pluripotente de CT. Se pretende diferenciar CTE de ratón hacia un tipo de neurona muy específica: la motoneurona (MN).

Para cumplir con el objetivo propuesto, es necesario tener conocimiento del desarrollo temprano del sistema nervioso central (SNC) y específicamente, de la diferenciación del tipo de neuronas que se quieran generar. Teniendo un conocimiento de las señales inductivas que dan lugar a los diferentes tipos de neuronas de la médula espinal (ME) se pueden utilizar estas mismas vías para obtener una población enriquecida de MNs. Es también necesario tener conocimiento de algunos de los marcadores a lo largo del desarrollo de MNs *in vivo*, para saber si *in vitro* se está siguiendo el mismo programa de diferenciación que tiene lugar *in vivo*.

El Sistema nervioso central se forma a partir del ectodermo

El SNC consta de cientos de tipos celulares especializados, tanto neuronales como gliales, que son derivados de una población uniforme de progenitores. Durante el desarrollo, las células progenitoras migran, proliferan, mueren e interaccionan unas con otras siguiendo un programa predeterminado con la finalidad de ensamblar un SNC funcional.

El SNC comienza su formación después de la gastrulación, esto es la formación de tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). A partir de una capa, el ectodermo, se forman tanto el SNC como el sistema nervioso periférico (SNP). Las células ectodermales con destinos neurales forman una “placa neural” que consta de un epitelio columnar. El resto del ectodermo da lugar a la epidermis. Aunque el ectodermo puede formar el tejido del SNC y la piel, el programa *default* que siguen las células que lo componen es neural. Para la diferenciación de células ectodermales a epidermis debe entonces existir una señal que inhiba el programa neural. Los mediadores de esta señal represora son miembros de la familia de proteínas morfogénicas de hueso (BMP por sus siglas en inglés; Kandel *et al.*, 2000).

En 1924, Hans Spemann y Hilde Mangold descubrieron que el ectodermo primitivo se diferencia a neuroectodermo por la acción de señales inductivas solubles provenientes de una región a la que más tarde se le llamó el organizador de Spemann. Las señales de este organizador son inhibidores de la vía de señalización de BMP. Las células en la región organizadora expresan grandes cantidades de las proteínas folistatina, noggina y cordina, las cuales tiene la habilidad de inducir la diferenciación neural del ectodermo. Estas proteínas se unen a BMPs previniendo la unión a sus respectivos receptores y permitiendo entonces la diferenciación neural. Aunque la especificación sea mediada directamente por antagonistas de la vía de BMP, hay otros factores necesarios para que los progenitores ectodermales adquieran carácter neural. Uno de estos se piensa que son los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF por sus siglas en inglés) especialmente el FGF8. Ésto está evidenciado por la observación de que la inhibición de señalización por FGF previene la inducción neural a pesar de que los antagonistas de BMPs están presentes (Streit *et al.*, 2000).

La placa neural se pliega centralmente formando una estructura tubular llamada tubo neural. Este tubo neural se separa completamente del ectodermo una vez que se ha cerrado. Esta disociación esta mediada por la expresión diferencial de moléculas de adhesión. El ectodermo expresa E-caderina mientras que la placa neural deja de producir esta proteína y en su lugar empieza a expresar N-caderina y N-CAM. A este proceso de formación de un primordio del SNC se le conoce como la neurulación (Fig. 5; Gilbert, 2003).

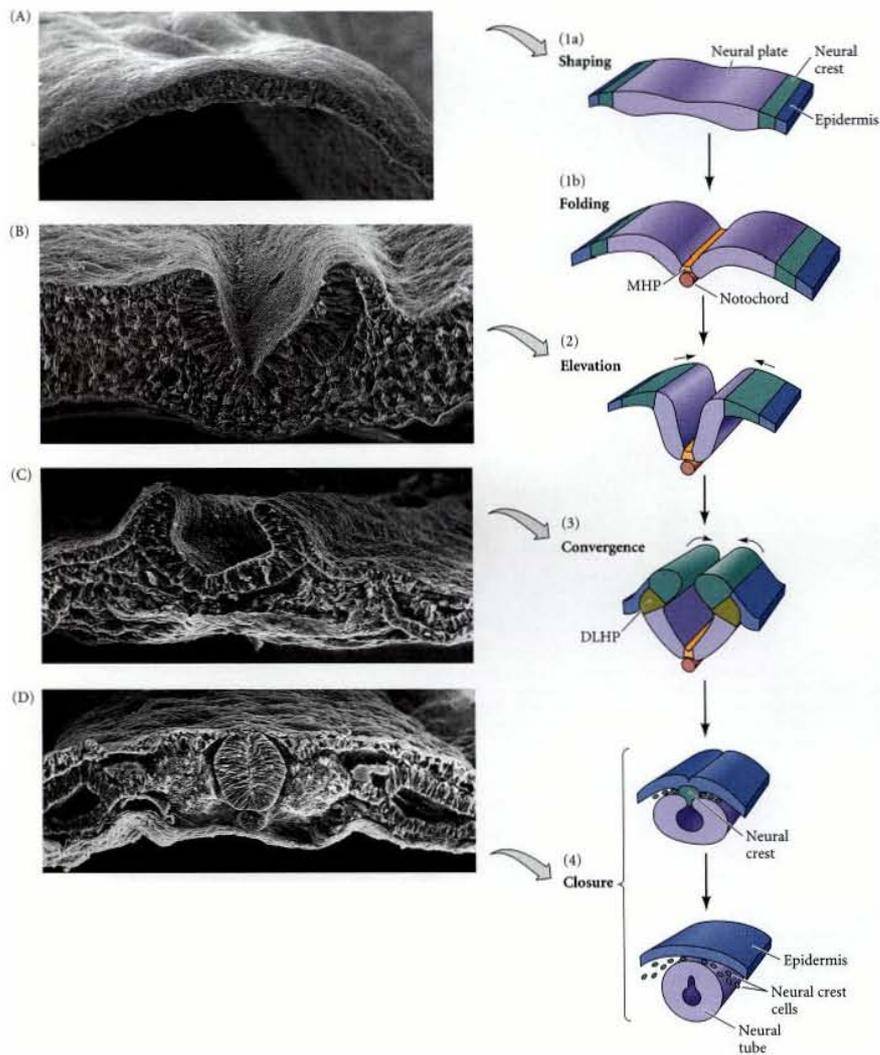


Fig. 5. La neurulación: células columnares de la placa neural se pliegan medialmente y se anclan sobre la notocorda. El tubo neural se forma y finalmente se separa de la epidermis (Gilbert, 2003).

La parte caudal del tubo neural da lugar a la médula espinal, mientras que rostralmente se forma el cerebro. El tubo neural se cierra durante el desarrollo, formando una cavidad o ventrículo central lleno de líquido. Las células neuroepiteliales empiezan a proliferar a diferentes velocidades. En la parte rostral del tubo neural se forman tres vesículas primarias: proscencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo. La formación de las vesículas primarias se debe en gran parte a la presión que ejerce el líquido dentro del ventrículo. Las vesículas primarias se subdividen más tarde: el procencefalo se divide en dos formando el telencéfalo rostralmente y el diencefalo caudalmente. El telencéfalo eventualmente da lugar a los hemisferios cerebrales mientras que el diencefalo a las

regiones talámicas e hipotalámicas. El mesencéfalo no se subdivide, mientras que el romboencéfalo forma dos nuevas vesículas, el metencéfalo y el mielencéfalo. Finalmente, el mielencéfalo forma la médula oblongada y el metencéfalo el cerebelo (Gilbert, 2003).

Temprano en el desarrollo del tubo neural, éste consta solamente de una capa de células neuroepiteliales. Estas células precursoras se dividen rápidamente y tienen propiedad de célula troncales, esto es de auto-renovación y capacidad de diferenciarse a distintos linajes especializados. Al examinar esta capa de células troncales es evidente que los núcleos se localizan en diferentes posiciones a lo ancho de la capa neuroepitelial; ésto da la impresión de que dicha capa tiene un grosor de más de una célula. Los núcleos de las células neuroepiteliales migran dentro de los confines de la membrana citoplasmática de manera vertical. La migración se relaciona con el estado del ciclo celular. Los núcleos de células en mitosis se encuentran cerca del lumen del ventrículo mientras que los núcleos que replican el DNA se encuentran al otro extremo de la capa germinal (Fig. 6).

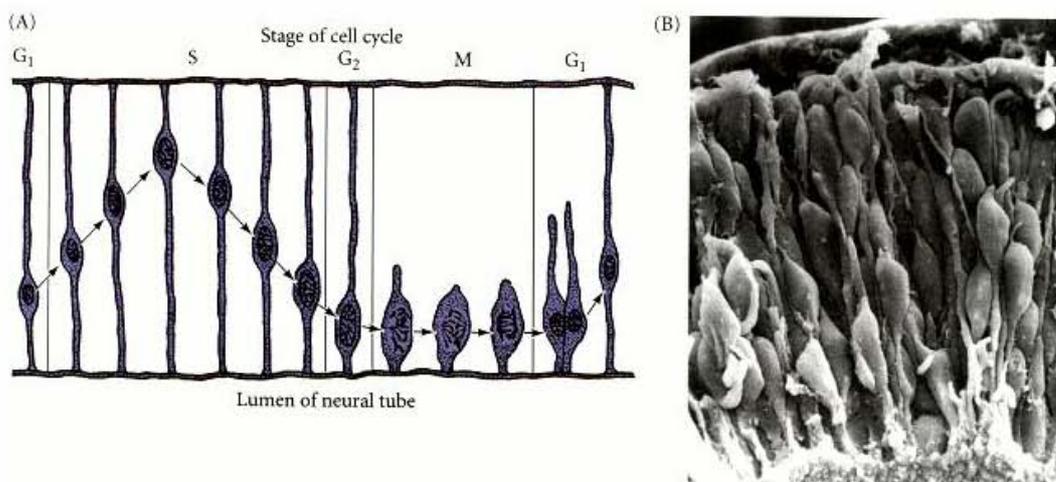


Fig. 6. **A**, Esquema de la migración nuclear de las células neuroepiteliales (migración intercinética nuclear). La posición del núcleo está directamente relacionada con la fase del ciclo celular. **B**, Fotomicrografía de neuroepitelio con núcleos celulares en posiciones distintas.

Las neuronas y células de la glía generadas por el neuroepitelio germinal migran con dirección radial hacia fuera del tubo neural. Las células neuroepiteliales pueden duplicarse en una de dos maneras: de manera simétrica produciendo dos células troncales hijas idénticas o asimétricamente, en donde una célula hija es un progenitor en camino a diferenciarse. La orientación del huso mitótico es determinante en el tipo de división que

una célula sobrelleva. En una división simétrica, la división es horizontal con orientación al epitelio, dejando a las dos células ancladas al ventrículo. En el caso de la división asimétrica, las células se dividen en orientación vertical, perpendicular al neuroepitelio, dejando a la célula hija desconectada del ventrículo con libertad de migrar fuera del tubo neural y diferenciarse.

Desarrollo de la Médula Espinal

El destino celular en la ME depende de sistemas de señalización durante la inducción neuronal. Los principales sistemas de señalización corren a lo largo y ancho de dos ejes: el dorsoventral y rostrocaudal. De esta manera, se establece una matriz de microambientes con distintas señales, donde la posición de células progenitoras en dicha matriz determina su destino e identidad final. La presencia y concentración de señales inductivas es clave para establecer la extensa variedad de tipos celulares. Posteriormente, se establecen también diferencias a nivel mediolateral.

Aunque la ME es una estructura caudal, morfológicamente muy diferente del resto del SNC, las células de las cuales se deriva expresan inicialmente características y marcadores muy similares a los de estructuras rostrales. Después de la inducción neural, se empieza a delinear el carácter caudal de la ME, definido a través de una reprogramación de los progenitores por señales extrínsecas. Se han implicado un gran número de factores en la adquisición del carácter caudal. Entre ellos están: los retinoides, BMPs , FGFs y Wnts (Jessell, 2000).

Papel del ácido retinoico en la formación del SNC.

Los retinoides, familia de moléculas derivadas de la vitamina A, están estrechamente involucrados en el proceso de desarrollo neural. En el SNC de los embriones de los vertebrados, el ácido retinoico (AR) tiene un papel importante en instruir a los diferentes tipos celulares en los ejes antero posterior y dorso ventral (Maden, 2002).

Se ha demostrado que la expresión de cientos de genes se controla por el AR durante la diferenciación neuronal. El AR es crucial en el crecimiento y la maduración de las neuronas por el control que ejerce sobre la expresión de enzimas, receptores de

superficie, neurotransmisores, factores de crecimiento, factores de transcripción y proteínas estructurales. El AR circula en forma de retinol unido a una proteína específica, la proteína de unión a retinol. Una vez dentro de la célula, el retinol se convierte enzimáticamente a retinal y finalmente a AR por acción de la enzima retinaldehído deshidrogenasa (Raldh2, por sus siglas en inglés). Raldh2 es una enzima dependiente de NAD con una alta especificidad por el retinaldehído. La eliminación del gen que codifica a la Raldh2 impide la síntesis de AR en el desarrollo y causa letalidad embrionaria muy temprano. El AR sintetizado entra al núcleo, donde se une a dos clases de factores transcripcionales: los receptores de ácido retinoico (RARs) y los receptores de retinoides X (RXRs). Los RARs y los RXRs se agregan en heterodímeros y reconocen secuencias consenso en los elementos controladores de los genes regulados por AR, conocidas como elementos de respuesta a AR (RAREs). El AR se cataboliza finalmente por el citocromo P450 (Fig. 7).

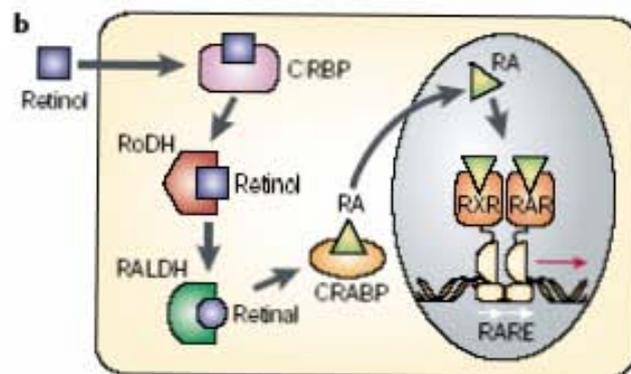


Fig. 7. Esquema de la vía metabólica que sintetiza al AR. Una vez sintetizado por la retinaldehído deshidrogenasa (RALDH), el AR entra al núcleo, donde es reconocido por sus receptores. El complejo proteína-AR reconoce secuencias consenso y tiene efectos reguladores de la transcripción (Maden, 2002).

El AR es una molécula que tiene distintos papeles a lo largo del desarrollo del sistema nervioso. A continuación se detallan algunas de las funciones propuestas para esta molécula con enfoque al desarrollo de la ME.

Históricamente, una evidencia directa del requerimiento de retinoides endógenos en el desarrollo del cerebro posterior se encontró cuando a embriones de codornices se les sometió a una deficiencia total de retinoides. En este modelo, el cerebro posterior y el mielencéfalo mostraron malformaciones. Por el contrario, el tratamiento de embriones de

Xenopus en estado de néurula con AR causa una reducción en los tejidos del cerebro anterior y cerebro medio, mientras que en las regiones posteriores se presenta una marcada expansión. Los niveles de AR se regulan mediante estrictos controles de su síntesis y su catabolismo. Concentraciones aberrantes de AR causan crecimiento y desarrollo anormal. Al administrar un exceso de AR a mamíferos gestantes, se nota un efecto altamente teratogénico (Maden, 2002).

El AR es sintetizado en un principio por las somitas. Su función inicial es extinguir la señalización por FGF en el neuroepitelio promoviendo la diferenciación. Temprano en el desarrollo, las células del ectodermo se hacen competentes para la inducción neural a través de la señalización por FGF8. Ésto mantiene activo el ciclo celular e inhibe la diferenciación. La extinción de la expresión de FGF es necesaria para promover la neurogénesis. El AR induce la expresión de NeuroM, un marcador temprano de la diferenciación neural. En el modelo de codornices a los cuales se les sometió a una deficiencia total de retinoides, se observa una vasta reducción en el número de neuronas y en la expresión de los genes neurogénicos Delta1, Neurogenina 1 y 2. La ausencia del AR también provoca una gran disminución de la expresión de los marcadores ventrales de la ME como son *Irx3*, *Dbx1* y *Dbx2*, los cuales se detallan más tarde. El resultado es la desaparición de neuronas ventrales incluyendo las MNs (Wilson y Maden, 2005).

Otra función del AR está en su papel en la especificación de diferentes poblaciones de MNs a lo largo del eje rostro-caudal. En la ME dicho eje se puede dividir en cinco regiones: cervical, braquial, torácica, lumbar y sacra. Aunque la mayoría de los tipos neuronales de la ME son producidos de igual manera a lo largo del eje rostro-caudal, las MNs no siguen este patrón. Este tipo de neurona exhibe diferentes identidades y subtipos dependiendo en los blancos que se necesita inervar en las diferentes zonas del eje anteroposterior. La identidad de las MNs a diferentes niveles de la ME es controlada por la expresión de los factores de transcripción Hox, los cuales se detallan más tarde. Estos genes a su vez son controlados por las acciones combinadas de señales del mesodermo paraxial, una de las cuales es el AR a diferentes concentraciones. Para la diferenciación de la región cervical es necesaria una alta concentración de AR, en la región braquial se requiere AR bajo y bajo FGF, en la región torácica alta concentración de FGF y en la lumbar alta FGF y

alta concentración de la proteína Gdf11, que pertenece a la familia de BMPs (Wilson y Maden, 2005).

El AR es determinante también en la especificación del subtipo de MN en la columna lateral motora en sus niveles braquial y lumbar. La columna lateral motora (LMC por sus siglas en inglés) inerva los músculos de las extremidades superiores y se compone de dos subtipos de MNs. Aquellas con posiciones laterales cuyos blancos son los músculos dorsales (LMC lateral) y las que se encuentran en posiciones mediales que inervan músculos ventrales (LMC medial, Fig. 8). En esta etapa del desarrollo, la síntesis de AR no se efectúa en el mesodermo vecino sino en las MNs más maduras que forman la parte medial de la LMC. Las MNs que forman la parte lateral son más jóvenes y migran a través de las MNs que sintetizan el AR. Se piensa que es esta señal la que induce el fenotipo de LMC lateral en estas MNs (Fig. 8).

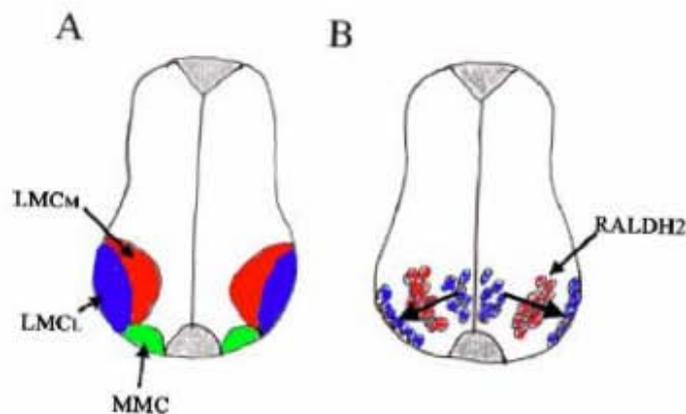


Fig. 8. La diferenciación de subtipos de motoneuronas. **A,** La columna lateral motora (LMC) medial (M) expresa RALDH (rojo) y sus MNs nacen antes que las neuronas de la LMC lateral (L). Al migrar del centro hacia afuera, las motoneuronas de la columna lateral motora (LMC) lateral son expuestas al AR, el cual induce el fenotipo necesario para inervar sus blancos dorsales. **B,** Posición final de las MNs en la LMC (Wilson y Maden, 2005).

Diferenciación dorsoventral en el tubo neural

La señalización dorsoventral tiene un papel primordial en establecer la amplia diversidad celular en las subdivisiones trazadas ya en el eje rostrocaudal. Inicialmente, en un estadio temprano del desarrollo del tubo neural, aparecen tres clases celulares: células de tipo placa de piso (*floor plate*) en la posición más ventral del tubo, neuronas motoras e interneuronas en posiciones cada vez más dorsales.

De manera similar a la diferenciación rostrocaudal, la diferenciación en el eje dorsoventral es mediada por señales extrínsecas provenientes de un grupo de células mesodérmicas llamadas la notocorda. Una vez que se desarrollan las células de la placa del piso, éstas auxilian a la notocorda en su función como fuente de morfógenos y señales inductivas. Tomando en cuenta la característica organizadora que toman las células de la placa del piso, no es extraño que dichas células sean la primeras en diferenciarse.

La región dorsal del tubo neural se forma con la participación de BMPs secretadas por células de la placa del techo (*roof plate*). Antes del cierre del tubo neural, las BMPs secretadas por el ectodermo dirigen la diferenciación de varios tipos celulares: células de la placa del techo, células de la cresta neural e interneuronas dorsales. Mas tarde, una vez que el tubo neural se ha cerrado completamente, las células de la placa del techo expresan BMPs, cuyo efecto es la generación de varios tipos de interneuronas sensoriales (Fig. 9).

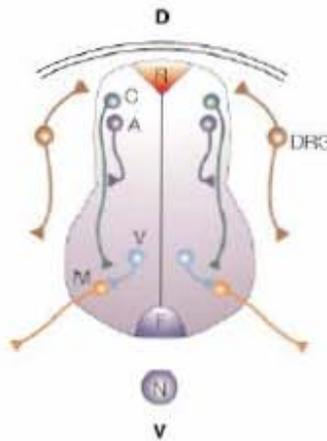


Fig. 9 La diferenciación de los tipos celulares ventrales (V) es mediada por señales provenientes de la notocorda y la placa del piso. En la parte ventral de la ME desarrollan motoneuronas (M) e interneuronas (V) más dorsal y medialmente. Durante el desarrollo de la región dorsal (D), influenciada por BMPs, se generan neuronas comisurales (C) y asociadas (A). R indica la placa del techo y F la placa del piso. DRG son ganglios de la raíz dorsal (Jessell, 2000).

La proteína Sonic Hedgehog como morfógeno ventral

El desarrollo de la parte ventral del tubo neural es influenciado de manera muy importante por el morfógeno Sonic hedgehog (Shh). La notocorda y más tarde las células de la placa del piso secretan esta proteína. Shh es un factor que induce la diferenciación de progenitores neurales hacia tres tipos básicos de células especializadas: células de la placa del piso, motoneuronas e interneuronas ventrales. En estudios donde se elimina la actividad de Shh mediante neutralización por anticuerpos, se abate completamente la diferenciación de los progenitores. ¿Cómo es que un solo factor puede ser determinante en la diferenciación de una sola población de progenitores a distintos tipos celulares? La respuesta está en el gradiente de concentración de Shh que se genera por difusión desde la parte ventral hacia la dorsal del tubo neural (Fig. 10). Se pueden identificar cinco tipos de neuronas que se desarrollan a partir de concentraciones variantes de Shh. Aquellos progenitores que se diferencian hacia motoneuronas en posiciones más ventrales están sujetos a concentraciones de Shh superiores a las requeridas en posiciones más dorsales.

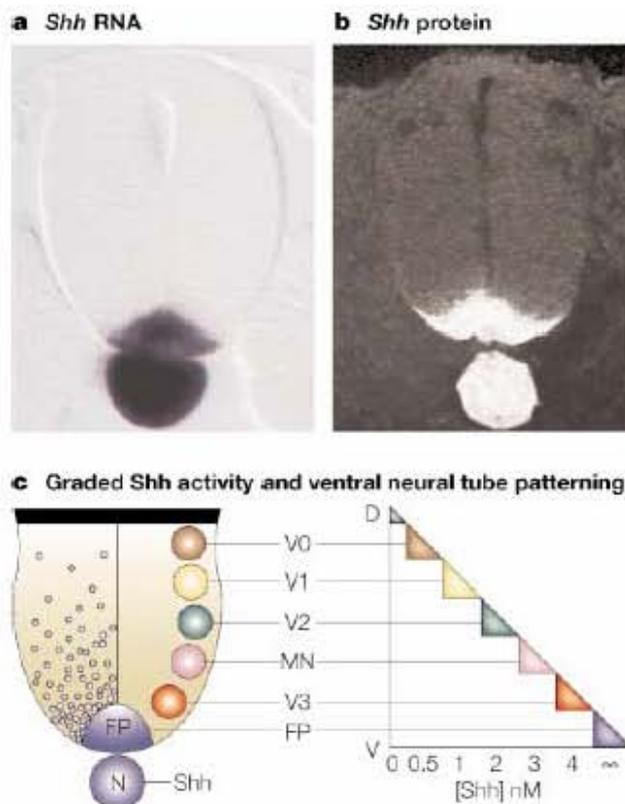


Fig. 10. La expresión de Shh por la notocorda y las células de la placa del piso. **a** y **b** son secciones de la Médula espinal de embrión de pollo mostrando el mRNA y la proteína Shh respectivamente. **c**, Esquema que representa el gradiente de concentración de Shh que se forma al ser secretado centralmente de la notocorda y la placa del piso. Se representan también los 5 tipos neuronales (V0-V3 son clases de interneuronas, MN son motoneuronas y FP, células de la placa del piso) que se generan a partir de la inducción por las diferentes concentraciones de Shh. A la derecha, se dan los valores de las diferentes concentraciones de Shh que inducen la diferenciación a los tipos celulares mencionados (Jessell, 2000).

Shh se sintetiza como un precursor inactivo. Mediante la actividad autoproteolítica de su extremo carboxilo, Shh se convierte a una forma activa. Después del corte, al extremo amino activo se le adiciona una molécula de colesterol, la cual es necesaria para anclar al morfógeno a la superficie de las células de la placa del piso o de la notocorda, limitando así parcialmente su difusión. El Shh secretado al medio extracelular interactúa con el receptor Patched (Ptch). La unión receptor ligando activa la actividad de la proteína de membrana smoothened (Smo) que a su vez activa una cascada de señalización que se interpreta y decodifica por la acción de factores de transcripción Gli (Ruiz i Altaba *et al.*, 2003) de las cuales se habla más adelante.

Las células a lo largo del eje dorsoventral interpretan las diferentes concentraciones de Shh expresando perfiles especiales de un grupo de proteínas de homeodominio. Este grupo de proteínas se puede dividir en dos clases. Aquellas cuya expresión se reprime por diferentes concentraciones de Shh y a las que se denominan de clase I (Pax7, Dbx1, Dbx2, Irx3 y Pax6). Las proteínas de clase II, por el contrario, requieren de concentraciones definidas de Shh para poder expresarse (Nkx6.1, Nkx6.2 y Nkx 2.2; Olig 2, aunque esta última es una proteína de tipo bHLH; Lee y Pfaff, 2001). El perfil de expresión de ambas clases de proteínas de homeodominio forma los microdominios p3, pMN, p2, p1, p0, pD, donde células progenitoras pueden desarrollarse a diferentes identidades celulares (Fig. 11).

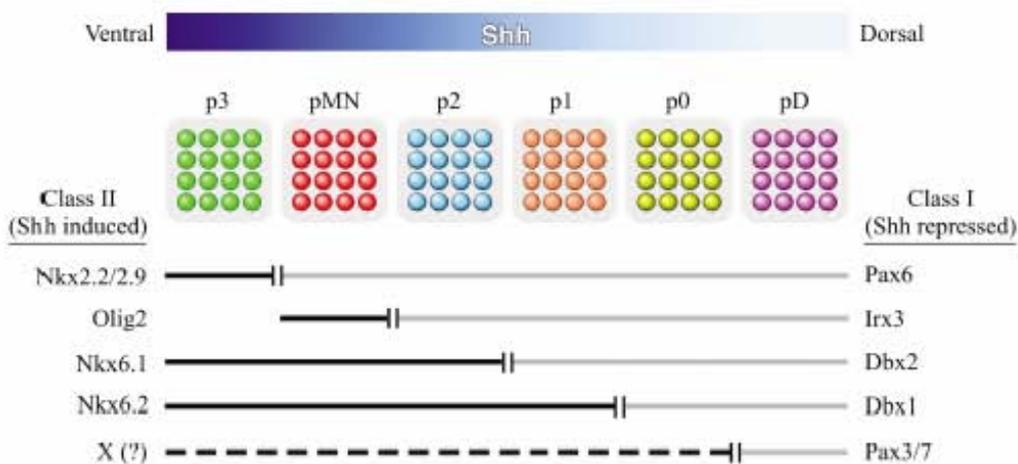


Fig. 11. Shh induce la formación de dominios ventrales en la Médula espinal al reprimir la expresión de proteínas con homeodominio de clase I (Pax7, Dbx1, Dbx2, Irx3 y Pax3) a diferentes concentraciones. Por el contrario, Shh induce la expresión de los genes de clase II (Nkx6.1/6.2 y Nkx2.2/2.9 y Olig 2). Los pares de proteínas clase I y II proteínas ejercen represión recíproca entre sí (Lee y Pfaff, 2001).

Los detalles del mecanismo por el cual Shh ejerce control sobre la expresión de las dos clases de proteínas de homeodominio no están completamente aclarados. Se ha propuesto que la familia de factores transcripcionales Gli son intermediarios clave en la señalización de tipo hedgehog. En vertebrados se han identificado tres genes para proteínas Gli (Gli 1-3). Estos genes son homólogos al gen de *Drosophila* que codifica al factor transcripcional *Cubitus interruptus*. Las proteínas Gli son los mediadores finales de la señalización por las proteínas Hedgehog, aunque también son responsivas a otras vías de señalización; por ejemplo, Gli2 y Gli3 responden a concentraciones de FGF y están implicadas en el desarrollo del mesodermo (Ruiz i Altaba *et al.*, 2003). En el tubo neural, las tres proteínas Gli se expresan en dominios que se sobrelapan parcialmente (Fig. 12), aunque más temprano en el desarrollo se expresan homogéneamente en la placa neural. Las tres proteínas Gli tienen, tanto formas que actúan como activadores transcripcionales, como formas (probablemente proteínas truncadas) con potente actividad represora.

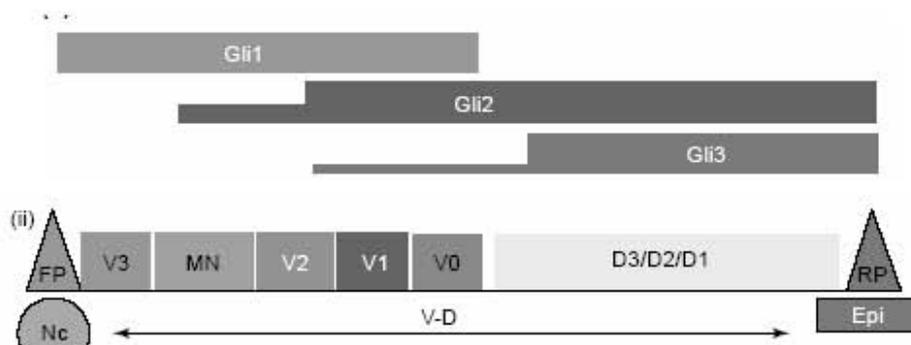


Fig. 12. Esquema representando la distribución de la expresión de los factores Gli a lo largo del eje dorsoventral en el desarrollo temprano de la médula espinal. Se representan los diferentes dominios descritos con anterioridad (p. 24) más D3, D2 y D1 que corresponden a regiones dorsales. Nc es la notocorda, Epi es epidermis, RP representa la placa del techo y FP la placa del piso (Ruiz i Altaba *et al.*, 2003).

Desarrollo de las motoneuronas

El neuroepitelio primitivo del SNC tiene una enorme potencialidad. Es capaz de dar lugar a un gran número de distintos tipos celulares tanto gliales como neuronales. Como se ha mencionado, inicialmente las señales inductoras (Shh y AR) establecen gradientes y por consiguiente, microambientes que dan lugar a distintos tipos de progenitores. Una población de progenitores en la ME da lugar a neuronas motoras y más tarde a oligodendrocitos. A esta población de células progenitoras se le denomina pMN. La generación secuencial de diferentes tipos celulares a partir de una sola población progenitora es una estrategia para expandir la diversidad celular en el SNC que se presenta también en otras regiones como la retina y la neocorteza (Lee *et al.*, 2005). Las primeras MNs postmitóticas se pueden detectar en el ratón en los días 9-9.5 (E.9-E.9.5) del desarrollo embrionario y su generación termina de E10.5 a E11.5.

Factores transcripcionales necesarios en el desarrollo de las MNs

Las características moleculares que distinguen a las distintas clases individuales de neuronas controlan el patrón de sus proyecciones axonales, la formación de conexiones a blancos apropiados y la expresión de los neurotransmisores específicos (Arber *et al.*, 1999). La aparición y estabilidad de estas características moleculares se definen a través de un proceso de diferenciación donde se asigna la identidad de tipos específicos celulares. Algunos de los eventos tempranos que especifican y dirigen la diferenciación de progenitores neurales a neuronas motoras se han definido con bastante detalle.

Durante el desarrollo de los diversos tipos celulares en la ME, la expresión diferencial de varios subtipos de factores transcripcionales determinan el destino celular. A continuación se detalla cómo los factores de transcripción, entre muchas funciones, están involucrados en la generación de MNs:

i) Las proteínas de homeodominio son una familia de factores de transcripción caracterizada por un dominio conservado de unión al DNA. Este dominio ácido consta de 60 aminoácidos codificados por una secuencia de 180 pares de bases conocida como la *homeobox*. El homeodominio se pliega en tres hélices alfa, de las cuales dos forman una conformación hélice-vuelta-hélice la cual es característica de proteínas de unión al giro mayor del DNA (Fig. 13). La tercera hélice es la que hace el contacto físico con sitios

conservados de DNA, específicamente con una secuencia TAAT. Se piensa que las proteínas de homeodominio activan baterías de genes que especifican las propiedades de diferentes segmentos del organismo en desarrollo (Gilbert, 2003).

ii) Los genes Hox, subfamilia de genes de homeodominio, son cruciales en la determinación del eje antero/posterior en vertebrados. Dichos genes son homólogos a los genes selectores homeóticos (Hom-C) de *Drosophila*. Los genomas de humano y ratón contienen cuatro grupos de genes parálogos Hox (Hoxa-Hoxd) y cada grupo contiene hasta trece miembros. Se piensa que los cuatro grupos de genes Hox en mamíferos surgieron a partir de duplicaciones tanto de genes como de regiones de cromosomas. Curiosamente, los diferentes genes Hox dentro de los cuatro grupos parálogos están organizados linealmente en el genoma en el mismo orden en el que se expresan a lo largo del eje antero/posterior; los genes tres prima son requeridos en el desarrollo de las estructuras anteriores mientras que aquellos en dirección cinco prima especifican regiones caudales (Gilbert, 2003).

iii) Otra familia de factores de transcripción que contienen un homeodominio son los Lim homeobox (Lhx). Estas factores se descubrieron por vez primera en el SNC en desarrollo de *Caenorhabditis elegans* y también contienen un dominio de dedos de zinc. Se ha sugerido que los genes Lhx son cruciales en la definición de la identidad neuronal mediante códigos de expresión (Dawid y Chitnis, 2001). Esta afirmación se basa en la observación de que en vertebrados, diferentes clases de MNs que inervan distintos grupos musculares expresan combinaciones únicas de genes Lhx justo antes de que haya una extensión axonal. Mutaciones o una alteración temporal/espacial de estos genes cambian las proyecciones y blancos de las MNs en desarrollo de una manera predecible. De los principales genes Lhx que participan en la especificación de MNs están el subgrupo de proteínas Islet (Isl) el cual tiene dos miembros en la mayoría de los vertebrados.

iv) Las proteínas de tipo bHLH son una amplia familia de factores de transcripción, conservados tanto en vertebrados como invertebrados, que contienen un motivo conservado básico hélice-asa-hélice (bHLH por sus siglas en inglés). Los genes proneurales son un subgrupo de proteínas bHLH que inicialmente se identificaron en estudios con *Drosophila*. Se unen a sitios en DNA conocidos sencillamente como cajas E (con una secuencia consenso CANNTG) en complejos heteroméricos. En mamíferos, los genes proneurales comúnmente se unen a proteínas de expresión ubicua llamadas E2A, E12 y E47. La

dimerización es un prerequisite para la unión al DNA y si se afecta la interacción proteica de los dímeros, la actividad proneural queda reprimida. En el desarrollo del SNC, los genes proneurales tienen varios papeles de suma importancia: promueven la neurogénesis e inhiben la gliogénesis, contribuyen a la salida del ciclo celular en progenitores neuronales (inhibiendo directamente a cinasas dependientes de ciclo celular, Cdks) y en algunos casos especifican el subtipo neuronal (Bertrand *et al.*, 2002).

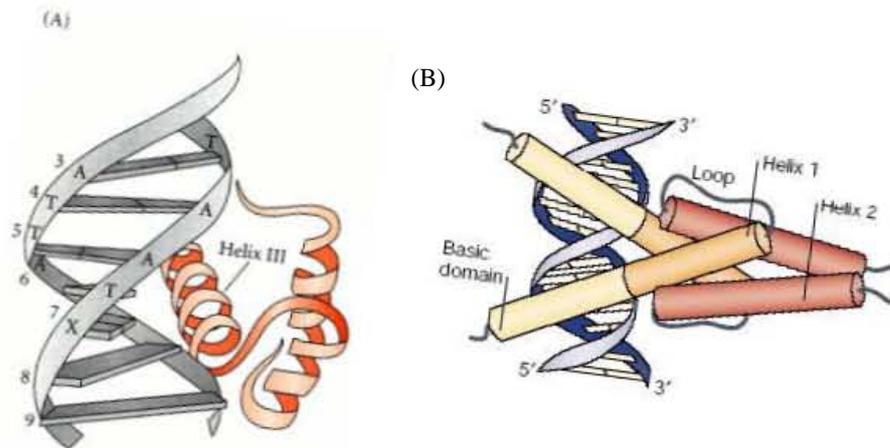


Fig. 13. **A**, Esquema de la interacción entre una proteína con homeodominio y el DNA en su secuencia TAAT (Gilbert, 2003). **B**, Dímero de factor de transcripción bHLH y la orientación que adoptan las subunidades cuando interaccionan con el DNA (Bertrand *et al.*, 2002).

En la región de los precursores de motoneuronas (pMN), las células neuroepiteliales interpretan las diferentes concentraciones de morfógenos (AR y Shh) y expresan factores de transcripción específicos como son Pax6, Nkx6.1, Nkx6.2 y Olig2 (Briscoe y Ericson, 2001). El dominio pMN colinda dorsalmente con el dominio p2, el cual genera interneuronas de tipo V2, y ventralmente con p3 que da lugar a interneuronas V3. La distinción en identidad entre los dominios pMN y p3 depende de interacciones represivas entre factores de transcripción expresados selectivamente en cada dominio. Pax6 en el dominio pMN reprime a Nkx2.2 y Nkx2.9; de manera inversa, estos últimos se expresan en p3 y reprimen a Pax6. El efecto de estas relaciones represivas cruzadas es la delineación muy precisa de cada dominio. El antes mencionado perfil de factores de transcripción en pMN no permanece estático. Después de la diferenciación de las MNs, cuando las células

en pMN empiezan a generar oligodendrocitos, se observa la expresión de la proteína Nkx2.2 (Lee *et al.*, 2005).

La expresión de Nkx6.1 y Nkx6.2 en el dominio pMN promueve la expresión de determinantes de MNs incluyendo proteínas de homeodominio como MNR2 y Lim3 (Lhx3). MNR2 autorregula de manera positiva su expresión y a la vez induce la aparición de Islet1 y HB9 (el cual se describe más tarde). La expresión de MNR2 está restringida solamente a progenitores de MNs, mientras que Lim3 se expresa también en el dominio p2. En pollo, la expresión ectópica de MNR2 es suficiente para dirigir la diferenciación de células neurales a MNs y al mismo tiempo, inhibir la generación de células de tipo V2 (Tanabe *et al.*, 1998). Por el contrario, la expresión ectópica de Lim3 en progenitores que no expresan MNR2 promueve la generación de neuronas V2. Estos resultados sugieren que MNR2 tiene un papel crucial en la especificación hacia MNs a partir de una población de progenitores ventrales que expresan Lim3 y que en ausencia de MNR2 pueden producir también neuronas tipo V2. Las neuronas tipo V2 pueden distinguirse de progenitores de MNs porque expresan otra proteína de homeodominio, el marcador Chx10. La aparición de Lim3 y MNR2 en pMN coincide con la salida del ciclo celular de los progenitores de motoneuronas y con su independencia de la señalización por Shh (Tanabe *et al.*, 1998). Aunque la última división celular coincide con la aparición de estos dos factores, se ha demostrado que ni Lim3 ni MNR2 son causantes directos de la salida del ciclo celular. La actividad inductora a motoneuronas de MNR2 es funcional solamente en neuronas postmitóticas (Novitsch *et al.*, 2001).

La proteína HB9 es un marcador específico de MNs postmitóticas. Es un factor transcripcional que tiene una secuencia de homeodominio esencialmente idéntica a la de MNR2. Sin embargo, a pesar de esta similitud con MNR2, HB9 no se expresa en progenitores del pMN que todavía no han determinado su destino como MNs u oligodendrocitos; su expresión está restringida solamente en motoneuronas postmitóticas. Temprano en el desarrollo de las MNs, la expresión de HB9 coincide con la de Lim3. Sin embargo, en estadios más avanzados donde se generan la mayoría de las MNs, las células que expresan HB9 pierden a Lim3 y empiezan a producir a Isl1. HB9 es requerido para la rápida extinción de Lim3 y Gsh4 (marcador de neuronas tipo V2) en MNs somáticas que

han salido del ciclo celular. Esta salida y la maduración de las MNs coinciden con la migración de las células a posiciones más laterales del tubo neural (Fig. 14).

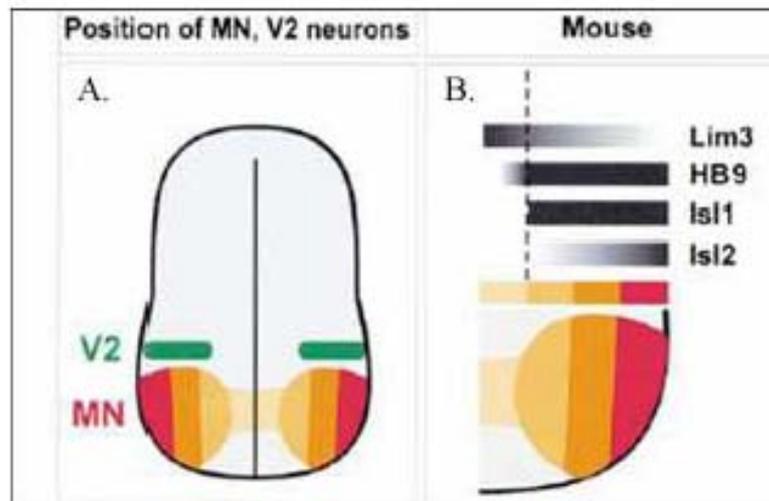


Fig. 14. A, Esquema en donde se muestran las posiciones donde se generan las MNs y neuronas tipo V2. B, Diagrama que indica el perfil temporal de expresión de HB9 en la diferenciación de MNs de ratones. La línea discontinua se refiere a la etapa en que las células salen del ciclo celular. (Arber *et al.*, 1999).

El papel de Olig2 y Ngn2 en la diferenciación de MNs

Hasta ahora, se ha mencionado principalmente el papel de proteínas homeodominio en el desarrollo de las MNs; sin embargo, trabajos recientes sugieren que factores de transcripción de tipo bHLH también juegan papeles importantes en la decisión entre el linaje de MN o de oligodendrocito y la salida del ciclo celular. Ngn2 y Olig2 son dos factores de tipo bHLH necesarios en el desarrollo del dominio pMN. La coexpresión de Olig2 y Ngn2 se observa en pMN durante el periodo de formación de MNs. Ratones *knockout* de las proteínas Olig1 y Olig2 carecen completamente de MNs y oligodendrocitos, mientras que la expresión ectópica de Olig2 en partes dorsales del tubo neural de pollo induce la aparición ectópica de MNs. La aparición de estas neuronas en el tubo neural dorsal inducida por la expresión ectópica de Olig2, muy probablemente se atribuya a que Olig2 estimula la expresión de Ngn2, factor con alta actividad neurogénica.

El papel de Olig2 en la diferenciación de células en pMN primero hacia MNs y luego hacia oligodendrocitos es complejo. En un principio, Olig2 actúa como un activador

de la diferenciación de MN, ya que su presencia tiene un efecto inductivo sobre la expresión de proteínas de homeodominio MNR2 y Lim3 y el factor bHLH Ngn2. Este último tiene la muy importante función de sacar a los progenitores del ciclo celular y dispara directamente la generación de MNs mediante la expresión de HB9. Complejos protéicos compuestos de Ngn2 y E47 interactúan con cajas E en el *enhancer* de HB9 (Lee y Pfaff, 2003). Estos complejos actúan en conjunción con Lim3 e Isl1 para promover un alto nivel de expresión de HB9 en neuronas postmitóticas. Apoyando este modelo, cuando tiempo después las células del pMN se diferencian a oligodendrocitos, la expresión de Ngn2 desaparece por completo. Una vez determinada la diferenciación de células pMN a MNs, Ngn2 es reemplazado por los factores bHLH análogos NeuroM y NeuroD (Lee y Pfaff, 2003). Estos dos, de manera similar, sinergizan con los factores homeodominio Isl1 y Lim3 para potenciar la expresión de Hb9.

Aunque Olig2 inicialmente activa la expresión de algunos genes que facilitan la diferenciación de células del pMN a MNs, recientemente se presentó evidencia (Lee *et al.*, 2005) que también funge como un factor que mantiene a los progenitores pMN indiferenciados. Paradójicamente, aunque Olig2 estimula la expresión de Ngn2, a la vez bloquea su función neurogénica a través de por lo menos dos mecanismos. Olig2 tiene interacciones directas proteína-proteína con los factores bHLH E47 y Ngn2, inhibiendo la formación del complejo activador Ngn2:E47 de modo dosis dependiente (Fig. 15). Olig2, probablemente en su forma dimerizada, interactúa con sitios de unión al DNA en elementos reguladores de genes necesarios en la diferenciación a MNs como Hb9, compitiendo directamente con el complejo activador Ngn2:E47 (Lee *et al.*, 2005). Es probable que Olig2 en su forma dimerizada también tenga efectos silenciadores fungiendo como base para la interacción con inhibidores transcripcionales.

¿Cómo entonces es que algunos progenitores del pMN se diferencian a MNs y otros permanecen indiferenciados si ambos expresan en Olig2 y Ngn2? La respuesta está en la expresión heterogénea de estos factores. Algunas células expresan niveles más altos de Ngn2, por consiguiente, se diferencian a un linaje neuronal mientras que las que expresan mayoritariamente Olig2 permanecen indiferenciadas. El incremento en niveles de Ngn2 eventualmente es suficiente para contrarrestar la inhibición por Olig2, disparando la diferenciación de células pMN a neuronas motoras. Aunque Olig2 promueve la expresión

de Ngn2, hay otras vías para la activación de este gene proneural. La vía de señalización Notch tiene efectos inhibitorios sobre la expresión de Ngn2. En peces cebra deficientes en señalización de Notch se producen más MNs de lo normal a expensas de oligodendrocitos (Park y Appel, 2003).

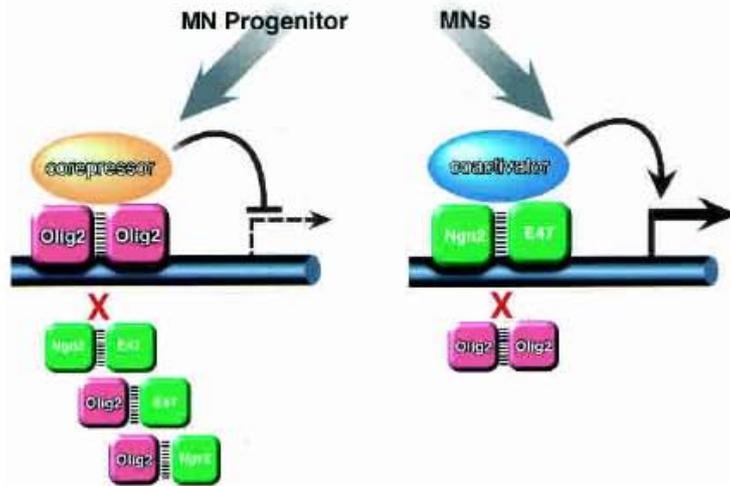


Fig. 15. Olig2 actuando en forma dimérica directamente sobre los elementos reguladores de la diferenciación a MN y compitiendo con otras proteínas bHLH con actividad neurogénica (parte izquierda). Eventualmente, los niveles altos de Ngn2 son suficientes para activar la diferenciación a MN (lado derecho).

Los genes Hox en la especificación de la organización columnar de MNs

En la organización neuronal del SNC de los vertebrados, a la unidad básica se le llama columna. En la ME, distintos subtipos de neuronas motoras segregadas en columnas inervan distintos blancos tanto musculares como neuronales (Dasen *et al.*, 2003). Las columnas motoras adquieren sus distintas características a lo largo del eje rostro-caudal: a nivel de extremidades (regiones branquiales y lumbares) se encuentra la LMC, mientras que a nivel torácico, las neuronas motoras autonómicas se organizan en la columna de Terni (CT) en el pollo (Fig. 16). La fuente de las señales que determinan los tipos de columnas es el mesodermo paraxial. Como se mencionó antes, diferentes concentraciones de FGFs retinoides y proteínas de la familia de BMP determinan la identidad columnar. Experimentos donde se transplantan regiones del mesodermo paraxial de niveles torácicos a

nivel de extremidad justo después del cierre del tubo neural indican que hay una re-especificación de la identidad de la LMC a CT.

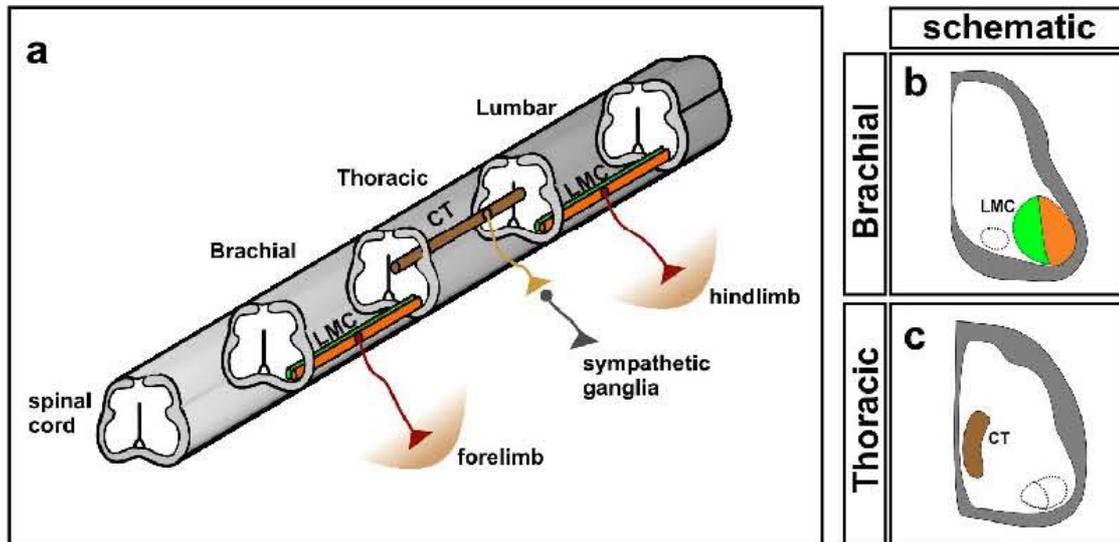


Fig. 16. Esquema de organización de distintas columnas motoras a lo largo de la ME de pollo.

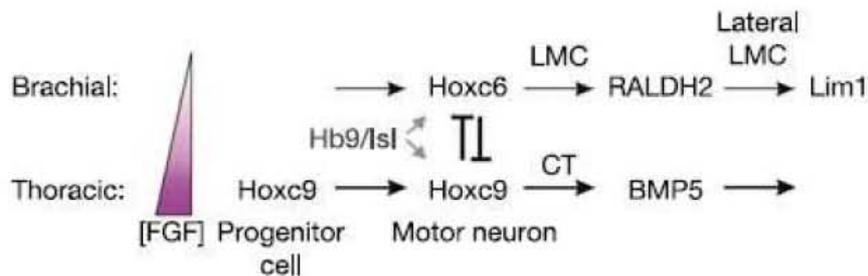


Fig. 17. Esquema de la participación de Hoxc9 en la determinación de dos distintas columnas motoras y la influencia de FGF sobre su expresión. La columna de Terni a nivel torácico expresa BMP5 mientras que a nivel braquial la columna lateral expresa Raldh2 y Lim1.

Las proteínas de homeodominio Hox se expresan diferencialmente a lo largo del eje rostro caudal e *in vitro* su expresión se puede inducir por exposición a diferentes concentraciones de FGFs. En el cerebro posterior se ha observado que los genes Hox determinan la diversificación neuronal y la identidad columnar. La expresión secuencial de genes Hox (pre y post mitóticamente) es necesaria en la determinación de los subtipos de columnas de MNs a lo largo del eje rostro-caudal. Los progenitores torácicos expresan Hoxc9 en estadios tempranos, mientras que los progenitores braquiales no expresan ningún gene Hox inicialmente. La expresión postmitótica de Hoxc9 inhibe la identidad de LMC pero es insuficiente para re-especificar a MNs de CT. Hoxc6 expresado postmitóticamente

en la región torácica es suficiente para reprogramar progenitores a una identidad de MNs de LMC. La habilidad de los derivados represores de ambos genes Hox de reprimir la diferenciación a LMC y CT es buena evidencia que Hoxc6 y Hoxc9 son necesarios para la determinación normal de las columnas motoras (Fig. 17).

La utilidad de generar neuronas motoras de manera ilimitada *in vitro*

El trasplante celular como terapia para lesiones de la ME

La recuperación de la ME después de una lesión está obstaculizada por la habilidad limitada del SNC de mamíferos de reestablecer conexiones neurales, re-mielinizar fibras nerviosas sobrevivientes y reemplazar células muertas (Hofstetter *et al.*, 2005). Una manera de superar este obstáculo en la regeneración del SNC mamífero podría ser el trasplante de células con la capacidad de generar algunos de los tipos celulares que se pierden por lesión o enfermedad. Hasta ahora, esta estrategia de trasplante se ha practicado con células a diferentes estadios de diferenciación y en modelos diferentes de neurodegeneración.

La generación de cultivos de células diferenciadas que presentan los marcadores y características fisiológicas de MNs a partir de CTE podría aplicarse a experimentos de trasplante en modelos de degeneración motora. Existen múltiples patologías donde se observa una pérdida de dicho tipo celular. La enfermedad más común que afecta a MNs en humanos es la esclerosis lateral amiotrófica (ALS por sus siglas en inglés), donde hay una muerte selectiva de estas neuronas. El resultado es una parálisis progresiva que resulta letal. La ALS es generalmente fatal después de 1 a 5 años de su diagnóstico. En términos de población, ataca a 3 personas de cada 100,000 y generalmente se diagnostica entre los 50 y 60 años de edad. El 90-95% de los casos son esporádicos, es decir, no hay una causa genética establecida. Sin embargo, en 5-10% de los casos, la enfermedad es heredable y a estos casos se les denomina de tipo familiar (FALS). En pacientes que sufren de ALS, las MNs superiores e inferiores mueren en el cerebro y la ME. La denervación de los músculos respiratorios y el diafragma es la causa de la muerte. Los detalles de la causa y el mecanismo de la muerte neuronal están en disputa todavía. Hasta ahora se han propuesto varios modelos causantes de la patología de ALS y FALS (Cleveland y Rothstein, 2001):

1. Estrangulación axonal causada por una desorganización de los neurofilamentos y el entorpecimiento del tráfico celular
2. Toxicidad de agregados intracelulares debida probablemente a un plegamiento erróneo de ciertas proteínas.
3. La excitotoxicidad por el disparo neuronal repetido y una pobre reabsorción de glutamato.

El análisis molecular y genético del FALS ha identificado a varios genes que directamente causan la patología y varios más que indirectamente inducen susceptibilidad (Majoor-Krakauer *et al.*, 2003). A partir del conocimiento de los genes involucrados en la patología de FALS, se han podido generar roedores transgénicos que presentan muchos de los rasgos de dicha enfermedad y que sirven como modelos para desarrollar y experimentar nuevas terapias. Un tipo de FALS es causada por mutaciones en la enzima citosólica superóxido dismutasa 1 (SOD1). Ratones y ratas que sobre expresan genes mutados de la SOD1 han servido como modelos experimentales de ALS (Gurney, 1994; Howland *et al.*, 2002). Por otra parte, recientemente se generaron ratones *knock in* a los que se les eliminó el elemento de respuesta a hipoxia de promotor del factor del crecimiento vascular endotelial (VEGF por sus siglas en inglés; Oosthuysen *et al.*, 2001). Estos ratones desarrollan síntomas muy similares a ALS. Inicialmente hay debilidad muscular seguida por muerte selectiva de MNs. Un rasgo común de ALS es la acumulación de filamentos intermedios en los axones y pericaria de las MNs afectadas. En ratones transgénicos que sobre-expresan neurofilamentos de cadena pesada también se observa un daño selectivo a las MNs. De manera similar, ratones que sobre-expresan periferina (un neurofilamento que se encuentra principalmente en el sistema nervioso periférico) desarrollan una muerte neuronal selectiva (Beaulieu *et al.*, 1999)

En otros modelos de daño a la ME se han realizado algunos trasplantes de CT o su descendencia. Un grupo reportó que transplantar CTE en el estado de cuerpos embrionarios (ver metodología) en la ME de ratas lesionadas por traumatismo, ocasionó la reversión parcial de déficits motores en las extremidades posteriores (McDonald *et al.*, 1999). La recuperación no fue total y no se estableció si la mejoría se debía a la supervivencia de las neuronas motoras o a un efecto estructural no específico.

Otro grupo implantó una línea de células troncales neurales (CTN) con o sin una matriz de polímeros luego de una hemisección en la región torácica de la ME de ratas. Aunque los resultados al implantar CT embebidas en la matriz fueron positivos, una respuesta similar se obtuvo al implantar sólo la matriz, en tanto el trasplante de CTN en ausencia del soporte mecánico no provocó ninguna mejoría (Teng *et al.*, 2002) lo que deja dudas de si realmente las CT fueron las responsables de la recuperación.

Recientemente se describió recuperación funcional en un modelo viral de neurodegeneración motora, usando células GE (Kerr *et al.*, 2003). Desafortunadamente, no se pudo correlacionar la neurogénesis de células motoras con la recuperación y se especula que las CM transplantadas ejercen un efecto trófico sobre las motoneuronas endógenas.

En 2004 el grupo de Rothstein publicó un trabajo (Llado *et al.*, 2004) en el que se investigaron las propiedades neuroprotectoras de CTN que sobre-expresan el factor neurotrófico derivado de glía (GDNF) tanto en explantes de ME como en un modelo de degeneración *in vivo*. El nervio facial de ratas de tres días se lesionó unilateralmente y luego se aplicó una esponja que contenía las CTN. Las células que sobre-expresaban GDNF tuvieron un efecto regenerativo mayor, aunque se reportó una recuperación total cuando la esponja se cargó solamente con GDNF, lo cual pone en duda el efecto regenerativo de las CMN transplantadas.

Hasta ahora, solamente se han mencionado modelos de lesión y degeneración de la ME de roedores. No obstante, se han empezado a utilizar primates como modelos experimentales, hecho que acerca un paso la posibilidad práctica del uso de trasplantes de CT a la clínica. En el 2005 un grupo japonés publicó un trabajo (Iwanami *et al.*, 2005) en el que se transplantaron CTN humanas a un modelo de contusión en monos tití. Las células transplantadas se diferenciaron a células neuronales y gliales y las cavidades formadas por la lesión fueron menores en animales a los cuales se les transplantaron células cuando se compararon a controles sin trasplante. Se observaron mejoras parciales en términos de comportamiento hasta 70 días después de la lesión, evaluadas por la cuantificación de actividad motora espontánea y la prueba de fuerza al apretar una barra.

Transplantes de células diferenciadas

Cuando se transplantan CTN a la ME se ve una diferenciación de las células mayoritariamente hacia astrocitos, lo cual sugiere que los efectos positivos se deben principalmente al soporte trófico que proveen las células implantadas. En algunos trabajos que se discuten a continuación, se utilizan protocolos de diferenciación sobre células pluri o multipotentes para luego hacer los transplantes a modelos de daño a la ME.

El grupo de Lars Olsen sobre-expresó el gene de Ngn2 en CTN para restringir la diferenciación hacia astrogliá y redirigirlas hacia neuronas y oligodendrocitos (Hofstetter *et al.*, 2005). El efecto de la sobre-expresión fue una disminución considerable (del 84% al 6%) de astrocitos, un incremento de oligodendrocitos y en menor medida, de neuronas después de nueve semanas del transplante. Un punto importante de este trabajo fue la demostración de que el transplante de CTN tenía efectos adversos en un modelo de contusión. Aunque se observa una mejora locomotora, cuantificada por la prueba de pasos en campo abierto BBB (Beattie, Basso y Bresnahan), se observa también una hipersensibilidad que causa que estímulos que no son nocivos bajo condiciones normales (como exposición a temperaturas moderadamente bajas) propicien dolor intenso. A esta condición se le conoce como alodinia y aunque la razón de su aparición no queda completamente esclarecida, los autores sugieren que se debe probablemente al crecimiento anormal y descontrolado de fibras neuronales después del transplante.

Previamente, se han reportado trabajos donde se implantan células derivadas de teratocarcinoma humano en modelos de enfermedades neurodegenerativas. La línea NTera2 de células pluripotentes derivadas de teratocarcinoma produce neuronas cuando se les expone al ácido retinoico. El grupo de Sanberg (Garbuzova-Davis *et al.*, 2002) utilizó dichas neuronas en un modelo de ALS familiar. En sus resultados encontró un incremento considerable tanto en la supervivencia de los ratones como en los puntajes de una batería de pruebas de comportamiento para cuantificar mejoras en el sistema motor. No obstante, hay que tomar en consideración que los transplantes se efectuaron antes de la aparición de los síntomas asociados con el modelo de FALS.

En un trabajo publicado por (Harper *et al.*, 2004) diferenciaron MNs a partir de CTE y se estudió su funcionalidad en un novedoso modelo *in vitro*. Las neuronas diferenciadas se co-cultivaron con mioblastos. Se observó que las neuronas extendían

largos axones, producían uniones neuro-musculares y generaban contracciones espontáneas. Las mismas neuronas generadas se transplantaron a un modelo de degeneración selectiva de MNs en ratas infectadas con el virus SindBis. Los trasplantes tuvieron como resultado la incorporación y supervivencia de motoneuronas a largo plazo, pero sin recuperación funcional. Como se ha observado que la mielina tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento axonal, en este mismo estudio se utilizó al dibutiril AMPc para revertir parcialmente la inhibición del crecimiento axonal por la mielina.

Previamente, se mencionó que las células pluripotenciales poseen una elevada actividad de telomerasa. En células que se encuentran en estados más avanzados de la diferenciación, esta enzima deja de expresarse, lo cual frena la división celular y la expansión. Una estrategia innovadora de incrementar la capacidad replicativa de células precursoras del CNS es sobre-expresar la telomerasa. (Roy *et al.*, 2004) establecieron líneas inmortalizadas a partir de células neuroepiteliales por transducción de un retrovirus que codifica a la telomerasa humana. Una línea celular (hSC11V-TERT) generó neuronas motoras identificadas por inmunotinciones contra Islet1 y colina acetil transferasa (ChAT) y por la expresión de la proteína verde fluorescente bajo la región reguladora de HB9. En un modelo de contusión en ME en rata, las células hSC11V-TERT se implantaron en el lugar de la lesión. Aunque no se practicaron pruebas de comportamiento para determinar si el implante tuvo un efecto positivo, si encontraron que las neuronas transplantadas sobrevivieron seis meses después del trasplante y que expresaban la descarboxilasa del ácido glutámico, sugiriendo que la mayoría de las células se diferenciaron a interneuronas gabaérgicas.

No hay más estudios en donde se pruebe si las CT son capaces de revertir condiciones patológicas ocasionadas por la muerte de neuronas motoras. Sin embargo, ahora sabemos que es posible tener integración estructural y sináptica, así como reversión de las afecciones motoras en animales hemiparkinsonicos al transplantar neuronas dopaminérgicas derivadas de CTE (Kim *et al.*, 2002), lo que alienta el uso de CM para revertir neuropatologías.

Justificación

En los últimos años, el aislamiento y el estudio de la Biología de las células troncales traen consigo una gran promesa. Las células troncales podrían ofrecer una fuente ilimitada de tejidos específicos para terapias de reemplazo en enfermedades tan devastadoras y comunes como son la enfermedad de Parkinson, ALS, Huntington, osteoartritis, diabetes tipo I y leucemias. La generación de tipos celulares e incluso tejidos *in vitro* derivados de células troncales no sólo sería útil para la terapia de reemplazo, sino también permitiría el estudio detallado de mecanismos de patogénesis a nivel celular. Además, la accesibilidad a células y tejido específicos diferenciados *in vitro* sería de inmensa utilidad para la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos.

La derivación de células pluripotentes a partir de un blastocisto clonado con el fin de generar células diferenciadas, ya sea para trasplantes o investigación, se conoce como clonación terapéutica. El proceso de clonación involucra la transferencia de un núcleo de una célula somática a un ovocito sin núcleo. La ventaja primordial de la clonación terapéutica es que, al utilizarse el núcleo donado de un paciente, las células diferenciadas a partir del blastocisto clonado tendrían el mismo genoma del donador y por consiguiente no sufrirían de un rechazo inmune si se practica un trasplante. Aunque existe evidencia de que el trasplante nuclear a ovocitos de ratón puede dar lugar a CTE a partir de los blastocistos clonados y que esas CT se pueden diferenciar en neuronas dopaminérgicas, que al ser transplantadas mejoran las alteraciones en animales parkinsonianos (Barberi *et al.*, 2004), esta metodología no se ha podido implementar en células humanas.

Aunque en teoría las células troncales pluripotenciales pueden diferenciarse a cualquier linaje, la generación de tipos específicos de células está todavía limitada a unos cuantos casos. Los protocolos de diferenciación son todavía bastante primitivos y poco eficientes. Por esta razón, es necesario el desarrollo y la estandarización de protocolos de diferenciación para poder generar tipos especializados de células de manera reproducible y en porcentajes tangibles y útiles.

En el caso del SNC se han reportado previamente protocolos que inician con CTE para generar neuronas (Bain *et al.*, 1995), y para dirigirlas a motoneuronas (Wichterle *et al.*, 2002). También, se ha demostrado que estas motoneuronas derivadas de células

troncales de ratón poseen las características electrofisiológicas funcionales de células que se han desarrollado *in vivo* (Miles *et al.*, 2004). En paralelo se han podido aplicar adaptaciones de estos protocolos de diferenciación a CTE de humano. En febrero del año pasado se publicó un trabajo (Li *et al.*, 2005) donde se genera neuroectodermo temprano y tardío a partir de células troncales embrionarias de humano. Estos precursores respondieron a señales ventralizantes y caudalizantes para generar poblaciones enriquecidas de MNs que semejan las que se encuentran en la ME. En el mismo trabajo se demuestra que estas células tienen actividad electrofisiológica y que inducen el aglutinamiento de los receptores a acetilcolina cuando se cocultivan con miotúbulos.

El objetivo de este proyecto es implementar y estandarizar un método para generar de manera confiable motoneuronas en números significativos, utilizando como base los protocolos previamente establecidos en el laboratorio del Dr. Iván Velasco Velázquez. Una población enriquecida de MNs sería de suma utilidad para posteriores estudios: por ejemplo, se podrían practicar trasplantes a modelos animales de degeneración neuronal; las neuronas motoras generadas de células troncales también serían útiles como un modelo simplificado *in vitro* para estudiar con detalle mecanismos de muerte neuronal o factores que promuevan la supervivencia.

Objetivos

General:

Obtener neuronas motoras al diferenciar células troncales embrionarias de ratón.

Particulares:

Generación de motoneuronas a partir de células troncales embrionarias de ratón

Se buscará la diferenciación de CTE a MNs mediante el protocolo descrito por Wichterle *et al.*, (2002) utilizando distintas técnicas de cultivo y la adición de morfógenos como son el AR y Shh.

Inmunodetección para corroborar la identidad de las células diferenciadas.

Mediante inmunotinciones se buscara detectar la expresión de marcadores neuronales específicos como son la tubulina beta III, el marcador nuclear neuronal NeuN, la proteína asociada a microtubulos Map2 y la colina acetil transferasa ChAT. También se harán tinciones contra los factores de transcripción y marcadores específicos de las MNs en desarrollo Isl1, Lim3, Lim1/2.

Aislamiento eficiente de los precursores para neuronas motoras.

En esta tesis se utilizan CTE que expresan a la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de la región promotora del gen *Hb9* (células HBG3). En ratones, HB9 se expresa específicamente en MNs postmitóticas, lo que permitirá el aislamiento de dicho tipo celular mediante separación activada por fluorescencia (FACS).

Métodos

Protocolo para la generación de motoneuronas a partir de CTE

El protocolo para generar dicho tipo celular está descrito en varios trabajos (Bain *et al.*, 1995; Wichterle *et al.*, 2002) y hace uso de dos potentes morfógenos: el AR y Shh. Las células troncales embrionarias de ratón se mantienen indiferenciadas mediante la adición de LIF al medio de cultivo. Después de su expansión, la diferenciación se induce al retirar el LIF y disociar las células enzimáticamente con tripsina. Las células se siembran en flotación y forman las estructuras denominadas EBs, a las cuales se les da un tratamiento con AR y Shh para generar progenitores neurales. Los EBs finalmente se siembran sobre vidrio o plástico tratados con proteínas de matriz extracelular. A continuación, se detallan los pasos descritos en este resumen.

1. Expansión de CTE sobre células nodriza y congelación

Antes de empezar los protocolos de diferenciación es necesario contar con un *stock* de CTE en congelación. Debido a que las CTE tienen una alta capacidad de auto-renovación, es posible expandir muy rápidamente a estas células. La CTE pueden crecer sobre platos tratados con una solución de gelatina al 0.1% (Sigma G-2500) en agua ultra pura, aunque tienden a crecer mucho más rápidamente si se siembran sobre una capa de células nodrizas. Estas células generalmente son fibroblastos (embrionarios o de líneas comerciales p. ej. STO). Es necesario inactivar mitóticamente a las células nodrizas para evitar que estas crezcan descontroladamente y compitan por los nutrientes con las CTE (Fig. 18).

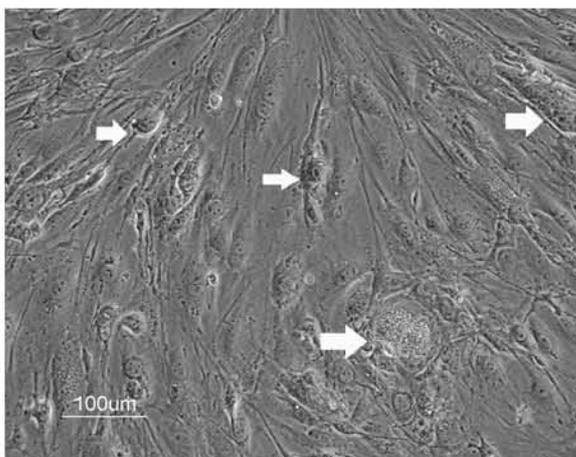


Fig. 18. Colonias con morfología compacta de CTE creciendo sobre fibroblastos STO inactivados por tratamiento con mitomicina. Las flechas señalan colonias pequeñas y densas de CT

2. Inactivación de fibroblastos con mitomicina

Para inactivar las células nodriza se utiliza el compuesto mitomicina C (Roche), el cual inhibe la replicación del ADN, evitando de esta manera la división celular. Cuando los fibroblastos alcanzan 80 % de confluencia, se retira el medio de cultivo y se añaden 7 mL de medio DMEM (para un plato de 10 cm) y 70 μ L de solución con mitomicina (1 mg/mL). Las células se incuban por 3 horas. Las células se lavan 3 veces con PBS estéril y luego se añade 1 mL de tripsina al 0.25 %/ EDTA 0.2g/L (Gibco) para disociar las células. Se incuban por 5 minutos a 37°C y se inactiva la tripsina añadiendo 5 mL de medio DMEM con suero fetal bovino al 10%. Se centrifugan las células a 1000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 minutos y se descarta el sobrenadante. Las células se resuspenden en un volumen adecuado de DMEM y se hacen conteos por exclusión de azul tripano utilizando un hemocitómetro. Las células pueden congelarse o re-sembrarse sobre platos cubiertos con gelatina (0.1%) el día anterior. Alrededor de 2 millones de células son suficientes para inocular una caja de cultivo con un diámetro de 10cm.

3. Congelación de células

Tanto las CTE como los fibroblastos se pueden almacenar en congelación a -80°C o en tanques de criopreservación llenos de nitrógeno líquido. Primeramente, las células se deben disociar enzimáticamente y contar. Se utiliza una solución de tripsina al 0.05%/EDTA para disociar las células y se hacen conteos de células vivas por exclusión de azul tripano. Después de los conteos, las células se resuspenden en medio *knockout* DMEM (KO ver apéndice) con suero fetal bovino al 15 % y una concentración final de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y se trasladan a crioviales. Se congelan a -80°C en contenedores que permiten la disminución gradual de temperatura. Después de un día a -80°C, los viales se pueden transferir a nitrógeno líquido.

4. Descongelación de células troncales embrionarias

La descongelación de los tubos de CTE de ratón es un paso crucial. La viabilidad de las células varía dependiendo del método empleado para descongerlas. Nuestras observaciones han sido que al resuspender las células en medio KO adicionado con LIF

inmediatamente después de que la suspensión se descongele y posteriormente centrifugar por 5 min a 1000 rpm, más células se adhieren a los platos cubiertos con gelatina y sobreviven. Si se empieza con un número mayor de células viables, el tiempo de cultivo en la primera fase (creciendo sobre gelatina) se reduce considerablemente.

Para descongelar, se prepara un tubo con 5 mL de medio KO. Alternativamente, se puede emplear el mismo medio de cultivo con reemplazo de suero en vez de suero fetal bovino. Los viales de criopreservación que contienen las CTE se retiran del nitrógeno líquido y se ponen en un baño a 37°C hasta que estén a punto de descongelarse. No es recomendable dejar mucho tiempo a las células en el baño de descongelación ya que el DMSO con el medio es tóxico a esta temperatura.

Las células se resuspenden cuidadosamente con una micropipeta y la suspensión celular se transfiere al tubo de 15 mL previamente preparado con medio KO. Al transferir la suspensión celular es recomendable hacerlo lentamente, añadiendo gota a gota la suspensión al tubo de 15 mL. Luego, el tubo con las células se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se descarta y el botón celular resultante se resuspende con medio KO (suplementado con suero o con reemplazo de suero) de acuerdo al número de platos en donde se sembrarán las células.

5. Expansión de células troncales embrionarias

Las células descongeladas se siembran y cultivan sobre platos cubiertos de gelatina en medio KO. Los platos se tratan con gelatina al 0.1% un día antes de que se utilicen para el cultivo. A las CTE se les cambia el medio KO y se les adiciona LIF (1000 U/mL, Chemicon) diariamente con el fin de inhibir la diferenciación de las células (Fig. 19). Las células crecen rápidamente y generalmente después de tres o cuatro días alcanzan la confluencia. No es recomendable permitir que las CTE crezcan a densidades muy altas ya que esto promueve su diferenciación espontánea debido al contacto celular. Antes de alcanzar la confluencia las células se disocian y congelan o resiembran para continuar la diferenciación.

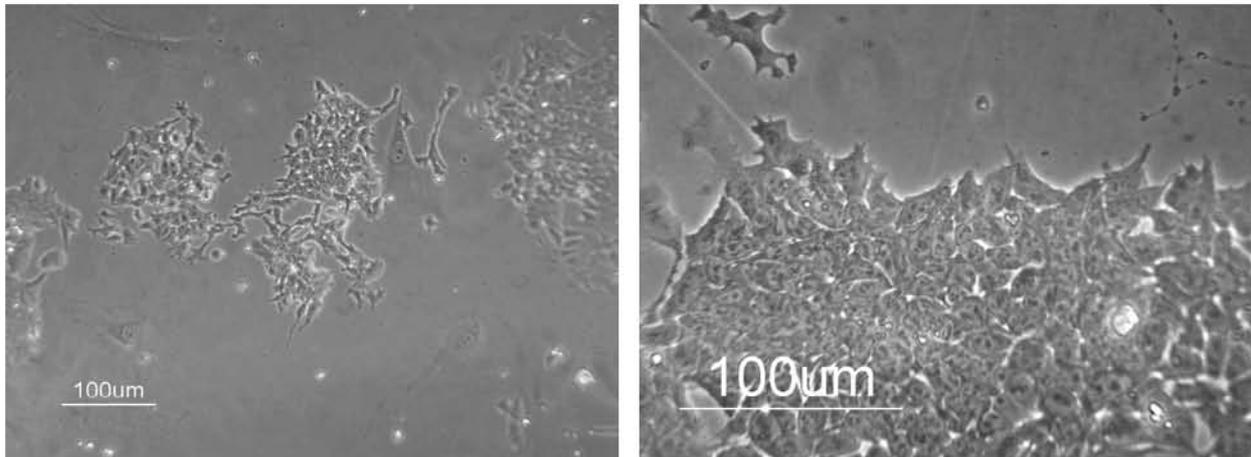


Fig. 19. CTE de ratón (línea R1) creciendo sobre platos tratados con gelatina (0.1%) en medio KO suplementado con LIF. Se presentan 2 aumentos de células 3 días después de descongelación

6. Generación de cuerpos embrionarios

Después de que las CTE se han replicado a un número satisfactorio (alrededor de 70% confluencia, por lo general 4-6 días después del día que se sembraron partiendo de un tubo con $3-6 \times 10^6$) éstas se disocian con tripsina y se resiembran en cajas de cultivo bacteriano sin ningún tratamiento. El propósito de dicha estrategia de cultivo es generar cuerpos embrionarios a partir de las células en flotación (Fig. 20). Dichos agregados celulares pueden producir un gran número de progenitores de distintos linajes.

Para iniciar la formación de EBs, las CTE creciendo sobre gelatina se lavan 3 veces con PBS. Se añaden 2.5 mL de tripsina al 0.05%/EDTA (Gibco) por 5 minutos a 37°C. Se añaden 5 mL de medio de diferenciación DNFK y se disocian las colonias mediante pipeteo. La suspensión celular se transfiere a un tubo de 15 mL y se centrifuga a 800 rpm por 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 10 mL de medio DNFK. Un paso opcional en este punto es sembrar las células sobre un plato de cultivo de 10 cm de diámetro previamente tratado, de 30 min a 1 hora, con gelatina (0.1%). El propósito de este paso es eliminar a la mayoría de los fibroblastos, ya que éstos se adhieren muy rápido al plato de cultivo celular. La suspensión de células ES se vuelve a centrifugar por 5 minutos a 800 rpm, se elimina el sobrenadante y se resuspenden en 10 mL DNFK. Se cuenta el número de células vivas utilizando un hemocitómetro y exclusión del colorante azul tripano y se siembran 2×10^6 células por cada plato de 10 cm.

En los primeros dos días, los EBs solamente se cultivan en medio DNFK. En el tercer día, los EBs con medio se transfieren a tubos de 15 mL, donde se dejan sedimentar por 10 minutos. Se succiona cuidadosamente el medio dejando los EBs hasta abajo del tubo. Se adiciona el mismo volumen de medio DNFK y se añade AR en concentración de 2 μM (Fig. 20) y Shh en diferentes concentraciones (ver sección de resultados). Este tratamiento se sigue por cuatro días adicionales (hay que cambiar el medio y adicionar AR y Shh de nuevo cuatro días después de que se han generado los EBs o cuando el medio se observe excesivamente acidificado por su color).

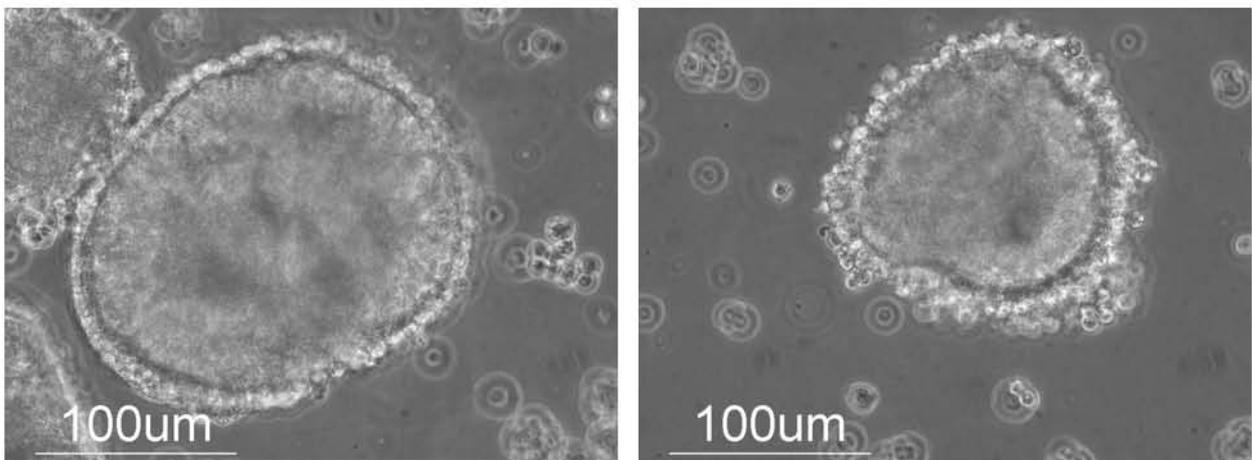


Fig. 20. Cuerpos embrionarios generados a partir de CTE R1. Izquierda, tratados con ácido retinoico 2 μM . Derecha, sin tratamiento de ácido retinoico. Fotos tomadas en el quinto día de iniciar la formación de EBs.

7. Disociación de cuerpos embrionarios

Una vez que a los cuerpos embrionarios se les ha dado un tratamiento con AR y Shh, éstos se disocian enzimáticamente para sembrar sobre un sustrato al cual las células se puedan adherir. Este paso, bastante sencillo en apariencia, es absolutamente crucial en el protocolo de diferenciación. El sustrato sobre el cual los EBs disociados se siembran es determinante en la supervivencia y el éxito del cultivo.

Se pueden utilizar diferentes superficies y a éstas se les pueden dar diferentes tratamientos, principalmente con proteínas de matriz extracelular. Las dos superficies que se utilizaron en este trabajo son cubreobjetos de vidrio y el plástico de cajas de cultivo de 24 pozos (Costar). Estas superficies se tratan con matrigel (una preparación soluble de proteínas extracelulares extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm que contiene

colagena IV, entactina, TGF-beta y proteoglicanos, Becton Dickinson). Alternativamente, se puede tratar el vidrio y plástico con poliornitina, seguida por laminina y/o fibronectina, aunque las células se adhieren mejor a superficies tratadas con matrigel. En general, las células tienen una mejor adherencia al plástico comparando con el vidrio (Fig. 21). Sin embargo, el tratamiento de cubreobjetos con matrigel es suficiente para asegurar que suficientes células se adhieran al vidrio; este hecho es útil más adelante cuando se practican inmunotinciones sobre los cubreobjetos.

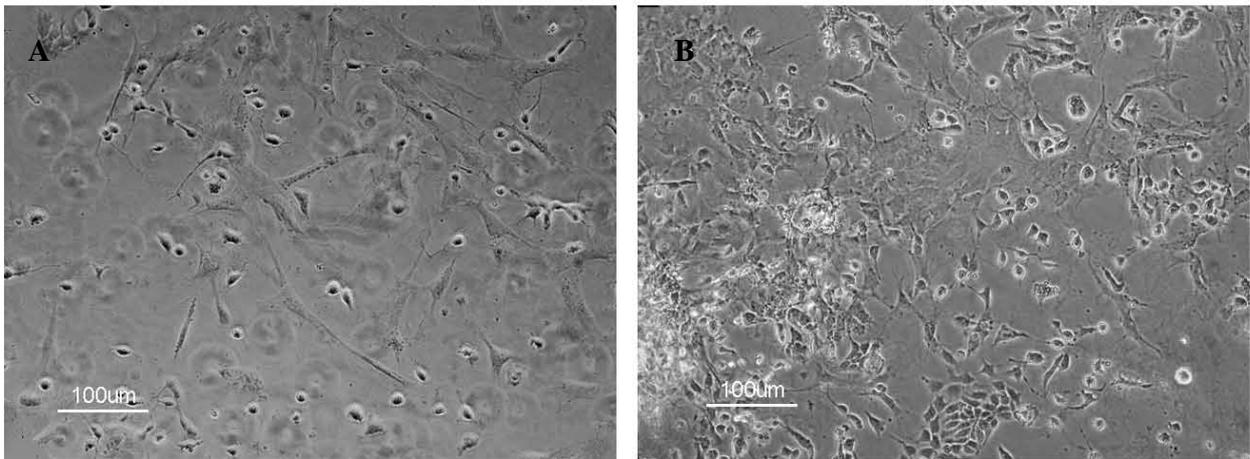


Fig. 21. Células disociadas de los EBs que fueron tratados con AR 2 μ M y Shh 90 nM por 4 días y sembradas sobre cubreobjetos tratados con matrigel (A) y directamente sobre el plástico también tratado con matrigel (B).

Las cajas con 24 pozos, con o sin cubreobjetos, se tratan con matrigel de la siguiente manera. Se prepara una solución 1:50 de matrigel en PBS estéril. Debido a que el matrigel se gelifica muy rápidamente a temperatura ambiente, es conveniente mantener todas las soluciones sobre hielo. Una vez diluida, la solución de matrigel se aplica a los pozos por lo menos un día antes de que se siembren células disociadas.

Para el protocolo de disociación, inicialmente se utilizó tripsina al 0.25% y al 0.05% con EDTA. Se observó que al utilizar tripsina en estas concentraciones, la supervivencia de las células se reducía enormemente. Al sembrar las células diferenciadas, éstas no sobrevivían por mucho tiempo.

Como alternativa se decidió utilizar un método de disociación empleando la enzima papaína. Para digerir los EBs que recibieron diferentes tratamientos en 1 mL de solución de papaína, se sigue el siguiente protocolo: 5 mL de solución de papaína se activan incubando a 37°C por 5 minutos. Los EBs se lavan dejándolos sedimentar, retirando el medio y añadiendo 1 mL de PBS. Se retira el PBS, se añade 150 μ L de solución de papaína y 10 μ L de solución de DNAsa y se tritura con micropipeta de 200 μ L 10 veces para romper los EBs más grandes. Se añade el resto de la solución de papaína (850 μ L a cada una de las 5 condiciones) y se incuba por 10 minutos a 37°C. Se tritura la suspensión celular con una pipeta de 1 mL 10 veces y se incuba de 5 a 10 minutos adicionales a 37°C. Para inactivar la papaína se añade medio con suero fetal bovino o suero de caballo.

Otro aspecto importante en la supervivencia de las células diferenciadas y resembradas es la densidad a la que se escoge hacer el cultivo. El sembrar de 120,000 a 180,000 células/pozo no solo incrementa la tasa de sobrevivencia, notamos también cambios en la morfología en cultivos más densos con más células extendiendo largas neuritas. Hemos observado que aquellas células con morfología y marcadores específicos de neuronas tienden a crecer muy cerca de zonas donde EBs que no se han disociado enteramente y se han adherido al sustrato (Fig. 22). Entonces, la disociación parcial de los EBs parece ser un paso muy importante para el protocolo de diferenciación.

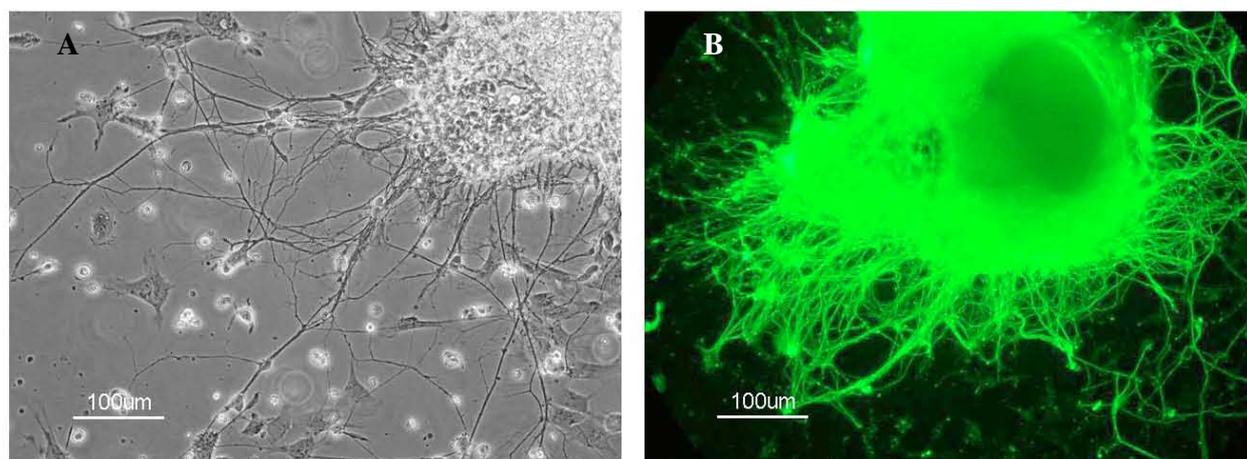


Fig. 22. **A,** Fotografía de campo claro de un EB disociado con papaína que fue tratado previamente con AR 2 μ M y Shh 30 nM y sembrado sobre un cubreobjetos cubierto con matrigel. Se distinguen largas neuritas emanando del EB. **B,** Fotografía de la inmunotinción fluorescente con anticuerpos que reconocen a la tubulina beta III de un EB tratado con AR 2 μ M y Shh 30 nM sembrado sobre plástico tratado con poli ornitina y fibronectina. Ambos cultivos 4 días después de disociación de EBs.

8. Protocolo de inmunotinción

Para realizar las tinciones con anticuerpos, las células se lavan 3 veces con PBS y luego se fijan con paraformaldehído al 4% en PBS 20 minutos. Se procedió a permeabilizar y bloquear con una solución de Triton X-100 al 0.3% en suero normal de cabra (o de burro, dependiendo del anticuerpo a emplear) al 10% en PBS por 45 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavan las células tres veces con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1% en PBS, dejando 5 minutos cada lavado. Luego se aplica el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo sin tritón y se incuba de una hora a temperatura ambiente o una noche a 4°C, dependiendo del anticuerpo.

Después de la incubación del anticuerpo primario, se hacen 3 lavados con PBS por 5 minutos cada uno. Finalmente se aplica el anticuerpo secundario (generalmente en concentraciones de 1:200 – 1:500) en 10% suero preinmune en PBS. Las células se montan sobre portaobjetos con medio de montaje preferiblemente que incluya el marcador nuclear DAPI.

9. Separación de células mediante citometría de flujo

Para hacer una cuantificación de células fluorescentes o una separación de células activada por fluorescencia (FACS), los EBs con distintos tratamientos se deben disociar con papaína como se describe en 7. Se debe tener cuidado en no dejar agregados de ningún tamaño ya que la presencia de éstos muy fácilmente tapa el flujo de los citómetros. Después de la disociación, las células se resuspenden en PBS y se filtran a través de una malla estéril para remover los agregados que hayan quedado. Las muestras se mantienen en hielo y se llevan a los citómetros. En prácticas de cuantificación y separación se utilizaron dos equipos, FACScalibur y FACSaria de Becton Dickinson en la unidad de citofluorometría de Instituto de Investigaciones Biomédicas. El personal de dicha unidad nos asistió en la preparación y calibración de los equipos. Las células primero se observaron en una gráfica comparando la SSC/FSC (SSC es una medida de la luz esparcida lateralmente y sirve para estimar la complejidad de la estructura celular mientras que FSC es una medida de la luz esparcida frontalmente y da una medida del tamaño relativo de las células). De esta manera se seleccionan aquellas células en base a tamaño para examinar los niveles de fluorescencia; las células muy pequeñas probablemente están atrofiadas y muertas. A partir

de la medida de fluorescencia se pueden seleccionar poblaciones específicas mediante “compuertas” para cuantificar o separar estas fracciones. Las células separadas por fluorescencia se recobraron en PBS estéril y más tarde se sembraron en medio DNFK sobre matrigel.

Resultados

Inmunotinciones de CTE sometidas al proceso de diferenciación

Se utilizaron anticuerpos que reconocen proteínas marcadoras de precursores neurales (nestina), de neuronas (Map2, NeuN, tubulina beta III; Fig. 23) y de glía (GFAP). De estos experimentos se determinó que dentro de los cultivos diferenciados tratados solamente con AR se encontraban neuronas; no obstante, se necesitan otros marcadores para determinar a que subtipo pertenecen.

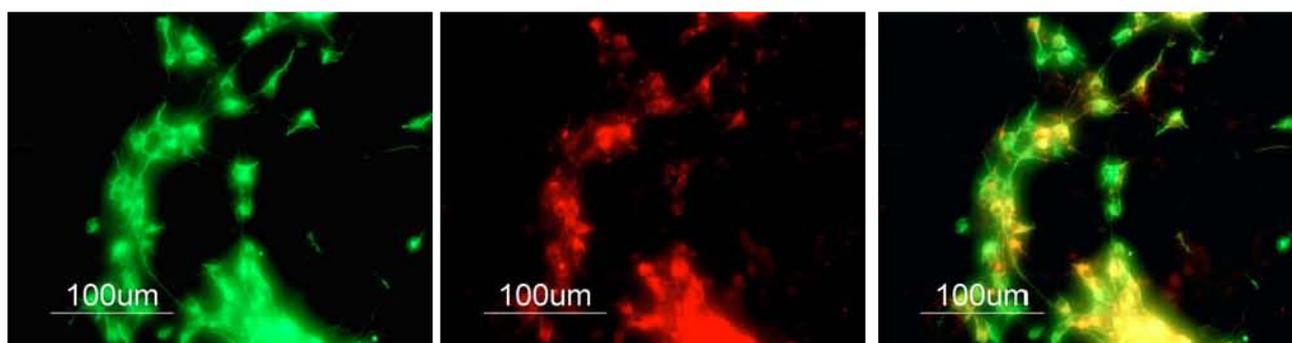


Fig. 23. Las CTE R1 diferenciadas con AR expresan la tubulina beta III (verde) y también la proteína NeuN, marcador nuclear neuronal (rojo). Fotografías capturadas con epifluorescencia. Cultivo de células diferenciadas y sembradas por 5 días después de disociación de EBs.

En experimentos posteriores, se utilizaron anticuerpos con mayor especificidad a neuronas de la ME. En cultivos celulares diferenciados a partir de la línea de CTE R1 tratados con AR y Shh (30, 90 y 180 nM) se encontraron neuronas que contienen tubulina beta III y Lim 1/2 (Fig. 24A). Imágenes con microscopía confocal confirman la localización nuclear de Lim 1/2 en células cuyos somas y axones son positivos a tubulina beta III (Fig. 24B).

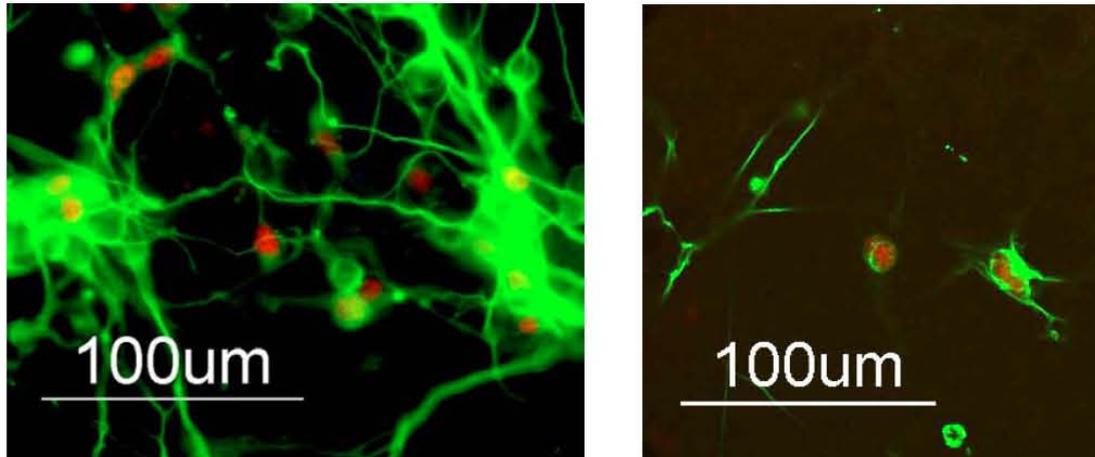


Fig. 24. **A**, Imagen de microscopía de epifluorescencia de células diferenciadas con AR 2 μ M y Shh 180 nM, teñidas con anticuerpos contra Lim 1/2 (rojo) y tubulina beta III (verde). **B**, Imagen de microscopía confocal de la misma preparación donde se observan los núcleos teñidos contra Lim 1/2 en células positivas a tubulina beta III. Células fijadas 5 días después de disociación de EBs.

Otro marcador de las MN en desarrollo es factor de transcripción Islet1 para el cual existen anticuerpos disponibles. En experimentos de inmunodetección contra Islet 1 en cultivos diferenciados se tuvieron bastantes problemas. En prácticas iniciales, utilizando un anticuerpo concentrado 10 veces, obtenido del Banco de hibridomas para el estudio del desarrollo (DSHB), se observó una tinción muy inespecífica. En prácticas subsecuentes, se utilizó un lote distinto del anticuerpo contra Islet1. En este segundo caso se practicó el protocolo de inmunofluorescencia sobre cortes de la ME de embriones de ratón (E13) para validar el anticuerpo y comprobar que da una tinción específica y detectable. El resultado fue un tanto ambiguo. Existen áreas en la parte ventral del tubo neural que parecen tener una marcación intensa. La localización podría corresponder con el patrón de expresión de Islet 1. Sin embargo, una tinción igual de intensa aparece en otras regiones del corte fetal. Es posible que variando la concentración del anticuerpo se podría obtener una tinción más específica. Finalmente, utilizando una mezcla de dos anticuerpos contra Islet (40.2D6 y 40.4D5) y un protocolo diferente de inmunotinción, logramos obtener una señal más convincente de la presencia de este factor de transcripción en nuestros cultivos (Fig. 25).

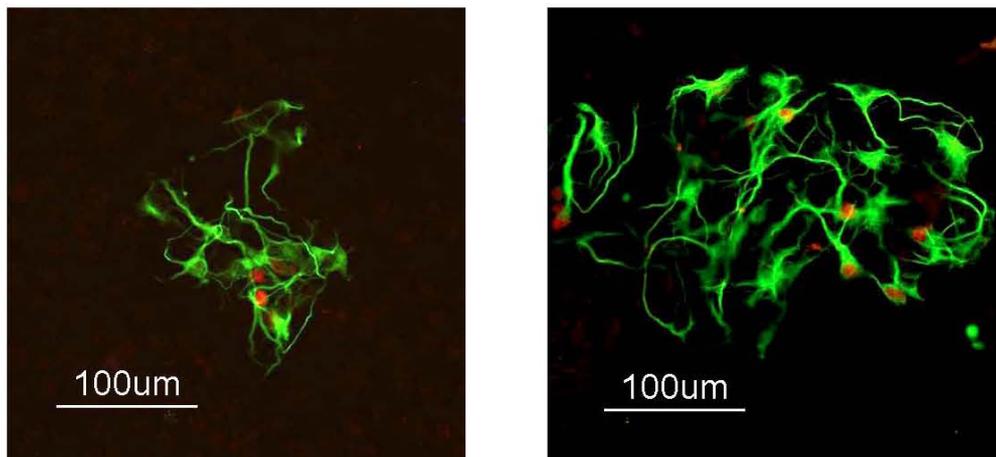


Fig. 25. Imágenes de microscopía confocal de una preparación de células diferenciadas con AR 2 μ M y Shh 90 nM, a las cuales se les practicó una doble tinción contra tubulina beta III (verde) e Islet1 (rojo). Células fijadas 2 días después de disociación de EBs.

Se continuaron los experimentos de tinción contra Islet1 utilizando nuevos lotes de anticuerpos producidos en el DSHB con resultados alentadores. De nuevo obtuvimos cultivos con neuronas jóvenes (positivas a tubulina beta III) y con tinción nuclear positiva a Islet1. Se utilizaron tres anticuerpos contra Islet 1, 40.2D6, 40.3A4 y 39.4D5, de los cuales el 40.2D6 daba la tinción más específica y limpia. Una razón por la cual las tinciones previas no detectaron Islet1 de manera constante podría ser que el epítipo de dicha proteína es bastante inestable y no se conserva después de la fijación con paraformaldehído. Si las inmunotinciones se practican uno o dos días después de que las células se han fijado los resultados son más favorables; mas allá de este lapso de tiempo, las probabilidades de obtener una buena tinción empiezan a decaer rápidamente.

En el caso de tinciones contra la enzima de neuronas colinérgicas, la ChAT, se observó un ruido de fondo muy intenso y una tinción inespecífica que parecía marcar a todas las CTE sometidas a protocolos de diferenciación. Utilizamos cortes de ME de rata adulta para estandarizar las condiciones que daban la mejor tinción en términos de limpieza (Fig. 26), sin embargo, nunca se pudieron replicar estos resultados sobre células cultivadas. Por esta razón, el anticuerpo contra ChAT (Chemicon) no se pudo emplear en inmunotinciones para la detección de posibles MNs dentro de cultivos de CTE diferenciadas.

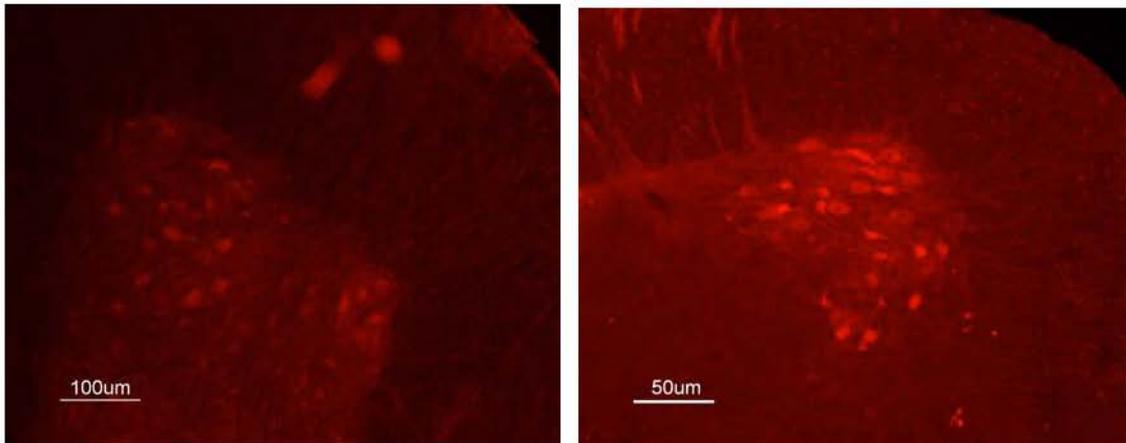


Fig. 26. Cortes de ME de rata adulta de la región lumbar teñidos con el anticuerpo que reconoce a la ChAT. La tinción es un tanto inespecífica aunque las MNs se marcan más intensamente. El asta ventral está orientada hacia arriba.

Selección de motoneuronas mediante expresión de la proteína verde fluorescente como molécula reportera

Inicialmente se propuso utilizar la expresión del factor de transcripción Hb9 como una manera de seleccionar MNs. Hb9 se expresa selectivamente en MNs postmitóticas. Una estrategia para marcar células que expresan Hb9 es utilizar la región promotora del gen de Hb9 (9 kb), para controlar la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés, Fig. 27). De esta manera, aquellas células que se hayan diferenciado a MNs y que estén expresando altos niveles de Hb9 también expresarán el gene reportero.

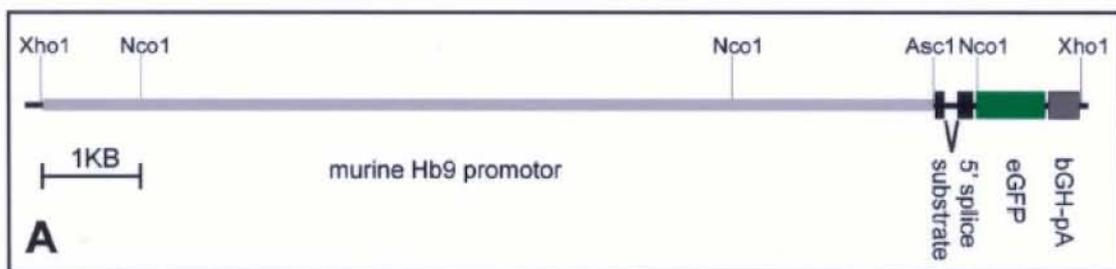


Fig. 27. Construcción que consta del promotor de Hb9 (alrededor de 9 kb) dirigiendo la expresión de la proteína verde fluorescente.

Se propuso electroporar CTE con esta construcción. Se decidió cotransfectar la construcción con un vector (pcDNA 3.1) que lleva un gen de resistencia contra neomicina con el propósito de utilizar este mismo fármaco para seleccionar células electroporadas. El protocolo de electroporación requiere de una considerable cantidad de ambos plásmidos,

sobre todo del que contiene el promotor de Hb9. Por esta razón, se amplificaron ambos utilizando un kit de purificación Qiagen maxiprep (Fig. 28). Luego, se hicieron dos intentos de expandir y electroporar células ES con ambas secuencias (el protocolo de electroporación fue: 0.25 kV, 500 μ F y una constante de tiempo de alrededor de 10 mseg). Se ha observado que el evento de electroporación causa la muerte celular en un alto porcentaje de las células a las que se les practica. En el primer intento de electroporación notamos que la gran mayoría de las células sobrevivieron lo cual nos hizo dudar si el protocolo de electroporación funcionó. Las células se congelaron e intentos posteriores de resembrar no dieron resultado, ninguna célula se adhirió a los platos de cultivo. En un segundo intento de electroporación, se utilizaron las mismas condiciones. Esta vez, se observó una prominente muerte celular a causa del evento de electroporación y del tratamiento posterior con neomicina. Las colonias sobrevivientes se seleccionaron y aislaron en pozos individuales. Durante la expansión celular y el aislamiento de colonias notamos que las células sobrevivientes perdieron la característica morfología de células ES. Las células sobrevivientes eran más grandes, con una forma similar a fibroblastos, un núcleo pequeño y difícil de distinguir, las colonias no eran compactas y aunque crecían rápidamente, lo hacían expandiéndose principalmente a los lados. Las células ES son comparativamente más pequeñas con un núcleo muy visible y sus colonias son muy densas y de varias capas.

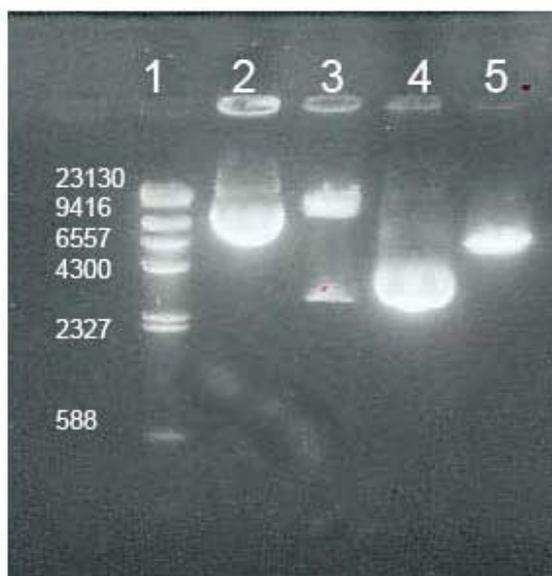


Fig. 28. Foto del gel de agarosa para la separación por electroforesis de los productos de amplificación y purificación de plásmidos. Carril 1 – marcador de peso molecular Carril 2 – plásmidos con construcción Hb9. Carril 3 - plásmidos con construcción Hb9 digerido con Xho I (dos bandas de tamaños esperados). Carril 4 – plásmido pcDNA 3.1. Carril 5 – plásmido pcDNA 3.1 digerido con Xho I.

Células HBG3

El grupo del Dr. Thomas Jessell generó una línea de CTE a partir de un ratón transgénico en el que se introdujo la secuencia de la GFP bajo el control de los elementos regulatorios de la proteína Hb9 (Wichterle *et al.*, 2002). La línea celular llamada HBG3 mantiene todas las características de las CTE y posee la capacidad de responder a la exposición de AR y Shh, diferenciándose a neuronas motoras y expresando de manera estable la GFP.

Como los resultados de las electroporaciones no fueron favorables, se decidió pedir estas células en donación. A partir de un vial, se expandieron las células sobre fibroblastos inactivados. Después de congelar un buen número de viales, se sometieron las células a protocolos de diferenciación hacia MNs empleando AR y diferentes concentraciones de Shh. Se incluyeron también controles a los que solamente se les dio un tratamiento con DMSO, el vehículo en el que se disuelve el AR. Al generar EBs, algunas células empezaron a expresar la GFP incluso sin la adición de ningún morfógeno. Se observó un incremento en la proporción de células fluorescentes al agregar AR y, más aún, al adicionar AR y Shh. Se utilizaron tres concentraciones de Shh y observamos un incremento dosis dependiente en el

número de células que expresaban GFP (Fig. 29). Cuando los EBs se disociaron mediante el tratamiento enzimático con papaina y las células resultantes se sembraron, algunas mostraban un intenso marcaje debido a la proteína verde fluorescente. Después de algunos días de maduración estas células mostraban una morfología característica de neuronas (Fig. 30).

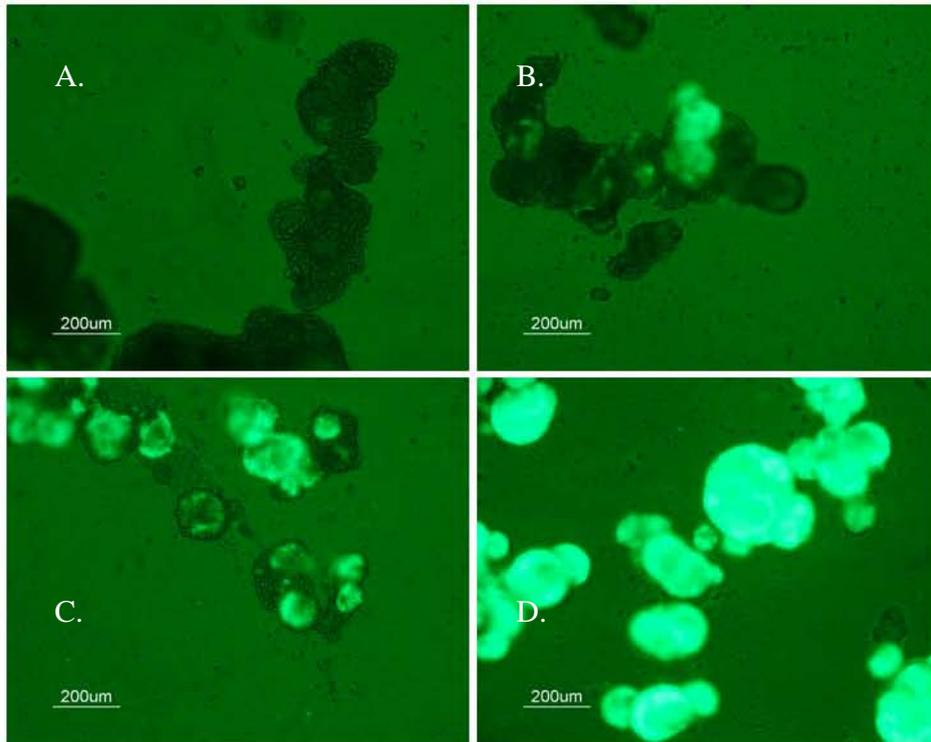


Fig. 29. Combinación de fotografías en campo claro y fluorescencia de EBs tratados con DMSO (A), AR 2 μ M (B), AR + Shh 100 ng/mL (C) y AR + Shh 600 ng/mL (D). La expresión del la GFP aumenta con la exposición a Shh.

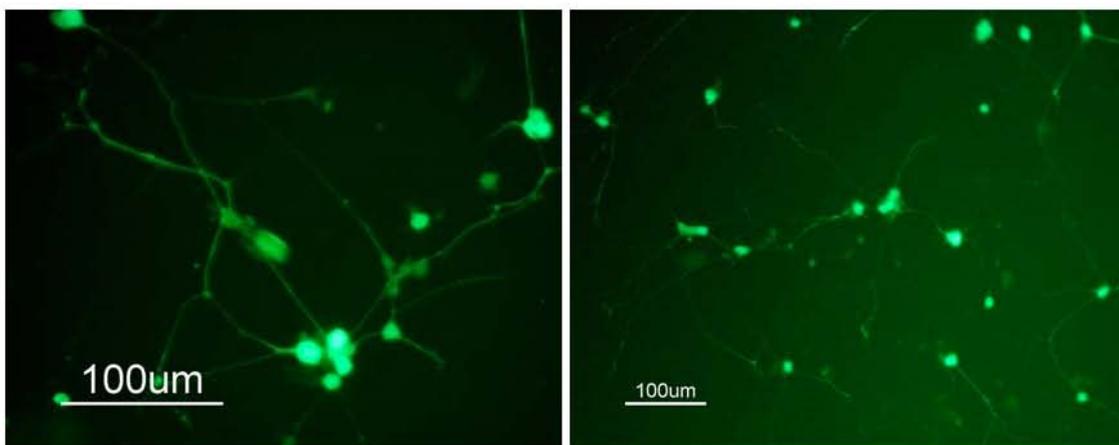


Fig. 30. Células sembradas sobre cajas tratadas con matrigel a partir de EBs tratados con AR y Shh (300 ng/ml).

Para corroborar la identidad neuronal de las células diferenciadas que expresan la proteína verde fluorescente, se practicaron inmunotinciones después de la disociación de los EBs. Se encontró que aquellas células que expresan la GFP también expresan marcadores neuronales como NeuN, tubulina beta III (neuronas jóvenes) y MAP2 (neuronas en un estado más avanzado de la maduración (Fig. 31). Las células HBG3 diferenciadas también expresan el factor de transcripción Islet1 (Fig. 32) lo cual corrobora su identidad de MN. En las tinciones contra Islet1 se encuentran células que también expresan tubulina beta III sin la presencia de GFP. Estas células podrían ser neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal. Alternativamente, estas células también podrían ser MNs que han perdido la fluorescencia de la GFP. Dentro del proceso de fijado con paraformaldehído al 4%, hemos observado que un gran número de MNs pierden la fluorescencia debida a GFP.

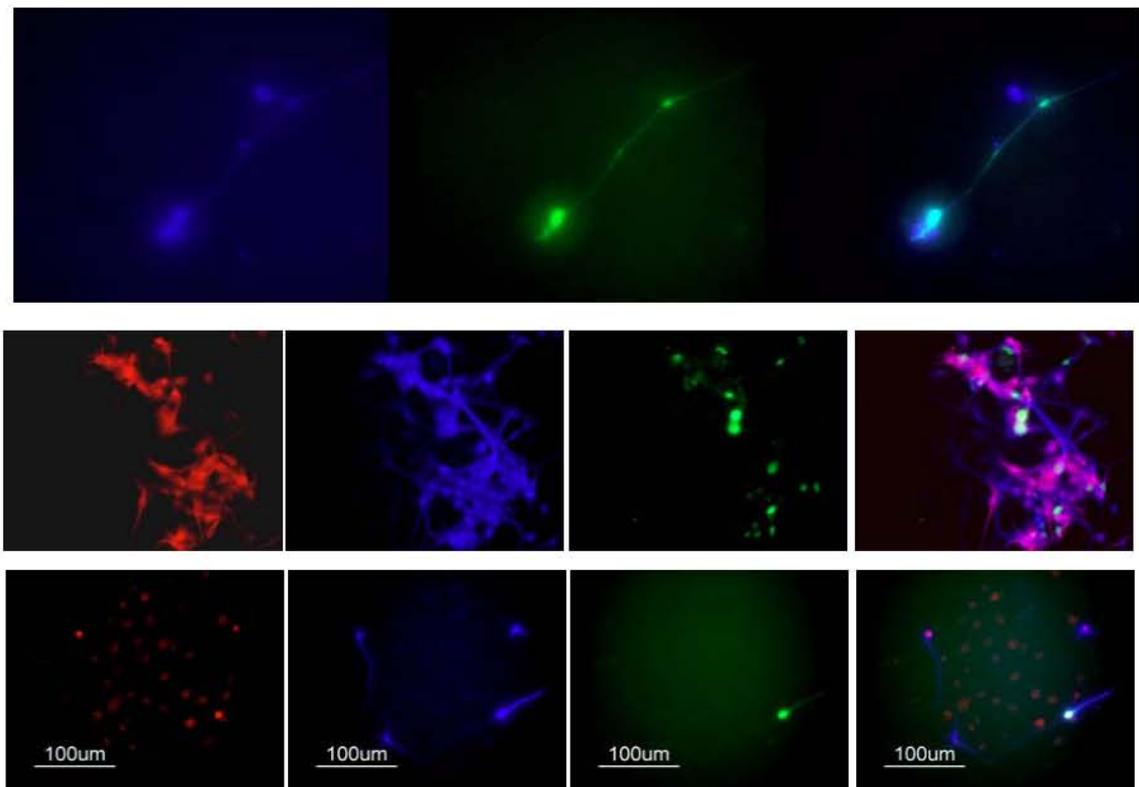


Fig. 31. Las células HBG3 diferenciadas que expresan la GFP (verde) también expresan marcadores neuronales como son tubulina beta III (azul), Map2 (rojo de serie intermedia) y NeuN (rojo en la serie de abajo). Estas tinciones fueron hechas sobre cultivos disociados provenientes de EBs tratados con AR y Shh 600 ng/mL.

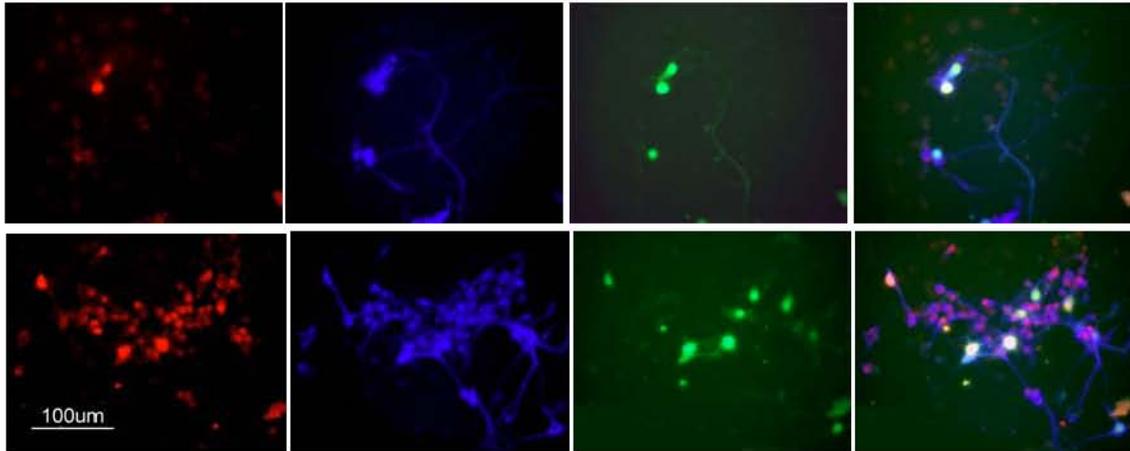


Fig. 32. Las células HBG3 diferenciadas que expresan la GFP (verde) también expresan tubulina beta III (azul) y el factor transcripcional Islet1 (núcleos rojos). Estas células fueron diferenciadas mediante el tratamiento de los EBs con AR y Shh 600 ng/mL.

Cuantificación de células GFP positivas

Se estimó la proporción de células verdes fluorescentes haciendo conteos manuales. Se contó el número de células disociadas totales en campos claros escogidos al azar, luego se cuantificó el número de células GFP positivas en el mismo campo (Fig. 33). Se contaron de 600-1300 células de cada condición para cada cultivo. Los conteos se hicieron de células vivas ya que al fijar mucha de la fluorescencia se pierde. La cuantificación de esta manera se hizo en más de tres cultivos. En cada cultivo, durante la etapa de cuerpos embrionarios, se adicionaron concentraciones ascendentes de Shh para ver si esto tenía un efecto sobre el número de células positivas. En cuerpos embrionarios se observó que la intensidad de la fluorescencia era claramente más alta en cultivos que recibieron la mayor dosis de Shh (Fig. 29). Haciendo una cuantificación de células disociadas es posible determinar si el incremento en fluorescencia observado previamente (Fig. 32) se debe a que hay una proporción más alta de células están que expresando HB9. Alternativamente, o en conjunción, el aumento en fluorescencia podría deberse no a un aumento en el número de células GFP positivas, sino a un incremento del nivel de expresión de HB9 (y por ende GFP) de aquellas células que inicialmente expresan GFP cuando solamente se exponen al ácido retinoico.

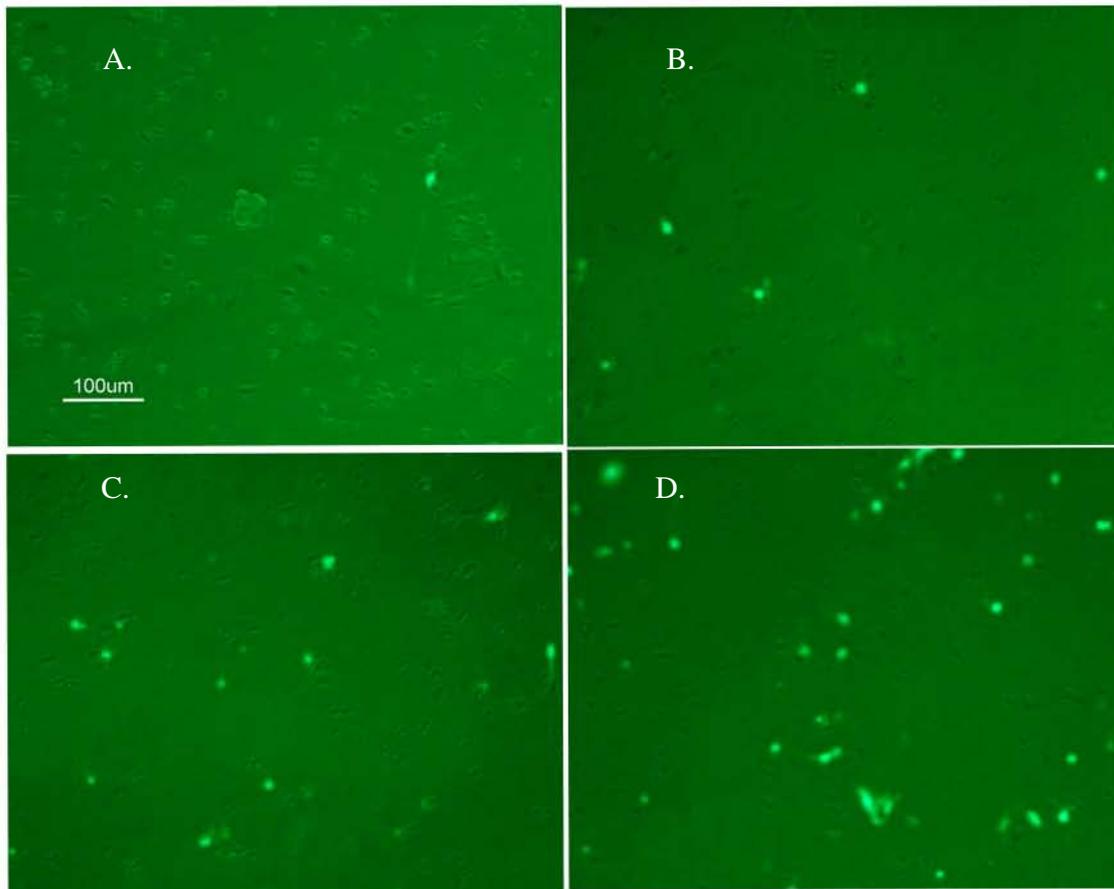


Fig. 33. Fotografías en campo claro y fluorescencia representativa de aquellas utilizadas para la cuantificación de la proporción de células GFP positivas. **A**, Células sin tratamiento. **B**, Células tratadas con AR 2 µM. **C**, tratamiento con AR 2 µM + 100 ng/mL Shh. **D**, AR 2 µM + 600 ng/mL Shh.

El promedio de los porcentajes de células GFP positivas de tres cultivos se resume en la Fig. 34. Se ve un aumento claro en número de células GFP positivas al añadir AR en el tratamiento de los EBs. El Shh también tiene un efecto positivo sobre la expresión de GFP que incrementa a concentraciones más altas de dicho morfógeno.

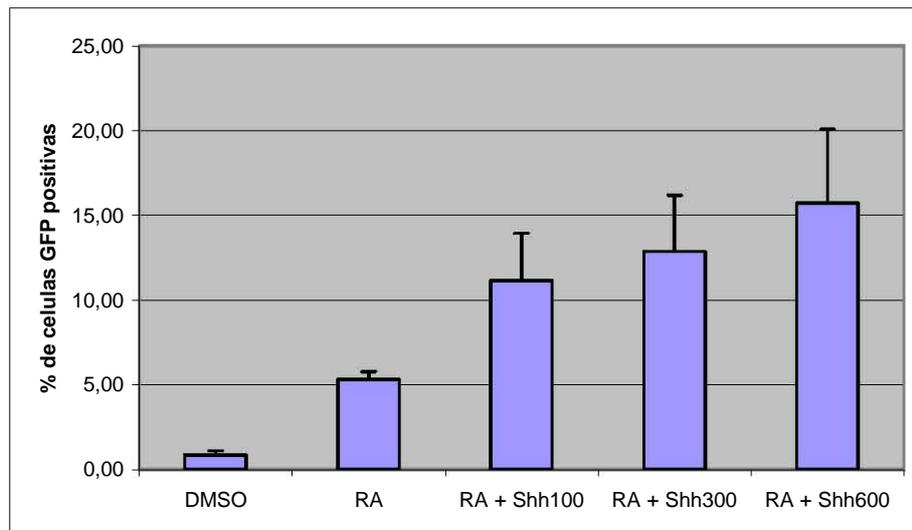


Fig. 34. El tratamiento con AR de las HBG3 induce un mayor número de células positivas a GFP. Este resultado es estadísticamente significativo. Las concentraciones ascendentes de Shh también incrementan de manera significativa la proporción de células GFP positivas.

Citofluorometría

Otra estrategia para cuantificar tanto el número de células fluorescentes como el nivel de fluorescencia es utilizando citometría de flujo. En experimentos iniciales se cuantificó el número de células fluorescentes de tres muestras utilizando el equipo FACScalibur (Becton Dickinson). Las tres muestras constaban de un control de células sin fluorescencia (fibroblastos STO), células HBG3 diferenciadas sin AR ni Shh y células HBG3 expuestas a AR (Fig. 35).

Para analizar los datos obtenidos de un total de 30,000 eventos se decidió examinar las poblaciones de células en cuatro particiones (delimitadas en cuatro cuadrantes en la gráfica de fluorescencia: SI cuadrante superior izquierdo, SD superior derecho, II inferior izquierdo e ID inferior derecho). El nivel de fluorescencia basal se seleccionó en base a los datos recabados de las células STO. Se encontró que la mayoría de estas células tiene un nivel de fluorescencia endógena menor a 10^2 (unidades arbitrarias). De la muestra de HBG3 sin tratamiento se observó una población de células con fluorescencia mayor a 10^2 (1.08%). En el caso de las células tratadas con AR notamos que una proporción similar de células tenían niveles superiores a los que consideramos basal (0.95%). Pese a que el número de

células “fluorescentes” fue similar en ambas muestras de HBG3 es claro que las células tratadas con AR tienen una fluorescencia más intensa (Tabla 2, fluorescencia media).

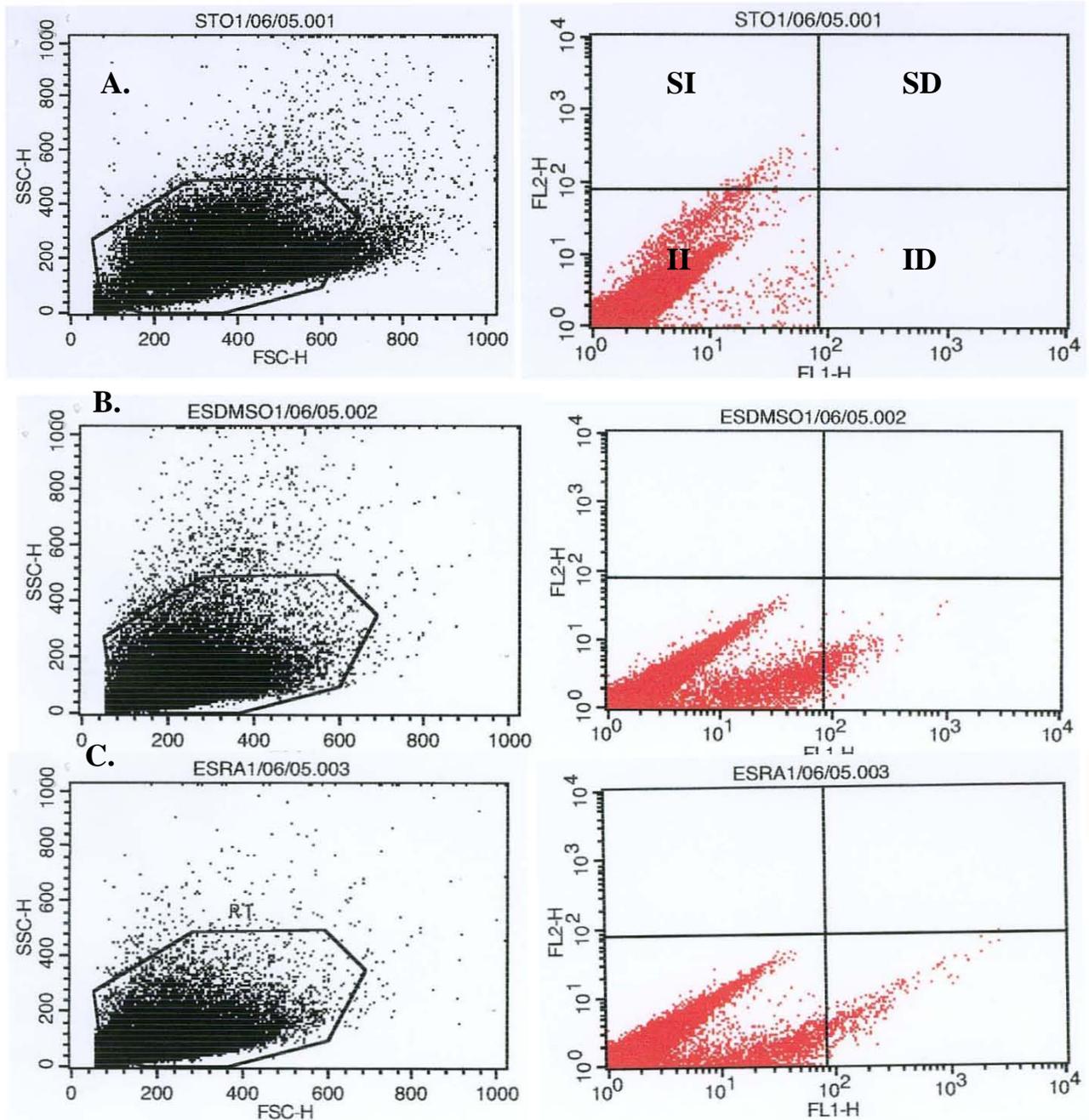


Fig. 35. Graficas de tamaño (FSC, forward scatter) y granularidad (SSC, side scatter) (izquierda) y fluorescencia en dos canales, FL1 (verde) y FL2 (roja) de la región seleccionada de células R1. **A,** Fibroblastos STO. **B,** Células HBG3 diferenciadas sin tratamiento. **C,** Células HBG3 tratadas con AR 2 μ M.

STO			
Cuadrante	Eventos	% células	Fluorescencia media FITC
SI	85	0.31	27.99
SD	1	0	117.57
II	27343	99.64	2.79
ID	14	0.05	113.20

HBG3 + DMSO			
Cuadrante	Eventos	% células	Fluorescencia media FITC
SI	0	0	0
SD	0	0	0
II	27241	98.92	4.49
ID	298	1.08	137.53

HBG3 + AR			
Cuadrante	Eventos	% células	Fluorescencia media FITC
SI	0	0	0
SD	1	0	0
II	27635	99.05	1.97
ID	264	0.95	244.97

Tabla 2. Datos obtenidos del análisis de tres muestras (STO, HBG3 y HBG3 +AR) utilizando el equipo FACScalibur. Las gráficas de fluorescencia se dividieron en cuatro cuadrantes: SI, cuadrante superior izquierdo; SD, superior derecho; II, inferior izquierdo; ID, inferior derecho. Las células consideradas fluorescentes corresponden al cuadrante ID con fluorescencia mayor a 10^2 .

Cuantificación y separación de células utilizando el equipo FACSaria

Se hizo un protocolo de separación de células por fluorescencia utilizando el equipo de Becton Dickinson FACSaria, el cual es mucho más nuevo y eficiente que el FACScalibur. Se seleccionaron células fluorescentes de dos fuentes, de HBG3 sin tratamiento y de HBG3 tratadas con AR. A partir de un plot SSC/FSC, se seleccionó la región de células a analizar (Fig. 36, P1) y de estas se seleccionaron solamente aquellas células con un nivel de fluorescencia mayor a 10^3 (unidades arbitrarias, P2). De las células HBG3 sin tratamiento se obtuvieron 94223 células de un total de 7873579 células analizadas (1.20%) y de las que se trataron con AR 60550 células de un total de 4740131 (1.3%).

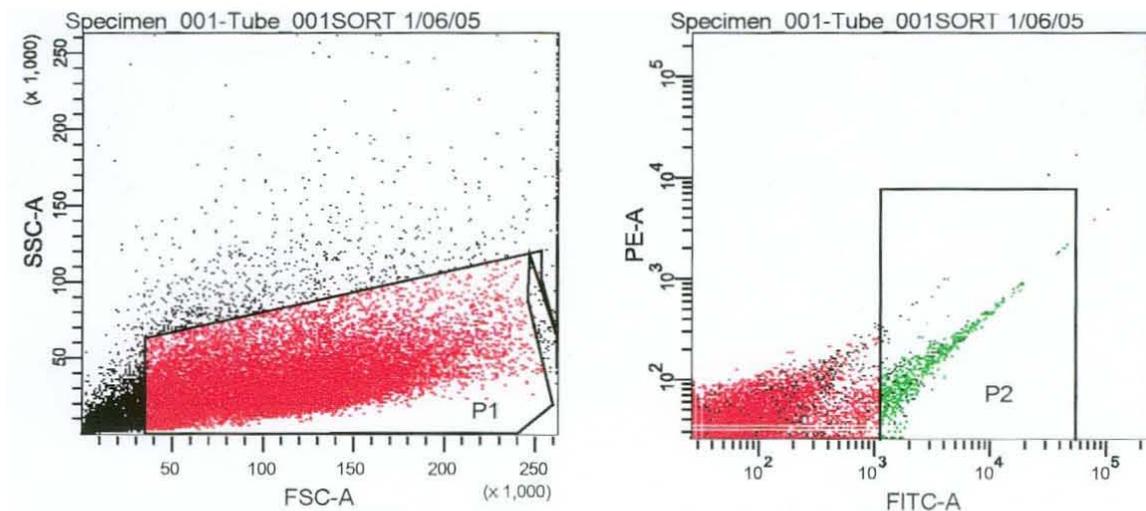


Fig. 36. Región P1 seleccionada de una grafica SSC/FSC. La fluorescencia de P1 se analizó y de esta se seleccionó P2 con niveles de fluorescencia mayores a 10^3 , para hacer un proceso de selección de células.

Se hizo una cuantificación similar utilizando el mismo equipo de citofluorometría de células HBG3 diferenciadas en cinco condiciones (sin tratamiento, AR 2 μ M, AR 2 μ M + 100 ng/mL Shh, AR 2 μ M + 300 ng/mL Shh y AR 2 μ M + 600 ng/mL Shh) (Fig. 37). Se analizaron también células B5, línea de CTE de ratón que expresa la proteína verde fluorescente bajo el promotor de la actina. Durante esta cuantificación se decidió considerar las células verdes fluorescentes como aquellas que tenían un nivel mayor a 10^4 . Se llegó a esta decisión ya que en la separación previa las células se seleccionaron a partir de 10^3 y cuando éstas se sembraron, se observó todavía un número muy grande de células ES indiferenciadas en base a su morfología y a su muy rápida tasa de crecimiento. El resumen de la cuantificación se graficó, y muestra el porcentaje de células GFP positivas en las cinco condiciones (Fig. 37 y Tabla 3).

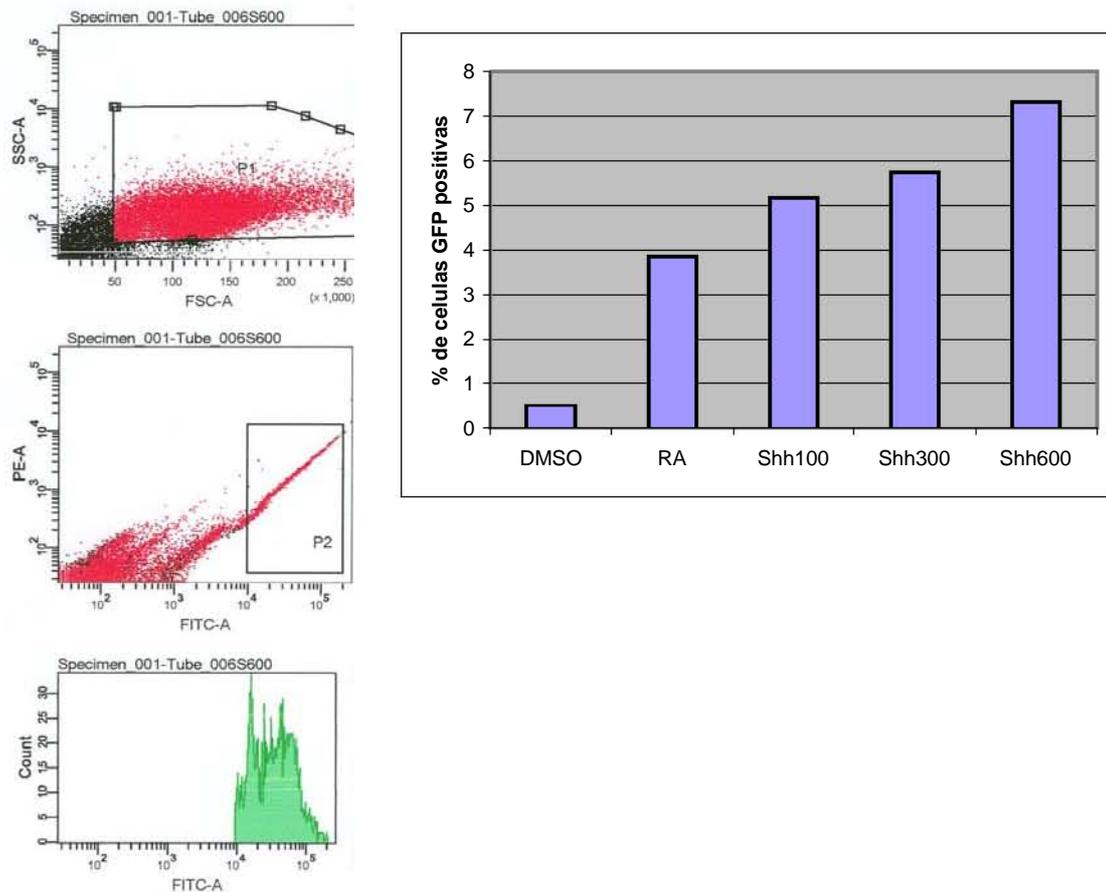


Fig. 37. Gráficas representativas de cuantificación de células fluorescentes (izquierda). La región P1 se seleccionó para analizar y de ésta, las células en la región P2 (células con fluorescencia mayor a 10^4) se cuantificaron, los porcentajes de células fluorescentes en cinco condiciones de diferenciación y se graficaron (derecha).

Muestra	Eventos totales	P1	P2	% Fluorescentes en P2	Fluorescencia media de P2
DMSO	30000	9692	50	0.52	38031
RA	30000	12177	468	3.84	34431
Shh100	30000	15203	784	5.16	37490
Shh300	30000	15013	862	5.74	38505
Shh600	30000	15635	1144	7.32	42235
B5	30000	14193	3641	25.65	22114

Tabla 3. Resumen del análisis de 6 muestras (5 condiciones de cultivo y células B5).

Finalmente, se aislaron poblaciones de células GFP positivas con los mismos parámetros que se utilizaron para hacer la cuantificación. Se aislaron células de dos condiciones de cultivo (AR $2 \mu\text{M}$ + 300 ng/mL Shh y AR $2 \mu\text{M}$ + 600 ng/mL Shh). De las células tratadas con 300 ng Shh se separaron 122366 de 5006820 eventos totales (2.44%) y de las que se trataron con 600 ng 61320 de un total de 2553879 (2.40%).

Discusión

Las CTE son células pluripotenciales que pueden diferenciarse a células de endo, meso y ectodermo tanto *in vivo* como *in vitro*. En cultivo, existen condiciones establecidas para producir neuronas a partir de CTE (Bain *et al.*, 1995; Okabe *et al.*, 1996; Tropepe *et al.*, 2001). Estos protocolos consisten en retirar las condiciones que sustentan la pluripotencialidad (Boiani y Scholer, 2005) o usar actividades inductoras como el contacto célula-célula o factores inductores solubles. Por ejemplo, la adición de AR es suficiente para especificar un número mayor de CTE hacia linajes neurales (Bain *et al.*, 1995). En nuestros cultivos de CTE que se diferenciaron mediante la formación de EBs y se suplementaron con AR, detectamos la presencia de marcadores pan-neurales como la tubulina beta III, NeuN y Map2 (Fig. 23). Aunque no hicimos una cuantificación formal de las neuronas, en experimentos con condiciones similares hechos por otros grupos (Bain *et al.*, 1995), se estima que la exposición al AR podría incrementar hasta siete veces el número de células que expresan antígenos específicos de neurona.

Se ha demostrado antes, que la acción de AR es necesaria y suficiente para producir neuronas motoras en presencia de FGF, de manera independiente del Shh (Novitch *et al.*, 2001). Sin embargo, en progenitores neurales generados a partir de CTE mediante el tratamiento con AR, la cantidad de MNs se incrementa considerablemente de manera dependiente de la dosis al adicionar Shh (Fig. 34 y 37).

Inicialmente se analizó el efecto del Shh sobre la generación de MNs con tinciones contra factores de transcripción presentes en el desarrollo de las MNs como Islet1, Lim 1/2. Mediante detección con anticuerpos específicos contra estas proteínas, que posteriormente son reconocidos por anticuerpos secundarios fluorescentes, para su observación con microscopía de epifluorescencia o confocal, identificamos la presencia de ambos factores de transcripción solamente en los cultivos tratados con Shh (Fig. 24 y 25). No obstante, la expresión de Islet1 no puede utilizarse como un marcador en la identificación inequívoca de MNs. Aunque esta proteína es esencial en el desarrollo de todas las MNs (Thaler *et al.*, 2004) y su presencia persiste en todos los subtipos motoneuronales, también se expresa en otras neuronas como las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal, localizados a lo largo de la ME. Aunque también se detectó la presencia de Lim 1/2, estas proteínas

solamente se expresan en un subtipo de MN, aquellas que forman la subdivisión lateral de la columna lateral motora. Por estas razones, aunque dichos anticuerpos son útiles en una detección inicial de células que pudieran ser MNs, no se pueden emplear para la cuantificación del número de MNs producidas en nuestros cultivos. Aunado a esto, los anticuerpos disponibles contra estas proteínas se adquieren del DSHB y observamos variabilidad en la calidad de los lotes que hemos recibido. Aunque se pudieron detectar neuronas que expresan a estos factores, no fue posible repetir las tinciones un número suficiente de veces para hacer conteos.

Entonces, se buscó un método alternativo para la cuantificación de MNs empleando la expresión de la GFP bajo el control del promotor de *Hb9*, un factor de transcripción específico de MNs (Wichterle *et al.*, 2002). Esta estrategia ofrece dos ventajas principales: la cuantificación de células que expresan GFP se facilita al saber que este factor de transcripción está presente solamente en MNs postmitóticas y las células vivas que expresan GFP se pueden identificar e incluso aislar mediante técnicas de citofluorometría. Inicialmente se hicieron intentos de electroporar la línea de CTE de ratón R1 con la construcción del promotor de *Hb9* unido a la secuencia de la GFP. Desafortunadamente, no se pudo obtener una línea que haya incorporado la construcción y conservado el estado de auto renovación y pluripotencia. Existen razones por lo cual los protocolos de electroporación dieron tan pobres resultados. Una muy factible, es el hecho de que no se linearizó el plásmido con la construcción. Al no efectuar este paso las probabilidades de que la construcción se integró al genoma decaen considerablemente. Otro posible error en la metodología pudo ser que el antibiótico empleado para la selección de las células transfectadas no estaba a la concentración necesaria para causar la muerte de las células no-transfectadas; esto explicaría por qué en una electroporación no se vio una muerte considerable de las CTE.

La línea de CTE de ratón HBG3 se derivó de ratones transgénicos que tienen dicha construcción reportera de la expresión de HB9 (Wichterle *et al.*, 2002). En la cepa de animales de la cual se derivaron las CTE, se observa la presencia de la GFP con el mismo patrón de expresión que HB9. La línea HBG3 se sometió al tratamiento con AR y posteriormente a diferentes concentraciones de Shh. Después de la disociación de los EBs, se sembraron las células y se observó, utilizando microcopía de fluorescencia, que aquellas

que expresaban GFP tenían una morfología característica de neurona (Fig. 30). Por inmunotinción, también se detectaron en ellas marcadores pan neurales (Fig. 31) y factores de transcripción necesarios en el desarrollo de las MNs (Fig. 32).

Se cuantificó el efecto inductor de Shh sobre la producción de MNs de dos maneras. Primero, se estimó la proporción de células con fluorescencia verde haciendo conteos manuales de células disociadas después del protocolo de diferenciación (Fig. 34). En CTE que recibieron tratamiento únicamente con DMSO, mostraron un mínimo de MNs (alrededor de 1%); la exposición por cuatro días al AR 2 μ M tuvo un efecto positivo, estadísticamente significativo, incrementando cinco veces la cantidad de células positivas a GFP. La adición de Shh tuvo un efecto dosis-dependiente sobre la generación de MNs. A la concentración más alta de Shh, 600 ng/mL, se generó un promedio de 15% de MNs en relación a las células totales.

Un segundo método de cuantificación de células GFP positivas fue utilizando citometría de flujo. La cuantificación en el equipo FACScalibur dio resultados similares cuando se compara la cantidad de células GFP positivas generadas a partir de células tratadas con AR o DMSO (control). Se observó que alrededor de 1% de las células son positivas en ambas condiciones (Fig. 35 y Tabla 2). Sin embargo, observamos que la fluorescencia promedio detectada en las células tratadas con AR era mucho más alta que aquella en las células expuestas a DMSO; 137.5 unidades de fluorescencia arbitrarias en condición control comparadas a 235 en células tratadas con AR (Tabla 2).

En experimentos de cuantificación en otro equipo de citometría (FACSaria) se observó que el tratamiento con AR incrementó la cantidad de células positivas a GFP de 0.5 % a 3.8 % cuando se compara con el tratamiento control. En este equipo, la adición de concentraciones ascendentes de Shh en el protocolo de diferenciación tuvo un efecto positivo en la producción de MNs, reflejado en un incremento tanto en el número de células GFP-positivas como en la intensidad de fluorescencia (Fig. 37 y Tabla 3). Este resultado concuerda con los datos observados al hacer conteos manuales. Cabe mencionar que a la concentración más alta de Shh (600 ng/mL) solamente se detectaron alrededor de 7.3 % de células GFP positivas, cerca de la mitad de células contadas manualmente.

El promedio de las células positivas a GFP es mucho mayor en conteos manuales que a través de la cuantificación con equipos de citometría de flujo. Esto tal vez se explique

porque células que expresan GFP a niveles bajos, considerados positivos en conteos hechos manualmente, no se consideran positivos en los parámetros asignados al citómetro. Otra posibilidad para explicar las diferencias es que la disociación enzimática de las células pueda decrementar el nivel de expresión de GFP, ya que los conteos manuales con el microscopio se realizaron después de que las células se resembraron durante varios días después de la disociación.

Finalmente, se practicaron separaciones de células GFP positivas por FACS y las células separadas se sembraron. Se observó que todas las células en estos cultivos eran fluorescentes.

Los resultados del efecto de Shh sobre la generación de MNs indican que al elevar la dosis de este morfógeno incrementa el número de dicho tipo celular. Sin embargo, si el objetivo es generar un cultivo celular con altos porcentajes de MNs, se pueden emplear concentraciones más bajas de Shh para luego seleccionar una población de células que expresen GFP bajo el promotor de HB9 por citometría de flujo. Utilizando la línea de células HBG3 y selección por FACS (selección de células activada por fluorescencia), el cultivo consistiría exclusivamente de MNs. De esta manera, se pueden utilizar concentraciones relativamente bajas de Shh lo cual es ventajoso en el sentido de que este es un reactivo muy valioso. Adicionalmente, es posible que concentraciones muy altas de Shh induzcan la diferenciación hacia otros linajes más ventrales de la ME como son neuronas de tipo V3 o células de la placa de piso en cuyo caso el uso de alto Shh sería contraproducente en la generación de cultivos ricos en MNs. Dentro del rango de las concentraciones de Shh utilizadas en este trabajo no se observó un decremento en la generación de MNs por el efecto de este morfógeno. Este indica que la concentración más alta probada (600 ng/mL) no es suficiente para inducir la diferenciación hacia progenitores más ventrales al pMN.

Conclusión

Al retirar las condiciones que mantienen la auto-renovación y pluripotencia de las CTE murinas (medio suplementado con suero fetal bovino y LIF), éstas se diferencian espontáneamente hacia células de distintos linajes incluyendo neuronas. En la búsqueda por controlar esta diferenciación espontánea y aleatoria, hemos observado que la generación de neuronas es mayor al añadir AR al medio de cultivo. Este hecho, previamente reportado (Bain *et al.*, 1995), es indicativo de que las CTE pueden responder de manera análoga *in vitro* a señales que participan en el desarrollo del SNC. Mediante el sistema reportero del gen de la GFP bajo el promotor de HB9 observamos que el AR es suficiente para generar MNs aunque en muy bajos porcentajes (alrededor de 4 a 5% de células totales, Figs. 34 y 37).

Las CTE también son responsivas *in vitro* al Shh, otro morfógeno esencial en la diversificación de tipos celulares en el SNC. En presencia de AR, el Shh incrementa la cantidad de MNs generadas en cultivos cuantificados a través del mismo sistema reportero. Dentro del rango de concentraciones que se probaron, (100 ng/ml a 600 ng/ml) se observó un efecto dosis dependiente el cual predécimos tendrá un tope a concentraciones mayores donde las CTE se empiecen a diferenciar a tipos neuronales más ventrales.

En este trabajo se han podido generar MNs utilizando estas dos señales en dos líneas de CTE murinas (R1 y HBG3). Su identidad como MNs se corroboró en ambas líneas por inmunotinciones contra marcadores pan-neurales (NeuN, Map2 y tubulina beta III) y factores de transcripción específicos del desarrollo de dicho tipo neuronal (Islet1 y Lim1/2). Se cuantificó el número de MNs vivas utilizando el gen reportero GFP mediante dos métodos: por conteos manuales y por citometría de flujo. En ambos casos se observó que el AR es suficiente para incrementar alrededor de 5 veces el número de MNs generadas. Aunque las cantidades de MNs varían dependiendo del método empleado para cuantificar, es claro que el Shh (en presencia de AR) también estimula positivamente la generación de MNs (Figs. 29, 34 y 37). Probablemente, el aspecto más importante del uso de citometría es el hecho de que permite la separación de células fluorescentes. Se obtuvieron cultivos de MNs puras, hecho que será extremadamente útil en experimentos de trasplante a futuro.

Perspectivas

La generación de motoneuronas *in vivo* sería útil en el estudio de patologías que afectan a las MNs como la ALS. Se podrían hacer transplantes a modelos de roedores que simulan los rasgos de dicha enfermedad en diferentes estados de desarrollo embrionario e incluso en el adulto. Sería interesante estudiar si las neuronas transplantadas en el embrión se integran de manera normal y, si más adelante, durante el surgimiento de la neurodegeneración, éstas también sufrirían daño o si se mantendrían sanas e incluso puedan prevenir la patología.

Se sabe que la especificación de los distintos subtipos de MNs es controlada por la exposición a morfógenos como el FGF, retinoides y proteínas morfogénicas de hueso (Liu *et al.*, 2001). A futuro, sería interesante estudiar si *in vitro*, se pueden generar cultivos que contengan números elevados de un sólo subtipo de MNs, por ejemplo, MNs generadas a nivel torácico en donde se encuentra la columna medial motora. Estos cultivos podrían ser útiles en modelos de lesión en la ME. Se podrían practicar transplantes de dichas poblaciones enriquecidas de MNs a animales lesionados a diferentes niveles de la ME. Sería interesante estudiar primero si hay una mejor integración de la MN transplantada, si hay una especificación regional de la MNs acorde al nivel de la ME en donde se produjo la lesión. Otro experimento interesante sería el transplante de MNs especificadas *in vitro* a una región a distintos niveles de la ME. Se podría estudiar si existe una innervación correcta de las neuronas transplantadas a niveles rostro/caudales distintos o si estas MNs mantienen la programación que se les dió *in vitro* y posiblemente extiendan axones en direcciones aberrantes.

Finalmente, otro aspecto que sería interesante estudiar es el efecto del FGF en la generación de MNs *in vitro* a partir de CTE. En estudios previos, hechos en explantes del tubo neural donde se abate la señalización por Shh mediante un anticuerpo, la exposición a AR y FGF es suficiente para inducir la expresión de Olig2 inicialmente, y posteriormente determinantes de MNs como son MNR, Lim3 y Ngn2. Es posible que exista una vía de señalización independiente del Shh en la especificación de tipos neuronales ventrales del tubo neural. Esta noción se apoya en la observación que la eliminación de elementos que regulan negativamente a la vía (Litingtung y Chiang, 2000; Persson *et al.*, 2002) de

señalización Shh en modelos deficientes en este morfógeno (Chiang *et al.*, 1996) resulta en la formación relativamente normal de tipos celulares ventrales del tubo neural. Sería útil estudiar si la adición del FGF a diferentes tiempos en el protocolo de diferenciación tiene algún efecto sobre la cantidad de MNs generadas y establecer si *in vitro* se pueden generar MNs en ausencia de Shh.

Apéndice

Preparación de Medios de cultivo

Medio Knock-Out ES

Knock-DMEM (Gibco)	500 mL
Suero fetal Bovino (Wisent)	75 mL
Solución de amino ácidos no esenciales (Gibco)	5 mL
Penicilina-estreptomicina (Gibco)	5 mL
2-mercaptoetanol	500 µL
L-Glutamina (Gibco)	5 mL

Medio Knock-Out ES con reemplazo de suero

Igual que medio knock out con la sustitución de la misma cantidad de suero fetal bovino con reemplazo de suero (Gibco).

Medio DMEM +10% suero (para cultivo de fibroblastos)

Medio de diferenciación DNFK

DMEM (Gibco)	125 mL
F12 (Gibco)	125 mL
Medio Neurobasal (Gibco)	250 mL
Penicilina- estreptomicina (Gibco)	5 mL
200mM L-Glutamina (Gibco)	3.75 mL
2-mercaptoetanol	360 µL
Reemplazo de suero knock out (Gibco)	56 mL

Preparación de soluciones para disociación con papaina

Earlé's balanced Salt Solution (EBBS), cantidades para preparar 100 mL

Cloruro de Sodio	680 mg
------------------	--------

Cloruro de Potasio	40 mg
Fosfato de sodio monobásico	14 mg
D-glucosa	100 mg
Sulfato de magnesio	18 mg
Cloruro de Calcio	19 mg
Rojo fenol	1 mg
Bicarbonato de sodio	220 mg

Solución de DNAsa (2000 U/mL) en EBSS

Solucion de Papaina

L-cisteina	1 mM
EDTA	0.5 mM
Papaina	121 mg/L
Todo en EBSS	

Referencias

- Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S (1999) Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* **23**:659-674.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* **168**:342-357.
- Beaulieu JM, Nguyen MD, Julien JP (1999) Late onset of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin. *J Cell Biol* **147**:531-544.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**:517-530.
- Boiani M, Scholer HR (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:872-884.
- Briscoe J, Ericson J (2001) Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* **11**:43-49.
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**:407-413.
- Cleveland DW, Rothstein JD (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* **2**:806-819.
- Dasen JS, Liu JP, Jessell TM (2003) Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature* **425**:926-933.
- Dawid IB, Chitnis AB (2001) Lim homeobox genes and the CNS: a close relationship. *Neuron* **30**:301-303.
- Donovan PJ, Gearhart J (2001) The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* **414**:92-97.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* **287**:1433-1438.
- Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G, Vescovi AL (2000) Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* **3**:986-991.
- Garbuzova-Davis S, Willing AE, Milliken M, Saporta S, Zigova T, Cahill DW, Sanberg PR (2002) Positive effect of transplantation of hNT neurons (NTera 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* **174**:169-180.
- Gilbert SF (2003) Developmental biology: 7th edition. Sinauer Associates, Inc.
- Gurney ME (1994) Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* **331**:1721-1722.
- Harper JM, Krishnan C, Darman JS, Deshpande DM, Peck S, Shats I, Backovic S, Rothstein JD, Kerr DA (2004) Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:7123-7128.
- Heath JK, Smith AG, Hsu LW, Rathjen PD (1990) Growth and differentiation factors of pluripotential stem cells. *J Cell Sci Suppl* **13**:75-85.
- Hofstetter CP, Holmstrom NA, Lilja JA, Schweinhardt P, Hao J, Spenger C, Wiesenfeld-Hallin Z, Kurpad SN, Frisen J, Olson L (2005) Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* **8**:346-353.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD (2002) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:1604-1609.
- Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S, Yamasaki M, Momoshima S, Ishii H, Ando K, Tanioka Y, Tamaoki N, Nomura T, Toyama Y, Okano H (2005) Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* **80**:182-190.
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**:20-29.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**:41-49.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) Principles of Neural Science: 4th edition. McGraw-Hill Medical.

- Kerr DA, Llado J, Shablott MJ, Maragakis NJ, Irani DN, Crawford TO, Krishnan C, Dike S, Gearhart JD, Rothstein JD (2003) Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J Neurosci* **23**:5131-5140.
- 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.
- Kirschstein R y Skirboll LR (2001) Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. National Institutes of Health. Report prepared by the National Institutes of Health.
- Lee SK, Pfaff SL (2001) Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* **4 Suppl**:1183-1191.
- Lee SK, Pfaff SL (2003) Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* **38**:731-745.
- Lee SK, Lee B, Ruiz EC, Pfaff SL (2005) Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes Dev* **19**:282-294.
- Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, Zhang SC (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **23**:215-221.
- Litingtung Y, Chiang C (2000) Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci* **3**:979-985.
- Liu JP, Laufer E, Jessell TM (2001) Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* **32**:997-1012.
- Llado J, Haenggeli C, Maragakis NJ, Snyder EY, Rothstein JD (2004) Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci* **27**:322-331.
- Maden M (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* **3**:843-853.
- Majoor-Krakauer D, Willems PJ, Hofman A (2003) Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Genet* **63**:83-101.
- 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.
- McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW (1999) Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* **5**:1410-1412.
- Miles GB, Yohn DC, Wichterle H, Jessell TM, Rafuse VF, Brownstone RM (2004) Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. *J Neurosci* **24**:7848-7858.
- Novitsch BG, Chen AI, Jessell TM (2001) Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* **31**:773-789.
- 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.
- Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudénbach V, Vermeylen P, Raat H, Acker T, Vlemminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* **28**:131-138.
- Park HC, Appel B (2003) Delta-Notch signaling regulates oligodendrocyte specification. *Development* **130**:3747-3755.
- Persson M, Stamatakis D, te Welscher P, Andersson E, Bose J, Ruther U, Ericson J, Briscoe J (2002) Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes Dev* **16**:2865-2878.
- Roy NS, Nakano T, Keyoung HM, Windrem M, Rashbaum WK, Alonso ML, Kang J, Peng W, Carpenter MK, Lin J, Nedergaard M, Goldman SA (2004) Telomerase immortalization of neuronally restricted progenitor cells derived from the human fetal spinal cord. *Nat Biotechnol* **22**:297-305.
- Ruiz i Altaba A, Nguyen V, Palma V (2003) The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code. *Curr Opin Genet Dev* **13**:513-521.

- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* **10**:55-63.
- Smith AG (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:435-462.
- Stevens LC (1967) The biology of teratomas. *Adv Morphog* **6**:1-31.
- Streit A, Berliner AJ, Papanayotou C, Sirulnik A, Stern CD (2000) Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* **406**:74-78.
- Tanabe Y, William C, Jessell TM (1998) Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* **95**:67-80.
- Teng YD, Lavik EB, Qu X, Park KI, Ourednik J, Zurakowski D, Langer R, Snyder EY (2002) Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3024-3029.
- Thaler JP, Koo SJ, Kania A, Lettieri K, Andrews S, Cox C, Jessell TM, Pfaff SL (2004) A postmitotic role for Isl-class LIM homeodomain proteins in the assignment of visceral spinal motor neuron identity. *Neuron* **41**:337-350.
- Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D (2001) Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* **30**:65-78.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* **110**:385-397.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**:684-687.
- Wilson L, Maden M (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* **282**:1-13.