



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Ciencias

**“PREPARACIÓN DE RETROVIRUS QUE CONTIENEN LA
FORMA ACTIVA DE NOTCH PARA INFECCIÓN DE
CÉLULAS MADRE NEURALES DE LA CORTEZA
CEREBRAL DE RATA.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
NIDIA SAMARA RODRÍGUEZ RIVERA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Tutor: Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez

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.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado
"Preparación de retrovirus que contienen la forma activa de Notch para la
infección de células madre neurales de la corteza cerebral de rata."
realizado por Nidia Samara Rodriguez Rivera

con número de cuenta 401014752 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio:

- Tutor Propietario Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez
- Propietario Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
- Propietario Dra. Diana Maria Escalante Alcalde
- Suplente Dr. Jesús Chimal Monroy
- Suplente M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera

Handwritten signatures and initials:
Velasco
Roque
Escalante
Chimal
Vilchis

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 04 de Abril del 2006
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE Biología

Handwritten signature of Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Iván Velasco Velázquez, en el departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, apoyado por el donativo PAPIIT IN 226703 de la DGAPA, UNAM.

Quiero dar las gracias mis sinodales: Dr. Iván Velasco, Dr. Julio Morán Andrade, Dra. Diana Escalante Alcalde, Dr. Jesús Chimal Monroy y M. en C. Alfonso Vilchis Peluyera, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Se agradece también a la Dra. Anayansi Molina Hernández por toda la ayuda y apoyo técnico brindado.

Más agradecimientos...

A todos los miembros del laboratorio AL-101. Nuevamente a Iván y Anayansi por todo el apoyo, en todos los aspectos, la orientación y tiempo dedicado. Espero seguir aprendiendo y compartiendo con ustedes mucho más. Erika, gracias por tu amistad y consejos, también una felicitación y un deseo, siempre estaremos ahí para celebrar los logros de la vida. Philip, gracias por todos los buenos momentos. Emmanuel, Fabián, Raquel y Rodrigo, gracias por hacer del tiempo de trabajo un tiempo agradable. Gracias a todos porque somos un buen equipo en el que es posible aprender y compartir gratos momentos.

A mi madre y a mi padre, gracias por estar siempre ahí cada uno a su modo. A mi hermana y hermano, los quiero mucho. A TODOS mis primos, en especial a Yunuen y al “aquelarre”: Dalia, Dulce, Itzel, Sandra y Citlalli, mis mejores primas-amigas, cualquier familia que se preste de ser una buena familia necesita un Biólogo en ella ¿no? ... bueno también ingenieros y otras cosas =).

A mis mejores amigas: Rosalba, Haydeé, Berenice, Mariana, Sonia y Elia. Soy afortunada al contar con ustedes chicas, gracias por estar siempre ahí.

A todas las personas que directa o indirectamente han estado y seguirán estando ahí en cada paso que doy en mi vida, gracias.

Resumen

El uso de vectores para la sobre-expresión de genes es una herramienta muy importante para estudios de análisis genético. Los vectores derivados de retrovirus como el virus de la Leucemia Murina de Moloney son de suma utilidad en estudios a largo plazo en células madre, debido a que son capaces de integrar su información genética a la del hospedero de una manera dependiente de la división celular. Las células madre (CM) poseen la capacidad de autorenovarse y generar nuevos tipos celulares especializados. De acuerdo con su capacidad de diferenciación y la fase en el desarrollo de la cual se obtengan a las CM se las puede clasificar como pluripotenciales o multipotenciales. Las CM que pueden diferenciarse a tipos celulares neurales pueden ser de ambos tipos. En esta tesis utilizamos a las células madre neurales que se encuentran presentes durante el desarrollo embrionario/fetal del organismo y que son multipotenciales. Durante la formación del Sistema Nervioso Central, se ha observado que los progenitores neurales generan primero neuronas y posteriormente glia. Se han caracterizado diferentes moléculas y vías de transducción que están involucradas en el destino de las células madre neurales. Notch es una proteína transmembranal que actúa como receptor y cuando su porción intracelular es liberada y translocada al núcleo, actúa como factor transcripcional. En células madre neurales se ha reportado que esta proteína se encuentra involucrada en el mantenimiento del estado indiferenciado y también en la diferenciación hacia destinos astrocíticos. Al sobre-expresar el fragmento intracelular activo de la proteína Notch1, mediante la transducción de células madre neurales con vectores retrovirales que contenían al fragmento fusionado a la proteína verde fluorescente como gen reportero, observamos que se promueve la diferenciación de estas células hacia astrocitos. Esta diferenciación preferencial no se observó en células infectadas con los virus que contenían sólo a la proteína verde fluorescente, por lo que se estableció una relación directa entre la activación de Notch y la diferenciación astrocítica.

Índice

	Pág.
Introducción	9
- Formas de transmisión de la información genética	9
- Retrovirus y vectores retrovirales.....	11
Vectores retrovirales.....	15
Vectores retrovirales derivados del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV).....	18
- Células madre.....	19
Células madre con potencial neurogénico.....	21
- La proteína Notch.....	26
La vía de señalización de Notch.....	27
Notch en el desarrollo del sistema nervioso central de mamíferos.....	28
Justificación	32
Planteamiento del problema	32
Objetivo	33
Objetivos particulares	33
Metodología	34
- Preparación de lotes retrovirales que expresen a la proteína verde fluorescente (GFP) y GFP con el fragmento intracelular de Notch1.....	35
Manipulación de vectores retrovirales derivados del MoMLV.....	36
Transformación de los plásmidos pGIA, pGNIA y pVSV-G en bacterias <i>E. coli</i> competentes.....	36

Amplificación y purificación de los plásmidos pGIA, pGNIA y pVSV-G.....	37
Cultivo, expansión, cuantificación y criopreservación de fibroblastos GP-293.....	40
Transfección de células GP-293 para la preparación de los lotes retrovirales.....	41
Cultivo, expansión, cuantificación y criopreservación de fibroblastos NIH 3T3.....	43
Preparación de vectores retrovirales que expresan al gen de la luciferasa.....	43
Transducción de fibroblastos NIH 3T3 con GLuc.....	45
Ensayo de Luciferasa: cuantificación de bioluminiscencia en lisados de fibroblastos NIH 3T3 infectados con GLuc.....	45
Determinación de la concentración de proteína en lisados de fibroblastos NIH 3T3 infectados con GLuc.....	46
Titulación de los vectores GIA y GNIA.....	48
- Cultivos primarios de CMN de corteza cerebral de rata E14.....	51
Disección de células de corteza de rata del día embrionario 14 (E14).....	51
Cultivo primario de células de corteza de rata E14.....	52
Pasaje de cultivos primarios de CMN de corteza cerebral de rata (E14).....	54
- Transducción de CMN de corteza cerebral de rata E14 con los vectores GIA y GNIA.....	55
- Inmunofluorescencia de las CMN en cultivos control y transducidas con los vectores GIA y GNIA.....	57
Cuantificación de los tipos celulares obtenidos y análisis estadístico.....	59

Resultados	60
- Se prepararon tres lotes diferentes de vectores retrovirales.....	60
- Las partículas virales fueron ensambladas y transducidas correctamente, no obstante la concentración por ultracentrifugación no fue eficiente	60
- Al concentrar a los virus GIA y GNIA obtuvimos un título mayor que los virus en sobrenadante, pero menor a lo reportado para estos vectores.....	61
- El patrón de expresión de la GFP en las células transducidas con el vector GNIA difiere del de las células transducidas con GIA.....	63
- Las CMN en condiciones de proliferación expresan mayoritariamente nestina y al ser tratadas con LIF se diferencian a astrocitos.....	63
- En condiciones de diferenciación, las CMN que sobre expresan al fragmento activo de Notch1 se diferencian preferentemente hacia astrocitos.....	71
Discusión	76
Conclusión	82
Perspectivas	83
Referencias	84
Índice de figuras y Tablas	89
Apéndice 1: símbolos y abreviaturas	92
Apéndice 2: soluciones y reactivos	95

Introducción

Formas de transmisión de la información genética

El flujo tradicional de la información genética se explica como la transferencia de esta información de los progenitores a su descendencia; no obstante, existen en la naturaleza mecanismos alternativos para esta transmisión, que pueden ser intra- e Inter-especies. Estos mecanismos no sólo son de suma importancia durante los procesos adaptativos y evolutivos de las especies que los practican, sino que también se han convertido en instrumentos útiles para el estudio celular y molecular de los organismos.

La transferencia de material genético de una bacteria a otra se describió por primera vez en la década de los 40, esta se realizaba mediante apéndices extracelulares llamados pilis, a través de los cuales se pasaban, de una célula a otra, pequeñas moléculas circulares de ADN de doble cadena llamados plásmidos, presentes en el citoplasma de las bacterias y con capacidad de replicación autónoma (Adelberg y Pittard, 1965). Estos plásmidos son los responsables de conferir a las bacterias que los portaban características como resistencia a antibióticos, metales pesados y otros patógenos.

Durante la década de los 70, se comenzó a explorar esta capacidad de almacenaje y transferencia de información de los plásmidos, característica que permitió que fueran utilizados como herramientas genéticas a las que llamamos vectores de clonación (Geoghegan, 2002).

La mayor parte de los vectores utilizados en la actualidad en biología molecular han sido modificados con el propósito de incorporar características que sean ventajosas dependiendo el tipo de trabajo para el que se les utilice, por ejemplo: incorporando secuencias reporteras que permitan detectar la presencia del vector, o seleccionar

directamente las células que lo contienen, detectar la presencia de algún gen insertado en el vector o conducir la expresión de algún gen o genes bajo diferentes contextos (Clark, 2005).

En la actualidad los plásmidos bacterianos son los vectores más utilizados, ya que pueden introducir secuencias de hasta 10 Kb y son fáciles de reproducir y aislar. Sin embargo, en algunas ocasiones cuando se necesita clonar grandes fragmentos de DNA es posible utilizar otro tipo de vectores, como por ejemplo: vectores derivados de bacteriófagos, vectores quiméricos como los cósmidos o incluso cromosomas completos.

Muchos virus son utilizados también como vectores, especialmente cuando se trabaja con eucariontes superiores. Dentro de los tipos de vectores virales utilizados se encuentran dos tipos principales: vectores adenovirales y vectores retrovirales (VR), cuya mayor diferencia radica, en el tipo de información genética que contienen, ADN o ARN respectivamente.

Los vectores adenovirales se derivan de los adenovirus, los cuales conforman una amplia familia de virus de cápside icosaédrica que atacan a las células animales. Los diámetros de sus viriones son cercanos a 75 nm y algunos de ellos pueden presentar adicionalmente una membrana. Los adenovirus poseen ADN de cadena lineal que puede ser sencilla o doble (Murphy *et al.*, 1994), el cual introducen a la célula que infectan por endocitosis o fusión membranal. Una vez dentro, el ADN utiliza directamente la maquinaria celular para realizar su ciclo en la célula hospedera: replicar, transcribir y traducir su material genético, para la producción de nuevos viriones (Coffin *et al.*, 1997).

Los adenovirus son capaces de infectar células quiescentes y en división. Es importante mencionar que, a pesar de que el ADN de estos virus se vale de la célula infectada para duplicarse, su material genético no se integra al del hospedero.

En los vectores adenovirales, el genoma del virión es modificado para contener secuencias codificantes de interés que pueden no sólo ser introducidas en las células infectadas, sino expresarse en ellas. Estos vectores son por lo tanto de gran utilidad para el

conocimiento de las funciones de determinadas secuencias o genes expresados bajo diferentes contextos celulares o bien del funcionamiento de diversas proteínas.

De manera similar, los vectores retrovirales (VR) son derivados a partir de otro tipo de virus, los retrovirus. Estos también pueden ser utilizados para introducir y expresar genes de interés dentro de células eucariontes. Sin embargo, presentan características distintivas que los hacen particularmente especiales y que permiten utilizarlos en estudios de expresión a largo plazo con células madre (CM). Ya que este trabajo pretende servir como base para el estudio de la expresión de una proteína activa en CM, este tipo de vectores serán revisados con mayor detalle a continuación.

Retrovirus y vectores retrovirales.

Los retrovirus comprenden una larga y diversa familia de virus encapsulados de ARN que se pueden clasificar en cuanto a su estructura, función y propiedades replicativas (Coffin, 1992). A las partículas infectivas ensambladas se les denomina viriones, los cuales pueden tener de entre 80 a 100 nm de diámetro, presentan un genoma diploide con longitud de 7 a 12 kb de ARN lineal de polaridad positiva. Además poseen una cápside protéica y una doble membrana de origen celular conocida como envoltura viral.

La característica más importante de esta familia es su estrategia replicativa, cuyo paso esencial es la transcripción reversa del ARN del virión a ADN lineal de doble cadena y su posterior integración al genoma de la célula infectada.

Su clasificación taxonómica los ubica en la familia *Retroviridae* en la cual se distinguen siete géneros agrupados en tres categorías basadas en sus relaciones evolutivas. Cinco de estos géneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus* y *Epsilonretrovirus*, corresponden a retrovirus con potencial oncogénico, más comúnmente conocidos como oncovirus. La segunda categoría corresponde al género *Lentivirus*, virus

que matan o causan pérdida de función en células o tejidos específicos, uno de los representantes de este género es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La tercera y última categoría contiene al género *Spumavirus*, del cual se sabe poco ya que, aunque no producen alguna enfermedad conocida, infectan a mamíferos incluido el hombre (Coffin *et al.*, 1997; Pringle, 1999). Existe poca conservación a nivel de secuencias entre los diferentes géneros (Pages y Bru, 2004).

Una forma más general de clasificación de los retrovirus de acuerdo a la organización de su genoma los agrupa en simples y complejos: los retrovirus simples contienen sólo las secuencias que codifican para la formación de la partícula infectiva, la retrotranscripción e integración de su genoma. Prácticamente todos los oncovirus, excepto el virus humano de las células T/virus de la leucemia bovina (HTLV-BLV), pertenecen a este grupo; por otro lado, los retrovirus complejos poseen además otras secuencias regulatorias más sofisticadas en su genoma, codificadas por procesamiento alternativo. Los lentivirus y los espumavirus entran en esta clasificación (Murphy *et al.*, 1994; Coffin *et al.*, 1997).

La definición canónica de los retrovirus se centra en las características presentes en los retrovirus simples. En este caso, dentro de los componentes básicos del genoma retroviral podemos distinguir dos tipos de secuencias: las secuencias que actúan en *trans*, que básicamente codifican para todos los componentes necesarios para integrar a la partícula infectiva y las secuencias en *cis*, que son las encargadas de la retrotranscripción, de la integración del genoma retroviral en la célula hospedera y el empaquetamiento de los viriones. Estas secuencias se encuentran en tres dominios o marcos de lectura abierta mayores llamados *Gag*, *Pol* y *Env* (Fig. 1A).

El dominio *Gag* dirige la síntesis de las proteínas internas estructurales del virión: matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC; Fig. 1B), componentes que son comunes a todos los retrovirus y se originan de una poliproteína precursora que sufre modificaciones

postraduccionales. Estas proteínas determinan el tamaño del virión y su morfología (Ako-Adjei *et al.*, 2005).

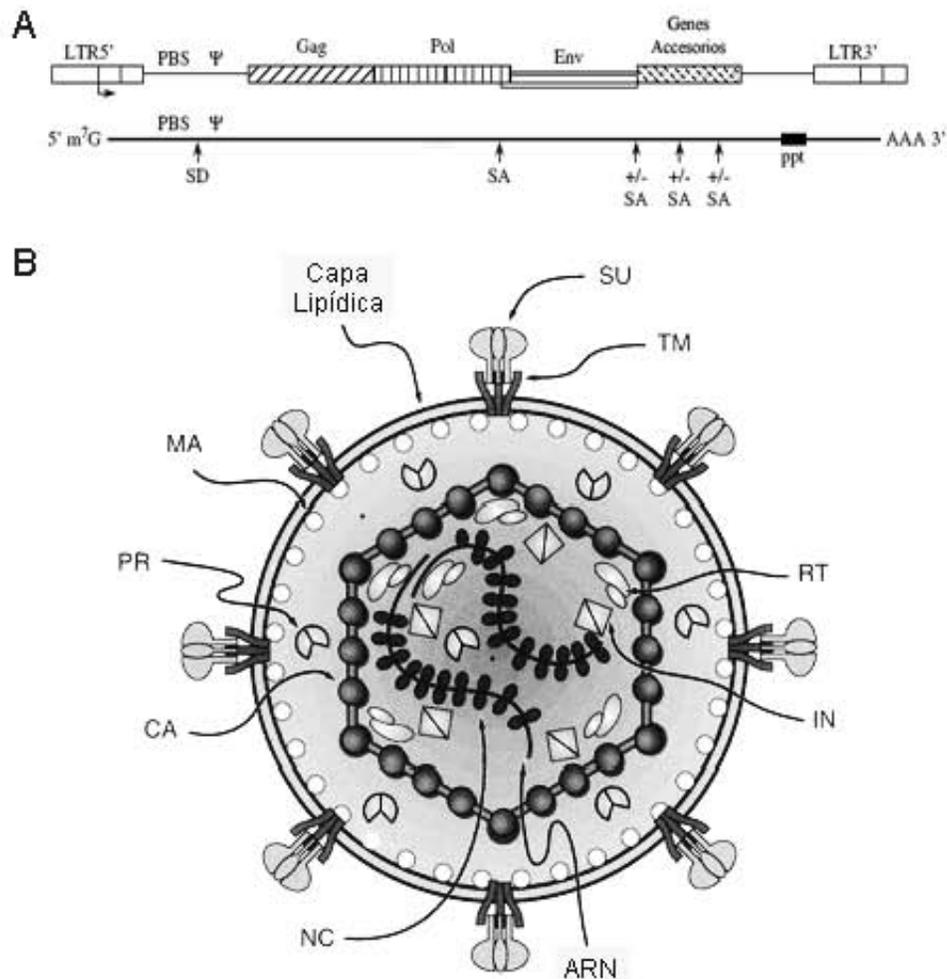


Fig. 1. Características generales de los retrovirus. A) Principales componentes del genoma retroviral y secuencias del ARN. LTR: secuencias repetitivas terminales largas; PBS: sitio de unión al promotor; ψ : señal de empaquetamiento; ppt: caset de polipurina; SD: donador de procesamiento alternativo; SA: aceptor de procesamiento alternativo; algunos genes accesorios pueden observarse en el extremo 3' y pueden sobreponerse a la secuencia U3 (ver texto; Modificada de Pages y Bru, 2004). **B)** Representación esquemática de una partícula retroviral. La envoltura viral está formada por una bicapa lipídica de origen celular en donde se insertan las proteínas TM (transmembranal) y SU (superficie), codificadas por el dominio *Env*; Las proteínas MA (matriz), CA (cápside) y NC (nucleocápside) son codificadas por el dominio *Gag*; RT (retrotranscriptasa) e IN (integrasa), son codificadas por el dominio *Pol*. PR (proteasa) es codificada por el dominio *Pro* que se ubica entre *Gag* y *Pol*. (Modificado de Coffin *et al.*, 1997).

El dominio *Pol* codifica a la proteína transcriptasa reversa (RT) y para la integrasa (IN; Fig. 1B), que es la encargada de la integración del genoma retroviral en el de la célula hospedera. Adicionalmente se ha propuesto que esta proteína pudiera estar involucrada en la retrotranscripción del ARN del virus (Peng *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 2001). Las proteínas generadas por el dominio *Pol* se producen como proteínas de fusión con las del dominio *Gag*, la proporción *Gag-Pol* contra *Gag* es importante en la modulación de la capacidad infectiva de los viriones (Paulus *et al.*, 2004).

Por último, el dominio *Env* codifica para dos glicoproteínas membranales: la de superficie (SU) y la transmembranal (TM), que se encuentran unidas mediante enlaces disulfuro o interacciones no covalentes (Coffin *et al.*, 1997) y ancladas a la membrana de origen celular formando trímeros (Fig. 1B). Estas proteínas son cruciales para la fusión de la membrana viral con la de la célula objetivo (Ou y Silver, 2005).

Adicionalmente, en los retrovirus se presenta un pequeño dominio llamado *Pro* que codifica para una proteasa que está involucrada en el procesamiento del precursor de *Gag* y que es esencial para la liberación de las partículas infectivas (Pettit *et al.*, 2005).

Otra secuencia en *cis* que es determinante para la retrotranscripción del genoma retroviral es el casete de polipurina (ppt), una secuencia rica en purina ubicada en el extremo 3' de *Env* (Fig. 1A) que dirige la síntesis de la segunda hebra de DNA (Pages y Bru, 2004).

A cada extremo del genoma de ARN encontramos dos secuencias repetitivas (R) que permiten a la RT saltar de un extremo a otro de la hebra de ARN durante la retrotranscripción. Estas secuencias contienen también señales de poliadenilación y lo cual determina la longitud del ARN viral (Pages y Bru, 2004).

Otras secuencias en *cis* que son necesarias para la expresión durante la etapa de provirus (etapa en la que el genoma retroviral ha sido retrotranscrito y se encuentra libre dentro de la célula infectada) son U3 y U5 ubicadas en los extremos 3' y 5' respectivamente, las cuales dirigen la transcripción de los genes retrovirales y el reconocimiento de las

secuencias R de poliadenilación. En estas regiones se encuentran también un par de secuencias repetitivas terminales largas (LTR's) que actúan como promotores de la transcripción del genoma retroviral (Coffin *et al.*, 1997).

Por último, la señal de empaquetamiento (ψ), la cual es codificada por empalme alternativo de las proteínas virales, es la encargada de reclutar ARN mensajeros (ARNm) virales para ser empaquetados en las partículas virales previamente formadas. Cabe notar que en ocasiones pequeñas moléculas de origen celular son empaquetadas también en la partícula infectiva (Pages y Bru, 2004).

Vectores retrovirales:

La expresión a largo plazo de un transgen a través de su integración al DNA de la célula hospedera es la característica más importante que presentan los VR (Pages y Bru, 2004). Los vectores derivados de virus son en general indistinguibles de sus virus progenitores; no obstante, presentan modificaciones importantes en cuanto a la organización de sus genomas.

Cuando se utilizan VR con capacidad duplicativa, es decir que son capaces de generar nuevas partículas infectivas después de introducir su material genético a una célula hospedera decimos que el virus infecta dicha célula, no obstante existen VR a los que se ha quitado esta capacidad de duplicación mediante el diseño del vector, para diferenciar a estos dos tipos de vector se utiliza el término transducción para referirse a la introducción del genoma del virión a la célula hospedera (Coffin *et al.*, 1997).

Los dominios *Gag*, *Pol* y *Env* son esenciales para la formación de la partícula infectiva y deben estar presentes en el vector. Sin embargo para evitar la creación de virus con capacidad replicativa, estos componentes suelen encontrarse en diferentes unidades transcripcionales. Esto disminuye la probabilidad de recombinación homóloga. Ya que proteínas del dominio *Pol* se traducen utilizando el ARNm de *Gag*, estos dos dominios se

construyen en una misma unidad transcripcional y *Env* en una unidad separada. Con ésto también se obtiene la ventaja de la libre elección del promotor para dirigir su expresión.

Las proteínas codificadas por *Env* son las que determinan la especificidad del virus o vector derivado, con base en esto se ha probado que la incorporación de envolturas heterotrópicas en los VR permite una mayor adaptación de estas proteínas al tipo celular objetivo. Por ejemplo, vectores derivados del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) o HIV han sido modificados utilizando cubiertas de otros retrovirus como el virus de la leucemia del mono gibón (GaLV) o proteínas de otros virus encapsulados como la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), la proteína HA del virus de la gripe o incluso la cubierta del virus ébola (Arai *et al.*, 1998; Wool-Lewis y Bates, 1998; Russell y Cosset, 1999).

Los VR pueden generarse a partir de células transfectadas transitoriamente con plásmidos que contienen todas las secuencias codificantes necesarias para la producción de una partícula retroviral recombinante. En este sistema las células se adaptan rápidamente al transgen pero el título es variable, entendiéndose como título a la cantidad de partículas infectivas por volumen de sobrenadante (Yang *et al.*, 1999). También es posible generar líneas celulares productoras estables que actúan como empaquetadoras integrando establemente los dominios de *Gal-Pol* y *Env* en dichas células (Vanin *et al.*, 1997). En ambos casos las partículas infectivas son liberadas al medio de cultivo celular y ahí son recuperadas. En ausencia de un vector recombinante que contenga la señal de empaquetamiento ψ , las partículas pueden incorporar cualquier ARNm abundante en las células y se consideran vacías (Muriaux *et al.*, 2001).

El sistema de células empaquetadoras utilizado tiene una gran influencia en el título de las partículas que se obtengan. En la elección de las líneas a utilizar deben tomarse en cuenta la ausencia de patógenos y una baja tasa de recombinación homóloga, debido a que

secuencias retrovirales endógenas pueden llegar a competir por el empaquetamiento con la secuencia de interés (Patience *et al.*, 1998).

El tamaño del transgen parece no ser una limitante en el empaquetamiento. Se ha observado que es posible empaquetar fragmentos de hasta 20 kb en VR derivados de MoMLV aunque, con muy baja eficiencia en la transcripción reversa (Shin *et al.*, 2000). En términos generales, se acepta un promedio de 6 a 8 kb en la longitud máxima del transgen para la mayoría de los VR (Coffin *et al.*, 1997). El transgen se clona generalmente en lugar de las secuencias codificantes del retrovirus entre ψ y ppt (Fig. 2).

Para su expresión los transgenes pueden utilizar el promotor LTR propio del retrovirus. Esta es una de las estrategias más sencillas. Sin embargo, este promotor es más susceptible de silenciamiento pues al no controlarse el sitio de inserción, la expresión del transgen depende del contexto de la cromatina. La selección de una secuencia LTR adaptada a la célula objetivo puede disminuir este problema (Ketteler *et al.*, 2002).

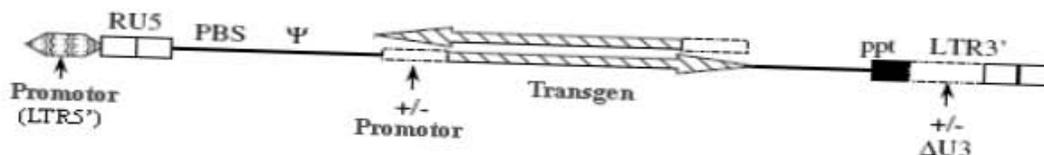


Fig. 2. Estructura básica de un vector retroviral. Dentro del retrovirus recombinante el ARN genómico es transcrito utilizando las secuencias U5 en 5' (LTR 5') o un promotor heterólogo. Algunas estructuras opcionales pueden ser: un promotor interno y la eliminación de las secuencias transcripcionales en la región 3' LTR. El transgen puede ser clonado en cualquier orientación. LTR's: secuencias terminales largas; RU5: secuencia terminal del extremo 5'; Δ U3: secuencia terminal del extremo 3'; PBS: sitio de unión al promotor; ψ : señal de empaquetamiento; ppt: caset de polipurina. (Modificada de Pages y Bru, 2004).

Otra aproximación es el uso de un promotor interno para el transgen que asegure la transcripción de éste en la célula objetivo (Fig. 2). El uso de promotores tejido-específicos para la célula objetivo aumenta en gran medida la capacidad de expresión del transgen y reduce el silenciamiento. En estos casos se elimina también la secuencia U3 en 3'. Este tipo de vectores son capaces de ensamblarse y/o integrarse en un tipo celular diferente del

destino sin presentar expresión de la proteína del transgen y se les llama autoinactivantes. (Pages y Bru, 2004).

Los VR más utilizados son derivados de oncovirus y lentivirus. La principal característica distintiva entre estos dos tipos de vectores es el tipo de células que pueden transducir. Los vectores lentivirales pueden transducir células en cualquier fase del ciclo celular mientras que los oncovirales sólo lo hacen en células en fase de división celular, esto puede representar una desventaja al limitar el rango de acción de los vectores oncovirales. Actualmente existen también VR híbridos que incorporan características de ambos tipos e incluso de otros virus encapsulados, como se mencionó anteriormente en el caso de las proteínas de la cápside viral o secuencias de importación nuclear. El tipo de vector a utilizar depende tanto del tipo celular objetivo como del tipo de análisis que se quiera realizar.

Vectores retrovirales derivados del MoMLV.

El MoMLV es un oncovirus del género *Gammaretrovirus* (Pringle, 1999), fue descrito en 1960 por J. B. Moloney y fue el primer genoma retroviral secuenciado en su totalidad (Shinnick *et al.*, 1981). Los VR derivados de este virus se encuentran dentro de los más utilizados para la transferencia génica en células de mamíferos e incluso para terapias genéticas a nivel clínico (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). Como el resto de los oncovirus, éste no es capaz de infectar a células quiescentes (Yang *et al.*, 1995; Andreadis *et al.*, 1997), y para que se pueda llevar a cabo la integración del DNA viral es necesario que la célula objetivo pase por la fase mitótica. Esto se atribuye a la necesidad de la ruptura de la membrana nuclear para que el provirus pueda alcanzar la cromatina (Roe *et al.*, 1993). No obstante, esta característica hace a los VR derivados del MoMLV una herramienta útil para la transferencia génica en células con un ciclo celular activo, tal es el caso de las células madre (CM).

Una característica importante que se ha incorporado a los vectores derivados de este tipo es la sustitución de las proteínas codificadas por *Env* silvestre, por la VSV-G. La producción de los VR encapsulados con esta proteína permite concentrar a las partículas infectivas por ultracentrifugación y por lo tanto, elevar los títulos obtenidos (Yang *et al.*, 1995).

Células madre.

Las CM poseen la capacidad de auto renovarse, es decir, dividirse para generar más CM con las mismas características que su progenitora mediante división simétrica, además de generar o diferenciarse en nuevos tipos celulares especializados (Donovan y Gearhart, 2001). La diferenciación de las CM puede darse tanto por división simétrica como asimétrica, en el primer caso la célula se divide y da origen a dos células hijas diferentes a la progenitora pero iguales entre sí, en el segundo la división genera dos células hijas diferentes entre sí una de las cuales conserva las características de CM.

De acuerdo al tipo de células a que pueden dar lugar, existen diferentes tipos de CM. Esto depende en gran medida de su localización y del estado del desarrollo de los organismos en que se encuentren.

Las CM aisladas de etapas más tempranas en el desarrollo tienen un mayor potencial de diferenciación, es decir, pueden generar más tipos celulares que las CM aisladas de estadios más tardíos. Con relación a esto, podemos clasificar a las CM como totipotenciales, pluripotenciales o multipotenciales.

Una CM totipotencial es aquella que es capaz de generar ella sola a todos los tipos celulares embrionarios y extraembrionarios que constituyen a un organismo. El cigoto, es decir la célula resultante de la unión de un óvulo con un espermatozoide, es la única célula que cumple con esta definición y por tanto la única CM totipotencial.

Las CM pluripotenciales son capaces de generar todos los tipos celulares constituyentes de un organismo, primordialmente células de las tres capas germinales primarias: endodermo, mesodermo y ectodermo, pero no estructuras extraembrionarias. Dentro de esta clasificación encontramos a las células madre embrionarias (CME) que son derivadas de la masa celular interna del blastocisto, el cual es considerado como el último estadio del desarrollo embrionario antes de la implantación (Evans y Kaufman, 1981; Fig. 3), a las células madre embrionarias germinales (CMEG) que se derivan de las células germinales primordiales que son las células precursoras de los gametos durante el desarrollo embrionario (Matsui *et al.*, 1992; Fig. 3) y a las células madre de carcinoma embrionario (CMCE) aisladas de teratocarcinomas (Andrews, 1998; Fig. 3), que son tumores gonadales que se generan en ovarios a partir de células precursoras llamadas ovocitos que se activan partenogénicamente ó mayoritariamente en testículos a partir de los precursores llamados gonocitos con características anormales (Andrews, 2002). Las CM pluripotenciales tienen muchos atributos en común, son cultivadas para su proliferación sobre una monocapa de fibroblastos mitoticamente inactivados llamadas células alimentadoras o en presencia del Factor inhibidor de la leucemia (LIF) sobre sustratos como gelatina, son morfológicamente muy similares en estas condiciones y algunos de los marcadores clásicos de estas células incluyen a la enzima fosfatasa alcalina, el factor de transcripción Oct-4 y una alta actividad de telomerasa (Donovan y Gearhart, 2001).

Las CM multipotenciales, se encuentran más restringidas en cuanto al número de tipos celulares que pueden generar. Corresponden a progenitores específicos de cada tejido que pueden generar por lo menos un tipo celular diferenciado. Un ejemplo de estas células puede ser las CM hematopoyéticas, que son capaces de generar todos los tipos celulares constitutivos de la sangre o también por supuesto las CM neurales, que se describen a continuación.

Células madre con potencial neurogénico.

Las CM con potencial neurogénico son aquellas que al diferenciarse pueden dar lugar a los diferentes tipos celulares constitutivos del sistema nervioso (SN): neuronas y glia. De acuerdo con este criterio, encontramos cinco grupos de CM que presentan este potencial, estos son: las CME, las CMEG, las CMCE, las células madre neurales embrionarias (CMN) y las células madre neurales de adulto (CMNA; Fig. 5).

Los primeros tres grupos corresponden a las CM pluripotenciales, que como ya se mencionó tienen la capacidad de diferenciarse hacia tipos celulares de las tres capas embrionarias y por tanto, en presencia de factores y condiciones de cultivo adecuadas, pueden diferenciarse a células neurales (Rathjen *et al.*, 2002; Tabar *et al.*, 2005).

Las CMN son las células precursoras del SN. Se originan a partir del neuroectodermo que durante la embriogénesis da lugar a dos poblaciones celulares: las células del tubo neural, que generan a los precursores del sistema nervioso central (SNC) y las células de la cresta neural, progenitoras del sistema nervioso periférico (SNP) (Stemple y Anderson, 1992; Rathjen *et al.*, 2002).

Recientemente se ha descubierto que no sólo durante etapa de desarrollo embrionario existen CMN, sino que también se ha logrado observar neurogénesis debida a diferenciación de CM en la vida adulta en algunas zonas restringidas del cerebro, denominadas CMNA (Alvarez-Buylla *et al.*, 2002).

La identificación inicial de las CMNA se hizo en el SNC de aves, al percatarse de la capacidad neurogénica en un núcleo de control vocal en canarios adultos (Goldman y Nottebohm, 1983). Por otro lado, en mamíferos, se han identificado dos regiones neurogénicas: la zona subventricular (ZSV) en los ventrículos laterales, (Doetsch *et al.*, 1999) y la capa subgranular del giro dentado en el hipocampo (Cameron *et al.*, 1993 ; Fig. 4B).

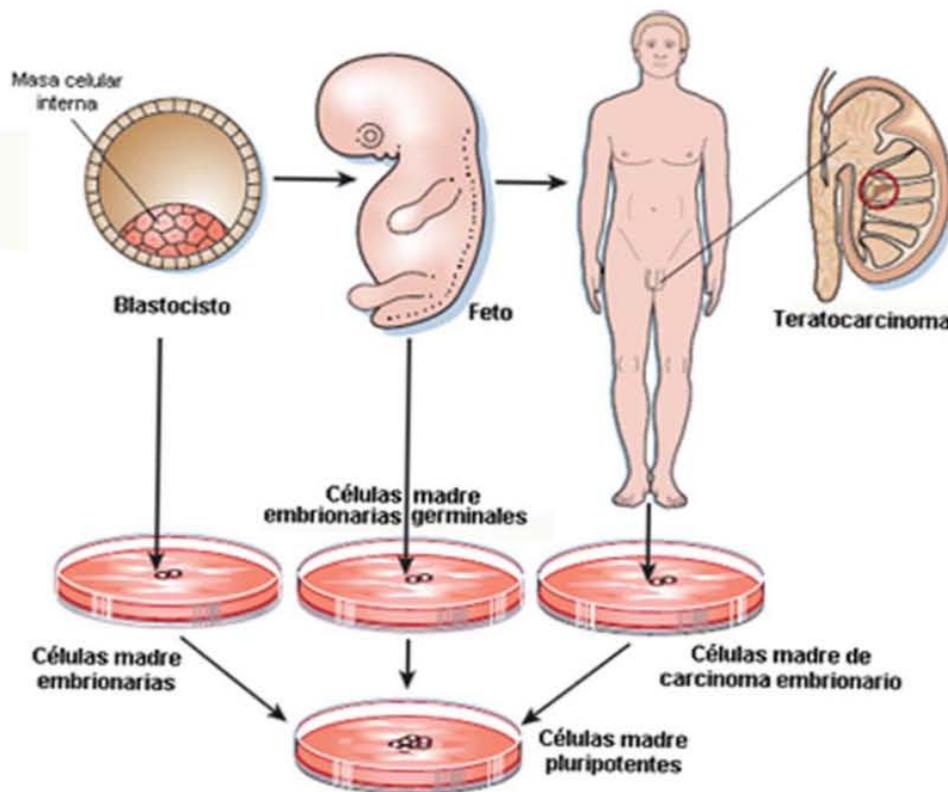


Fig. 3. Origen de las células madre (CM) pluripotenciales con potencial neurogénico. El esquema representa los sitios de los cuales se pueden obtener los tres tipos de CM pluripotenciales, las cuales presentan las mismas características bioquímicas y morfológicas en cultivo y éstas células pueden diferenciarse entre otros tipos celulares, a destinos neurales. De la masa interna del blastocisto se obtienen las células madre embrionarias (CME), de las células primordiales germinales de gónadas embrionarias, las células madre embrionarias germinales (CMEG) y por último de tumores testiculares de adulto se derivan las células madre de carcinoma embrionario (CMCE; Modificado de Donovan y Gearhart, 2001).

Como en esta tesis se utilizaron CMN extraídas de la corteza cerebral en desarrollo, a continuación se revisa la forma en que se genera el SNC. Como ya se mencionó, las CMN se generan durante la formación del SN de los organismos en desarrollo, el cual en vertebrados se origina a partir del ectodermo neural (neuroectodermo). Mediante la inducción embrionaria primaria del mesodermo notocordal, el cual se encuentra localizado por debajo del ectodermo (en la región que va a dar origen a la cabeza), se forma la placa neural que está constituida por células columnares (Keller *et al.*, 1992; Fig. 4). La placa neural se alarga por acción de la notocorda y las células epidérmicas adyacentes se mueven hacia el centro de la placa neural produciendo un plegamiento y elevación de la placa para formar un surco.

Las células dorsales adyacentes al surco neural posteriormente formarán la cresta neural, éstas son multipotenciales y constituyen las CMN del sistema nervioso periférico (SNP; Stemple y Anderson, 1992; Fig. 4), ya que al diferenciarse *in vivo* dan lugar a melanocitos, células de los gánglios de la raíz dorsal, neuronas adrenomedulares y células de Schwann (Le Douarin y Teillet, 1974). Además se ha observado que en condiciones de cultivo estas células son capaces de diferenciarse a células de músculo liso (Anderson *et al.*, 1997).

De manera simultánea, el tubo neural se forma al cerrarse el surco neural, el cual dará lugar al cerebro y la médula espinal, es decir al SNC (Gilbert, 2003; Fig. 4). Durante todo este proceso es posible apreciar que la naturaleza de las células involucradas cambia, por ejemplo, alrededor del 90% de las células presentes en el tubo neural en el día de desarrollo embrionario 11 (E 11) expresan la proteína de filamentos intermedios Nestina, la

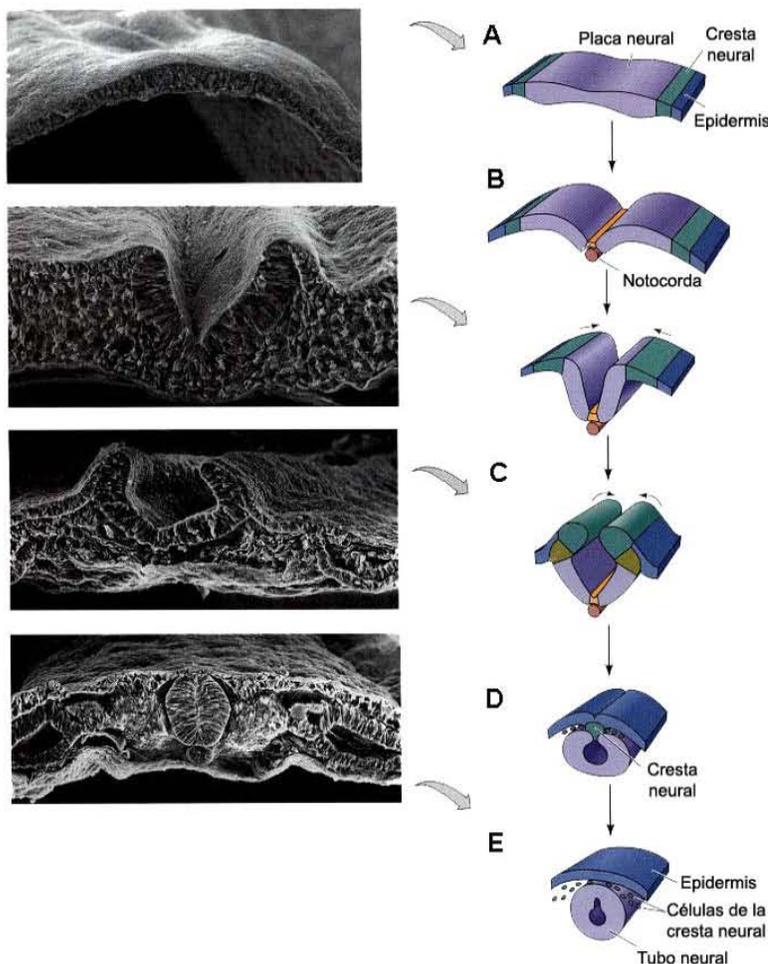


Fig. 4. Neurulación primaria.

A) Las células de la placa neural pueden distinguirse como células alargadas en la región dorsal del ectodermo. **B)** El plegamiento de la placa comienza en la región media del embrión donde las células se anclan a la notocorda cambian su forma mientras que las células que formarán a la epidermis se mueven hacia el centro. **C)** Los pliegues neurales se elevan mientras que la futura epidermis continúa avanzando hasta la línea media. **D)** En el lugar en que los pliegues neurales convergen se forma la cresta neural, que une al tubo neural con la epidermis. **E)** Las células de la cresta neural se dispersan separando al tubo neural de la epidermis. A la izquierda se muestran imágenes de microscopía de barrido de la neurulación en embriones de pollo. (Modificada de Gilbert, 2003)

cual es un marcador muy utilizado para la identificación de CMN (Lendahl *et al.*, 1990). Estas CMN tienen el potencial de generar, *in vitro*, múltiples tipos de neuronas maduras que pueden sintetizar y responder a neurotransmisores como dopamina, acetilcolina, GABA y glicina. (Kalyani *et al.*, 1998). A partir de estas CM, se generan en etapas posteriores los diferentes precursores celulares característicos de cada estructura del SNC y a medida que el desarrollo va avanzando, la proporción de CMN va disminuyendo debido al aumento de progenitores más restringidos y a la presencia de células diferenciadas. Además, diferentes reportes señalan que durante el desarrollo del SNC es posible localizar a las CMN de manera más restringida después de E14 en regiones como: la corteza cerebral, la región basal del cerebro anterior, el hipocampo (Temple, 2001) y el cerebelo (Laywell *et al.*, 2000; Fig. 5A).

Como ya se mencionó, una gran cantidad de los precursores neurales expresan nestina. Existen otros marcadores que pueden ser utilizados para identificar a los diferentes tipos de células neurales como β -Tubulina III, Map2 o NeuN, para identificar a las neuronas; la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es expresada por células gliales astrocíticas; la proteína O4 es expresada por oligodendrocitos.

Es importante mencionar que en ratas, la mayor población de neuronas corticales se genera entre los días 15 a 20 de desarrollo fetal (Bayer y Altman, 1991). En el SNC y SNP las neuronas se generan antes que la glia, mediante división asimétrica de las CMN (Temple, 2001). El ambiente celular y la expresión diferencial de distintos genes durante las diferentes etapas son determinantes para la especificación de los tipos celulares. Por ejemplo, un grupo de genes llamados proneurales son necesarios para iniciar el desarrollo de linajes neuronales y promover la generación de progenitores comprometidos a la diferenciación neuronal. Estos genes comienzan a expresarse desde la aparición del neuroectodermo y poseen secuencias que al ser traducidas a proteína generan dominios básicos de hélice-asa-

hélice, que les permiten interactuar con el ADN como factores de transcripción regulando la expresión o represión de otros genes (Bertrand *et al.*, 2002).

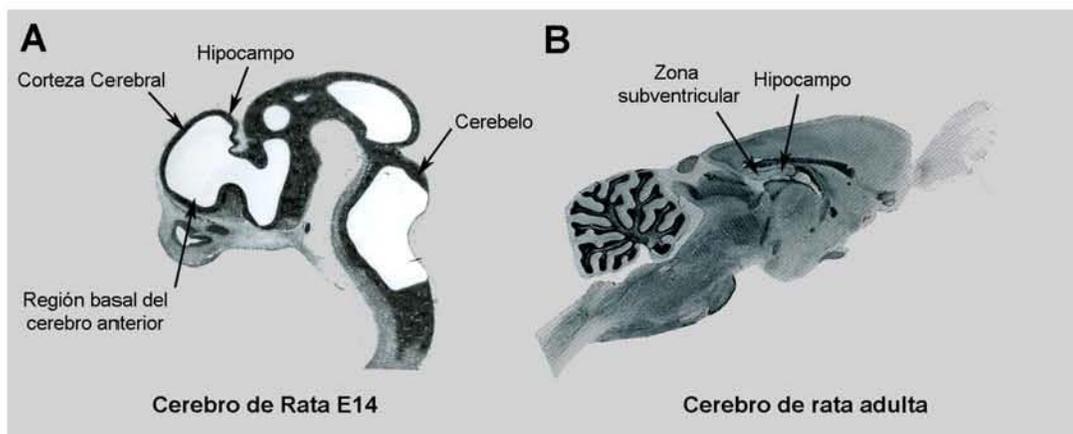


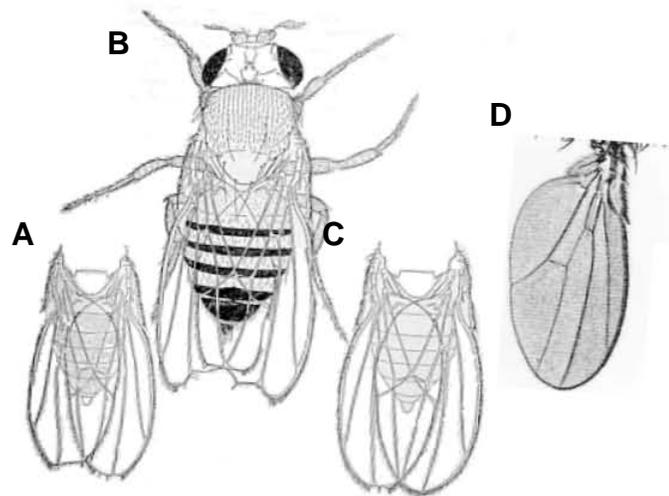
Fig. 5. Principales regiones de las cuales se han aislado células madre neurales (CMN). A) Corte sagital del cerebro de un embrión de rata en estadio embrionario dE14 días (E14), las flechas indican las zonas en el cerebro embrionario de donde se han logrado obtener CMN (Modificado de Altman y Bayer 1995). B) Corte sagital del cerebro de una rata adulta, en donde las flechas señalan las regiones en donde se ha reportado la presencia de células madre neurales de adulto (CMNA; Modificado de Pellegrino *et al*, 1986).

Por otro lado, en rata y ratón se ha observado que la diferenciación hacia destinos gliales astrocíticos se favorece por la acción de factores como el factor ciliar neurotrófico (CNTF) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF) mediante la activación de la vía de señalización JAK-STAT (“Janus Kinases-Signal Transducers and Activators of Transcription”; Rajan y McKay, 1998), la cual es muy importante en los procesos de diferenciación celular. Sin embargo en estadios tempranos se ha demostrado que CMN corticales no son capaces de diferenciarse a astrocitos en presencia de estos factores a pesar de poseer todos los elementos de la vía de transducción (Molne *et al.*, 2000), lo que sugiere que el contexto celular es esencial para determinar el tipo celular diferenciado. Otro estímulo reportado que favorece la diferenciación astrocítica es el mediado por la vía que activa la proteína Notch.

La proteína Notch.

Notch es una proteína transmembranal que pesa 300 kDa. El gen que la codifica, del mismo nombre, fue descrito por primera vez en *Drosophila* a principios del siglo XX (Mohr, 1919). Mientras que la pérdida total del gen resulta letal, la pérdida parcial de su función ocasionaba un fenotipo de bordes aserrados (*notch* en inglés) en las alas de las moscas, hecho del cual obtuvo su nombre (Fig. 6).

Fig. 6. Fenotipo de moscas con pérdida parcial de la función del gen Notch. De izquierda a derecha se observan los diferentes fenotipos que pueden presentarse en las moscas mutantes de Notch. **A)** Condición promedio; **B)** Condición extrema; **C)** Casi normal; **D)** Normal (Tomada de T. H. Morgan, *The physical basis of heredity*, 1919).



La proteína Notch está conformada por dos dominios: uno extracelular en el extremo amino terminal, de aproximadamente 200 kDa que contiene 36 repeticiones consecutivas de secuencias parecidas al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 3 repeticiones de una secuencia rica en cisteínas llamada Notch/Lin12; el dominio transmembranal-intracelular de aproximadamente 100 kDa, contiene un dominio llamado RAM, (por sus siglas en inglés “RBP-Jk associated molecule”) seguido de 6 repeticiones consecutivas de ankirina, secuencias de localización nuclear, un dominio rico en glutamina conocido como “opa” y una secuencia PEST, rica en prolina, glutamato, serina y treonina. Ésta es una secuencia de ubiquitinización que es reconocida por el proteosoma (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

La vía de señalización de Notch

Notch es un factor transcripcional. Su vía de señalización inicia cuando el dominio extracelular de Notch se une a su ligando (Delta y Jagged en vertebrados, Serrate en *Drosophila*, LAG-2 y APX-1 en *C. elegans*), el cual es una proteína transmembranal ubicada en alguna célula adyacente, que ejerce un tipo de señalización yuxtácrina, la cual requiere del contacto célula-célula para su activación (Figura 7A).

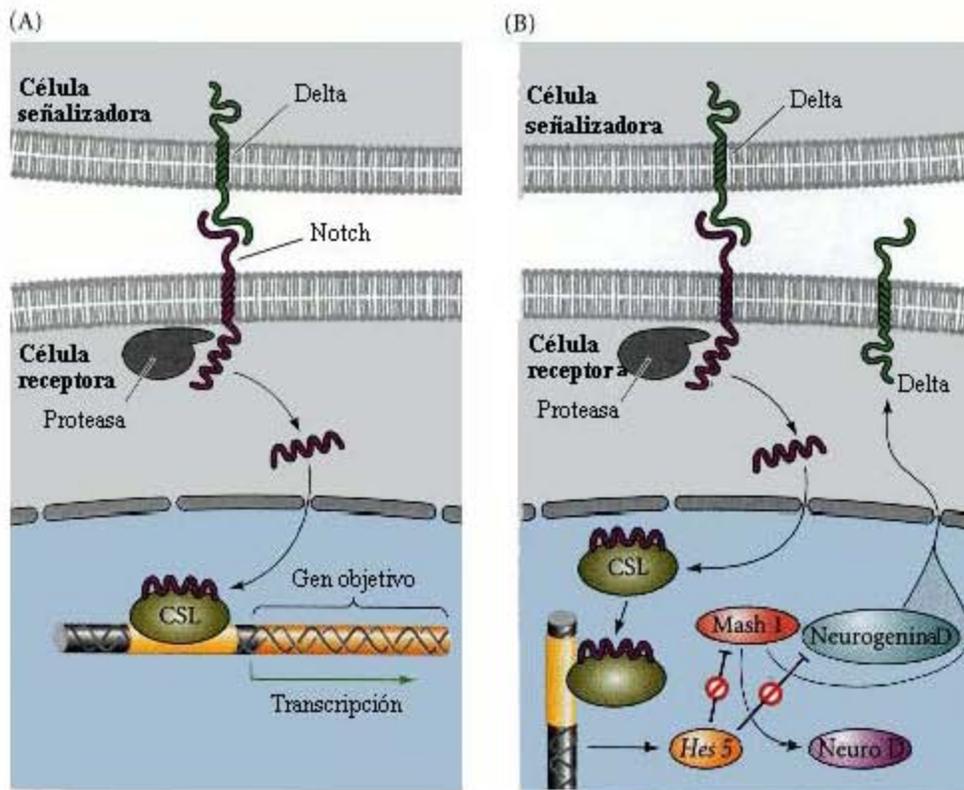


Fig. 7. Vía de señalización de Notch. A) Modelo de la activación de Notch. El ligando (Delta, Jagged o Serrate), una proteína transmembranal que se encuentra en una célula adyacente se une al dominio extracelular de la proteína Notch; esta unión provoca un cambio conformacional en la proteína Notch que permite la acción de proteasas que liberan la parte intracelular de esta proteína. El fragmento intracelular liberado se transloca al núcleo en donde forma un complejo con factores de transcripción de la familia CSL para activar la transcripción de genes. **B)** Inhibición de la neurogénesis mediada por Notch. Los principales objetivos del complejo Notch-CSL son los genes Hes, que son a su vez represores transcripcionales de genes proneurales como Mash 1 y Neurogenina D, bloqueando de esta forma la diferenciación neuronal y la producción de ligandos en dicha célula mediada por neurogeninas. (Modificada de Gilbert, 2003).

La unión de Notch con su ligando produce un cambio conformacional en la proteína que permite que el dominio transmembranal-intracelular sea desprendido por acción de una doble proteólisis mediada por metaloproteasas de la familia ADAM/TRACE y presenilinas (Schroeter *et al.*, 1998; Das *et al.*, 2004). El fragmento intracelular de Notch (ICN) liberado al citoplasma por la proteólisis, es la parte activa de la proteína que al translocarse al núcleo de la célula, forma un complejo con proteínas de la familia CSL (CBF1/ RBP-Jk en mamíferos, Suppressor of Hairless en moscas y Lag-1 in gusanos), las cuales tienen sitios de unión a ADN de tipo hélice-asa-hélice básico (bHLH), que les permiten interactuar con el ADN y modular la transcripción de genes (Fig, 7A). En mamíferos, el complejo RBP-Jk-Notch activa la transcripción de los genes *Hairy/Enhancer of Split* (Hes) que son represores transcripcionales de genes proneurales del tipo bHLH (Nakamura *et al.*, 2000; Bertrand *et al.*, 2002; Fig. 7B).

Notch en el desarrollo del SNC de mamíferos:

Desde el punto de vista evolutivo, el mecanismo de señalización de Notch está muy conservado (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Se han reportado proteínas homologas de Notch desde invertebrados como *C. elegans* (LIN-12 y GLP-1) hasta mamíferos (Notch 1, 2, 3 y 4). Los genes de Notch son expresados ampliamente durante el desarrollo embrionario, lo que sugiere que es una proteína involucrada en la regulación de la diferenciación de muchos tipos celulares (Lindsell *et al.*, 1996).

En el SNC de mamíferos se expresan tres proteínas homólogas de Notch: Notch1, Notch2 y Notch3 así como los ligandos Delta y Jagged. La expresión de las proteínas Notch se ha detectado desde la formación del neuroectodermo (Lindsell *et al.*, 1996) y es posible observar su expresión hasta la vida adulta. La activación de la vía Notch desempeña diferentes funciones que dependen del contexto celular y el estadio en el que se exprese. Sin embargo, debido a que requiere del contacto celular directo para su activación, su

mecanismo central de acción se basa en un mecanismo conocido como inhibición lateral, en el cual la activación de la vía de Notch en una célula tiene efecto sobre el destino de ésta, pero también controla el destino de las células que la rodean y expresan su ligando. Este mecanismo parece ser recíproco, es decir, el aumento en la expresión los receptores Notch puede incrementar la expresión de sus ligandos en las células adyacentes, de la misma manera que el aumento en la expresión de los ligandos puede incrementar la expresión del receptor (Greenwald, 1998).

En algunas regiones de SNC los patrones de expresión de 2 ó 3 homólogos de la familia Notch son idénticos, mientras que en otras se expresa sólo uno de ellos (Reaume *et al.*, 1992; Lardelli y Lendahl, 1993; Williams *et al.*, 1995).

En ratas, Notch1 se expresa de manera uniforme en el neuroepitelio a partir del día embrionario 9.5 (E9.5). Para el día E12.5, el cerebro ya se encuentra diferenciado en cerebro anterior (constituído por las vesículas telencefálicas y el diencéfalo), cerebro medio o mesencéfalo y cerebro posterior (subdividido en el metencéfalo rostral y el mielencéfalo caudal). En este estadio, Notch1 se expresa fuertemente en la parte basal del telencéfalo y en el tálamo, pero presenta una expresión muy débil en la corteza. Notch 3 presenta el mismo patrón de expresión en estas regiones, mientras que Notch 2 se expresa en el epitelio del plexo coroide (Lindsell *et al.*, 1996).

En E13.5, Notch 1 y 3 se expresan en el diencéfalo, en la región del tálamo dorsal y ventral, además de la zona ventricular, el cerebro posterior y a lo largo de toda la médula espinal. Adicionalmente, se expresa en las células de la capa basal del epitelio olfatorio constituido por progenitores neurales (Lindsell *et al.*, 1996).

Al iniciar las primeras etapas de diferenciación, la forma activa de Notch se encuentra involucrada en el mantenimiento de las poblaciones de CMN, controlando la división asimétrica de los precursores (Hitoshi *et al.*, 2002; Noctor *et al.*, 2002). Posteriormente (alrededor del día E16 en ratas), dirige la diferenciación de las CMN a destinos gliales

astrocíticos (Morrison *et al.*, 2000; Tanigaki *et al.*, 2001; Grandbarbe *et al.*, 2003), en la corteza cerebral de ratón, promueve la formación de glia radial (Gaiano *et al.*, 2000), en retina de rata y ratón su sobre-expresión promueve la diferenciación a glia de Müller después del nacimiento (Furukawa *et al.*, 2000; Hojo *et al.*, 2000). En esta misma dirección, al activar a Notch durante estadios embrionarios en los que normalmente se lleva a cabo la neurogénesis en roedores, se ha observado una inhibición de la diferenciación neuronal y un aumento en la diferenciación de células astrocíticas (Chambers *et al.*, 2001; Patten *et al.*, 2003).

Al parecer, en el SNP la sobre-expresión de Notch en estadios donde normalmente se generan neuronas promueve diferenciación glial de manera irreversible, es decir, la producción neuronal no se recupera al disminuir la expresión de Notch (Morrison *et al.*, 2000), no obstante en el SNC no es así. En este sentido se ha observado que durante la formación de las capas neuronales de la corteza cerebral, la sobre-expresión de Notch previene la diferenciación neuronal y que esta inhibición es temporal pues al apagar la expresión de Notch la neurogénesis se reanuda, pero generando neuronas de las capas de la corteza cerebral correspondientes al estadio en que se encuentra el embrión y no a las capas de los estadios en que inició la sobre-expresión de Notch (Mizutani y Saito, 2005).

En ratones mutantes para Notch1, se observa una diferenciación neuronal temprana ocasionada por el fallo en la inhibición de genes proneurales que provoca el agotamiento prematuro de las CMN y es letal al rededor del E11 (de la Pompa, *et al.*, 1997, Lutolf, *et al.*, 2002, Yang, *et al.*, 2004, Yoon, *et al.*, 2004,), mientras que en los mutantes para Notch2 se presenta muerte neural profusa desde E9 que también es letal en E11 (Hamada, *et al.*, 1999). Por otro lado, la pérdida de función de Notch3 no presenta ningún fenotipo significativo (Yoon y Gaiano, 2005).

Con el propósito de estudiar el efecto que tiene la sobre-expresión de la forma activa de la proteína Notch1 en la diferenciación de CMN provenientes de la corteza cerebral fetal de ratas E14, en este trabajo nos dimos a la tarea de preparar suspensiones de retrovirus deficientes en la replicación, uno que contiene una proteína de fusión de la proteína verde fluorescente-ICN1 (GFP-ICN1) y otro que expresa solamente al gen de la GFP.

Justificación

Los mecanismos básicos que promueven el mantenimiento o la diferenciación de las CM no se conocen con precisión. Se sabe que la vía de Notch está presente durante estos procesos, pero su papel aún no es claro. En este trabajo se busca conocer más acerca del papel esta vía durante la proliferación y diferenciación de CMN en estadios tempranos del desarrollo embrionario.

Planteamiento del problema

Se ha reportado en varios trabajos que la sobre-expresión de Notch en precursores neurales embrionarios normalmente especificados a destinos neuronales puede provocar un cambio en su diferenciación hacia destinos gliales, principalmente astrocíticos (Morrison *et al.*, 2000; Tanigaki *et al.*, 2001; Grandbarbe *et al.*, 2003). Otros autores sugieren que la activación de esta vía se encarga de mantener el estado indiferenciado de los precursores neurales (Nakamura *et al.*, 2000; Hitoshi *et al.*, 2002; Noctor *et al.*, 2002), es decir mantener el estado de CM, en tanto la vía se mantenga activa. Es posible que esta vía se encuentre involucrada en ambos procesos, actuando mediante mecanismos diferentes en cada caso (Oishi *et al.*, 2004). En este trabajo se utilizaron vectores retrovirales que expresan la forma activa de Notch1 para transducir CMN de la corteza cerebral con el propósito de establecer si estas células se mantienen como precursores o se diferencian hacia destinos neuronales o gliales.

Objetivo

Analizar el efecto de la sobreexpresión del fragmento intracelular activo de Notch1 en la diferenciación de células madre neurales de corteza cerebral embrionaria de rata en estadios tempranos del desarrollo embrionario, mediante el establecimiento de un protocolo para la infección de éstas células con vectores retrovirales derivados del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV).

Objetivos particulares

- Preparación de lotes retrovirales que expresen a la GFP y GFP-ICN1.
- Aislamiento y cultivo de CMN de la corteza cerebral de fetos de rata E14.
- Transducción de CMN con los vectores retrovirales y cuantificación de la eficacia de transducción.
- Evaluación del efecto de la activación de Notch1 en la diferenciación en este estadio.

Metodología

Para el presente estudio se utilizaron vectores retrovirales derivados del MoMLV y modificados con la envoltura del virus de la estomatitis vesicular VSV-G (Yee *et al.*, 1994 y 1994b), que expresan a la proteína verde fluorescente (GFP), en el caso del vector control y a la GFP fusionada al ICN1, además de la proteína humana fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) como un segundo gen reportero (Fig. 8). La expresión de los genes es controlada por el promotor EF1 α de *Xenopus laevis* y entre GFP-ICN1 y PLAP existe una secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES), para permitir la expresión bicistrónica de las proteínas (Yoon *et al.*, 2004). El protocolo utilizado para la preparación y concentración de las partículas retrovirales nos fue proporcionado por el Dr. Nicholas Gaiano (Gaiano *et al.*, 1999)

Ambas construcciones retrovirales fueron utilizados para la transducción de CMN obtenidas a partir de la corteza cerebral de rata en E14 (Kim *et al.*, 2003). La eficiencia de la transducción, así como los destinos celulares de las células transducidas, fueron analizados mediante inmunofluorescencia.

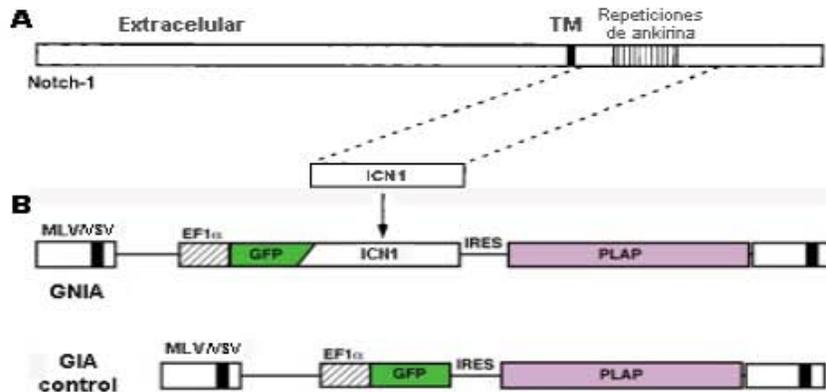


Fig. 8. Representación esquemática de la proteína Notch1 y de las construcciones retrovirales utilizadas para expresar al ICN1 en CMN de corteza cerebral de rata. A) La región utilizada para la construcción de los vectores retrovirales, ICN1, corresponde a los residuos 1753 a 2185 del dominio intracelular de la proteína Notch1, que contiene a la región de repeticiones de ankirina (Modificada de Gaiano *et al.*, 2000). B) Los vectores retrovirales derivados del virus MoMLV generados: GNIA, que expresa el ICN1 fusionado a la GFP y GIA, vector control que expresa únicamente a la GFP. La expresión del transgen bicistrónico está dirigida por un promotor externo de *Xenopus* (EF1 α) y ambos virus permiten la expresión de la fosfatasa alcalina. Abreviaturas: MLV, genoma derivado del virus de la leucemia murina; VSV, secuencias regulatorias del virus de la estomatitis vascular; EF1 α , factor de elongación 1 α ; GFP, proteína verde fluorescente; ICN1, fragmento intracelular de Notch1; IRES, secuencia interna de entrada al ribosoma; PLAP, fosfatasa alcalina placentaria humana (Modificada de Yoon *et al.*, 2004).

Preparación de lotes retrovirales que expresen a la proteína verde fluorescente (GFP) y GFP-ICN1.

Los vectores retrovirales GIA y GNIA (Fig. 9), fueron construidos utilizando el sistema de expresión retroviral pantrópica de BD Biosciences, mediante co-transfección transitoria de los vectores de expresión retroviral pGIA o pGNIA (proporcionados por el Dr. Nicholas Gaiano) y el vector pVSV-G (Fig. 9), que permite la expresión de la proteína VSV-G a partir de un promotor de citomegalovirus (CMV).

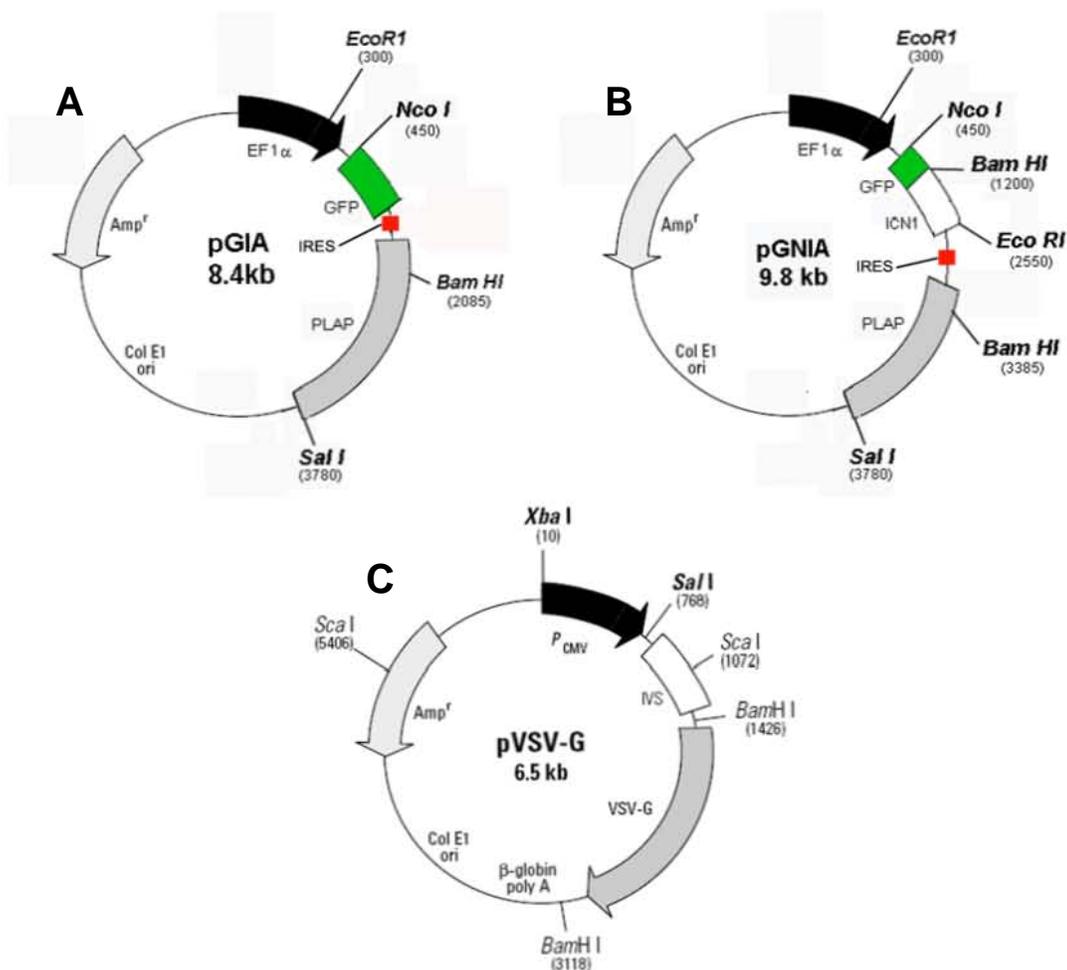


Fig. 9. Plásmidos de expresión utilizados en la construcción de los vectores retrovirales GIA y GNIA. **A)** Vector de expresión pGIA: expresa a la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor EF1 α de *Xenopus* y contiene una secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES) para permitir la expresión de la proteína fosfatasa alcalina placentaria humana (PLAP). **B)** Vector de expresión pGNIA: contiene una proteína de fusión de GFP con el fragmento intracelular de Notch1 (ICN1) expresada bajo el promotor EF1 α , una secuencia IRES y a la PLAP. **C)** Vector de expresión pVSV-G: expresa a la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) bajo el promotor del citomegalovirus humano (P_{CMV}), contiene la secuencia del intrón sintético IVS que aumenta la estabilidad del ARN mensajero y a la proteína β -globina de conejo. Col E1 ori: sitio de inicio de la replicación; Amp^r: gen de resistencia a ampicilina.

Manipulación de vectores retrovirales derivados del MoMLV.

Los virus derivados del MoMLV, modificados con la proteína VSV-G deben ser manipulados bajo ciertas normas de bioseguridad, debido a que las glicoproteínas del VSV permiten al virus penetrar en las células humanas. En consecuencia es posible para estos vectores infectar a los individuos que trabajen con o cerca de ellos.

Tomando en cuenta lo anterior, se utilizaron los siguientes procedimientos para minimizar el riesgo al trabajar con estos vectores:

1. Todo el trabajo con células productoras y transducidas con los VR se realizó en una campana de bioseguridad tipo II y flujo laminar vertical.
2. Siempre se usaron guantes y bata para evitar la exposición de alguna parte de la piel a los VR.
3. Todas las pipetas, puntas de micropipeta, tubos, platos de cultivo y en general todo el material que entró en contacto con los VR fue enjuagado o depositado en un contenedor con cloro antes de ser desechado.
4. Cualquier derramamiento o goteo dentro de la campana de soluciones que contuvieran a los VR fue tratado con cloro antes de ser limpiado con toallas de papel.

Transformación de los plásmidos pGIA, pGNIA y pVSV-G en bacterias *E. coli* competentes.

Antes de realizar las cotransfecciones, los plásmidos con las construcciones requeridas fueron amplificados y purificados utilizando el “Kit de Maxiprep” de Qiagen.

1. Bacterias *E. coli* competentes (Top 10 de Invitrogen) fueron transformadas mediante choque térmico con 500 ng de los plásmidos pGIA, pGNIA y pVSV-G en una suspensión de 16.5 μ l.

2. Se agregaron los plásmidos a la suspensión bacteriana y se dejaron en hielo durante 20 minutos, posteriormente se aplicó un choque térmico de 30 segundos a 42°C, después del cual las bacterias se volvieron a colocar en hielo.
3. Se agregaron 250 µl de medio SOC a temperatura ambiente (TA) a cada suspensión bacteriana, y se dejaron incubar a 37°C durante 3 horas.
4. Posteriormente, cada cultivo fue distribuido en cajas Petri de 10 cm de diámetro que contenían medio Luria Broth agar con ampicilina (LB-Amp) y que fueron puestas en incubación a 37°C durante toda una noche.

Amplificación y purificación de los plásmidos pGIA, pGNIA y pVSV-G.

1. Se tomó una colonia de cada una de las cajas Petri que contenían bacterias transformadas con los diferentes plásmidos, para inocular 5 ml de medio LB-Amp líquido. El medio inoculado fue incubado durante 8 horas a 37°C con agitación vigorosa (300 revoluciones por minuto; rpm).
2. El cultivo resultante fue resuspendido en 100 ml de medio LB-Amp para cada plásmido y se dejó incubar nuevamente a 37°C, con agitación continua (300 rpm), durante toda la noche.
3. Para recuperar las bacterias cultivadas, la suspensión fue centrifugada a 6 000 rpm (6000 x g) durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, en una ultracentrífuga refrigerada Beckman, con un rotor Sorvall GSA.
4. Se eliminó el sobrenadante y los botones celulares obtenidos fueron resuspendidos en 10 ml del amortiguador de lisis P1 (Qiagen Maxiprep kit) y pasados un tubo Falcon de 50 ml en cada caso.
5. Se agregaron 10 ml del amortiguador P2 (Qiagen Maxiprep kit) a cada lisado mezclando las soluciones suavemente por inversión de 4 a 6 veces, después se dejaron incubar a TA por 5 minutos.

6. Se agregaron 10 ml de amortiguador P3 (Qiagen Maxiprep kit) previamente enfriado en hielo a cada solución mezclando por inversión de 4 a 6 veces y las soluciones se dejaron incubar en hielo durante 20 minutos.
7. Después de la incubación en hielo, se centrifugó cada tubo a 4 000 rpm (3200 x g) durante 30 minutos a 4°C, en una centrífuga de mesa Thermo Forma, y se recuperó el sobrenadante de cada tubo, que contiene el ADN plasmídico, a tubos nuevos.
8. Los sobrenadantes fueron centrifugados una vez más a 3200 x g durante 15 minutos a 4°C y después fueron recuperados en tubos nuevos. Al pasar cada sobrenadante a su tubo nuevo, estos fueron filtrados a través de una doble capa de Kim Wipes (Kimberly-Clark) para remover cualquier partícula que quedara en solución.
9. De manera paralela, se agregaron 10 ml de amortiguador QBT a tres columnas Qiagen-tip 500 (Qiagen Maxiprep kit) y se dejó que las columnas se vaciaran por gravedad.
10. Posteriormente, se agregó cada uno de los sobrenadantes filtrados a su respectiva columna para permitir que el ADN plasmídico interaccionara con las resinas de éstas.
11. Al detenerse el flujo de los sobrenadantes, se lavaron las columnas dos veces con 10 ml de amortiguador QC (Qiagen Maxiprep kit), dejando vaciar las columnas por gravedad.
12. Una vez lavado, el ADN fue colectado en tubos desechables de 50 ml fluyendo con 15 ml de amortiguador QF (Qiagen Maxiprep kit) a cada columna.
13. El ADN fue precipitado al añadir 10.5 ml de isopropanol a TA a cada tubo. La solución con el ADN fue mezclada y centrifugada a 11 000 rpm (15 000 x g) durante 30 minutos a 4°C, en una centrífuga refrigerada Beckman, con un rotor Sorvall SS-34. Posteriormente el sobrenadante fue decantado.
14. Los botones obtenidos fueron lavados con 5 ml de etanol 70% a TA, centrifugados nuevamente a 15 000 x g por 10 minutos y el sobrenadante decantado.
15. Los botones fueron dejados secar durante 20 minutos y posteriormente fueron resuspendidos en 300 µl de amortiguador TE pH 8.0.

16. La concentración y pureza de cada plásmido fue determinada por espectrofotometría: se realizaron diluciones 1:1000 y 1:2000 de cada solución y se midió su absorbancia (A) a 260 y 280 nm para determinar la pureza del ADN obtenido mediante la relación $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$, en donde los valores cercanos a 2 representan un mayor grado de pureza de la muestra.
17. Para calcular la concentración de ADN plasmídico en cada caso se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de dilución} \times A_{260\text{ nm}} \times 50 = [] \mu\text{g/ml}$$

Donde:

$A_{260\text{ nm}}$ = Absorbancia a 260 nm

50 = constante para ADN en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cuando $A_{260\text{ nm}} = 1$

[] = concentración de ADN

Los valores de absorbancia, concentración y pureza obtenidos en cada caso se muestran en la Tabla 1. Para realizar los cálculos, se tomó el promedio de las 2 diluciones hechas.

Tabla 1. Densidades ópticas, concentración final e índice de pureza de los plásmidos pVSV-G, pGIA y pGNIA obtenidos a partir de maxiprep.

Dilución	1:2000		1:1000		[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Pureza 260/280
	260 nm	280 nm	260 nm	280 nm		
pVSV-G	0.023	0.011	0.04	0.023	1.50	1.74
pGIA	0.013	0.009	0.047	0.023	1.215	1.65
pGNIA	0.024	0.014	0.114	0.098	1.52	1.63

Cultivo, expansión, cuantificación y criopreservación células GP-293.

La línea celular GP-293 derivada de la línea celular HEK 293, incluida en el sistema de expresión retroviral pantrópica de BD Biosciences, expresa establemente a los genes de los dominios *Gag* y *Pol* del MoMLV y fue utilizada como línea empaquetadora para la producción de VR pantrópicos deficientes de replicación mediante la contransfección del vector de expresión retroviral pGIA o pGNIA y el vector de la cápside pVSV-G. A continuación se detalla el procedimiento:

1. Un vial con 3×10^6 fibroblastos GP-293 en pase 1 (P1) se descongeló y fue sembrado en una caja de cultivo de 10 cm de diámetro, con 7 ml de medio DMEM (por sus siglas en inglés "*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*") con glutamina 2 mM, 10% de suero fetal bovino (SFB), y 1% penicilina/1% estreptomycin (DMEM + SFB) a 37°C con 95% de aire y 5% de CO₂.
2. Las células GP-293 fueron despegados para ser expandidos en nuevas cajas después de una semana: se extrajo el medio y la caja fue lavada dos veces con 5 ml del amortiguador de fosfatos (PBS). Se agregó 1 ml de tripsina al 0.25 % EDTA 0.038% en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) a la caja y se dejó incubar durante 5 minutos a 37°C. Después se agregaron 5 ml de medio DMEM + SFB, para detener la acción de la tripsina. Las células despegadas fueron resuspendidas con la pipeta y pasadas a un tubo Falcon de 15 ml.
3. La solución de células resuspendidas fue centrifugada a 1000 rpm (200 x g) durante 5 minutos a 4°C, en una centrífuga de mesa Thermo Forma. El sobrenadante fue descartado y el botón celular obtenido se resuspendió en 5 ml de DMEM + SFB.
4. El número de células obtenidas fue determinado haciendo una dilución a partir de las células en suspensión de 1:2 a 1:5 en 20 µl, dependiendo del tamaño del botón y cuantificando el número celular con una cámara de Neubauer.

5. Para expandir a la línea celular, se resembró el volumen equivalente a 0.5×10^6 en nuevas cajas con 7 ml de DMEM + SFB incubando a 37°C y 5% CO₂.
6. Los pasos 2 a 5 fueron repetidos para expandir a las células en cajas nuevas que se dejaron proliferar hasta alcanzar una confluencia de 80% aproximadamente, después de lo cual, las células fueron despegadas nuevamente para sembrar las cajas necesarias para la transfección con los plásmidos obtenidos de maxiprep y almacenar las células restantes en criopreservación.
7. Para la transfección, las células fueron resuspendidas y cuantificadas. Se obtuvieron 2.02×10^8 células y se sembraron 1×10^6 células en 2 platos de cultivo de 15 cm de diámetro con 15 ml de DMEM + SFB.
8. Al resto de las células en suspensión (200×10^6) se agregaron 36 ml de DMEM + SFB y 4 ml de DMSO, para quedar a una concentración de 10% de DMSO y a una densidad de 5×10^6 células/ml. Posteriormente se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos de criopresevación que fueron colocados a -20°C durante 2 horas, después -70°C toda la noche y finalmente almacenados en nitrógeno líquido.

Transfección de células GP-293 para la preparación de los lotes retrovirales.

1. Una vez que habían alcanzado una confluencia de aproximadamente 80%, se cambió el medio a los 2 platos de cultivo de 15 cm con fibroblastos GP-293, por 15 ml de medio fresco DMEM + SFB. Se utilizó un plato para la transfección con pVSV-G + pGIA y el otro para pVSV-G + pGNIA.
2. En dos tubos Falcon de 50 ml se agregaron 33 µg (22 µl) del pVSV-G y 25 µg del pGIA (20.6 µl) o pGNIA (16.4 µl); un tubo fue usado para cada vector de expresión.
3. Se agregaron 250 µl de CaCl₂ 2 M a cada tubo
4. Se agregó agua hasta aforar a 2 ml y se mezclaron los tubos girándolos suavemente.

5. Posteriormente se agregaron 2 ml de amortiguador salino de HEPES (HeBS) 2X pH 7.1 a la mezcla con ADN mediante goteo, mientras se burbujeaba suavemente en la mezcla con una pipeta pasteur.
6. Después de completar la adición de HeBS se mezclaron los tubos vigorosamente y se añadieron los 4 ml de la mezcla de cada construcción a un plato de cultivo girándolo suavemente para mezclarlo después al terminar la adición.
7. Los platos se dejaron incubar durante 6 horas a 37°C con 5% de CO₂, después de lo cual se cambió el medio por 13 ml de DMEM + SFB.
8. El sobrenadante, es decir el medio de cultivo, fue colectado a las 24 horas de incubación y reemplazado por 13 ml de DMEM + SFB.
9. Se recuperó nuevamente el sobrenadante 36 horas después de iniciada la primera incubación y reemplazó el medio por 12.5 ml de DMEM con pen/strep y sin suero.
10. 48 horas después de iniciada la primera incubación se recolectó el medio final y los platos fueron tratados con hipoclorito y desechadas.
11. Los sobrenadantes colectados contenían a las partículas virales ensambladas y fueron almacenados a -70°C.
12. Los sobrenadantes obtenidos a las 24 y 36 horas de incubación de cada construcción que contenían medio con suero fueron utilizados para preparar suspensiones concentradas de RV y de los sobrenadantes recolectados a las 48 que tenían medio sin suero se hicieron alícuotas de 1ml que fueron almacenadas a -70°C.
13. Para concentrar a las partículas virales, se mezclaron los sobrenadantes de la misma construcción retroviral y se centrifugaron a 25 000 rpm (82 000 x g) durante 90 minutos a 4°C con un rotor SW28 de columpio.
14. Al terminar la centrifugación, se retiró el sobrenadante aspirándolo con vacío y teniendo cuidado de no tocar el fondo de los tubos en donde se encontraba el botón de las partículas retrovirales.

15. Los botones se dejaron secar colocando los tubos boca abajo sobre una toalla de papel con cloro durante 3 minutos.
16. Una vez secos los botones, se les agregó 100 μ l de PBS a cada tubo, se cubrieron con parafilm y se colocaron a 4°C toda la noche con agitación leve continua.
17. Al día siguiente se resuspendieron los botones pipeteando suavemente para evitar la formación de burbujas. Se pasaron los virus resuspendidos a un tubo eppendorf (uno para cada VR), se mezcló nuevamente y se hicieron alícuotas de 10 μ l que fueron almacenadas a -70°C.

Cultivo, expansión, cuantificación y criopreservación de fibroblastos NIH 3T3.

Las células NIH 3T3 son una línea celular de fibroblastos de ratón. Estas células fueron utilizadas para realizar pruebas control de infección con VR modificados con la proteína VSV-G utilizada en la construcción de los vectores GIA y GNIA, y para realizar la titulación de las partículas infectivas de los VR.

El cultivo, expansión, cuantificación y expansión de estos fibroblastos se realizó siguiendo el mismo protocolo que en caso de las células GP-293.

1. Un vial con 3×10^6 células en P23, fue descongelado y sembrado en 3 platos de 10 cm de diámetro.
2. De 12 a 14 días después las células fueron expandidas a 10 platos nuevos.
3. Al alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia, las células de 5 de los platos fueron congeladas y los platos restantes se utilizaron para las transfecciones control del ensayo de luciferasa.

Preparación de VR que expresan al gen de la luciferasa (GLuc).

La línea celular GP-293 Luc (BD Biosciences), expresa establemente al gen de la luciferasa transfectado a partir de un plásmido de expresión retroviral. Este gen codifica para

la enzima del mismo nombre que tiene un peso molecular de 60 kDa y cataliza la conversión de su sustrato, la luciferina a oxiluciferina con un desprendimiento de luz a 562 nm (Fig. 10). Esta es la reacción causante de la bioluminiscencia, que es un fenómeno presente en una gran cantidad de organismos de diferentes phyla, por ejemplo las luciérnagas (*Photinus pyralis*), cuya luciferasa es la más utilizada como herramienta en Biología molecular y Bioquímica (Gould y Subramani, 1988; Baldwin, 1996).

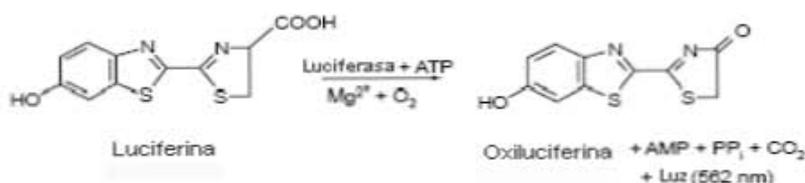


Fig 10. La conversión de luciferina a oxiluciferina es catalizada por la enzima luciferasa en presencia de ATP, Mg²⁺ y oxígeno. Esta reacción libera energía luminosa a 562 nm. (Modificada del manual del sistema de ensayo y detección de luciferasa, BD Biosciences).

La expresión del gen de la luciferasa en el vector GLuc, derivado del MoMLV modificado con la proteína VSV-G fue utilizada para realizar un control del ensamblaje y la capacidad de transfección de dichas partículas retrovirales al cuantificar la bioluminiscencia desprendida por lisados de células infectados con los VR que expresan luciferasa (VR-luc) cuando se agrega su sustrato.

1. Un vial con 3×10^6 células GP-293 Luc fue descongelado y sembrado en un plato de cultivo de 10 cm de diámetro con 7 ml de DMEM + SFB. Las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂ durante 10 días.
2. Posteriormente, los fibroblastos fueron despegados, siguiendo el mismo protocolo que en el caso de las células GP-293 y fueron resembrados en 2 cajas de 15 cm de diámetro.
3. Los platos fueron utilizados para ser transfectados con 33µg (22µl) del plásmido pVSV-G utilizando HeBS pH 7.06 y HeBS pH 7.1 (un plato para cada pH).

4. La transfección fue realizada siguiendo el mismo protocolo que la producción de VR con las células GP-293.
5. Se mezclaron los sobrenadantes obtenidos de cada pH a 24, 36 y 48 horas de incubación, obteniendo un volumen final de 39 ml para cada pH.
6. 10 ml de los sobrenadantes de cada pH fueron separados en alícuotas de 1 ml para realizar infecciones directamente y los sobrenadantes restantes fueron concentrados mediante centrifugación. Todas las alícuotas se almacenaron a -70°C hasta el día de la infección.

Transducción de fibroblastos NIH 3T3 con GLuc.

1. Se utilizó una alícuota de virus concentrados (10 µl) y en sobrenadante (1 ml) de cada pH para transducir un plato de 10 cm de diámetro con fibroblastos NIH 3T3 en 70% de confluencia (cuatro platos).
2. Los platos se dejaron incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante dos días y posteriormente fueron lisadas con 1 ml de amortiguador de lisis (ver composición en apéndice) durante 20 minutos a 4°C y resuspendidas utilizando una pipeta. Adicionalmente se lisaron las células de una caja de fibroblastos NIH 3T3 que no había sido expuesta a las partículas virales para ser utilizada como control negativo.
3. Posteriormente los lisados fueron recuperados y divididos en alícuotas de 200 µl que fueron almacenadas a -70°C. Dos alícuotas de cada condición fueron separadas para la cuantificación de bioluminiscencia.

Ensayo de Luciferasa: cuantificación de bioluminiscencia en lisados de fibroblastos NIH 3T3 infectados con GLuc

La cuantificación de la bioluminiscencia, medida en unidades relativas de luz (URL) se realizó utilizando un luminómetro. La cinética de la reacción biolumínica es muy rápida

una vez que se agrega el sustrato, alcanzando un pico de emisión alrededor de los 0.5 segundos. Por lo tanto, y debido a que no se contó con un inyector automático, se prepararon primero las muestras con el amortiguador de ensayo y el sustrato fue agregado a cada muestra justo antes de realizar la medición. Las mediciones se realizaron por duplicado.

1. A cada muestra se agregaron 200 μ l de amortiguador de ensayo a TA.
2. Posteriormente, cada una fue colocada en el luminómetro, se agregaron 200 μ l de D-luciferina 1 mM e inmediatamente después se realizó la medición de la luminiscencia
3. Como blancos para determinar la lectura basal del luminómetro se utilizaron: 1 ml de amortiguador de ensayo y 500 μ l de amortiguador de ensayo + 500 μ l de D-luciferina 1 mM.

Determinación de la concentración de proteína en lisados de fibroblastos NIH 3T3 infectados con GLuc.

Para poder normalizar las lecturas de ULR obtenidas al medir la bioluminiscencia, se calculó la concentración de proteína presente en las muestras analizadas mediante el método de Bradford.

1. Para construir la curva estándar se empleó albúmina de suero de bovino (BSA) a 4 concentraciones conocidas: 1, 3, 5 y 7 μ g y un blanco sin proteína. Las mediciones se realizaron por duplicado como se muestra en la Tabla 2.
2. Se prepararon diluciones 1:200 por duplicado de las muestras con los lisados de fibroblastos NIH 3T3, como se muestra en la Tabla 3.
3. Todas las muestras fueron cargadas en una caja de 96 pozos y su absorbancia fue determinada utilizando un lector de ELISA a 600 nm.

Tabla 2. Curva estándar de albúmina.

μl BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	μl H ₂ O	μg de proteína	Bradford (μl)	Absorbancia (600nm)	Promedio Abs.
0	10	0	190	0	0.0085
0	10	0	190	0.017	
1	9	1	190	0.162	0.147
1	9	1	190	0.132	
3	7	3	190	0.342	0.3975
3	7	3	190	0.453	
5	5	5	190	0.523	0.6175
5	5	5	190	0.712	
7	3	7	190	0.749	0.7395
7	3	7	190	0.73	

Se calculó la absorbancia de 4 concentraciones conocidas de BSA, 1, 3, 5, y 7 μg . Se muestran los valores de absorbancia obtenidos a 600nm y el promedio de absorbancia de cada duplicado.

- Con base en el promedio de absorbancia obtenido en cada concentración, se construyó el gráfico de la curva estándar a partir del cual se obtuvo la ecuación de la recta: $y = 0.10645x + 0.041366$ con un valor de correlación de 0.98 (Fig. 11).
- A partir de la ecuación de la gráfica se calcularon las concentraciones de las muestras de lisados, los valores se muestran en la Tabla 3.

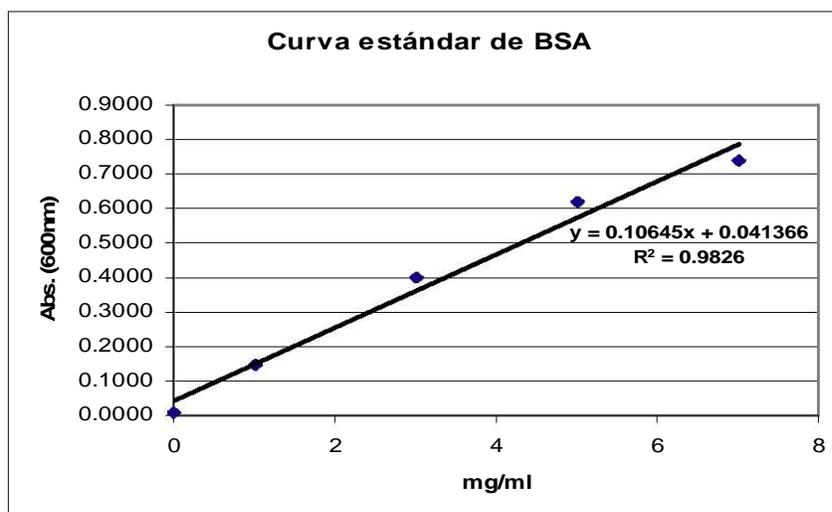


Figura 11. Gráfica de la curva estándar de albúmina. Se calculó la regresión lineal de los promedios de absorbancia a 600 nm de concentraciones conocidas de albúmina.

Tabla 3. Concentración de proteína en los lisados de fibroblastos NIH 3T3.

	Muestra	μl	$\mu\text{l H}_2\text{O}$	Bradford μl	Absorbancia (600nm)	$[\mu\text{g}/\mu\text{l}]$	Promedio $[\mu\text{g}/\mu\text{l}]$
Virus en sobrenad.	pH 7.06	1	9	190	0.514	4.440	4.501
	pH 7.06	1	9	190	0.527	4.562	
	pH 7.1	1	9	190	0.499	4.299	4.520
	pH 7.1	1	9	190	0.546	4.741	
Virus concent.	pH 7.06	1	9	190	0.609	5.332	5.455
	pH 7.06	1	9	190	0.635	5.577	
	pH 7.1	1	9	190	0.605	5.295	5.281
	pH 7.1	1	9	190	0.602	5.267	
	Control neg.	1	9	190	0.363	3.021	3.021

Se midió la absorbancia a 600 nm de cada muestra en una dilución final de 1:200, por duplicado. Utilizando la ecuación de la curva estándar de BSA se calcularon las concentraciones en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cada muestra y se obtuvo el promedio por duplicados, excepto control negativo.

Titulación de los vectores GIA y GNIA.

Para tener un estimado de la cantidad de partículas infectivas presentes en las alícuotas de los vectores GIA y GNIA se calculó su título utilizando una modificación del método de placa para la determinación de infectividad viral, al transducir fibroblastos NIH 3T3 con diluciones seriadas de estos. De acuerdo con este método, la infectividad de los lotes retrovirales se expresa como unidades formadoras de placas, o en este caso colonias (ufc) por unidad de volumen (Flint, 2000). El principio de este método es el siguiente: debido a que ambos vectores expresan a la GFP como reportera, es posible distinguir a las células transducidas al excitarlas con una lámpara de mercurio y un filtro que permita la excitación a 475 nm y otro que permita detectar la fluorescencia emitida a 516 nm. En cultivos en monocapa, una célula transducida es capaz de dividirse y generar nuevas células GFP+ de forma clonal hasta formar colonias. Cada una de estas colonias habrá sido por tanto generada a partir de una sola unidad infectiva de partículas retrovirales, que es entonces por definición, la unidad de partículas virales capaz de infectar a una célula y se expresa en este caso en ufc. Por tanto, al calcular la cantidad de ufc contenidas en una unidad definida de

volumen (por ejemplo, ml), es posible tener un valor estándar de comparación para las transducciones de los diferentes lotes retrovirales.

La titulación de los lotes retrovirales se realizó como se explica a continuación:

1. Un vial de fibroblastos NIH 3T3 fue descongelado y sembrado en un plato de cultivo de 10 cm con 6 ml de medio DMEM + SFB y se dejó incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 10 días, reemplazando el medio por medio fresco cuando su color se tornaba amarillento (ácido; después de 5 a 6 días aprox.).
2. Posteriormente, las células fueron despegadas y expandidas en 3 platos de 10 cm que se dejaron en incubación durante 7 días más.
3. Para ser transducidos con los VR, los fibroblastos fueron despegados y sembrados en 4 platos de cultivo de 24 pozos y dejados en incubación toda la noche.
4. Se utilizó una alícuota de cada condición: virus GIA y GNIA concentrados y en sobrenadante, para preparar doce diluciones seriadas de los virus y transducir un plato de cultivo de 24 pozos, de cada condición. Cada dilución se hizo por duplicado.
5. La dilución inicial se preparó agregando 5 µl de la respectiva alícuota viral en dos pozos con 545 µl de medio DMEM + SFB, es decir, una concentración 1:100 ó 1×10^{-2} . En los pozos restantes se tenía previamente un volumen de 450 µl de medio DMEM + SFB.
6. Se homogeneizó el medio girando suavemente la caja y posteriormente se tomaron 50 µl del medio de cada pozo que fueron pasados al pozo de la siguiente dilución.
7. El paso anterior se repitió hasta completar los pozos correspondientes a la última dilución (Fig. 12).
8. Las células en contacto con los virus fueron dejadas en incubación a 37°C con 5% de CO₂ durante 3 días, al cabo de los cuales se les retiró el medio, fueron lavados 2 veces con 500 µl de PBS y por último las células de cada pozo fueron fijadas con 500 µl de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos a 4°C.

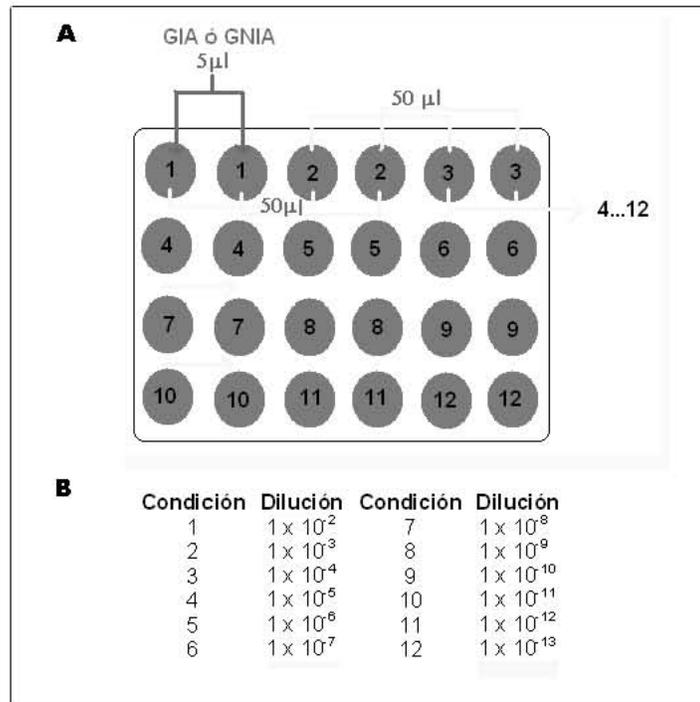


Fig. 12. Titulación de los vectores GIA y GNIA. A) Representación esquemática del diseño experimental utilizado en la titulación de los VR. Se utilizó un plato de 24 pozos con fibroblastos NIH 3T3 para cada preparación de virus concentrados y en sobrenadante. **B)** Concentraciones finales de los lotes retrovirales en cada condición. Cada condición se realizó por duplicado.

9. Una vez fijadas las células, se retiró el PFA, se lavó cada pozo dos veces más con PBS.
10. Los platos fueron protegidos de la luz y almacenados a 4°C con 500 μ l de PBS en cada pozo.
11. Para obtener un estimado de la cantidad de partículas infectivas por unidad de volumen presentes en cada uno de los lotes retrovirales, se observó a las células bajo un microscopio de fluorescencia. Las células transducidas con los VR expresaban a la GFP y de acuerdo con la dilución utilizada, en algunos casos fue posible distinguir colonias de células GFP+ de origen clonal.
12. Se cuantificó el número de colonias en las diluciones en que estas eran discretas (< a 100 colonias por pozo), lo que nos dio un estimado del número de ufc/ml de solución viral.

13. El número de ufc fue multiplicado por la dilución del pozo en que se encontraba. En los casos en que varias diluciones tenían menos de 100 colonias se sacó un promedio por condición para obtener el valor final del título de cada lote retroviral.

Cultivos primarios de CMN de corteza cerebral de rata E14

Se utilizaron ratas hembras gestantes de E14 días proporcionadas por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular, las cuales fueron sacrificadas por decapitación para obtener a los embriones en E14 a partir de los cuales se obtuvieron las CMN de corteza cerebral.

Disección de células de corteza de rata del día embrionario 14 (E14).

Todos los instrumentos utilizados y el área de trabajo fueron desinfectados con etanol 70%.

1. Practicando una incisión en la parte baja abdominal de la rata con fetos, se le extrajo el útero, el cual contenía a los embriones.
2. El útero fue colocado inmediatamente en una caja petri enfriada en hielo con solución salina para mantener tejidos (Krebs • Mg^{2+} • BSA). Por cada rata se obtuvieron de 10 a 18 embriones aproximadamente.
3. Mientras eran mantenidos en solución fisiológica, los embriones fueron extraídos del útero, se removieron los sacos vitelinos y sus cabezas fueron separadas y puestas en otro plato con solución nueva (Fig.13).
4. Utilizando un microscopio estereoscópico se realizaron disecciones de la región media de la corteza en cada hemisferio cerebral de los embriones. Las porciones obtenidas fueron pasadas a un plato con solución nueva (Fig.13).

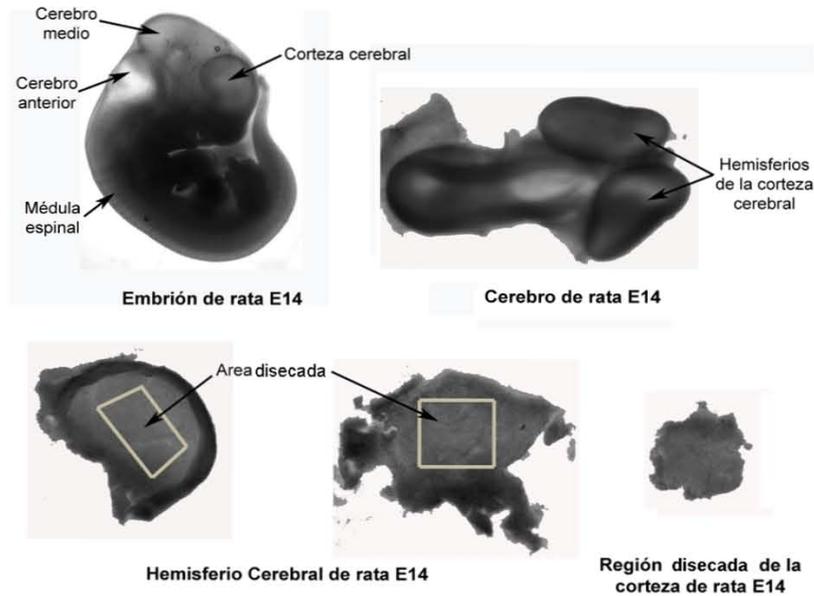


Fig. 13. Disección de CMN de la corteza cerebral de ratas E14. Los embriones son obtenidos de hembras con 14 días de gestación, de los cuales se extrajo el cerebro para obtener los hemisferios cerebrales. Los rectángulos muestran la región disectada de cada hemisferio cerebral que fue utilizada para la obtención de CMN.

Cultivo primario de células de corteza de rata E14.

Las CMN de corteza cerebral de rata E14 fueron sembradas en platos de cultivo de 10 cm de diámetro, para ser expandidas y posteriormente sembradas a platos de 24 pozos con cubreobjetos de vidrio a una densidad inicial de 10 000 células por pozo. Los cultivos de CMN fueron mantenidos con 10 ng/ml de bFGF como mitógeno (Fig. 14).

1. Una vez obtenidos los tejidos, éstos fueron recuperados en un tubo Falcon de 15 ml junto con la solución fisiológica en que estaban suspendidos y centrifugados a 1000 rpm (200 x g) en una centrífuga de mesa Thermo Forma durante 5 minutos a 4°C.
2. El sobrenadante fue descartado y al botón que contenía los fragmentos de tejido se le agregaron 900 µl de solución fisiológica nueva.
3. Los fragmentos de tejido fueron disgregados mecánicamente con la ayuda de una punta de micropipeta de 1 000 µl (P1000), subiendo y bajando la suspensión a través de la punta de 6 a 8 veces para deshacer el tejido y obtener las células en suspensión.

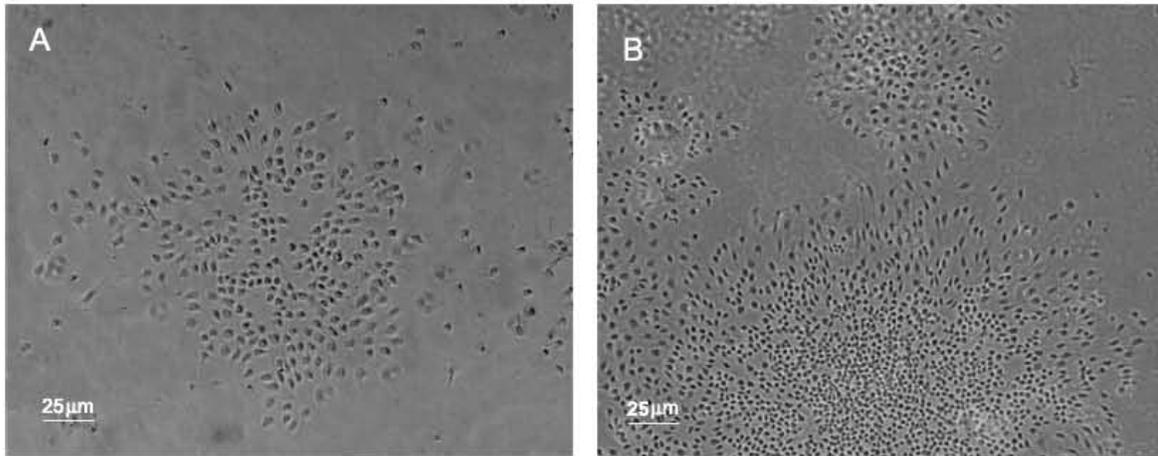


Fig. 14. Cultivos en P1 de CMN de corteza cerebral de rata E14. Imágenes en campo claro de los cultivos en P1 de CMN de corteza cerebral de rata extraídas de embriones en E14. La morfología de estas células en proliferación es en general de circular a ovoide, con somas compactos y pocas prolongaciones celulares; las células crecen formando colonias circulares. **A)** Cultivo en etapas iniciales de P1. **B)** Cultivo en P1 después de 3 a 4 días de proliferación. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 20X.

4. La suspensión se dejó reposar durante 3 a 5 min. para que los fragmentos no disociados sedimentaran.
5. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, es decir, las células en suspensión, cuidando de no tomar los fragmentos no disociados y se transfirió a un tubo nuevo.
6. En el primer tubo se agregó un ml de solución Krebs y se repitieron los pasos 3, 4 y 5, recuperando el sobrenadante obtenido en el nuevo tubo junto con el obtenido anteriormente.
7. La suspensión obtenida fue centrifugada nuevamente a 200 x g por 5 minutos a 4°C para sedimentar a las células.
8. Una vez obtenido el botón celular, se retiró el sobrenadante del tubo y se agregaron de 1 a 2 ml (dependiendo el tamaño del botón obtenido) de medio N2 y el botón celular fue resuspendido con ayuda de una punta P1000 para obtener una suspensión celular.
9. Una vez hecho esto, se cuantificó la cantidad de células obtenidas por ml de medio utilizando una cámara de Neubauer. El conteo se realizó bajo el mismo protocolo que en el caso de los fibroblastos de ratón.

10. Una vez calculado el número de células obtenido, se sembraron de 1 a 1.4 millones de células por plato de cultivo de 10 cm de diámetro, previamente tratadas con poli-ornitina (PLO) [15 µg/ml] y fibronectina (Fn) [1 µg/ml] en 7 ml finales de medio N2 y 10 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) .
11. Estos cultivos, denominados en pasaje cero (P0), fueron incubados a 37°C con 5% de CO₂ para su expansión con una adición diaria de bFGF a una concentración final de 10 ng/ml y cambiando el medio cada 2 días, hasta alcanzar una confluencia de 60 a 80%, aproximadamente en 4 a 6 días.

Pasaje de cultivos primarios de CMN de corteza cerebral de rata (E14).

Una vez que los cultivos P0 llegaban a la confluencia deseada, se procedió a despegar a las células y resembrarlas en cajas de 24 pozos (ahora P1) que contenían un cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro en el fondo, previamente tratados con PLO y Fn.

1. Se retiró el medio de cultivo de cada caja P0 y se hicieron 2 lavados de 5 minutos a cada caja con 5 ml de PBS con EDTA 0.1 mM.
2. Posteriormente se agregaron 7 ml de PBS-EDTA nuevo y dejó incubar cada caja a 37°C y 5% de CO₂ durante 20 minutos para despegar a las células.
3. El paso anterior era repetido de ser necesario, es decir, si la mayor parte de las células no se despegaba al cabo de este tiempo.
4. Las células en suspensión fueron recuperadas en tubos Falcon y centrifugadas a 200 x g durante 15 minutos a 4°C.
5. Se retiró el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 1 a 2 ml de medio N2 nuevo, dependiendo del tamaño del botón.

6. Se calculó la cantidad de células por ml utilizando una cámara de Neubauer y se sembraron 10 000 células por pozo en platos de cultivo de 24 pozos con 400-500 μ l de medio N2 y 10 ng/ml de bFGF.
7. El mantenimiento de estas células, en P1, se realizó de la misma manera que los cultivos en P0, es decir, adicionando bFGF diariamente y cambiando el medio cada 2 días.

Transducción de CMN de corteza cerebral de rata E14 con los vectores GIA y GNIA.

Al obtener una confluencia de aproximadamente 50% en los cultivos en P1 de CMN de corteza cerebral de rata E14 (1 o 2 días después de ser sembrados), éstos eran infectados con los vectores retrovirales GIA y GNIA.

Se utilizaron 6 condiciones diferentes por duplicado para los cultivos en P1 que fueron preparadas como sigue:

- a) **G1**: células transducidas con 11.4 μ l (800 ufc) del vector GIA en sobrenadante, en 488.6 μ l de medio N2 + bFGF 10 ng/ml final.
- b) **G2**: células transducidas con 0.31 μ l (280 ufc) del vector GIA concentrado, en 500 μ l de medio N2 + bFGF 10 ng/ml final.
- c) **N1**: células transducidas con 350 μ l (400 ufc) del vector GNIA en sobrenadante, en 150 μ l de medio N2 + bFGF 10 ng/ml final.
- d) **N2**: células transducidas con 3.7 μ l (140 ufc) del vector GNIA concentrado, en 500 μ l medio N2 + bFGF 10 ng/ml final.
- e) **LIF**: células sin VR tratadas con 0.5 μ l de factor inhibidor de la leucemia (LIF; concentración final 1000 unidades/ml) en 500 μ l de medio N2 + bFGF 10 ng/ml final.
- f) **Control**: células sin VR en 500 μ l de medio N2 + bFGF 10 ng/ml final.

1. Se retiró el medio de cultivo de los pozos a transducir y se reemplazó por el volumen correspondiente de medio fresco.
2. Se agregó la cantidad de retrovirus correspondiente a los pozos de cada condición por duplicado.
3. Se agregaron 0.5 μ l de solución concentrada (1 000 X) de bFGF a cada pozo y las cajas se dejaron incubar a 37°C con 5% de CO₂.
4. En las condiciones transducidas con los VR, el medio se dejó sin cambiar durante 3 días en los que únicamente se agregó bFGF a diario. En las condiciones LIF y Control, el medio fue cambiado 2 días después y también se agregó bFGF y LIF en la condición que lo requería, a diario.
5. Tres días después de la transducción, se cambió el medio a los pozos con VR por 500 μ l de medio N2 fresco + bFGF 10 ng/ml. Las células transducidas fueron mantenidas en cultivo durante 1 o 2 días más después de retirar a los virus y en presencia de FGF para mantener un ambiente de proliferación.
6. Al cabo de este periodo, se tomó uno de los duplicados (cubreobjetos) de cada condición en proliferación y se pasó a un plato nuevo, para ser fijado.
7. La fijación de las células en proliferación se realizó de la misma forma que en el paso 8 de la titulación de los VR. Los cubreobjetos fueron almacenados a 4°C con 500 μ l de PBS hasta teñirlos mediante inmunofluorescencia.
8. Al resto de los cubreobjetos se les cambió el medio por 500 μ l de medio N2 fresco + ácido ascórbico a una concentración final de 200 μ M, sin bFGF. Al retirar al bFGF, que es un mitógeno al que responden las CMN, se promueve la diferenciación de las células en cultivo.
9. Las células fueron mantenidas en estas condiciones de diferenciación durante 6 días, cambiando el medio cada 2 días por N2 fresco + ácido ascórbico.

10. Al cabo de este tiempo se removió el medio de los pozos restantes y éstos fueron fijados de la misma forma que los cubreobjetos en fase de proliferación.

Inmunofluorescencia de las CMN en cultivos control y transducidas con los vectores GIA y GNIA.

Para determinar la cantidad y los tipos celulares generados a partir de las CMN que fueron transducidas y compararlas con los cultivos controles, los cubreobjetos fijados con PFA fueron teñidos con diferentes anticuerpos para visualizar algunos de los tipos celulares presentes con la técnica de inmunofluorescencia.

En los cultivos fijados en fase de proliferación se analizó la presencia de CMN mediante la tinción un anticuerpo contra nestina hecho ratón (monoclonal de clase IgG1 en dilución 1:100), de neuronas jóvenes positivas al anticuerpo TuJ1 (contra β -Tubulina III) hecho en ratón monoclonal IgG2a en dilución 1:1000 o policlonal de conejo en dilución 1:2000; y de células gliales astrocíticas positivas a un anticuerpo contra la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) con un anticuerpo policlonal de conejo en dilución 1:1000 o monoclonal de rata IgG2a en una dilución 1:100. Mientras que en los cultivos fijados después de la fase de diferenciación se analizó la presencia de células positivas a TuJ1 y GFAP.

En los últimos dos experimentos, se utilizó también un anticuerpo policlonal de conejo contra GFP en una dilución 1:500 o monoclonal de ratón (IgG2a) [1:100] para visualizar a las células transducidas con los VR.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 488 (fluorescencia verde) hecho en cabra, anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 568 (fluorescencia roja) hecho en cabra, anti-IgG2a de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC; fluorescencia verde) hecho en cabra, anti-IgG de rata acoplado a Alexa

350 (fluorescencia azul) hecho en cabra y anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 350 hecho en cabra. Todos los anticuerpos secundarios fueron utilizados en concentraciones de [1:500].

El procedimiento para la tinción con inmunofluorescencia se realizó como sigue:

1. Los cubreobjetos con las células fijadas fueron bloqueados con 500 μ l de la solución de bloqueo PBS con 10% de suero normal de cabra (NGS) y Tritón X-100 al 0.3 % durante una hora a TA, con agitación continua.
2. Se retiró la solución de bloqueo y los pozos fueron lavados con 500 μ l de PBS 3 veces durante 5 minutos cada vez, con agitación.
3. Se aplicaron los anticuerpos primarios disueltos en 20 μ l de PBS con 10% de NGS y se dejaron incubar 2 horas a TA o toda la noche a 4°C cubriendo cada cubreobjetos con un círculo de Parafilm.
4. Se recuperaron los anticuerpos (estos fueron utilizados 2 veces más) y se lavaron los pozos con 500 μ l de PBS 3 veces durante 5 minutos cada vez, con agitación.
5. Posteriormente, se aplicaron los anticuerpos secundarios en 300 μ l de PBS 10% NGS y se dejaron incubar durante 2 horas a TA o toda la noche a 4°C con agitación continua, protegiendo a las cajas de la luz.
6. Se recuperaron los anticuerpos (que también fueron reutilizados hasta 2 veces más) y se lavaron los pozos con 500 μ l de PBS 3 veces durante 5 minutos cada vez, con agitación.
7. Finalmente se agregaron 500 μ l de PBS por pozo y los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos de vidrio con medio de montaje para fluorescencia a base de agua.
8. Las preparaciones montadas fueron etiquetadas y se dejaron secar durante toda la noche protegidas de la luz.

Cuantificación de los tipos celulares obtenidos y análisis estadístico.

Las preparaciones montadas fueron observadas al microscopio de fluorescencia y se tomaron fotos de las diferentes condiciones con ampliaciones de 20X, 40X y 100X. Se fotografiaron los canales separados para fluorescencia azul, verde y roja.

Las fotografías de los diferentes canales correspondientes al mismo campo fueron empalmadas utilizando el programa Adobe Photoshop 7.0 y se utilizaron de 4 a 7 campos por condición para cuantificar el número de células positivas a Nestina, β -Tubulina III, GFAP y GFP presentes, de acuerdo a cada condición, en las preparaciones de células en proliferación y en el caso de las células diferenciadas, el número total de células por campo y el número células β -Tubulina, GFAP y GFP positivas en cada caso. Para la cuantificación del total de células por campo se utilizó el programa Image J.

Las medias de los experimentos \pm el error estándar fueron graficadas utilizando el programa Graph Pad Prism 2.01 y el análisis estadístico de los datos se realizó mediante las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y t de Student-Newman-Keuls con un valor de confianza de 95%, utilizando el programa WINKS 4.80a.

Resultados

Se prepararon tres lotes diferentes de vectores retrovirales.

Los plásmidos pGIA, pGNIA y pVSV-G fueron amplificados y purificados por maxiprep obteniendo concentraciones de 1.215 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1.52 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de plásmido respectivamente en 300 μl de amortiguador TE pH 8.0 (Tabla 1). Estos plásmidos fueron utilizados para la preparación de los vectores GIA, GNIA y GLuc.

Las partículas virales fueron ensambladas y transducidas correctamente, no obstante la concentración por ultracentrifugación no fue eficiente.

Se utilizó al vector GLuc como control del ensamblaje y la capacidad de infección de las partículas virales generadas con la proteína VSV-G, mediante la medición de la intensidad de bioluminiscencia emitida por lisados de fibroblastos NIH 3T3 transducidos con virus GLuc concentrados por ultracentrifugación y en sobrenadante. Los resultados obtenidos a partir del promedio de las 2 mediciones realizadas fueron normalizados con respecto a la lectura basal del blanco y divididos entre los μg de proteína presentes en cada muestra analizada (ver Tabla 3) para obtener un estimado de las URL por μg de proteína en cada muestra; estos resultados se muestran en la Tabla 4.

La cantidad de URL/ μg de proteína obtenida en las muestras transducidas por los VR en sobrenadante fue mayor a la obtenida por los lisados transducidos con VR concentrados. Además, la cantidad de bioluminiscencia observada en los lisados de vectores en sobrenadante preparados a pH 7.1 es muy superior a la presentada por los lisados de pH 7.06 (Fig. 15), por lo que se decidió utilizar este pH para la preparación de los lotes retrovirales GIA y GNIA.

Tabla 4. Cuantificación de bioluminiscencia en lisados de células NIH 3T3 transducidas con el vector GLuc.

Muestra	URL 1 2	Promedio URL	Muestra – blanco	[µg/ muestra]	URL/µg proteína	
Blanco	240	245	0	0	0.00	
Control negativo	317	250	38.5	604.2	0.064	
pH 7.06 concentrado	48062	49249	48655.5	48410.50	1056.2	45.83
pH 7.1 concentrado	50125	55734	52929.5	52684.50	1091	48.29
pH 7.06 sobrenadante	3122890	2877475	3000182.5	2999937.50	900.2	3332.52
pH 7.1 sobrenadante	49180956	49101676	49141316	49141071.00	904	54359.59

Se realizaron mediciones por duplicado de la bioluminiscencia emitida para cada condición, expresada en URL (unidades relativas de luz). El promedio de dichas mediciones fue normalizado con respecto al control y dividido entre la cantidad de proteína, en µg, presente en las muestras.

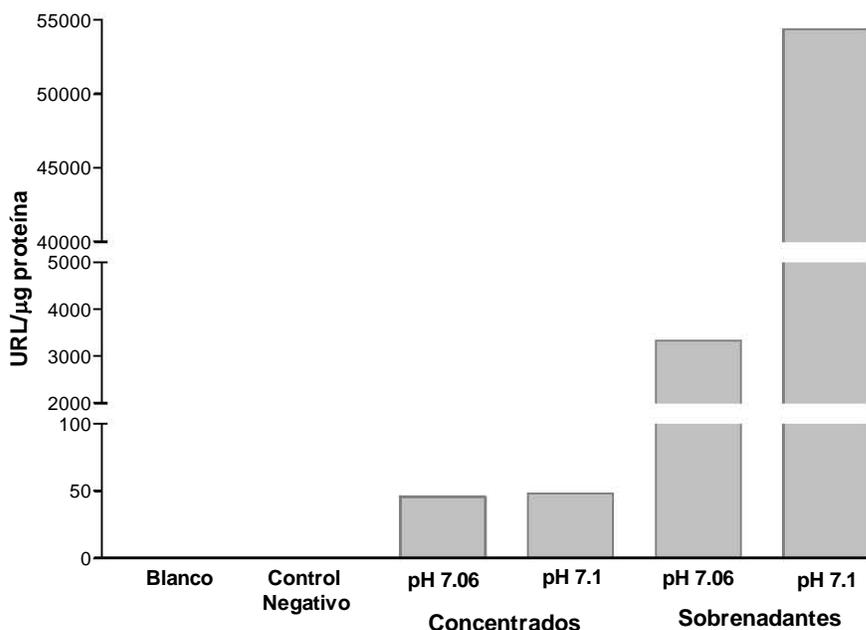


Fig. 15. Bioluminiscencia emitida por lisados de células NIH 3T3 transducidas con GLuc. La cantidad de bioluminiscencia, expresada en URL (unidades relativas de luz) /µg de proteína, fue mayor en los lisados transducidos con el vector GLuc en sobrenadante que en los lisados transducidos con los VR concentrados por ultracentrifugación. Adicionalmente, la cantidad de bioluminiscencia presente en las muestras transducidas con VR en sobrenadante a pH 7.1 fue 16 veces superior a la de pH 7.06.

Al concentrar a los virus GIA y GNIA obtuvimos un título mayor que los virus en sobrenadante, pero menor a lo reportado para estos vectores.

Los lotes retrovirales GIA y GNIA concentrados por centrifugación y presentes en el sobrenadante, fueron preparados con HeBS pH 7.1 y usados para transducir fibroblastos NIH 3T3 para su titulación. Se realizaron diluciones seriadas por duplicado, como ya se

explicó en la metodología, y se cuantificó el número de colonias (representadas como ufc) positivas a GFP, presentes en las diluciones donde éstas eran discretas, para asegurar su origen clonal. El número de colonias, multiplicado por la dilución en que se cuantificaron nos dio un estimado directo del número de ufc/ml presentes en las preparaciones virales y representó por tanto el título retroviral de cada lote. Los resultados de la determinación de ufc/ml se presentan en la Tabla 5. En los virus que fueron concentrados por ultracentrifugación obtuvimos un título mayor al obtenido en los sobrenadantes, sin embargo el título fue menor a lo reportado por la literatura (Gaiano *et al.*, 1999)

Tabla 5. Determinación del título de los lotes retrovirales GIA y GNIA.

	Pozo	Dilución	# ufc	ufc/ml	Promedio ufc/ml
GIA sobrenadante	1a	1:1000	35	35000	35000
	1b	1:1000	35	35000	
GNIA sobrenadante	2a	1:100	19	1900	2300
	2b	1:100	27	2700	
GIA concentrado	3a	1:10 000	56	560000	440000
	3b	1:10 000	32	320000	
GNIA concentrado	4a	1:1000	97	97000	77500
	4b	1:1000	58	58000	

El título de los lotes retrovirales GIA y GNIA, fue determinado utilizando una modificación del método de placa para la determinación de infectividad viral. Se cuantificó el número de colonias de las diluciones en donde éstas eran discretas, lo cual nos dio un estimado del número de ufc (unidades formadoras de colonias) /ml presentes en las preparaciones virales.

De acuerdo con el título obtenido, se calculó el volumen necesario en cada caso para realizar las transducciones de los VR en células P1 de corteza cerebral fetal de ratas E14, sembradas a una densidad inicial de 10 000 células por pozo en platos de cultivo de 24 pozos. Las transducciones se realizaron como se enumera a continuación: de los virus en sobrenadante GIA (G1), 400 ufc (11.4 µl), de los virus en sobrenadante GNIA (N1) 800 ufc (350 µl), de los virus concentrados GIA (G2), 140 ufc (0.31 µl) y por último de los virus concentrados GNIA (N2), 281 ufc (3.7 µl).

El patrón de expresión de la GFP en las células transducidas con el vector GNIA difiere del de las células transducidas con GIA.

Las CMN de corteza cerebral de rata E14 fueron transducidas con los vectores GIA o GNIA, uno o dos días después de haber sido sembradas en los platos de cultivo de 24 pozos. El éxito de la transducción se verificó por la expresión del gen reportero de GFP en los cultivos. En el caso de las células transducidas con el vector GIA se observó la expresión de la GFP en todo el cuerpo celular, es decir, soma y prolongaciones celulares, mientras que en células transducidas con el vector GNIA la expresión de la GFP se localizó únicamente en el núcleo de las células (Fig. 16).

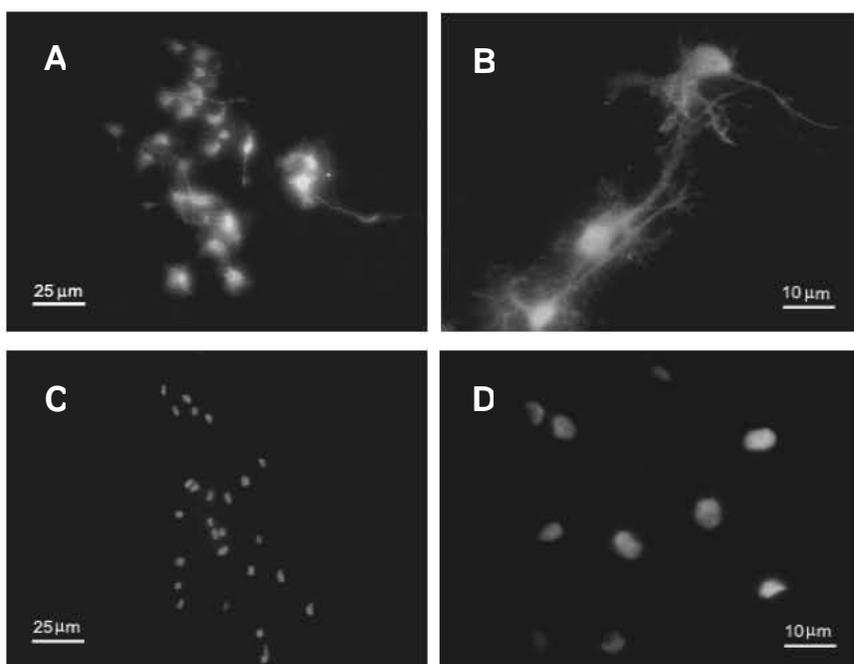


Fig. 16. CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores retrovirales GIA y GNIA. A y B) Expresión del vector GIA en CMN de corteza cerebral de rata E14. La proteína de fusión GFP-ICN1 se expresa de manera homogénea en todas las células transducidas con este vector, es decir, se observa expresión de la GFP tanto en soma como en las prolongaciones celulares. A) 40X; B) 100X. C y D) Expresión del vector GNIA en CMN de corteza cerebral de rata E14. La proteína de fusión GFP-ICN1 se expresa únicamente en el núcleo de las células transducidas. C) 40X; D) 100X.

Las CMN en condiciones de proliferación expresan mayoritariamente nestina y al ser tratadas con LIF se diferencian a astrocitos.

Los cultivos de CMN transducidos con los vectores GNIA (N1 y N2) y GIA (G1 y G2), en condición control y de tratamiento con el factor inhibidor de la leucemia fueron teñidos con anticuerpos contra diferentes marcadores de destinos neurales para analizar y cuantificar su

presencia en condiciones de proliferación (con bFGF) y de diferenciación (N2 + ácido ascórbico).

Se analizó la presencia del marcador de CMN nestina, del marcador de neuronas jóvenes β -Tubulina III y del de células gliales astrocíticas GFAP en los cultivos mantenidos en condiciones de proliferación, mediante dobles tinciones contra nestina y β -tubulina III (Figs. 17 y 19) ó nestina y GFAP (Figs. 18 y 20), además de la presencia de células positivas a GFP transducidas con los virus GIA y GNIA (Figs. 19 y 20).

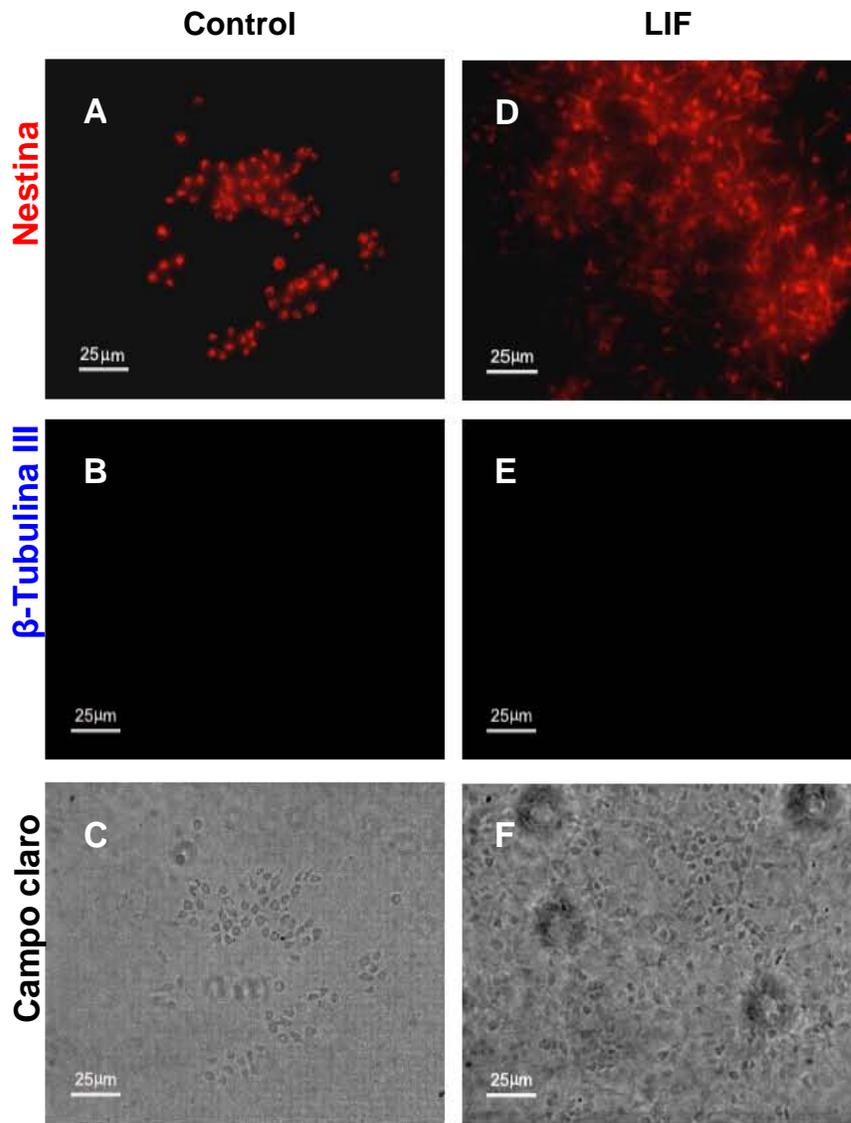


Fig. 17. Inmunofluorescencia para detectar nestina y β -tubulina III en CMN de corteza cerebral de rata E14 en condiciones control y tratadas con LIF. **A-C)** CMN control después de 4 a 5 días de cultivo en condiciones de proliferación. El 85.84% de las células son positivas a nestina; 0.48% coexpresa nestina y β -Tubulina III y 0.1% expresa β -tubulina III. **D-F)** CMN tratadas con LIF durante 4 a 5 días en condiciones de proliferación, 98.85% de las células son positivas a nestina, 0.49% coexpresa nestina y β -tubulina III y 0.02% expresa β -tubulina III. Las fotografías se tomaron con objetivo 40 X. LIF: factor inhibidor de la leucemia.

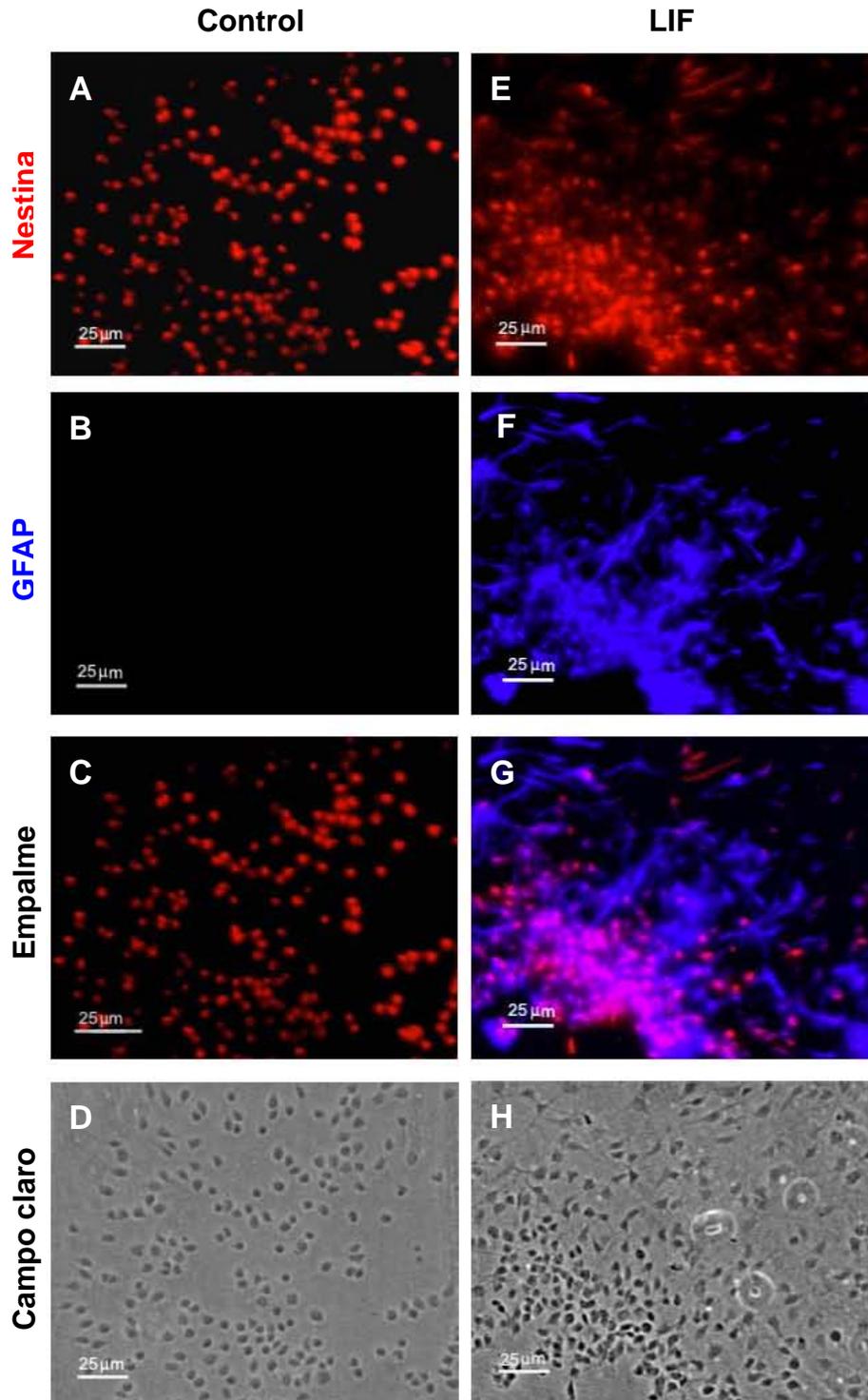


Fig. 18. Inmunofluorescencia para detectar nestina y GFAP en CMN de corteza cerebral de rata E14 en condiciones control y tratadas con LIF. A-D) CMN después de 5 a 6 días de cultivo en condiciones de proliferación, 82.4% de las células expresan nestina y 0.36% coexpresa nestina y GFAP. **E-H)** CMN tratadas con LIF 4 a 5 días en condiciones de proliferación. 98.35% de las células expresa nestina, 56.5% del total coexpresa nestina y GFAP y 0.05 % de las células expresan GFAP. Las fotografías se tomaron con objetivo 40 X. LIF: factor inhibidor de la leucemia.

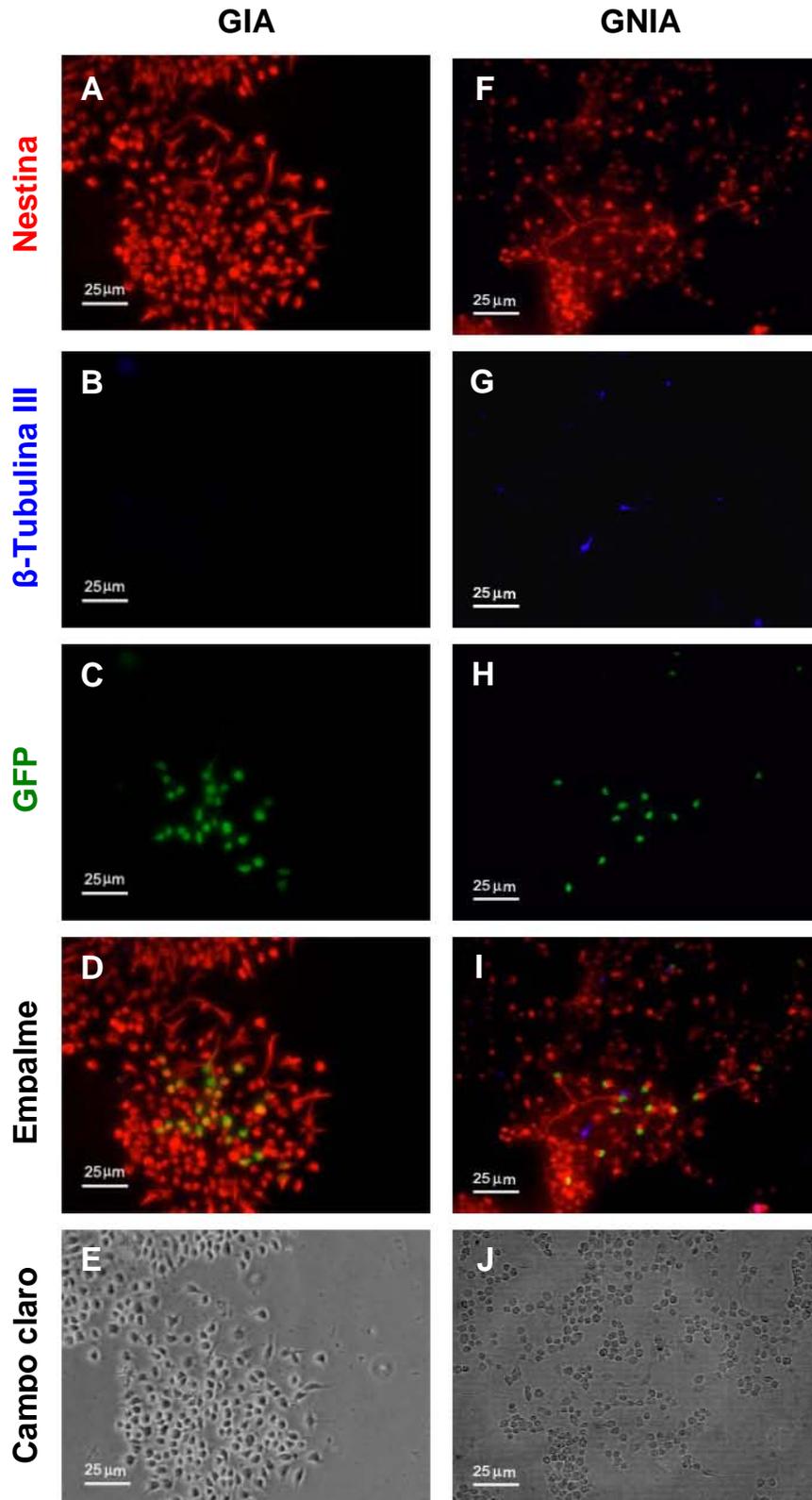


Fig. 19. Inmunofluorescencia contra nestina y β-Tubulina III en CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores GIA y GNIA.

A-E) CMN cultivadas en condiciones de proliferación 2 a 3 días después de la transducción con GIA. 93.85% de las células con positivas a nestina, 0.48% coexpresan nestina y β-Tubulina III, 0.62% expresa solo β-Tubulina III y 6.76% expresan GFP. **F-J)** CMN cultivadas en condiciones de proliferación 2 a 3 días después de la transducción con GNIA. 97.75% de las células expresan nestina, 0.72% coexpresan nestina y β-Tubulina III, 0.01% expresan solo β-Tubulina III y 3.33 % expresan GFP. Las fotografías se tomaron con objetivo 40 X.

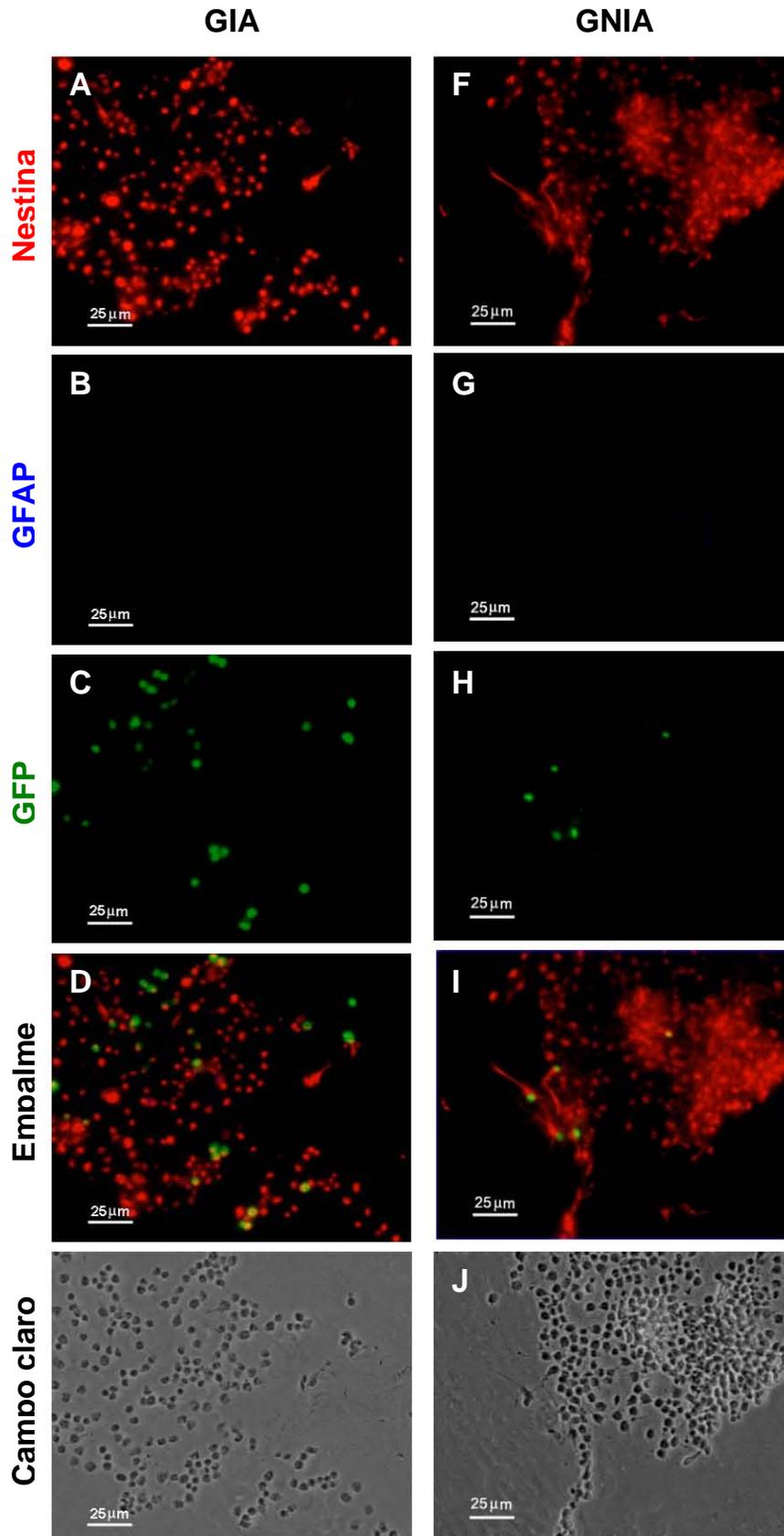


Fig. 20. Inmunofluorescencia contra nestina y GFAP en CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores GIA y GNIA.

A-E) CMN cultivadas en condiciones de proliferación 2 a 3 días después de las transducción con GIA. 95.45% de las células son positivas a nestina, 0.01% co-expresa nestina y GFAP, 0.04% expresan sólo GFAP y 7.7% expresan GFP. **F-J)** CMN cultivadas en condiciones de proliferación 2 a 3 días después de la transducción con GNIA. 98% de las células expresan nestina, 4.62% co-expresan nestina y GFAP, 0.11% expresan únicamente GFAP y 8-91% expresan GFP. Las fotografías se tomaron con el objetivo de 40X.

Las CMN en

condiciones de proliferación expresaron mayoritariamente al marcador de células neurales indiferenciadas nestina (Figs. 17 a 20; Tabla 6), sin presentar ninguna diferencia significativa entre las diferentes condiciones (Fig. 21). La expresión de los marcadores β -Tubulina III y GFAP fue menor al 1% en las 4 condiciones y no se observó ninguna diferencia significativa en cuanto a su expresión entre los tratamientos. En la mayoría de los casos fue posible observar células que co-expresaban a los marcadores nestina y β -Tubulina III o nestina y GFAP, aunque con poca frecuencia (Tabla 6). En el caso de la co-expresión de nestina y β -Tubulina III no se observó una diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los tratamientos; por otro lado, en el tratamiento con LIF se observó que el 54.55% de las células co-expresaban nestina y GFAP, lo cual representó una diferencia estadísticamente significativa con respecto a el resto de los tratamientos (Fig. 21).

El porcentaje de células positivas a GFP en los tratamientos N1 (virus GNIA en sobrenadante) y G1 (virus GIA en sobrenadante) con respecto al total de células representó el porcentaje de transducción para cada caso. En el tratamiento N1 se obtuvo un porcentaje de transducción del 6.12% y en el tratamiento G1 de 7.14% (Tabla 6). No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones (Fig. 21).

Tabla 6. Cuantificación de marcadores neurales y células GFP+ en cultivos de CMN de corteza cerebral de rata E14 en condiciones de proliferación.

	% Nestina	% Nes/ β -Tub	% β -Tubulina	% Nes/GFAP	% GFAP	% GFP
Control	84.13 \pm 7.72	0.49 \pm 0.32	0.09 \pm .09	0.36 \pm 0.27	0.00	---
LIF	98.61 \pm 0.35	0.49 \pm 0.49	0.02 \pm .02	54.55 \pm 6.01	0.05 \pm 0.05	---
N1	97.88 \pm 0.58	0.73 \pm 0.58	0.01 \pm .01	3.47 \pm 2.02	0.11 \pm 0.04	6.12 \pm 1.93
G1	94.66 \pm 1.82	0.48 \pm 0.45	0.62 \pm 0.59	0.01 \pm 0.01	0.04 \pm 0.04	7.24 \pm 1.7

Se cuantificó el número de células positivas a nestina, β -Tubulina III, GFAP y que co-expresaban nestina y β -Tubulina III o nestina y GFAP para las condiciones control, LIF, N1 y G1; en las condiciones N1 y G1 transducidas con los vectores GNIA y GIA, respectivamente, se cuantificó el número de células positivas a GFP. La Tabla muestra el promedio de los porcentajes totales de todos los experimentos analizados \pm el error estándar (n=4).

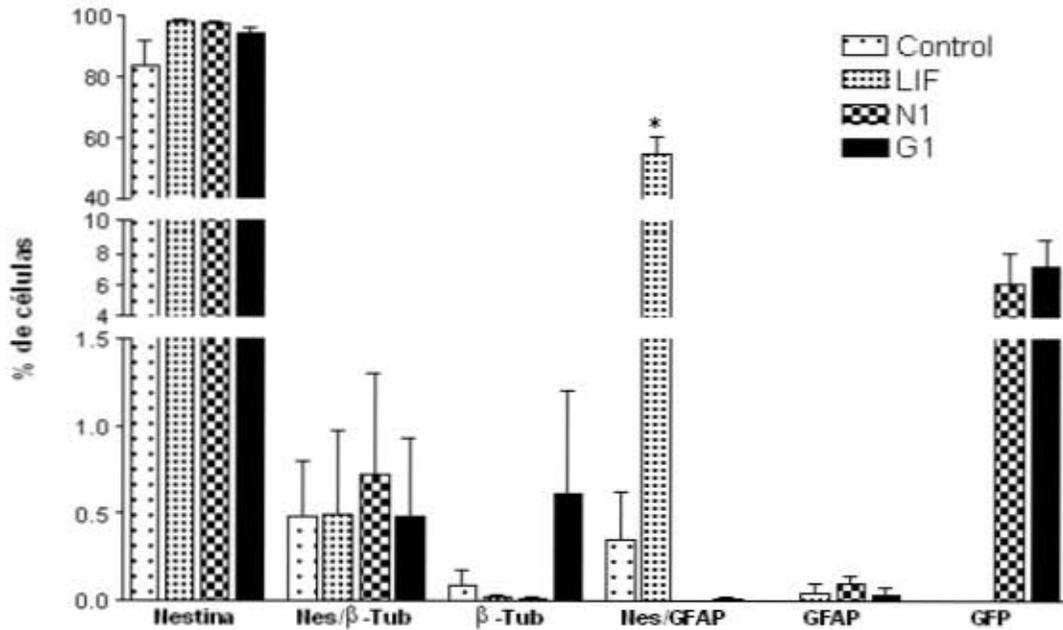


Fig. 21. Análisis de la expresión de marcadores neurales y del porcentaje de transducción en los cultivos en proliferación de CMN de corteza cerebral de rata E14. La mayor parte de las células expresan nestina, no existe ninguna diferencia significativa en este caso para las 4 condiciones. Tampoco se observaron diferencias significativas en el número de células positivas a β -Tubulina III (β -Tub), que co-expresaban nestina y β -Tubulina III (Nes/ β -Tub) ni en el número de células positivas a GFAP para ninguna condición. En las células tratadas con LIF se observó que 54.55% de las células co-expresaban nestina/GFAP (Nes/GFAP). Este aumento en la expresión fue estadísticamente significativo con respecto a las demás condiciones (ANOVA; Newman-Keuls, $p < 0.001$). No se observó ninguna diferencia significativa al comparar a las otras 3 condiciones. El porcentaje de transducción en las condiciones de CMN transducidas con los vectores GNIA y GIA fue 6.12% y 7.24% respectivamente, no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos. Los datos representan la media \pm el error estándar.

Se cuantificó el porcentaje de células positivas a los marcadores neurales nestina, β -Tubulina III y GFAP presentes en las células positivas a GFP de las condiciones N1 y G1 crecidas en presencia del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF; Tabla 7) como mitógeno para promover la proliferación celular. La mayor parte de las células transducidas expresa nestina. No se observó la expresión de β -Tubulina III en las células transducidas con el vector GNIA y en el caso de las células transducidas con el vector GIA sólo se observó en uno de los 4 experimentos analizados. La expresión de GFAP se observó en 2 de los 4 experimentos analizados para la condición N1 y en 1 de los 4 experimentos analizados para el caso de la condición G1; en todos los casos las células positivas a GFAP co-expresaban

también nestina. Cabe señalar que en el tratamiento N1 en muchas ocasiones la morfología de las células positivas a nestina era diferente a la presentada en las tinciones control para esta proteína, en estos casos las células presentaban varias prolongaciones y formas estrelladas (Figs. 19I y 20I). Aunque el porcentaje de células positivas a GFAP fue ligeramente mayor en la condición N1, al comparar los promedios de los experimentos analizados no se observó una diferencia estadísticamente significativa para ninguno de los marcadores en estas condiciones (Fig. 22).

Tabla 7. Cuantificación de los marcadores neurales presentes en células GFP+ provenientes de transfecciones con los vectores GNIA y GIA en condiciones de proliferación

	N1			G1		
	% Nestina	% bTub	% GFAP	% Nestina	% bTub	% GFAP
	98.73	0	---	79.64	1.71	---
	100	0	---	100	0	---
	98.15	0	---	98.44	0	---
	100	0	---	85.28	0	---
	96.23	---	0	94.58	---	0
	100	---	0	99.42	---	0
	100	---	11.27	100	---	0
	100	---	100	91.61	---	69.86
Promedio	99.14	0	27.82	93.62	0.43	17.47
Error	0.49	0	24.21	2.70	0.43	17.46

Porcentaje de células transducidas con los vectores GNIA y GIA (GFP+) positivas a nestina, β -Tubulina III o GFAP en los cultivos en proliferación de CMN de corteza cerebral de rata E14. Se muestran los promedios por experimento y el promedio final de todos los experimentos con su error estándar. n = 8 para nestina y n = 4 para β -Tubulina III y GFAP.

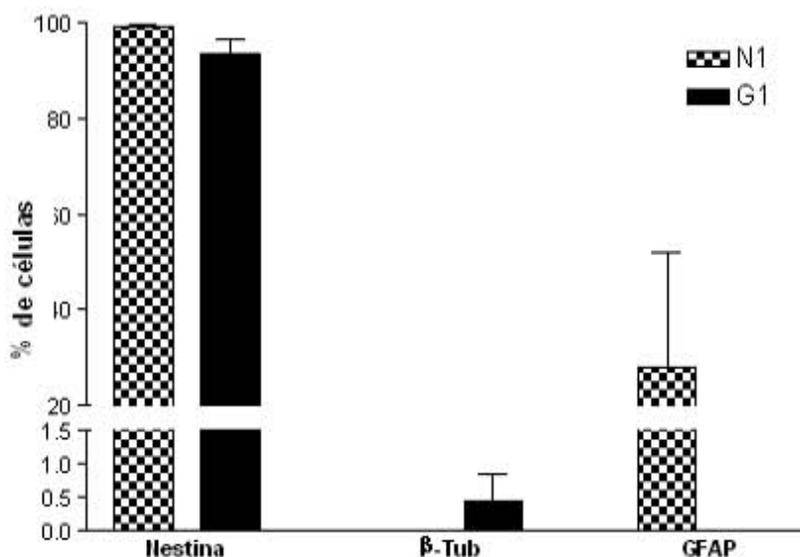


Fig. 22. Análisis de la expresión de marcadores neurales en cultivos en proliferación de CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores GIA y GNIA. La mayoría de las células GFP+ en ambas condiciones expresan nestina; no se observó expresión de β -Tubulina III en las células transducidas con el vector GNIA (N1) y su expresión en G1 fue sólo del 0.43%. En ambas condiciones, un porcentaje de las células positivas a nestina co-expresaba también GFAP este porcentaje fue ligeramente mayor en el caso de N1, sin embargo no se observó una diferencia significativa entre las dos condiciones. Los datos representan la media \pm el error estándar.

En condiciones de diferenciación, las CMN que sobre expresan al fragmento activo de Notch1 se diferencian preferentemente hacia astrocitos.

En el caso de las CMN cultivadas en condiciones de diferenciación, es decir, en ausencia del mitógeno bFGF y con ácido ascórbico, para reducir la oxidación del medio, se analizó la presencia de los marcadores β -tubulina III para neuronas jóvenes y GFAP para células astrocíticas. Se cuantificó el número de células GFP positivas transducidas con los virus GIA y GNIA que expresaban estos marcadores (Figs. 23 y 24). Para este caso se utilizaron dos condiciones diferentes para cada uno de los vectores retrovirales, virus en sobrenadante (N1 y G1) y los virus concentrados por ultracentrifugación (N2 y G2).

Los porcentajes de células positivas a cada marcador y a GFP se presentan en la Tabla 8. No se observó ninguna diferencia significativa en cuanto a la expresión de β -tubulina III en ninguna de las condiciones, pero para el marcador GFAP la condición tratada con LIF presentó un aumento estadísticamente significativo en la expresión (20.83%) con respecto al resto de las condiciones (Fig. 25). En los cultivos transducidos con los vectores GIA y GNIA obtuvimos, para el caso de los virus en sobrenadante, un 3.19 % de células positivas a GFP en el tratamiento N1 y 6.62% en el tratamiento G1. En los tratamientos con los virus concentrados obtuvimos 2.31% de células positivas a GFP en la condición N2 y 2.92% en el tratamiento G2 (Tabla 8). No se observaron diferencias significativas entre ninguna de las condiciones (Fig. 25).

Tabla 8. Cuantificación de células positivas a β -Tubulina III, GFAP y GFP en cultivos de CMN de corteza cerebral de rata E14 en condiciones de diferenciación.

	% β-Tub	% GFAP	% GFP
Control	7.45 \pm 4.18	4 \pm 1.47	---
LIF	2.77 \pm 1.03	20.83 \pm 5.55	---
N1	2.71 \pm 0.65	4.52 \pm 1.3	3.19 \pm 1.89
G1	4.58 \pm 1.51	3.58 \pm 0.84	6.62 \pm 1.62
N2	1.64 \pm 0.07	3.53 \pm 1.14	2.31 \pm 0.93
G2	3.9 \pm 0.49	1.68 \pm 0.51	2.92 \pm 0.19

Se cuantificó el número de células positivas a β -Tubulina III y GFAP para las condiciones control, LIF, N1, N2, G1 y G2; en las condiciones N1, N2, G1 y G2 transducidas con los vectores GNIA y GIA, se cuantificó el número de células positivas a GFP. La Tabla muestra el promedio total de todos los experimentos analizados \pm el error estándar. (n = 5, excepto en N2, n = 3 y G2 n = 4).

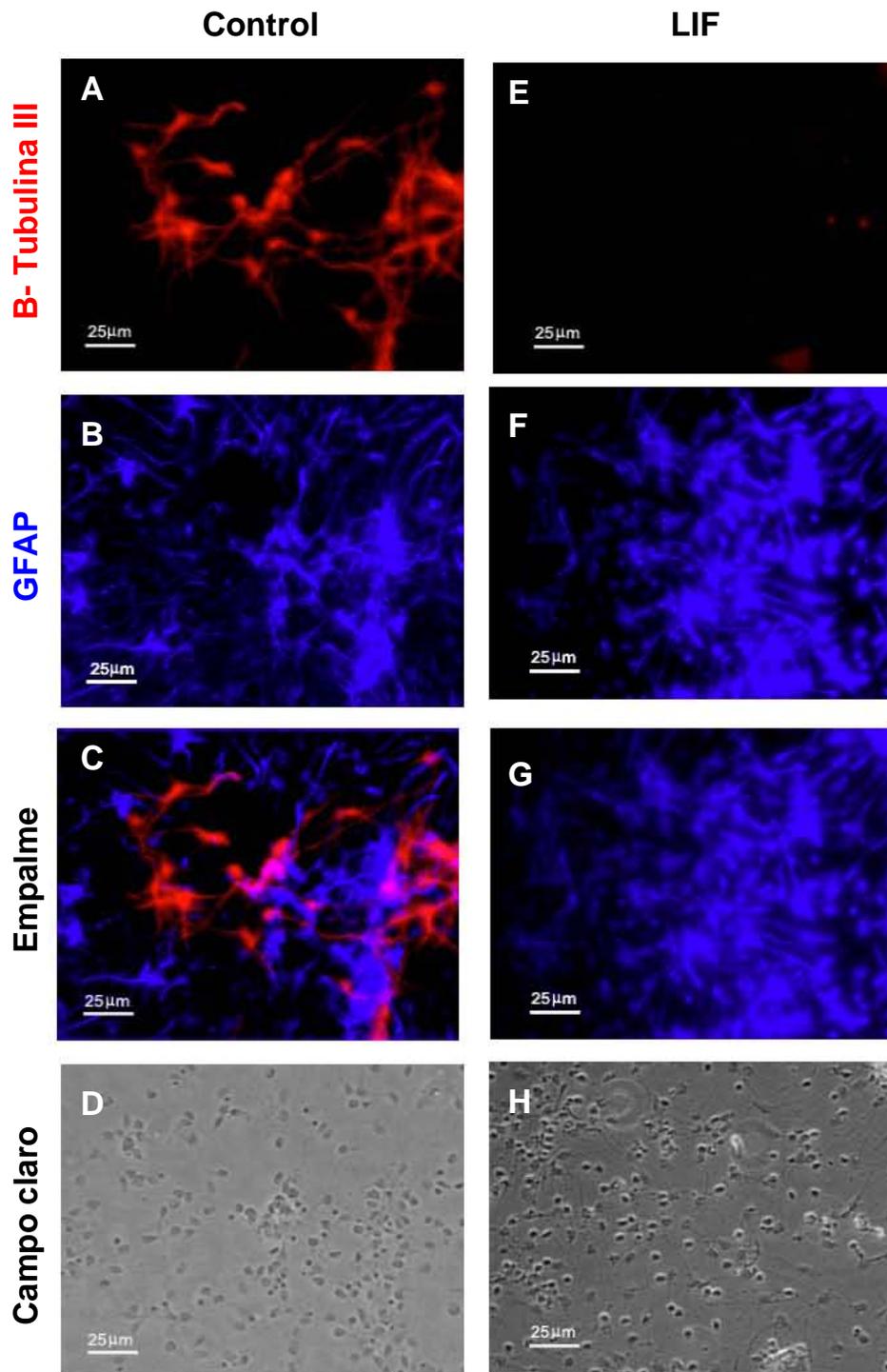


Fig. 23. Inmunofluorescencia contra β -tubulina III y GFAP en CMN de corteza cerebral de rata E14 condiciones control y adicionadas con LIF en las fases de proliferación y diferenciación. A-D) CMN después de 6 días de cultivo en condiciones de diferenciación con ac. ascórbico. El 7.4% de las células expresa β -Tubulina III y 4% expresa GFAP. E-H) CMN después de 6 días de cultivo con LIF y en condiciones de diferenciación. El 2.77% de las células expresa β -Tubulina III y 20.33% expresa GFAP. Las fotografías se tomaron con objetivo 40 X. LIF: factor inhibidor de la leucemia.

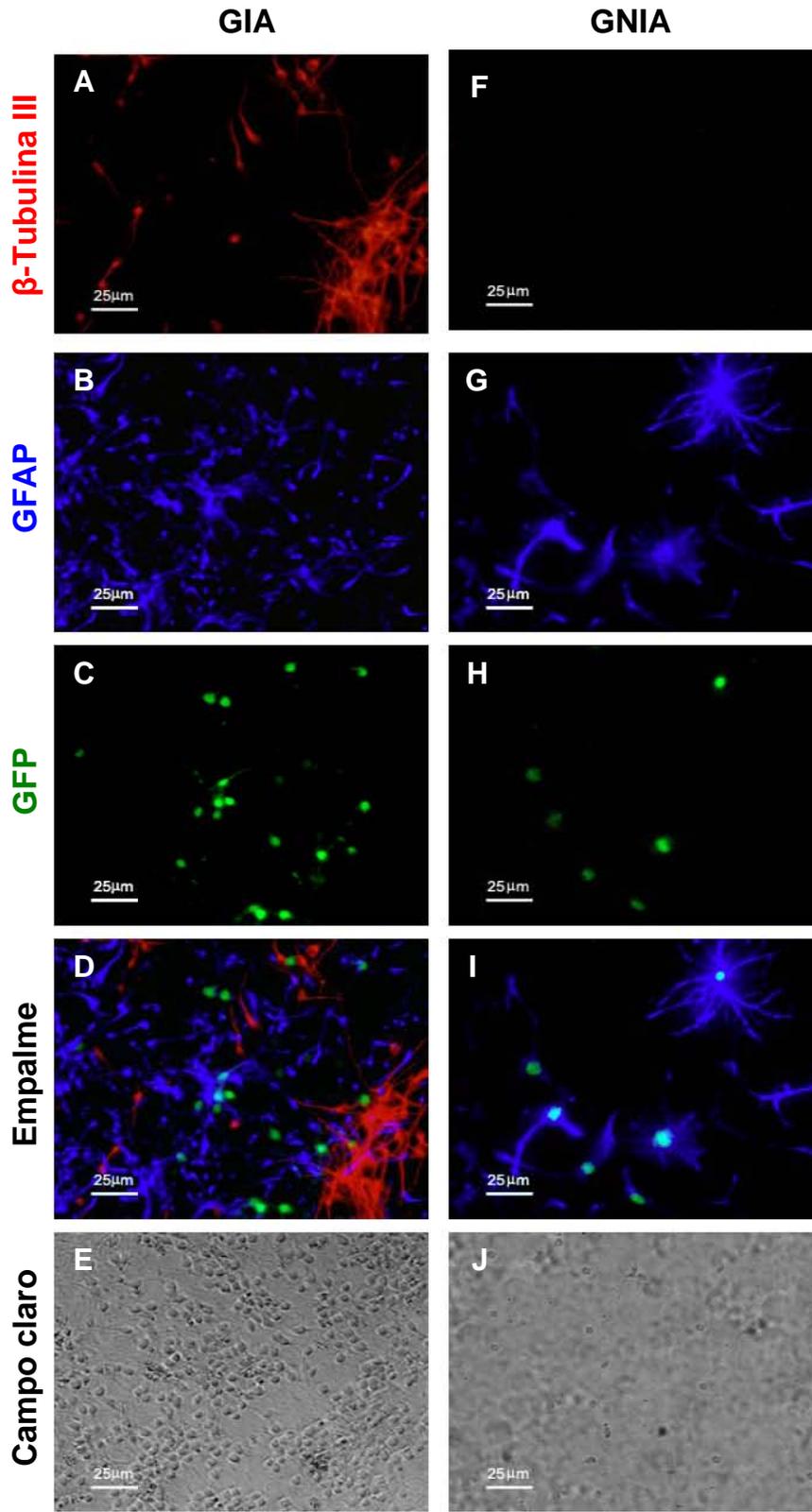


Fig. 24. Inmunofluorescencia contra β-tubulina III y GFAP en CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores GIA y GNIA.

A-E) CMN transducidas con VR GIA después de 6 días de cultivo en condiciones de diferenciación. En las células transducidas con el virus en sobrenadante el 4.58% expresa β-Tubulina III, 3.58 % expresan GFAP y 6.62% expresa GFP. En las células transducidas con el virus concentrado, el 3.9% expresa β-Tubulina III, 1.68% expresa GFAP y 2.92% expresa GFP. **F-J)** CMN transducidas con GNIA después de 6 días de cultivo en condiciones de diferenciación. En las células transducidas con el virus en sobrenadante el 2.71% expresa β-Tubulina III y 4.52% expresa GFAP y 3.19% expresa GFP. En células transducidas con el virus concentrado, 1.64% expresa β-Tubulina III, 3.53 % expresa GFAP y 2.31% expresa GFP. Las fotografías se tomaron con objetivo 40 X.

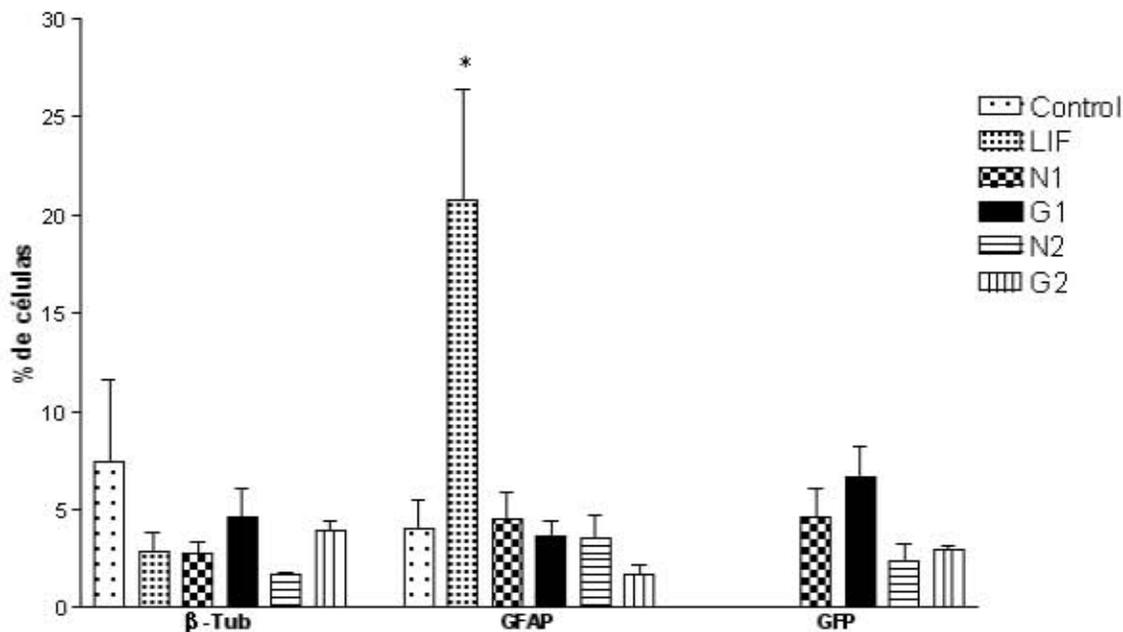


Fig. 25. Análisis de la expresión de marcadores neurales y GFP en cultivos de CMN de corteza cerebral de rata E14 en condiciones de diferenciación. No se observó ninguna diferencia estadística en el número de células que expresaban β -tubulina III en ninguna de las condiciones. En la condición LIF un mayor porcentaje de las células (20.83%) expresaban GFAP, este aumento fue estadísticamente significativo con respecto a las demás condiciones (ANOVA: Newman-Keuls, $p < 0.001$), el resto de las condiciones no presentan diferencias entre ellas. En las condiciones transducidas con los vectores retrovirales no se observaron diferencias significativas en cuanto a la expresión de GFP en ningún caso. Los datos representan la media \pm el error estándar.

Para conocer el linaje de las células transducidas con los VR, se cuantificó el número de células que co-expresaban GFP y β -tubulina III o GFP y GFAP (Tabla 9). El porcentaje de células positivas a GFAP fue significativamente mayor en las condiciones transducidas con los VR que sobre expresaban ICN1. En las condiciones transducidas con el VR control que sólo expresaba GFP, se observó un mayor número de células positivas a β -tubulina III. Esta diferencia fue estadísticamente significativa con respecto a las condiciones transducidas con GNIA (Fig. 26).

Tabla 9. Porcentaje de CMN transducidas con los vectores GIA y GNIA que expresan β -tubulina III o GFAP en condiciones de diferenciación.

	% β -Tub	% GFAP
N1	0	86.56 \pm 9.5
G1	31.81 \pm 7.46	28.8 \pm 9.96
N2	1.08 \pm 1.08	74.33 \pm 19.75
G2	27.1 \pm 9.59	20.15 \pm 6.2

Porcentaje de células transducidas con los vectores GNIA y GIA (GFP+) positivas a β -Tubulina III o GFAP en los cultivos de CMN de corteza cerebral de rata E14 en condiciones de diferenciación. Se muestra el promedio de todos los experimentos \pm el error estándar; n = 5

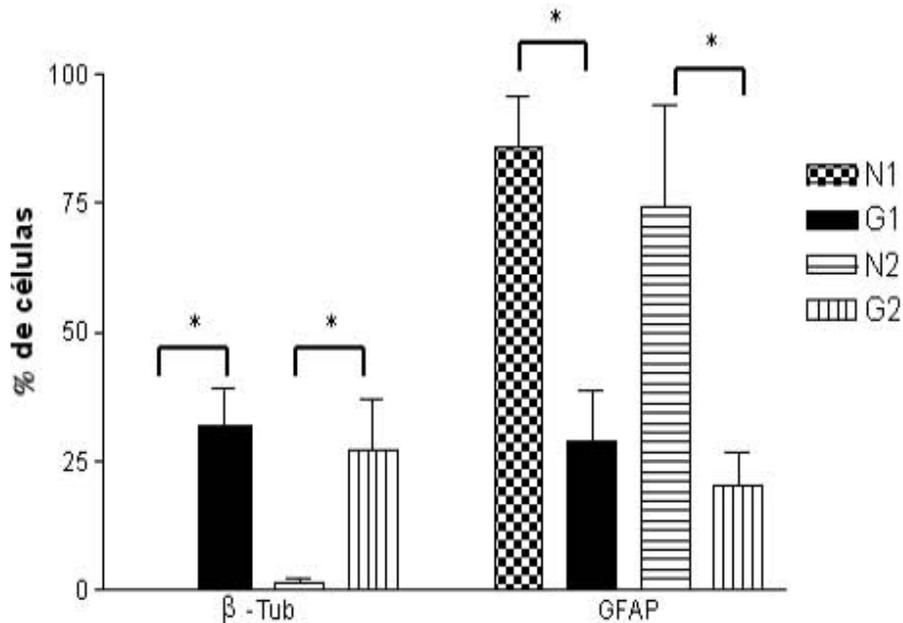


Fig. 26. Análisis de la expresión de β -Tubulina III y GFAP en CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores GIA y GNIA en condiciones de diferenciación. En las dos condiciones transducidas con el vector GIA se observó un mayor número de células GFP+ que expresaban β -Tubulina III, con respecto a las condiciones transducidas con el vector GNIA; esta diferencia fue estadísticamente significativa (ANOVA, Newman-Keuls, p = 0.0045). En el caso de las células transducidas con el vector GNIA, se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de células positivas a GFAP, con respecto a las condiciones transducidas con el vector GIA (ANOVA, Newman-Keuls, p = 0.016). Los datos representan la media \pm el error estándar.

Discusión

Una característica de los vectores retrovirales que tienen a la proteína VSV-G es que permite ampliar el intervalo de especies capaces de ser transducidas (Coffin, *et al.*, 1997). Esto representa una ventaja en cuanto al número de especies en que los vectores pueden ser utilizados, pero también un riesgo en cuanto a su manipulación ya que dentro de los tipos celulares capaces de transducción se encuentran las células humanas y por tanto existe la capacidad de infección para quien trabaja con o cerca de ellos. No obstante, el diseño de vectores deficientes en la replicación, como los utilizados en este trabajo, reduce este riesgo pues éstos contienen al transgen de interés, son capaces de integrar su material a la célula que infectan, pero no son capaces de ensamblar nuevos viriones ni liberarlos para infectar otras células, ya que no llevan consigo las secuencias necesarias para la producción de las proteínas retrovirales (*Gag* y *Pol*), que se encuentran únicamente en las células empaquetadoras utilizadas para su ensamblaje. Sin embargo, al trabajar con cualquier agente que presente algún riesgo aunque sea potencial, siempre es necesario utilizar las medidas de bioseguridad pertinentes durante su manipulación.

Otra de las ventajas que presenta el uso de vectores modificados con la proteína VSV-G es la posibilidad de concentrar por ultracentrifugación a las partículas infectivas. Las proteínas nativas del dominio *Env* retroviral SU y TM son las encargadas del reconocimiento de receptores de superficie celular para la infección del hospedero. Estas proteínas forman un complejo dimérico que se encuentra unido por enlaces débiles (Coffin, *et al.*, 1997) y que no es capaz de soportar las fuerzas de ultracentrifugación aplicadas para concentrar a las partículas infectivas, mientras que la proteína VSV-G es mucho más estable que las proteínas de envoltura retrovirales y es capaz de soportar las fuerzas de ultracentrifugación necesarias para la concentración de los viriones manteniendo así la funcionalidad de éstos.

El propósito de utilizar a los VR modificados con la proteína VSV-G era concentrar a las partículas infectivas para que al centrifugar se elevara el título viral final y así poder incrementar el porcentaje de transducción. A pesar de que con el protocolo utilizado para concentrar las partículas infectivas fue posible obtener un título mayor en los virus GIA y GNIA que el de los virus en sobrenadante (Tabla 5), este aumento no fue del orden esperado de acuerdo a lo reportado por Gaiano y colaboradores (1×10^8 a 5×10^9 ufc/ml; Gaiano *et al.*, 1999).

Al medir la eficiencia de transducción y de manera indirecta la capacidad funcional de la proteína VSV-G después de haber cuantificado la cantidad de partículas infectivas presentes en las preparaciones virales que contenían al gen reportero de la luciferasa observamos que, de manera contraria a lo esperado, los lisados de células transducidas con los vectores GLuc en sobrenadante mostraban una mayor actividad de bioluminiscencia por μg de proteína con respecto a los lisados transducidos con los virus que fueron concentrados por ultracentrifugación, en los que se esperaba una mayor capacidad de transducción (Tabla 4 y Fig. 15). Esto sugiere que el procedimiento de concentración no fue lo suficientemente eficiente, debido probablemente a alguna falla en el procedimiento utilizado o bien a la pérdida de la capacidad transductiva de los viriones debido a algún daño ocasionado por el procedimiento de concentración, lo cual podría explicar el bajo título viral obtenido después de concentrar los vectores GIA y GNIA. No obstante, la presencia de la actividad bioluminiscente en todos los lisados nos sugiere que las partículas virales se ensamblaban correctamente y tenían la capacidad de transducir a las células objetivo.

Puesto que fue necesario utilizar una mayor cantidad de ufc de los virus GNIA con respecto a los GIA podemos suponer que el vector GIA presenta una mayor capacidad de transducción que el vector GNIA (Fig. 22). Esto podría deberse a factores internos relacionados con el control de la expresión del fragmento activo de Notch, relacionados por

ejemplo con el sitio de inserción del transgen, o a una menor capacidad de integración del ADN proviral que contiene al ICN1 debida al tamaño del transgen.

Se sabe que durante el desarrollo de la corteza cerebral en mamíferos, la generación de neuronas se presenta primero con respecto a la generación de las células gliales. En rata, la neurogénesis comienza alrededor del estadio E12 y alcanza su pico máximo alrededor del E15, mientras que la presencia de astrocitos comienza a detectarse alrededor del E16 (Qian *et al.*, 2000). Estudios *in vitro* muestran que al adicionar LIF a cultivos de CMN provenientes de corteza cerebral de embriones E14 y E15 se obtienen astrocitos, no así en cultivos obtenidos del E12, mostrando así que la generación de astrocitos es posterior al día E12 (Molné *et al.*, 2000).

Un estudio realizado por Morrow y colaboradores en el 2001 muestra que estos mismos precursores *in vitro* conservan la capacidad temporal de generar neuronas y astrocitos en cultivo, que ésta capacidad depende del ambiente celular en que se encuentran los precursores y que el tiempo en el que las CMN permanecen en cultivo recapitula lo que sucede en el desarrollo *in vivo*. Esto quiere decir que los progenitores aislados de estadios tempranos tienden a producir una mayor cantidad de células neuronales y una menor cantidad de astrocitos cuando son diferenciados y que esta proporción se va invirtiendo conforme avanza el tiempo en el que los progenitores son mantenidos en cultivo, lo que sugiere que las propiedades de las CMN se van modificando con el tiempo (Qian *et al.*, 2000). Por este motivo el uso de cultivos primarios de CMN más allá de P3 no es recomendable para la generación de neuronas debido a que se constituyen mayoritariamente de precursores gliales y la proporción de CMN disminuye. Debido a esto elegimos utilizar en nuestros experimentos CMN en P1 para, por un lado eliminar células ya diferenciadas presentes en P0 y, por otro lado, asegurar que los progenitores neurales eran lo más parecidos a los presentes *in vivo* en ese estadio del desarrollo.

Al transducir a las CMN con los vectores GIA y GNIA se comprobó la expresión del transgen por la fluorescencia emitida al expresarse la proteína reportera GFP. La expresión de GFP observada en las células transducidas con el vector GIA difirió de la observada en las células transducidas con el vector GNIA, en este sentido en las transducciones con vectores GIA se observó una expresión de la GFP homogénea en todo el citoplasma de estas células (Fig. 16 A y B), mientras que en las células que introdujeron al vector GNIA la expresión de la GFP fusionada al ICN1 fue observada únicamente en los núcleos celulares (Fig. 16 C y D). En condiciones fisiológicas la unión del ligando de Notch a su receptor provoca que se libere el fragmento intracelular activo de la proteína, el cual es translocado al núcleo en donde funciona como factor transcripcional. Por lo tanto, la expresión diferencial observada en ambas condiciones nos sugiere que la proteína se logró expresar de manera correcta, translocarse al núcleo y probablemente, como lo sugieren nuestros resultados, ser funcional.

Otro dato interesante es el hecho de que las CMN mantenidas en condiciones de proliferación expresaban mayoritariamente nestina en todos los casos, excepto las células tratadas con LIF donde se observó, que aproximadamente la mitad de las células co-expresaban esta proteína de filamentos intermedios y GFAP (Fig. 18 E-H) además de presentar un cambio en la morfología típica de los progenitores neurales (Fig. 17 D-F). Cuando estas células fueron diferenciadas se mantuvo un aumento significativo en las células positivas a GFAP con respecto a otras. Este resultado concuerda con lo reportado por diversos grupos, en los que se ha visto que los progenitores neurales tardíos son capaces de diferenciarse hacia destinos astrocíticos en presencia de LIF cuando éste se une a su receptor en la membrana celular activando la vía JAK-STAT, inhibiendo la transcripción de genes proneurales (Rajan y McKay, 1998; Molné *et al.*, 2000). Esta condición experimental nos sirvió para ser utilizada como control positivo.

Por otro lado, los cultivos en proliferación sin tratamiento y transducidos con el vector GIA mostraron una morfología de las células positivas a nestina muy similar, mientras que las células transducidas con el vector GNIA presentaron diferencias en la morfología típica de los progenitores neurales, generando prolongaciones e incluso formas estrelladas que recuerdan a la morfología de los astrocitos (Figs. 19 I y 20 I). De hecho, algunas de estas células mostraban en este punto un doble marcaje contra nestina y GFAP en 2 de 5 experimentos analizados por duplicado. Aun queda por indagar si este efecto fue producto de los altos niveles de expresión del transgen o es un aspecto que puede darnos una pista más acerca de la regulación de esta vía, pero esto sugiere que probablemente la sobre-expresión del ICN1 causa una especificación de las CMN hacia un linaje astrocítico, lo cual puede ser confirmado en células diferenciadas transducidas con los virus concentrados o en sobrenadante en donde logramos obtener un 74 % y 86 % de las células que expresaron GFAP y que presentaron una morfología típica de astrocitos respectivamente (Tabla 9 y Fig. 24 I). Nuestros resultados concuerdan con lo expuesto en otros trabajos en donde se ha demostrado que la sobre-expresión de Notch en CMN provoca la diferenciación hacia astrocitos (Morrison *et al.*, 2000; Tanigaki *et al.*, 2001; Grandbarbe *et al.*, 2003).

La presencia del marcador nestina en el resto de las condiciones en proliferación sugiere que las señales que promueven el mantenimiento de las CMN son más fuertes que las que promueven la diferenciación en estos casos.

La diferencia entre el potencial de diferenciación glial promovido por el control positivo tratado con LIF y las CMN transducidas con el vector GNIA podría indicar que bajo condiciones de proliferación las señales de diferenciación promovidas por LIF son más potentes a las del fragmento activo de Notch1, aunque se ha reportado que Notch se encuentra involucrado también en el mantenimiento del estado de CM, por lo que aún queda por indagar respecto a los factores que regulan a esta vía bajo diferentes contextos celulares.

Como se mencionó anteriormente, la proporción de células positivas a GFAP observados en este trabajo durante el tratamiento con LIF son similares a los reportados en la literatura. Molné y colaboradores mostraron que el efecto gliogénico promovido por LIF en cultivos de CMN de la corteza cerebral de rata del E14 y P1 es de alrededor del 50% en presencia de bFGF y que la activación de la vía JAK/STAT por el receptor del factor neurotrófico ciliar (CNTF) que pertenece a la familia de los receptores de LIF, promueve la diferenciación de estos mismos precursores en un 29% (Bonni, *et al.*, 1997).

Nuestros datos, en conjunto con lo obtenido por Molné y por Bonni, sugieren que en ausencia de señales proliferativas el efecto gliogénico promovido por la sobre-expresión de Notch1 es más eficiente que el inducido por la vía JAK/STAT. Nuevamente, es necesario aclarar si este efecto está ligado al nivel de expresión del transgen en las células transducidas el cual aún debe ser determinado.

cabe mencionar que aún cuando el número de células transducidas con el vector GNIA fue mucho menor al número de células que estuvieron en contacto con el factor LIF, una mayor proporción de células gliales fue producida por los retrovirus (74 % y 86 %) con respecto a las tratadas con LIF (20.8 %), así pues, sería de suponerse que si se logra una mayor eficiencia de transducción se conseguiría elevar el número de células positivas a GFAP en cultivo debido que un mayor número de células estarían sobre expresando Notch1.

Conclusión

En esta tesis nos fue posible preparar lotes retrovirales que expresaban a la GFP y a la proteína de fusión GFP-ICN1, con los cuales se transdujeron CMN de corteza cerebral de rata E14 y se evaluó el destino celular de las células transducidas al ser cultivadas en condiciones de proliferación y diferenciación.

El alto porcentaje de células astrocíticas obtenidas a partir de la transducción con el vector GNIA en la fase de diferenciación podría ser consecuencia de la adquisición de este compromiso debida a la sobre expresión del fragmento intracelular activo de Notch1 durante la fase de proliferación, lo que es sugerido por la morfología glial presente en los progenitores durante la proliferación.

En las células transducidas con el virus control GIA y las células sin tratamiento no se observaron diferencias entre la cantidad de células neuronales y gliales presentes, por los que se descarta que el efecto gliogénico de la sobre-expresión de Notch1 pueda deberse al procedimiento de infección retroviral.

Nuestros resultados sugieren que la inducción gliogénica mediada por la sobre-expresión del ICN1 en CMN de corteza cerebral de rata E14 es mayor, en ausencia de señales proliferativas, a la que se obtiene al tratar a estas células con LIF.

En este trabajo se estableció un protocolo reproducible para la sobre-expresión de la forma activa de Notch1 en CMN. Estos estudios permitirán contar con una herramienta esencial para en un futuro, continuar el estudio del efecto de la activación de esta vía durante el desarrollo utilizando modelos *in vitro* o *in vivo*, y así continuar ampliando el conocimiento de las funciones de la vía de Notch y su importancia.

Perspectivas

Como ya se ha mencionado, existe una relación temporal en cuanto a la capacidad de diferenciación de las CMN. En estadios tempranos se favorece principalmente la neurogénesis mientras que, conforme avanza el desarrollo, se favorece la generación de tipos celulares gliales. Los resultados en este trabajo apoyan la idea de que la sobre-expresión de Notch favorece la gliogénesis (Morrison *et al.*, 2000; Tanigaki *et al.*, 2001; Grandbarbe *et al.*, 2003), pero no que bajo condiciones de proliferación se favorezca el estado indiferenciado de los precursores neurales (Nakamura *et al.*, 2000; Hitoshi *et al.*, 2002; Noctor *et al.*, 2002). La alta capacidad inducción gliogénica observada debido a la sobre-expresión de ICN1 en CMN de corteza cerebral de E14 pudo haber sido facilitada por el estadio a partir del cual se obtuvieron las células. Sería conveniente evaluar el efecto de esta sobre-expresión en estadios más tempranos, por ejemplo E12, en donde las CMN presentan un mayor compromiso hacia la generación de tipos neuronales. Sería posible analizar también el efecto de la muerte y la proliferación celular al sobre-expresar ICN1 CMN, utilizando técnicas como TUNEL y el análisis de la incorporación de Bromo-deoxiuridina (BrdU) para cada caso.

Otro punto por aclarar es, si dicho efecto está relacionado con los niveles de expresión del transgén, mediante la separación por FACS en diferentes poblaciones de las células transducidas con respecto al nivel de expresión de GFP. Se mediría entonces si hay un nivel de expresión que favorece el compromiso glial al diferenciar a las células. En paralelo se podría también analizar la influencia de la sobre-expresión del transgen en el ciclo celular, al medir la cantidad de DNA y la fluorescencia debida a GFP en el citómetro de flujo. Otra manera de cuantificar los niveles de expresión podría ser la determinación por inmunoblot de GFP y de marcadores neuronales o gliales. Por último, se podría cuantificar el ARNm para GFP y marcadores de diferenciación con PCR semicuantitativo o de tiempo real.

Referencias:

- Adelberg EA, Pittard J (1965) Chromosome Transfer in Bacterial Conjugation. *Bacteriol Rev* **29**:161-172.
- Ako-Adjei D, Johnson MC, Vogt VM (2005) The retroviral capsid domain dictates virion size, morphology, and coassembly of gag into virus-like particles. *J Virol* **79**:13463-13472.
- Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* **57**:751-758.
- Anderson DJ, Groves A, Lo L, Ma Q, Rao M, Shah NM, Sommer L (1997) Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**:493-504.
- Andreadis ST, Brott D, Fuller AO, Palsson BO (1997) Moloney murine leukemia virus-derived retroviral vectors decay intracellularly with a half-life in the range of 5.5 to 7.5 hours. *J Virol* **71**:7541-7548.
- Andrews PW (1998) Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *Apmis* **106**:158-167; discussion 167-158.
- Andrews PW (2002) From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**:405-417.
- Arai T, Matsumoto K, Saitoh K, Ui M, Ito T, Murakami M, Kanegae Y, Saito I, Cosset FL, Takeuchi Y, Iba H (1998) A new system for stringent, high-titer vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector induction by introduction of Cre recombinase into stable prepackaging cell lines. *J Virol* **72**:1115-1121.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**:770-776.
- Baldwin TO (1996) Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Structure* **4**:223-228.
- Bayer SA, Altman J (1991) Neocortical Development, Primera Edición, New York: Raven Press.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**:517-530.
- Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg ME (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* **278**:477-483.
- Callen JC (2000) Biología Celular. De las moléculas a los organismos, Primera Edición. México.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* **56**:337-344.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**:669-672.
- Chambers CB, Peng Y, Nguyen H, Gaiano N, Fishell G, Nye JS (2001) Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development* **128**:689-702.
- Clark DP (2005) Molecular Biology. Understanding the genetic revolution, Primera Edición, UK: Elsevier Academic Press.
- Coffin JM (1992) Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**:143-164.

- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (1997) *Retroviruses*, Primera Edición: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Das I, Craig C, Funahashi Y, Jung KM, Kim TW, Byers R, Weng AP, Kutok JL, Aster JC, Kitajewski J (2004) Notch oncoproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function. *J Biol Chem* **279**:30771-30780.
- de la Pompa JL, Wakeham A, Correia KM, Samper E, Brown S, Aguilera RJ, Nakano T, Honjo T, Mak TW, Rossant J, Conlon RA (1997) Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**:1139-1148.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**:703-716.
- Donovan PJ, Gearhart J (2001) The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* **414**:92-97.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**:154-156.
- Flint SJ (2000) Capítulo 2. En: *Principles of virology: molecular virology, pathogenesis and control*, pp 28-33. Washington D. C.: ASM Press.
- Furukawa T, Mukherjee S, Bao ZZ, Morrow EM, Cepko CL (2000) rax, Hes1, and notch1 promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* **26**:383-394.
- Gaiano N, Nye JS, Fishell G (2000) Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* **26**:395-404.
- Geoghegan T (2002) Molecular Applications. En: *Modern Microbial Genetics*, Segunda Edición (Streips UN, Yasbin RE, eds), páginas 243 y 244. U. S.: Wiley-Liss, Inc.
- Gilbert SF (2003) *Developmental Biology*, Séptima Edición: Sinauer Associates, Inc.
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:2390-2394.
- Gould SJ, Subramani S (1988) Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem* **175**:5-13.
- Grandbarbe L, Bouissac J, Rand M, Hrabe de Angelis M, Artavanis-Tsakonas S, Mohier E (2003) Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development* **130**:1391-1402.
- Hamada Y, Kadokawa Y, Okabe M, Ikawa M, Coleman JR, Tsujimoto Y (1999) Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development* **126**:3415-3424.
- Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, van der Kooy D (2002) Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev* **16**:846-858.
- Hojo M, Ohtsuka T, Hashimoto N, Gradwohl G, Guillemot F, Kageyama R (2000) Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene Hes5 in mouse retina. *Development* **127**:2515-2522.
- Kalyani AJ, Piper D, Mujtaba T, Lucero MT, Rao MS (1998) Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J Neurosci* **18**:7856-7868.
- Keller R, Shih J, Sater A (1992) The cellular basis of the convergence and extension of the *Xenopus* neural plate. *Dev Dyn* **193**:199-217.
- Ketteler R, Glaser S, Sandra O, Martens UM, Klingmuller U (2002) Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther* **9**:477-487.
- Kim JH, Panchision D, Kittappa R, McKay R (2003) Generating CNS neurons from embryonic, fetal, and adult stem cells. *Methods Enzymol* **365**:303-327.

- Lai L, Liu H, Wu X, Kappes JC (2001) Moloney murine leukemia virus integrase protein augments viral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* **75**:11365-11372.
- Lardelli M, Lendahl U (1993) Motch A and motch B--two mouse Notch homologues coexpressed in a wide variety of tissues. *Exp Cell Res* **204**:364-372.
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA (2000) Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13883-13888.
- Le Douarin NM, Teillet MA (1974) Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neuroectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev Biol* **41**:162-184.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**:585-595.
- Lindsell CE, Boulter J, diSibio G, Gossler A, Weinmaster G (1996) Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol Cell Neurosci* **8**:14-27.
- Lutolf S, Radtke F, Aguet M, Suter U, Taylor V (2002) Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development* **129**:373-385.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**:841-847.
- Mizutani K, Saito T (2005) Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. *Development* **132**:1295-1304.
- Mohr OL (1919) Character changes caused by mutation of an entire region of a chromosome in *Drosophila*. *Genetics* **4**:275.
- Molne M, Studer L, Tabar V, Ting YT, Eiden MV, McKay RD (2000) Early cortical precursors do not undergo LIF-mediated astrocytic differentiation. *J Neurosci Res* **59**:301-311.
- Morgan TH (1919) *The Physical Basis of Heredity*, 1a Edition.
- Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, Verdi JM, Hicks C, Weinmaster G, Anderson DJ (2000) Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* **101**:499-510.
- Morrow T, Song MR, Ghosh A (2001) Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development* **128**:3585-3594.
- Muriaux D, Mirro J, Harvin D, Rein A (2001) RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5246-5251.
- Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD (1994) *Virus Taxonomy: The classification and nomenclature of viruses*, Primera Edición, Vienna: Springer-Verlag.
- Nakamura Y, Sakakibara S, Miyata T, Ogawa M, Shimazaki T, Weiss S, Kageyama R, Okano H (2000) The bHLH gene *hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci* **20**:283-293.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* **22**:3161-3173.
- Oishi K, Kamakura S, Isazawa Y, Yoshimatsu T, Kuida K, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y (2004) Notch promotes survival of neural precursor cells via mechanisms distinct from those regulating neurogenesis. *Dev Biol* **276**:172-184.
- Ou W, Silver J (2005) Inhibition of murine leukemia virus envelope protein (env) processing by intracellular expression of the env N-terminal heptad repeat region. *J Virol* **79**:4782-4792.
- Pages JC, Bru T (2004) Toolbox for retrovectorologists. *J Gene Med* **6 Suppl 1**:S67-82.

- Patience C, Takeuchi Y, Cosset FL, Weiss RA (1998) Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells. *J Virol* **72**:2671-2676.
- Patten BA, Peyrin JM, Weinmaster G, Corfas G (2003) Sequential signaling through Notch1 and erbB receptors mediates radial glia differentiation. *J Neurosci* **23**:6132-6140.
- Paulus C, Ludwig C, Wagner R (2004) Contribution of the Gag-Pol transframe domain p6* and its coding sequence to morphogenesis and replication of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **330**:271-283.
- Peng WJ, Pan JT, Lai MC, Chiu CF, Lin TH (1997) The genome of Moloney murine leukemia virus can be integrated by the integrase of human immunodeficiency virus type 1 expressed alone in vivo. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* **21**:144-160.
- Pettit SC, Clemente JC, Jeung JA, Dunn BM, Kaplan AH (2005) Ordered processing of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor is influenced by the context of the embedded viral protease. *J Virol* **79**:10601-10607.
- Pringle CR (1999) Virus Taxonomy - 1999. *Arch Virol* **144**.
- Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S (2000) Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* **28**:69-80.
- Rajan P, McKay RD (1998) Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* **18**:3620-3629.
- Rathjen J, Haines BP, Hudson KM, Nesci A, Dunn S, Rathjen PD (2002) Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: homogeneous formation and differentiation of a neuroectoderm population. *Development* **129**:2649-2661.
- Reaume AG, Conlon RA, Zirngibl R, Yamaguchi TP, Rossant J (1992) Expression analysis of a Notch homologue in the mouse embryo. *Dev Biol* **154**:377-387.
- Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO (1993) Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J* **12**:2099-2108.
- Russell SJ, Cosset FL (1999) Modifying the host range properties of retroviral vectors. *J Gene Med* **1**:300-311.
- Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R (1998) Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* **393**:382-386.
- Shin NH, Hartigan-O'Connor D, Pfeiffer JK, Telesnitsky A (2000) Replication of lengthened Moloney murine leukemia virus genomes is impaired at multiple stages. *J Virol* **74**:2694-2702.
- Shinnick TM, Lerner RA, Sutcliffe JG (1981) Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* **293**:543-548.
- Stemple DL, Anderson DJ (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* **71**:973-985.
- Tabar V, Panagiotakos G, Greenberg ED, Chan BK, Sadelain M, Gutin PH, Studer L (2005) Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain. *Nat Biotechnol* **23**:601-606.
- Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T (2001) Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* **29**:45-55.
- Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* **414**:112-117.
- Vanin EF, Cerruti L, Tran N, Grosveld G, Cunningham JM, Jane SM (1997) Development of high-titer retroviral producer cell lines by using Cre-mediated recombination. *J Virol* **71**:7820-7826.
- Williams R, Lendahl U, Lardelli M (1995) Complementary and combinatorial patterns of Notch gene family expression during early mouse development. *Mech Dev* **53**:357-368.

- Wool-Lewis RJ, Bates P (1998) Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J Virol* **72**:3155-3160.
- Yang S, Delgado R, King SR, Woffendin C, Barker CS, Yang ZY, Xu L, Nolan GP, Nabel GJ (1999) Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection. *Hum Gene Ther* **10**:123-132.
- Yang Y, Vanin EF, Whitt MA, Fornerod M, Zwart R, Schneiderman RD, Grosveld G, Nienhuis AW (1995) Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein. *Hum Gene Ther* **6**:1203-1213.
- Yang X, Klein R, Tian X, Cheng HT, Kopan R, Shen J (2004) Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Dev Biol* **269**:81-94.
- Yee JK, Miyanochara A, LaPorte P, Bouic K, Burns JC, Friedmann T (1994) A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9564-9568.
- Yee JK, Friedmann T, Burns JC (1994b) Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* **43 Pt A**:99-112.
- Yoon K, Nery S, Rutlin ML, Radtke F, Fishell G, Gaiano N (2004) Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors. *J Neurosci* **24**:9497-9506.
- Yoon K, Gaiano N (2005) Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* **8**:709-715.

Índice de figuras y tablas

Figuras	Pág.
Fig. 1. Características generales de los retrovirus.....	13
Fig. 2. Estructura básica de un vector retroviral.....	17
Fig. 3. Origen de las células madre pluripotenciales con potencial neurogénico.....	22
Fig. 4. Neurulación primaria.....	23
Fig. 5. Principales regiones de las cuales se han aislado células madre neurales.	25
Fig. 6. Fenotipo de moscas con pérdida parcial de la función del gen Notch.....	26
Fig. 7. Vía de señalización de Notch.....	27
Fig. 8. Representación esquemática de la proteína Notch1 y de las construcciones retrovirales utilizadas para expresar al ICN1 en CMN de corteza cerebral de rata.....	34
Fig. 9. Plásmidos de expresión utilizados en la construcción de los vectores retrovirales GIA y GNIA.....	35
Fig. 10. La conversión de luciferina a oxiluciferina es catalizada por la enzima luciferasa en presencia de ATP, Mg ²⁺ y oxígeno.....	44
Fig. 11. Gráfica de la curva estándar de albúmina.....	47
Fig. 12. Titulación de los vectores GIA y GNIA.....	50
Fig. 13. Disección de CMN de la corteza cerebral de ratas E14.....	52
Fig. 14. Cultivo en P1 de células madre neurales de corteza cerebral de rata E14.....	53
Fig. 15. Bioluminiscencia emitida por lisados de células NIH3 T3 transducidas con GLuc.....	61
Fig. 16. CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores retrovirales GIA y GNIA.....	63
Fig. 17. Inmunofluorescencia contra nestina y β -tubulina III en CMN de corteza cerebral de rata E14 condiciones Control y tratadas con LIF.....	64

Fig. 18. Inmunofluorescencia contra nestina y GFAP en CMN de corteza cerebral de rata E14 condiciones control y tratadas con LIF.....	65
Fig. 19. Inmunofluorescencia contra nestina y β -Tubulina III en CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores GIA y GNIA.....	66
Fig. 20. Inmunofluorescencia contra nestina y GFAP en CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores GIA y GNIA.....	67
Fig. 21. Análisis de la expresión de marcadores neurales y del porcentaje de transducción en los cultivos en proliferación de CMN de corteza cerebral de rata E14...	69
Fig. 22. Análisis de la expresión de marcadores neurales en cultivos en proliferación de CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores GIA y GNIA.....	70
Fig. 23. Fig. 23. Inmunofluorescencia contra β -tubulina III y GFAP en CMN de corteza cerebral de rata E14 condiciones control y adicionadas con LIF en las fases de proliferación y diferenciación.....	72
Fig. 24. Inmunofluorescencia contra β -tubulina III y GFAP en CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores GIA y GNIA.....	73
Fig. 25. Análisis de la expresión de marcadores neurales y GFP en cultivos de CMN de corteza cerebral de rata E14 en condiciones de diferenciación.....	74
Fig. 26. Análisis de la expresión de β -Tubulina III y GFAP en CMN de corteza cerebral de rata E14 transducidas con los vectores GIA y GNIA en condiciones de diferenciación.....	75

Tablas	Pág.
Tabla 1. Densidades ópticas, concentración final e índice de pureza de los plásmidos pVSV-G, pGIA y pGNIA obtenidos a partir de maxiprep.....	39
Tabla 2. Curva estándar de albúmina.....	47

Tabla 3. Concentración de proteína en los lisados de fibroblastos NIH 3T3.....	48
Tabla 4. Cuantificación de bioluminiscencia en lisados de células NIH3 T3 transducidas con el vector GLuc.....	61
Tabla 5. Determinación del título de los lotes retrovirales GIA y GNIA.....	62
Tabla 6. Cuantificación de marcadores neurales y células GFP+ en cultivos de CMN de corteza cerebral de rata E14 en condiciones de proliferación.....	68
Tabla 7. Cuantificación de los marcadores neurales presentes en células GFP+ provenientes de transfecciones con los vectores GNIA y GIA en condiciones de proliferación.....	70
Tabla 8. Cuantificación de células positivas a β -Tubulina III, GFAP y GFP en cultivos de CMN de corteza cerebral de rata E14 en condiciones de diferenciación.....	71
Tabla 9. Porcentaje de CMN transducidas con los vectores GIA y GNIA que expresan β -tubulina III o GFAP en condiciones de diferenciación.....	75

Apéndice 1: símbolos y abreviaturas

ADN:	ácido desoxiribonucleico
ANOVA:	análisis de varianza
ARN:	ácido ribonucleico
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
bFGF:	factor de crecimiento fibroblástico básico
bHLH:	dominio básico hélice-asa-hélice
BSA:	albúmina de suero de bovino
CA:	cápside
CM:	células madre
cm:	centímetros
CMCE:	células madre de carcinoma embrionario
CME:	células madre embrionarias
CMEG:	células madre embrionarias germinales
CMN:	células madre neurales
CMNA:	células madre neurales de adulto
CMV:	citomegalovirus
CNTF:	factor neurotrófico ciliar
CSL:	CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1
E14:	estadio embrionario dE14 días de gestación
Fn:	fibronectina
g:	fuerza centrífuga relativa
GaLV:	virus de la leucemia del mono gibón
GFAP:	proteína ácida fibrilar glial

HeBS:	amortiguador salino de HEPES
Hes:	<i>Hairy/Enhancer of Split</i>
HTLV-BLV:	virus humano de las células T-virus de la leucemia bovina
ICN:	fragmento intracelular de Notch
ICN1:	fragmento intracelular de Notch1
IN:	integrasa
LB-Amp:	medio Luria Broth base con ampicilina
LIF:	factor inhibidor de la leucemia
LTR:	secuencias repetitivas largas
MA:	matriz
µg:	microgramos
µl:	microlitros
mg:	miligramos
ml:	mililitros
mM:	milimolar
MoMLV:	virus de la leucemia murina de moloney
NC:	proteína nucleocápside
ng:	nanogramos
NGS:	suero normal de cabra (<i>"normal goat serum"</i>)
nm:	nanómetros
P:	pase celular
PBS:	amortiguador de fosfatos
pen/strep:	penicilina/estreptomicina
PFA:	paraformaldehído
PLO:	poliornitina
ppt:	caset de polipurina

R:	secuencia repetitiva de poliadenilación
rpm:	revoluciones por minuto
RT:	reverso transcriptasa
SFB:	suero fetal bovino
SN:	sistema nervioso
SNC:	sistema nervioso central
SNP:	sistema nervioso periférico
SOC:	medio <i>Super Optimal Catabolite</i>
SU:	proteína superficie
TA:	temperatura ambiente
TM:	proteína transmembranal
ufc:	unidades formadoras de colonias
URL:	unidades relativas de luz
UV:	ultravioleta
VIH:	virus de la inmunodeficiencia humana
VR:	vectores retrovirales
VR-luc:	vectores retrovirales que expresan a la luciferasa
VSV:	virus de la estomatitis vesicular
VSV-G:	proteína G del virus de la estomatitis vesicular
ψ:	señal de empaquetamiento

Apéndice 2: soluciones y reactivos:

Transformación de los plásmidos pGIA, pGNIA y pVSV-G en *E. coli*s competentes

- Medio SOC (Gibco)
Composición en 1 lt:

Triptona	2%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM

Esterilizar por autoclave

- Medio agar LB-Amp (Gibco)
Composición en 1 lt:

Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	15g
NaOH 1N	1ml
Agar	15 g

Esterilizar por autoclave

- Medio LB-Amp (1 lt)

Triptona	10g	1 %
Extracto de levadura	5 g	0.5 %
NaCl	5 g	0.5 %

Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH.

Amplificación y purificación de los plásmidos pGIA, pGNIA y pVSV-G

- Kit de maxiprep (Qiagen)

- Amortiguador TE pH 8.0 (10 ml)

Tris Cl	121 mg	0.1 M
EDTA	2 mg	1 mM

Cultivo, expansión, cuantificación y criopreservación de células GP-293

- Medio DMEM 10% SFB y penicilina [100 unidades/ml]/streptomicina [100 µg/ml] (1 lt)

DMEM (Gibco)	1000 ml	
SFB	100 ml	10%
pen/strep	10 ml	1%

- Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) 10X (1lt)

NaCl	1.37 M	80 g
KCl	27 mM	2 g
Na ₂ HPO ₄	0.2 M	27.07 g
NaH ₂ PO ₄	2 mM	2.4 g

Esterilizar por autoclave

- Tripsina 0.25% EDTA 0.038% (Gibco)

Composición en 1 lt:

Tripsina	2.5 g	0.25%
EDTA-4Na	0.38 g	0.038%
Rojo fenol	15 mg	0.0015%

En solución salina balanceada de Hanks (HBSS) sin Ca²⁺ ni Mg²⁺

- Medio de criopreservación:

DMEM (Gibco; 10 ml)		
SFB,	1 ml	10%
pen/strep	100 µl	1%
DMSO	1 ml	10%

Transfección de células GP-293 para la preparación de los lotes retrovirales

- Sistema pantrópico de expresión retroviral (BD Biosciences)

- CaCl₂ 2M (Gibco)

- HeBS 2X (200 ml)

NaCl	3.2 g
KCl	142 mg
Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	76 mg
D-glucosa	540 mg
HEPES (libre de ácidos)	2 g

Se disuelve todo en 180 ml de H₂O bidestilada y se ajusta el pH a 7.03 con NaOH 5N. Aforar a 200 ml y preparar tres lotes a pH ligeramente diferentes.

Ajustar el pH a 7.06 con NaOH 1N y separar 65 ml del total. Llevar el resto a pH 7.10 y separar otros 65 ml. El resto se ajusta a pH 7.14.

Filtrar para esterilizar los 3 lotes con filtros de 0.45 µm y dividir cada lote en alícuotas de 12 ml que se almacenan a -20°C.

Ensayo de Luciferasa

- Amortiguador de lisis (10 ml)

NaCl	27 mg	150 mM
Tris pH 7.2	24.2 mg	20 mM
Tritón X-100	100 µL	1%
DTT	1.5 mg	1 mM
1 Tableta de inhibidor de proteasas		

- Amortiguador de ensayo (20 ml)

Ticina	107.5 mg	30 mM
DTT pH 7.8	31 mg	10 mM
ATP	33.1 mg	3 mM
MgSO ₄ -7H ₂ O	73.8 mg	15 mM

- D-Luciferina pH 6.1-6.5 1 mM 2.8 mg en 10 ml de H₂O bidestilada.

Titulación de los vectores GIA y GNIA.

Paraformaldehído (PFA) 4% (10 ml)

H ₂ O	8 ml (calentar y mantener en agitación)
PFA	0.4 g
PBS 10X	1 ml
H ₂ O	1 ml (para aforar a 10 ml)
NaOH 42%	8 µl

Diseción de células de corteza de rata del día embrionario 14 (E14)

- Etanol 70%

- Solución de Krebs 10X (1 lt)

NaCl	7.07 g
KCl	36 mg
KH ₂ PO ₄	166 mg
NaHCO ₃	2.14 mg
Glucosa	2.57 g
Rojo Fenol	15 mg

- Stock de Mg²⁺ (MgSO₄ 3.8%; 10 ml)

MgSO ₄	380 mg
-------------------	--------

- Solución para mantener tejidos (10 ml)

Krebs 10X	10 ml
BSA	0.3 g
Stock de Mg ²⁺	800 µl

Cultivo primario de células de corteza de rata E14

- Medio N2 (1 lt)

DMEM F12 (Gibco)	12 g	
Insulina	25 mg	-se disuelve en 500 µl de agua estéril y 5 µl de NaOH 10 mM.
Sodio-selenio (5 µg/ml)	60 µl	30 nM
Putresina (1M)	100 µl	100 µM
Progesterona (300 µM)	66.6 µl	20 nM
Glucosa	1.55 g	8.6 mM
Glutamina	73 mg	0.4 mM
NaHCO ₃	1.69 g	20 mM
Transferrina	100 mg	1.3 µM

Ajustar pH a 7.2 y filtrar para esterilizar y añadir antibióticos.

Penicilina/estreptomicina 100X 10 ml concentración final 1%

- PLO [15 µg/ml]

- Fibronectina 1000X [1 mg/ml]

- bFGF 1000X [10 µg/ml]

Pasaje de cultivos primarios de CMN de corteza cerebral de rata (E14).

- PBS-EDTA (0.1 mM)

PBS 1 lt

EDTA 0.5 mM pH 8 20 ml

Transducción de CMN de corteza cerebral de rata E14 con los vectores GIA y GNIA.

- LIF 1000 X [10⁶ unidades/ml]

- Ácido ascórbico 1000 X [200 mM]

Inmunofluorescencia de las CMN en cultivos control y transducidas con los vectores GIA y GNIA.

- PBS 0.1% BSA (100 ml)

PBS 100 ml

BSA 100 mg

- Solución de bloqueo (10 ml)

PBS 1X 9 ml

NGS 1 ml

Tritón X-100 30 µl

- Anticuerpos primarios

anti-nestina monoclonal IgG1 hecho ratón (Developmental Studies Hybridoma Bank)

TuJ1 policlonal hecho en ratón (Covance).

TuJ1 policlonal hecho en conejo (Covance).

anti-GFAP policlonal hecho en conejo (DAKO).

anti-GFAP monoclonal IgG2a hecho en rata (ZYMED).

anti-GFP policlonal hecho en conejo (Molecular Probes).

anti GFP monoclonal IgG2a hecho en raton (Q-BIO gene).

- Anticuerpos secundarios

anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 488 hecho en cabra (Molecular Probes).

anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 568 hecho en cabra (Molecular Probes).

anti-IgG2a de ratón acoplado a FITC hecho en cabra, (Southern Biotechnology).

anti-IgG de rata acoplado a Alexa 350 hecho en cabra (Molecular Probes).

anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 350 hecho en cabra (Molecular Probes).

- Aqua Poly/Mount (Polysciences Inc.)