



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---



**Maestría en Ciencias Bioquímicas**

**“Inducción de la expresión transgénica de Oct-4 por  
retrovirus que expresan a la recombinasa de Cre en  
células troncales neurales”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

**BIOL. NIDIA SAMARA RODRÍGUEZ RIVERA**

Tutor: DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ

**Septiembre 2008**





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.

## **Agradecimientos**

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Iván Velasco Velázquez en el departamento de de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, apoyado por CONACYT con el proyecto de ciencia básica 50715

Quiero agradecer a los miembros de mi comité tutorial, Dra. Hilda Lomelí Buyoli, Dr. Jorge Vazquez Ramos y Dr. Iván Velasco por todos sus comentarios y apoyo durante la realización del trabajo experimental.

También quiero agradecer a los miembros de mi jurado, Dra. Lourdes Massieu Trigo, Dr. Félix Recillas Targa, Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dr. Jorge Vázquez Ramos y Dr. Julio Morán Andrade, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

De igual forma quiero agradecer todo el apoyo técnico, ayuda y comentarios brindados por la Dra. Anayansi Molina Hernández y la Biol. Eugenia Rojas.

## **Los más importantes!!!**

Quiero utilizar este espacio para dar las gracias a todas aquellas personas que han estado acompañándome en el camino, tanto profesional como personalmente.

Ana, Emmanuel, Fabián, Gricelda, Itzel, Iván, Erika, Eugenia, Natllely y Rodrigo, cada uno de ustedes fue muy importante a su forma, además de mi "familia" en estos años en el instituto. Gracias por todo.

A mis padres, ambos me han dado mucho y los amo por igual. Gracias sobre todo por dejarme siempre tomar mis propias decisiones, por respetarlas y por estar siempre ahí incondicionalmente. A mis hermanos Ivonne y Omar, pues también han sido mis maestros. Los amo y me llena de alegría poder compartir este momento con ustedes.

Ezequiel, mi ángel. No hay palabras para agradecerte todo. Te amo, gracias por entrar en mi vida y quedarte ahí. Este apenas es el comienzo 😊 .

A todos mis prim@s amig@s, aún con el poco tiempo y la distancia siempre han estado presentes. Yunuen, una mención especial, por que eres especial, échale muchas ganas siempre, nos queda mucho por delante primos!!!

A todos mis amigos, ninguno va antes o después que otro, todos ustedes son especiales y los quiero mucho.

## Índice

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>5</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>7</b>
Células troncales.....	7
Mantenimiento de la pluripotencia en células troncales.....	9
El factor de transcripción Oct-4 .....	10
Desarrollo den sistema nervioso y células troncales neurales.....	
15    Desarrollo del mesencéfalo y sus derivados.....	
17	
Células troncales neurales adultas.....	18
<b>Antecedentes.....</b>	<b>19</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>24</b>
<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>25</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>26</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>26</b>
<b>Objetivos particulares.....</b>	<b>26</b>

<b>Metodología.....</b>	<b>27</b>
Estudio de la proliferación y diferenciación de células troncales neurales extraídas del mesencéfalo ventral de ratones Oct4LoxP.....	27
Genotipificación de ratos Oct4-LoxP: tinción con X-gal.....	28
PCR: Genotipificación de embriones Oct4-LoxP y control de la escisión por Cre .....	29
Preparación vectores retrovirales.....	30
Titulación de los vectores retrovirales.....	32
Inmunotinciones.....	32
Ensayos de incorporación de BrdU.....	33
TUNEL.....	33
RT-PCR.....	34
Análisis estadístico.....	35
<b>Resultados.....</b>	<b>36</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>47</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>51</b>

## Abreviaturas

BrdU	Bromo-deoxiuridina
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico (también FGF-2)
CGP	Células germinales primordiales
CMI	Células de la masa interna
CT	Células troncales
CTCE	Células troncales de carcinoma embrionario
CTE	Células troncales embrionarias
CTEG	Células troncales embrionarias germinales
CTN	Células troncales neurales
CTNA	Células troncales neurales adultas
FGF8	Factor de crecimiento fibroblástico 8
FGF20	Factor de crecimiento fibroblástico 20
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
NGS	Suero normal de cabra
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
POU5f1	Factor de transcripción clase 5 de dominio POU
SFB	Suero fetal bovino
SHH	Sonic Hedgehog
SSEA1	Antígeno específico de la etapa embrionaria 1
TA	Temperatura ambiente
TH	Tirosina-hidroxilasa
TUNEL	Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling

u.f.c	Unidades formadoras de colonias
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosido
ZSV	Zona subventricular
$\beta$ -geo	Caset de resistencia a neomicina fusionado al gen de $\beta$ -galactosidasa de pollo



## Resumen

Las células troncales poseen la capacidad de autorenovarse y de generar diferentes tipos celulares (Donovan y Gearhart, 2001) dependiendo del linaje y/o grado en el desarrollo del cual sean obtenidas. Las células troncales neurales (CTN), obtenidas durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso son capaces de diferenciarse a todos los tipos celulares de este linaje, principalmente neuronas y glia. Por otro lado, células más tempranas, como las células troncales embrionarias (CTE) pueden diferenciarse no sólo a células de linaje neural si no al resto de los linajes embrionarios (endodermo y mesodermo), por lo que se les llama pluripotentes. Se sabe que las CTE expresan factores de transcripción como Sox-2, Nanog y Oct-4, que son importantes en el mantenimiento de la pluripotencia o la autorenovación características de estas células (Niwa, 2001). Se ha visto que algunos de estos factores por sí solos son capaces de mantener estas capacidades en las CTE y, por otro lado, la expresión ectópica de estos factores ha mostrado que se puede reprogramar a una célula ya diferenciada a un estado pluripotente (Takahashi y Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007).

Por tal motivo en este trabajo iniciamos la búsqueda de un modelo de estudio basado en CTN en el que se expresara ectópicamente a la proteína Oct-4, con el fin de analizar si este factor es clave en el proceso de desdiferenciación o reprogramación de estas células a un estadio pluripotente o con mejor capacidad de diferenciación a tipos celulares específicos. Para lo cual se utilizaron CTN de corteza de ratones de 14 días de gestación Oct4-LoxP, que tienen insertado un transgén con  $\beta$ -galactosidasa y neomicina flanqueado por sitios LoxP y la secuencia del gen de Oct-4, se buscó activar ectópicamente la expresión de Oct-4 transduciéndolas con vectores retrovirales que expresaban a la recombinasa de Cre fusionada a la proteína verde fluorescente. Se buscó mediante inmunocitoquímica la presencia de Oct-4 en las células transducidas bajo diferentes condiciones de cultivo pero no fue detectada. El nivel de expresión de RNA mensajero fue de aproximadamente 15% en comparación con el nivel basal expresado por CTE. Adicionalmente encontramos un incremento moderado en la muerte celular en las células Cre-GFP+ que se incrementó conforme avanzaba el tiempo de cultivo. Finalmente

se concluyó que los ratones Oct4-LoxP no son un buen modelo para el estudio de la expresión ectópica de Oct-4 en CTN.

## **Introducción**

### **Células Troncales**

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

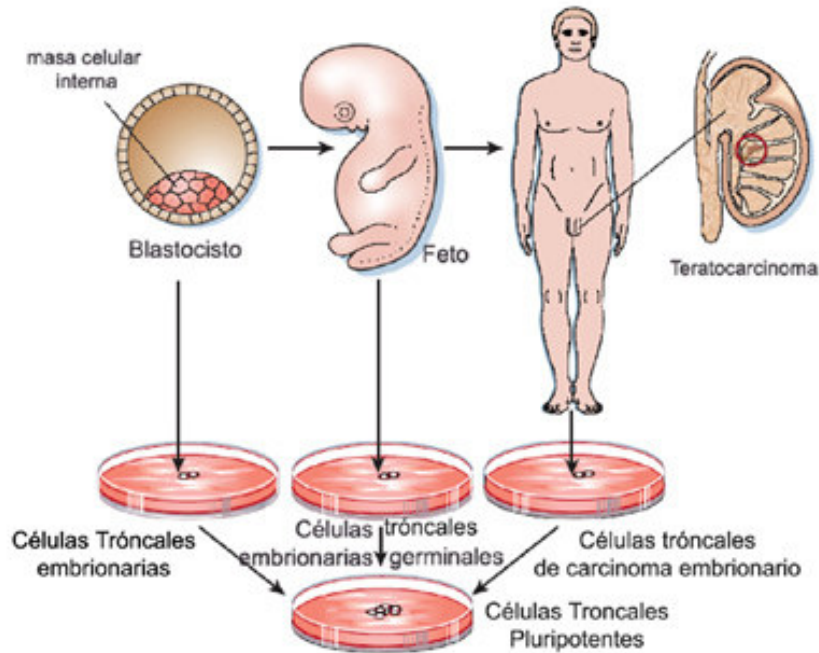
De acuerdo al tipo de células a las que pueden dar lugar, existen diferentes tipos de CT. Esto depende en gran medida de su localización y del estado del desarrollo de los organismos de los que se aíslan.

Una célula totipotente es aquella que es capaz de generar 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.

Las CT aisladas de etapas más tempranas en el desarrollo tienen un mayor potencial de diferenciación, es decir, pueden generar más tipos celulares que las CT aisladas de estadios más tardíos. Así podemos clasificar a las CT como pluripotentes o multipotentes (Fig. 1).

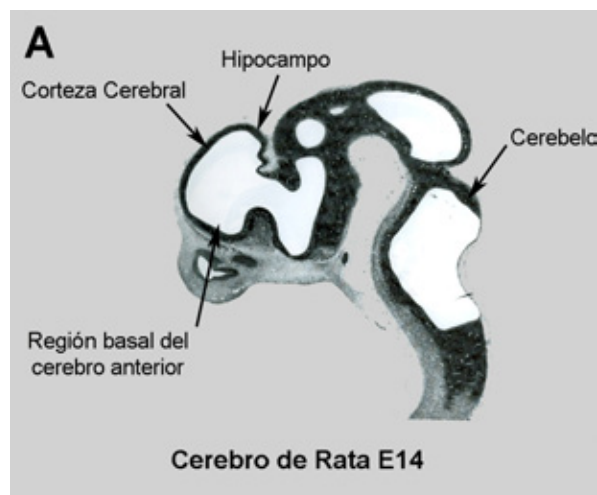
Las CT pluripotentes son capaces de generar todos los tipos celulares constituyentes de un organismo, primordialmente células de las tres capas germinales primarias: endodermo, mesodermo y ectodermo, pero no estructuras

extraembrionarias (como la placenta). Dentro de esta clasificación, encontramos a las células troncales embrionarias (CTE) que son derivadas de la masa celular interna del blastocisto (Fig. 1), el cual es considerado como el último estadio del desarrollo embrionario antes de la implantación del embrión (Evans y Kaufman, 1981); también están las células troncales embrionarias germinales (CTEG), que se derivan de las células germinales primordiales que son las células precursoras diploides de los gametos durante el desarrollo embrionario (Matsui *et al.*, 1992); el tercer tipo son las células troncales de carcinoma embrionario (CTCE) aisladas de teratocarcinomas (Andrews, 1998), que son tumores que se generan en ovarios a partir de ovocitos que se activan partenogénicamente y en mayor medida en testículos a partir de gonocitos con características anormales (Andrews, 2002). Las CT pluripotentes de ratón, tienen muchos atributos en común, son cultivadas para su proliferación sobre una monocapa de fibroblastos mitóticamente inactivados, llamadas células alimentadoras, o en presencia del Factor inhibidor de la leucemia (LIF). Las células pluripotentes son morfológicamente muy similares en estas condiciones y expresan varias moléculas en común como: la enzima fosfatasa alcalina, E-Caderina, el antígeno específico de etapa embrionaria 1 (SSEA1), los factores de transcripción Oct-4 y Nanog, además de presentar una alta actividad de telomerasa (Gardner y Brook, 1997; Donovan y Gearhart, 2001).



**Fig. 1. Origen de las células troncales (CT) totipotentes y pluripotentes.** El esquema representa de izquierda a derecha los sitios de los cuales se pueden obtener los tres tipos de CT pluripotentes. De la masa celular interna del blastocisto se obtienen las células troncales embrionarias (CTE), de las células primordiales germinales de gónadas embrionarias, las células troncales embrionarias germinales (CTEG) y por último, de tumores gonadales de adulto se derivan las células troncales de carcinoma embrionario (CTCE). Las CT pluripotentes presentan las mismas características bioquímicas y morfológicas en cultivo. Estas células pueden diferenciarse a tipos celulares pertenecientes a las 3 capas germinales, endodermo, mesodermo y ectodermo (Modificado de Donovan y Gearhart, 2001).

Las CT multipotentes se encuentran más restringidas en cuanto a la variedad de tipos celulares que pueden generar. Son progenitores específicos de cada tejido que pueden generar por lo menos un tipo celular diferenciado. Ejemplos de estas células pueden ser las CT hematopoyéticas, que son capaces de generar todos los tipos celulares constitutivos de la sangre, o las células troncales neurales (CTN) que generan todas las estructuras del sistema nervioso (Fig. 2).



**Fig. 2. Principales regiones de las cuales se han aislado células troncales neurales (CTN).** A) Corte sagital del cerebro de un embrión de rata en estadio embrionario de 14 días (E14), las flechas indican las zonas en el cerebro embrionario de donde se han logrado obtener CTN (Modificado de Altman y Bayer, 1995).

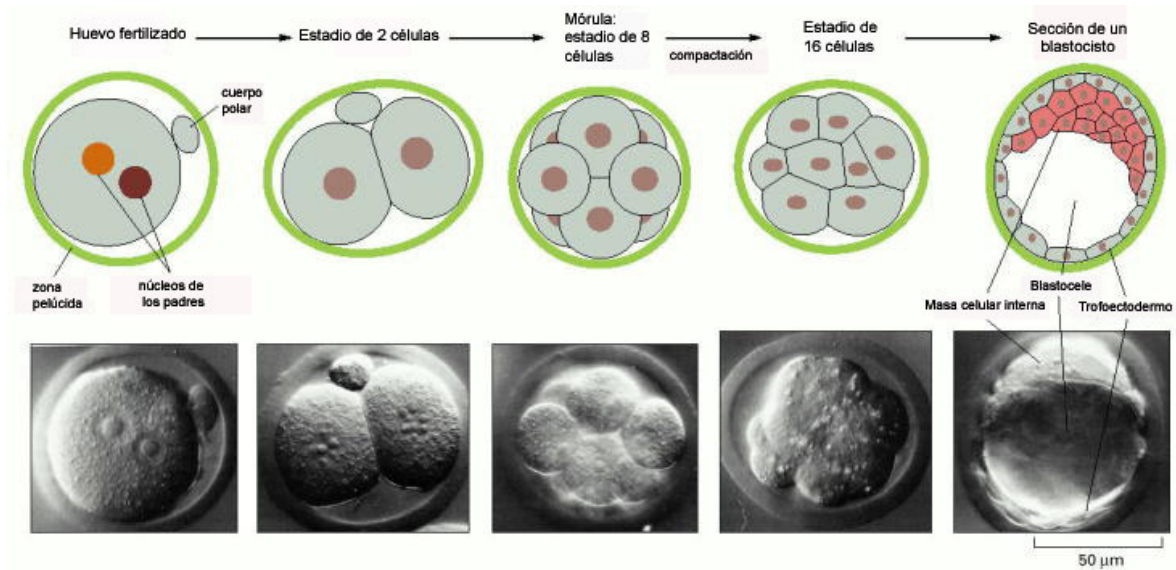
## **Mantenimiento de la pluripotencia en CT**

En mamíferos, desde el punto de vista del desarrollo embrionario, a la formación del cigoto prosigue la segmentación, que consiste en una serie de divisiones mitóticas rápidas y consecutivas que establecen la condición pluricelular del nuevo individuo. Durante esta etapa, se suprime la fase G1 del ciclo celular y disminuye la duración de G2 en las células en división. A consecuencia de estas divisiones se forma la mórula, que es un grupo compacto de células, aproximadamente del mismo tamaño que el cigoto, del cual se originaron en primer lugar. La mórula se forma en el estadio de 8 a 16 células y está constituida por un pequeño grupo de células internas rodeado de un grupo un tanto mayor de células externas (Barlow y Sherman, 1972). La formación de estos dos grupos celulares constituye justamente el primer proceso de diferenciación en el desarrollo en los mamíferos. Estos dos grupos celulares generados por compactación dan origen posteriormente al blastocisto, que posee una cavidad interna llamada blastocele y constituye el último estadio antes de la implantación. La mayor parte de las células que quedan al exterior de la mórula van a constituir el trofoblasto o trofoectodermo y en la parte central o interior de la mórula a la masa celular interna (CMI; Fig. 3). Las células del trofoblasto generan estructuras no embrionarias como el corion, que es la parte no embrionaria de la placenta, encargada de la nutrición y el transporte de oxígeno al embrión, y de formar una barrera contra el sistema inmune de la madre. Mientras que a partir de las CMI se origina el embrión y el amnios. En ratón, las primeras células reconocidas como pluripotentes en la CMI del blastocisto se aíslan desde el día embrionario 3.5 (E3.5) y hasta aproximadamente E5.5 algunas células primitivas del ectodermo permanecen pluripotentes (Boiani y

Scholer, 2005). Una proteína clave en el mantenimiento de la pluripotencia de las CMI es el factor de transcripción Oct-4.

### El factor de transcripción Oct-4

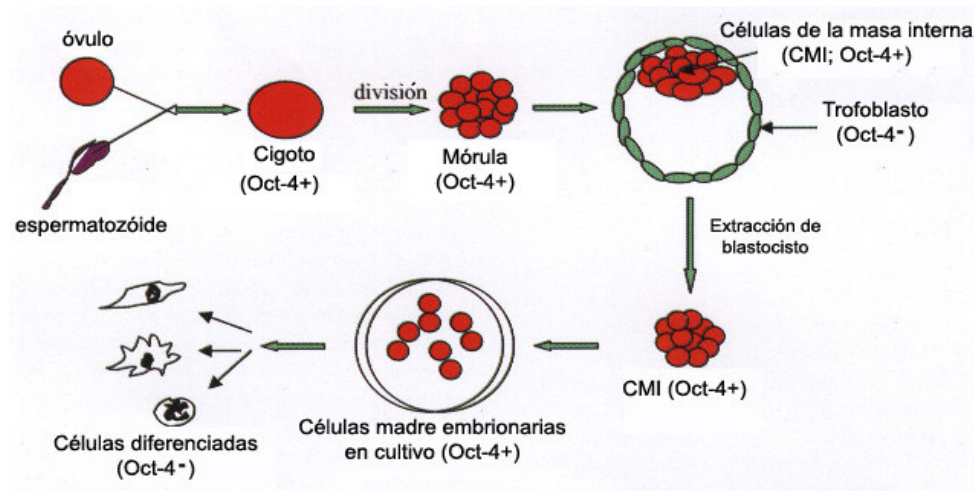
Oct-4 es un factor transcripcional de 352 aminoácidos que fue identificado por



**Fig. 3. Desarrollo temprano en mamíferos.** El cigoto se forma a partir de la fusión del óvulo con el espermatozoide. Posteriormente el cigoto se divide consecutivamente para generar una esfera compacta de células llamada mórula. Más tarde se genera una cavidad en la masa celular (blastocelo) y se forma el blastocisto, última estructura antes de la implantación, en donde se distinguen dos grupos celulares con características particulares: las células de la masa celular interna, que van a generar principalmente a los tipos celulares que constituyen al embrión, y las células del trofoectodermo que generan estructuras extraembrionarias (Modificada de Gilbert, 2003).

primera vez como un factor de unión a octámeros en CTE y CTCE (Lenardo *et al.*, 1989; Scholer *et al.*, 1989). Pertenece a la familia Pit-Oct-Unc (POU) y también es conocido como factor de transcripción clase 5 de dominio POU (POU5f1). Esta proteína se expresa únicamente en mamíferos. Inicialmente se encuentra en el óvulo y se mantiene presente en el cigoto como un factor de origen materno (Scholer *et al.*, 1989; Rosner *et al.*, 1991), su expresión se mantiene durante todo el periodo de pre-implantación (Scholer *et al.*, 1989; Okamoto *et al.*, 1990; Rosner *et al.*, 1990). En el blastocisto, la expresión de Oct-4 desaparece del trofoectodermo y sólo se detecta en la CTI (Okamoto *et al.*, 1990; Rosner *et al.*, 1990; Palmieri *et al.*, 1994). En el endodermo primitivo, los niveles de la proteína se incrementan incluso por encima de

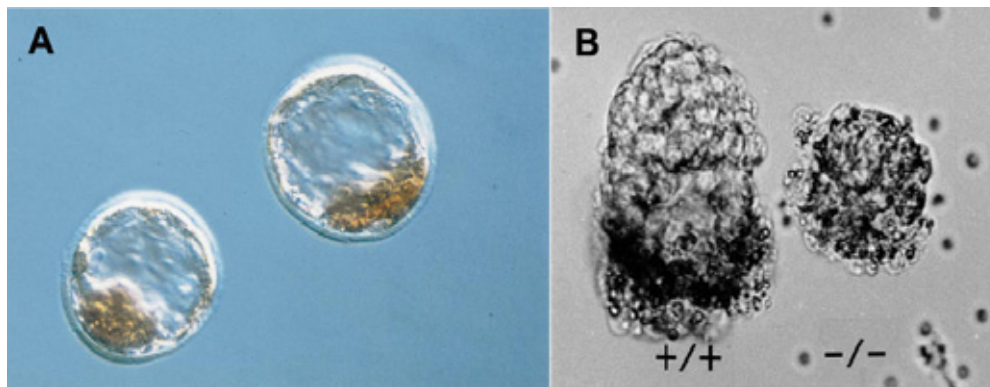
los niveles en las CMI cuando estas comienzan a diferenciarse y migran a lo largo de la superficie interna del trofoectodermo. En el ectodermo, su expresión persiste hasta E7.5 (Rosner *et al.*, 1990), después de este estadio su expresión se restringe a las células germinales primordiales (CGP). Esta proteína se expresa también en CT pluripotentes en cultivo (Fig. 4)



**Fig. 4. Expresión de Oct-4 durante el desarrollo pre-implantación del embrión y en células madre embrionarias (CME).** Parte superior: Oct-4 se encuentra presente en el óvulo y se expresa en el cigoto como un factor de origen materno. La expresión cigótica de Oct-4 comienza alrededor del estadio de 8 células y se mantiene en todas las células de la mórula. Cuando se forma el blastocisto, Oct-4 se reprime en las células del trofoblasto, pero su expresión se mantiene en las células de la masa interna (CMI). Parte inferior: a partir de las CMI se pueden generar CME que expresan Oct-4 mientras se mantienen indiferenciadas. Al diferenciarse las CME, la expresión de esta proteína se suprime.

Dada su expresión en células totipotentes y CT pluripotentes, se asume que Oct-4 está implicada en la pluripotencia y el mantenimiento de un estado indiferenciado muy primitivo (Rosner *et al.*, 1990), ya que cuando estas células se

diferencian los niveles de la proteína disminuyen (Fig. 4). Adicionalmente, se ha observado que embriones de ratones *Oct-4*<sup>-/-</sup> generan mórulas muy compactas que fallan en diferenciarse a CMI y mueren durante el periodo de implantación (Fig. 5), y cuando estas células se cultivan adquieren morfologías parecidas a células del trofoectodermo (Nichols *et al.*, 1998). No obstante, otras observaciones sugieren que se requiere una cantidad crítica de Oct-4 para mantener la pluripotencia, pues al incrementar en un 50% la expresión endógena de la proteína en CTE de ratón, éstas se diferencian a células de endodermo o mesodermo, mientras que su represión por debajo del 50% promueve la diferenciación de las CTE hacia trofoectodermo (Fig. 6; Niwa *et al.*, 2000). Adicionalmente, se observó que la expresión mantenida de Oct-4 en CTE de ratón cultivadas en ausencia de suero y LIF, promovía la diferenciación de éstas a células parecidas a ectodermo que posteriormente se diferenciaban hacia neuronas (Shimozaki *et al.*, 2003).

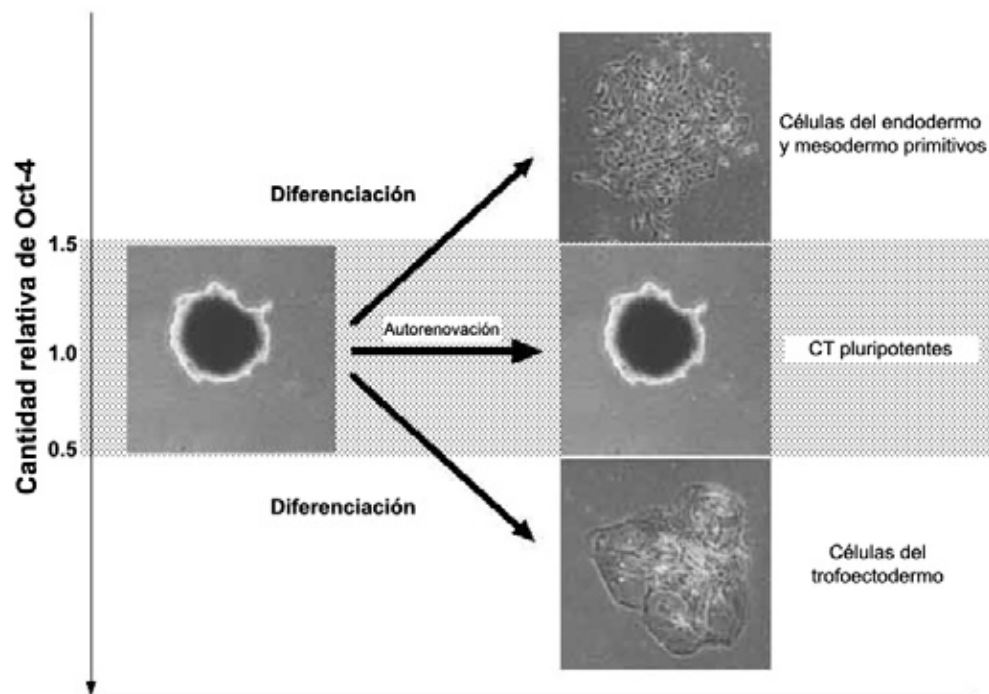


**Fig. 5. Expresión de la proteína Oct-4 en embriones tempranos de ratón.** **A)** Expresión endógena de Oct-4 en blastocistos de 3.5 días de desarrollo embrionario (E3.5). La expresión de la proteína se concentra en las células de la masa interna (Modificada de Ovitt y Schöler, 1998). **B)** Embriones en estadio de peri-implantación (E5.25) silvestres (+/+) y mutantes negativos para Oct-4 (-/-). Los embriones silvestres son capaces de formar células de la masa interna (CMI), mientras que los mutantes conservan una morfología de mórula y no generan CMI (Modificada de Nichols *et al.*, 1998)

La expresión del gen *Oct-4* se reprime en CTE, CTEG y CTCE cultivadas en presencia de ácido retinóico o en ausencia de LIF, lo que provoca que las células se diferencien (Palmieri *et al.*, 1994). Al tratar CTE o CTCE con ácido retinóico, *Oct-4* sufre una rápida inactivación transcripcional al principio del proceso de diferenciación.



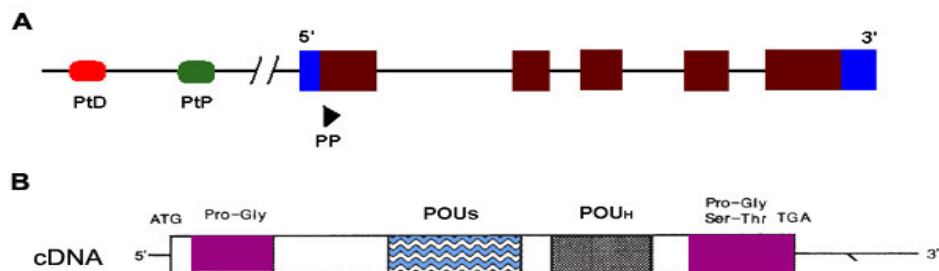
Esta inactivación es temporal y lleva a cambios epigenéticos que permiten un silenciamiento irreversible debido a la heterocromatinización y la metilación del ADN en el promotor, controlada por la metilasa G9a (Feldman *et al.*, 2006). Por otro lado, el *locus* de Oct3/4 se encuentra en la región eucromática donde se encuentra el complejo mayor de histocompatibilidad (Nordhoff *et al.*, 2001; Horton *et al.*, 2004), en una región de alta densidad génica y con gran cantidad de genes activos que mantienen su expresión hasta la diferenciación terminal. Con base en esto, en otro estudio se observó que el mecanismo de represión de Oct-4 era altamente selectivo y estaba mediado no sólo por la metilación de las islas CpG en el promotor, sino también por la tri-metilación del residuo de lisina 27 en la histona H3 debida a proteínas del complejo Polycomb que aparentemente son capaces de reprimir genes selectivamente sin afectar las regiones genómicas adyacentes (Aoto *et al.*, 2006).



**Fig. 6. Relación entre la expresión de Oct-4 y el destino de las células troncales.** Para mantener un fenotipo indiferenciado, el nivel de Oct-4 debe mantenerse dentro de los niveles normales de expresión diploide  $\pm$  el 50%. Si la expresión de Oct-4 se incrementa por encima de este nivel, las células madre se diferencian a endodermo o mesodermo primitivo, mientras que si sus niveles disminuyen más allá del 50% las células se diferencian hacia trofoectodérmicas. (Modificado de Niwa, 2001).

Oct-4 es capaz de mediar la activación o represión de diversos genes durante el desarrollo (Pesce y Scholer, 2001) uniéndose a las secuencias octaméricas ATGCAAAT, ATTTGCAT; también puede unirse a secuencias alternativas ricas en A/T (Okamoto *et al.*, 1990; Saijoh *et al.*, 1996) que se encuentran en las regiones promotoras o potenciadoras de los genes que regula. El dominio que media esta unión, POU contiene dos subdominios: el subdominio específico POU (POU<sub>S</sub>) y el homeodominio (POU<sub>H</sub>), adicionalmente presenta secuencias ricas en prolina y glicina en el extremo N-terminal y en la parte C-terminal una región rica en prolina, glicina y serina/treonina. Las regiones ricas en prolina suelen estar involucradas en activación transcripcional (Rosner *et al.*, 1990; Fig. 7).

Todos los miembros de la familia a la que pertenece el gen *Oct-4* se expresan durante el desarrollo embrionario temprano (Ovitt y Scholer, 1998). Este gen contiene 5 exones (Okazawa *et al.*, 1991; Yeom *et al.*, 1996). Oct-4 se encuentra en el cromosoma 17 en ratones y en una región homóloga a éste en el cromosoma 6 en humanos (Takeda *et al.*, 1992). Su región promotora no contiene caja TATA (Okazawa *et al.*, 1991) y tiene por lo menos tres regiones reguladoras: un promotor proximal ubicado dentro de los primeros 250 pares de bases (pb) después de la región del inicio de la transcripción, un potenciador proximal y un potenciador distal que se encuentran 1.2 y 2 kb río arriba del inicio de la transcripción respectivamente (Fig. 7).



**Fig. 7. Estructura y regiones regulatorias del gen de Oct-4.** A) Estructura genómica y regiones regulatorias del gen *Oct-4*. PP: promotor proximal; PtP: potenciador proximal; PtD: potenciador distal. Las cajas azules representan regiones no traducidas y las café los 5 exones que constituyen al gen, separados por 4 intrones (líneas). B) Representación esquemática del cDNA de Oct-4, con los dominios presentes en la proteína. Pro-Gly: dominio N-terminal rico en prolina y glicina; POU<sub>S</sub>: dominio POU específico; POU<sub>H</sub>: homeodominio POU; Pro-Gly-Ser-Thr: dominio rico en prolina, glicina, serina y treonina (Modificado de Rosner *et al.*, 1990)

El promotor proximal contiene sitios superpuestos de unión para factores de transcripción de la familia de Sp1, que median la expresión de genes que carecen de la caja TATA en sus promotores (Pugh y Tjian, 1991); esta actividad se encuentra presente sobre todo en genes de células indiferenciadas, mientras que en células diferenciadas se ha observado que la potenciación de promotores requiere de la caja TATA (Majumder y DePamphilis, 1994). Este promotor contiene además un elemento de respuesta hormonal (HRE) parecido a un elemento de respuesta canónica para ácido retinóico (RARE), que es reconocido por varias proteínas de la familia receptores a hormonas esteroideas incluyendo al ácido retinoico y los receptores retinoides X (Okazawa *et al.*, 1991; Schoorlemmer *et al.*, 1994).

El potenciador proximal se encarga de controlar la represión de *Oct-4* mediada por AR (Okazawa *et al.*, 1991), mientras que el potenciador distal conduce la expresión del gen durante el periodo pre-implantación y en las células germinales primordiales (Yeom *et al.*, 1996).

*Oct-4* es capaz de autorregularse, adicionalmente se han identificado muchos genes a los que es capaz de regular ya sea directa o indirectamente, algunos de ellos son: *Fgf4*, que codifica para el factor de crecimiento fibroblástico 4 (Avilion *et al.*, 2003) y que se expresa en las CMI (Yuan *et al.*, 1995), *Rex1* que codifica para un factor transcripcional con dominio de dedos de zinc que también se reprime después de la implantación (Ben-Shushan *et al.*, 1998), *Nanog*, y *Sox2* que codifican para factores transcripcionales homónimos que también son reguladores esenciales en el mantenimiento de las CMI y la autorenovación en CT pluripotentes (Mitsui *et al.*, 2003; Rodda *et al.*, 2005; Loh *et al.*, 2006). En este último caso, la relación que existe entre *Oct-4* y *Sox2* durante la determinación de destinos celulares en la etapa de pre-implantación se encuentra muy bien estudiada, ambos factores se regulan mutuamente (Catena *et al.*, 2004; Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005) y además actúan

sinérgicamente en la regulación de otros genes, como por ejemplo en el caso de *Nanog* (Rodda *et al.*, 2005). También se sabe que Oct-4 reprime a genes como *Pax6*, *Hox*, *Lhx* y *Engrailed-1* que se encuentran involucrados en la diferenciación neuronal (Boyer *et al.*, 2005).

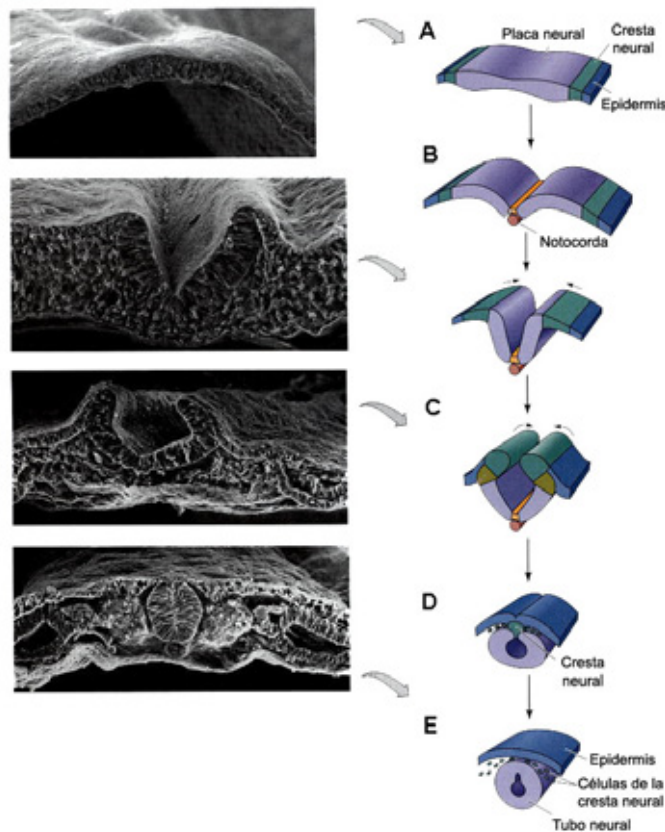
### **Desarrollo del sistema nervioso y células tróncas neurales**

En el presente trabajo, utilizamos CTN de mesencéfalo ventral de ratones, por lo que a continuación se explicará la formación de SN y los factores involucrados en la especificación de esta región del cerebro.

Durante la formación del SN en vertebrados, a partir del ectodermo neural (neuroectodermo) se forma la placa neural que está constituida por células columnares (; Keller *et al.*, 1992), mediante la inducción embrionaria primaria del mesodermo de la notocorda, el cual se encuentra localizado por debajo del ectodermo, en la región que va a dar origen a la cabeza (Fig. 8A). 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 (Fig. 8B). Las células dorsales adyacentes al surco neural posteriormente formarán la cresta neural (Fig. 8C y D), éstas son multipotenciales y constituyen las CTN del sistema nervioso periférico (Stemple y Anderson, 1992), ya que al diferenciarse *in vivo* dan lugar a melanocitos, células de los ganglios 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 sistema nervioso central (Fig. 8E Gilbert, 2003). Durante todo este proceso, es posible apreciar que la naturaleza de las células involucradas cambia: alrededor del 90% de las células presentes en el tubo neural en el día de desarrollo embrionario 11 (E11) expresan la proteína de filamentos

intermedios nestina, la cual es un marcador muy utilizado para la identificación de CTN (Lendahl *et al.*, 1990). Estas CTN 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 CTN, 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 CTN 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 CTN de manera más restringida en regiones como la corteza cerebral, el mesencéfalo ventral, la región basal del cerebro anterior, el hipocampo (Temple, 2001) y el cerebelo (Laywell *et al.*, 2000).

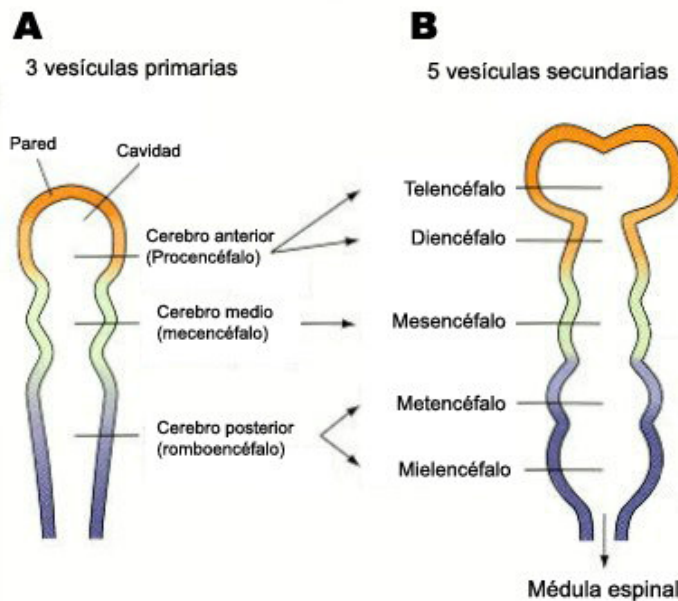


**Fig. 8. Neurulación primaria.**  
**A)** Las células de la placa neural pueden distinguirse como células alargadas en la región dorsal del ectodermo. **B)** El plegamiento de la placa comienza en la región media del embrión donde las células se anclan a la notocorda y cambian su forma mientras que 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).

### Desarrollo del mesencéfalo y sus derivados:

Después de la formación del tubo neural, comienzan a distinguirse estructuras globulares llamadas vesículas. Alrededor del día E8.5 en ratón pueden distinguirse 3 vesículas que constituyen las 3 divisiones básicas del cerebro: cerebro anterior, medio y posterior ó prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo respectivamente (Ybot-Gonzalez *et al.*, 2007); Fig. 9A), conforme avanza el desarrollo embrionario estas vesículas se subdividen para dar origen a 5 regiones. El prosencéfalo se divide en telencéfalo y diencefalo, el mesencéfalo se conserva y el romboencéfalo se subdivide en metencéfalo y mielencéfalo (Fig. 9B).

Cada una de estas vesículas va a conformar diferentes estructuras en el cerebro adulto. En particular el mesencéfalo, da origen a diferentes núcleos que están relacionados con el control del movimiento ocular o del esqueleto y los músculos. El cerebro medio también es una estación de paso esencial de las señales auditivas y visuales (Kandel *et al.*, 1995).



**Fig. 9. Neurulación secundaria.**

**A)** Posterior a la formación del tubo neural, éste se regionaliza en 3 vesículas: cerebro anterior, medio y posterior. **B)** Estas tres vesículas se subdividen posteriormente en 5 zonas, que constituirán finalmente a todas las regiones del cerebro: telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo.

Uno de los núcleos importantes que se generan en el cerebro medio es la *substancia nigra*, que está constituida principalmente por neuronas dopaminérgicas

(DA). Esta población se genera alrededor de E12 en ratón. En el presente trabajo, es de nuestro interés la diferenciación de neuronas DA ya que éstas son las células que degeneran en padecimientos como la enfermedad de Parkinson.

Como una vía de tratamiento a esta enfermedad se han diseñado terapias de reemplazo celular, en donde se implantan en el cerebro de animales modelo, como roedores o primates células DA obtenidas de tejido embrionario o diferenciadas a partir CTE ó CTN. Los protocolos existentes para la diferenciación de neuronas DA no tienen porcentajes de eficiencia de hasta 30% y se generan junto con estas neuronas otras poblaciones neurales. En una búsqueda por mejorar los protocolos de diferenciación para incrementar la proporción de neuronas DA es indispensable comprender los procesos de diferenciación de éstas células durante el desarrollo. Además de buscar nuevas estrategias para diferencias células troncales.

En el desarrollo, la inducción molecular del mesencéfalo comienza incluso antes de que la estructura anatómica sea evidente y está mediada por diferentes factores transcripcionales cuya expresión depende de señales organizadoras provenientes principalmente del istmo (Nakamura *et al.*, 2005; Nakamura y Watanabe, 2005). Algunos de los factores determinantes en esta inducción son: el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8), FGF20 y Sonic hedgehog (SHH) (van der Walt *et al.*, 2004; Smidt y Burbach, 2007).

En el presente trabajo uno de los objetivos es analizar la diferenciación de la población de neuronas dopaminérgicas presentes en la *substancia nigra* del mesencéfalo ventral de ratones E12, que pueden ser identificadas por la presencia de proteínas marcadoras como la Tirosina-hidroxilasa (TH) que es una enzima que participa en la síntesis de dopamina y noradrenalina y adrenalina.

## **CTN adultas**

Finalmente, no sólo durante el desarrollo embrionario existen CTN; también se ha observado neurogénesis debida a diferenciación de CT en la vida adulta en algunas zonas restringidas del cerebro (Alvarez-Buylla *et al.*, 2002).

La identificación inicial de las CTN adultas se hizo en el SNC de aves, en un núcleo de control vocal en canarios adultos (Goldman y Nottebohm, 1983). En mamíferos, se han identificado dos regiones neurogénicas: la zona subventricular adyacente a los ventrículos laterales (Doetsch *et al.*, 1999) y la capa subgranular del giro dentado en el hipocampo (Cameron *et al.*, 1993).



## Antecedentes

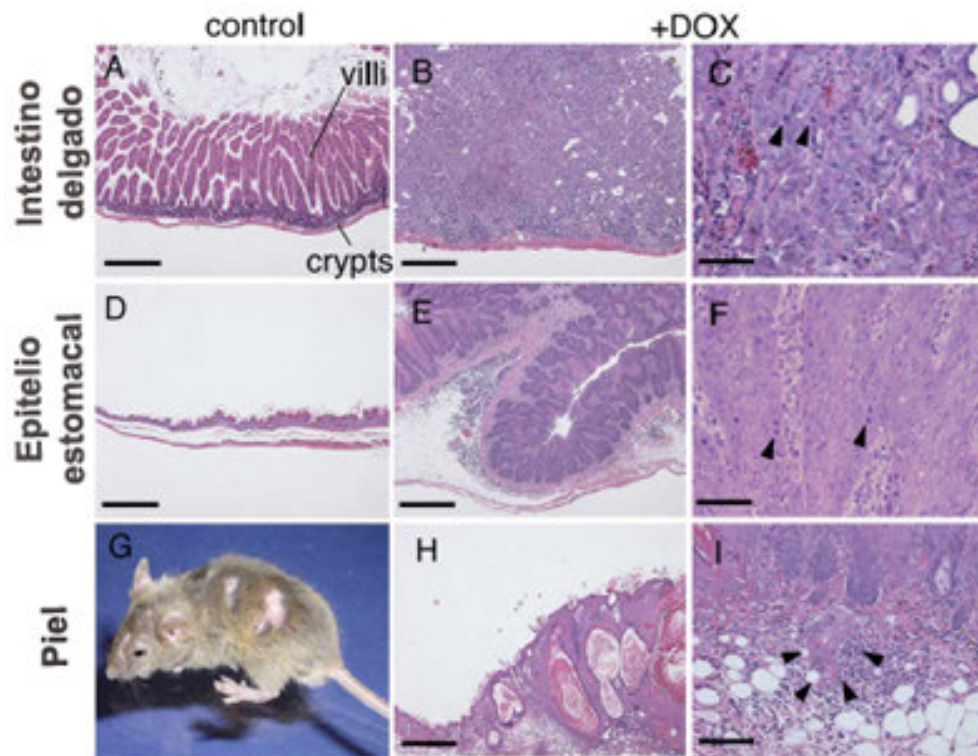
Con todo lo anterior queda en manifiesto que Oct-4 es un factor esencial durante el desarrollo temprano y dado que su expresión coincide temporal y espacialmente con la de las poblaciones pluripotentes no es extraño que se le considere como un factor esencial en el mantenimiento de la pluripotencia. Adicionalmente, algunos grupos han reportado la presencia de Oct-4 en tejidos ya diferenciados como sangre de cordón umbilical (Kucia *et al.*, 2006), células estromales mesenquimales y derivadas de médula espinal adulta (Jiang *et al.*, 2002; D'Ippolito *et al.*, 2004; Pochampally *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005), células del fluido amniótico, cardiomiocitos, páncreas (Ratajczak *et al.*, 2007) y células capilares (Yu *et al.*, 2006) . En todos los casos dicha población presentaba cierto grado de plasticidad, capacidad proliferativa e incluso otros marcadores que normalmente se asocian a células pluripotentes. Estos datos apoyan la idea de que Oct-4 puede desempeñar *per se* un papel importante en la identidad pluripotente de las células, además de que su expresión es permisible en contextos diferentes al que clásicamente se le asocian.

En este mismo sentido, también se ha observado que las células somáticas pueden ser reprogramadas al transferir sus núcleos al citoplasma de ovocitos (Wilmot *et al.*, 1997) o por fusión con CTE (Tada *et al.*, 2001; Cowan *et al.*, 2005), lo que indica la existencia de factores que pueden conferir pluripotencia a las células somáticas (Takahashi y Yamanaka, 2006). Algunos factores necesarios para el mantenimiento de la pluripotencia y supervivencia de las células troncales pluripotentes en cultivo son Nanog, Oct-4 y Sox2 (Niwa *et al.*, 2002; Boyer *et al.*, 2005; Loh *et al.*, 2006).

El grupo del Dr. Smith (Silva *et al.*, 2006) publicó un trabajo en el que se observa que la sobre-expresión de *Nanog* en células híbridas fusionadas de CTE y CTN aumenta la cantidad de colonias con morfología de CTE obtenidas. No obstante, la sobre-expresión de *Nanog* en CTN no fue capaz de inducir en ellas un fenotipo pluripotente. Con estos resultados, este grupo concluye que es posible sea necesaria

una combinación de factores para infundir pluripotencia a células más comprometidas y no un factor único. Sin embargo, como ya se mencionó, se sabe que *Nanog* es regulado transcripcionalmente por Oct-4 y Sox-2 (Rodda *et al.*, 2005), lo que hace posible que la activación de esta regulación en niveles anteriores de la señalización sea más eficiente en este sentido.

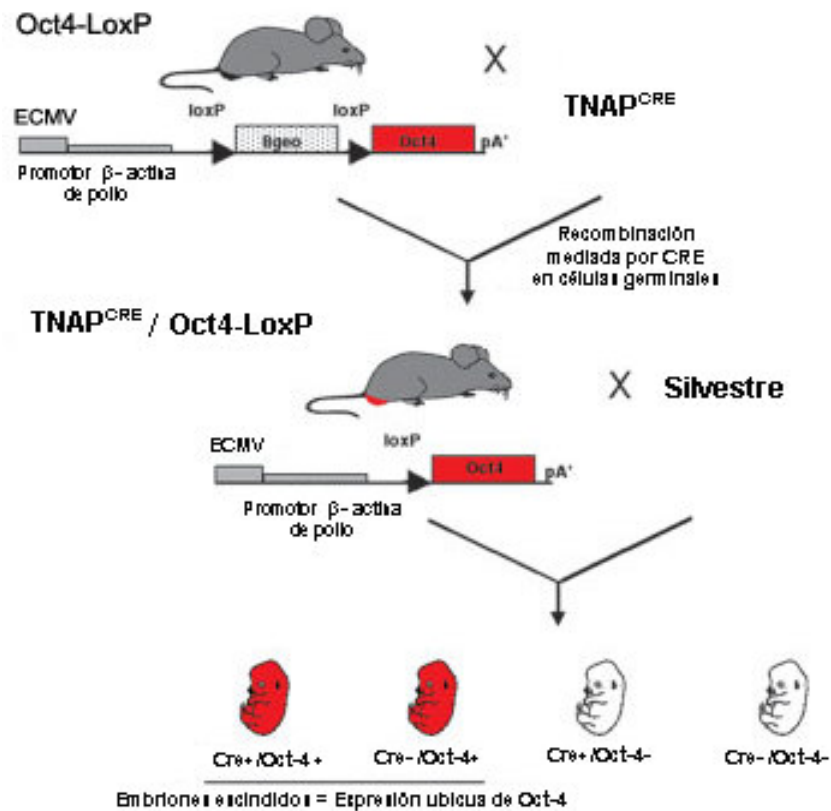
Otro antecedente es el estudio hecho por el grupo de Jaenisch (Hochedlinger *et al.*, 2005) en donde se generaron ratones transgénicos que expresaban Oct-4 bajo un promotor inducible por doxiciclina. Para activar la expresión de Oct-4 se administraba el antibiótico a los ratones en el agua que bebían. En este sistema se pudo observar un incremento en la proliferación de células precursoras, inhibición de la diferenciación y displasia en tejidos epiteliales como piel, intestino y estómago (Fig. 10), aunque no se observó ningún efecto en tejidos nerviosos, probablemente porque



**Fig. 10. Displasia en ratones con Oct-4 inducible.** A-C) La inducción de Oct-4 provoca crecimiento displásico en el intestino delgado (B), las células anormales muestran displasia y células mitóticas (C, flechas) mientras que los ratones control presentan una morfología normal (A). D-F) El epitelio estomacal se encuentra engrosado (E) y presenta células atípicas con núcleos alargados y nucleolos prominentes, además de la falta de diferenciación y muchas células en mitosis (F, flechas). G-I) En la piel se encontraron múltiples tumores (G), que histológicamente recuerdan a los de cáncer cutáneo con crecimiento invasivo aparente hacia el tejido subcutáneo (I, flechas). Barras de escala 500  $\mu$ m (A, B D, E y H); 50  $\mu$ m (C y F); 100  $\mu$ m (I). (Tomado de Hochedlinger *et al.*, 2005)

el antibiótico no fue capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

Un trabajo en donde se analizó la actividad de Oct-4 fue el del grupo de la Dra. Lomelí (Ramos-Mejía *et al.*, 2005) que produjo ratones transgénicos que expresan ubicuamente este gen, al integrar a su genoma una construcción que incluía al



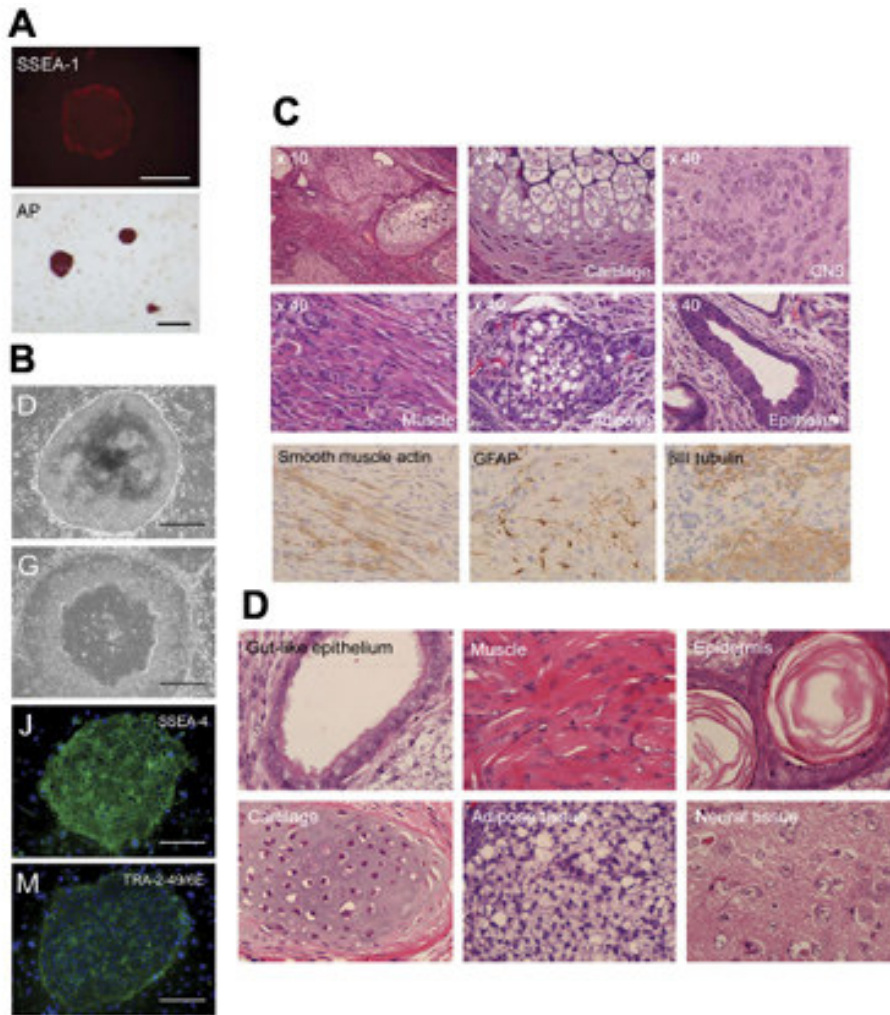
promotor de β-actina de pollo y el potenciador del citomegalovirus, seguidos por un caset con la proteína de fusión del gen de resistencia a neomicina y la β-galactosidasa (β-geo) flanqueado por sitios loxP y posteriormente, la secuencia codificante de *Oct-4* (ratones Oct4-loxP; Fig. 11).

**Fig. 11. Generación de ratones que expresan Oct-4 de forma ubicua.** Representación esquemática de los alelos transgénicos de presentes en los ratones de las líneas Oct4-LoxP y TNAP<sup>CRE</sup>/ Oct4-LoxP. En la línea Oct4-LoxP, la expresión del reportero  $\beta$ -geo se encuentra en todo el ratón. Después de la recombinación con CRE, en los ratones TNAP<sup>CRE</sup>/ Oct4-LoxP se remueve el caset  $\beta$ -geo y Oct-4 se expresa en la línea germinal. Machos TNAP<sup>CRE</sup>/ Oct4-LoxP son cruzados con hembras CD1 y los gametos modificados de TNAP<sup>CRE</sup>/ Oct4-LoxP permiten la generación de embriones con expresión general de Oct-4 mostrados en rojo en la figura. (Modificado de Ramos-Mejia *et al.*, 2005).

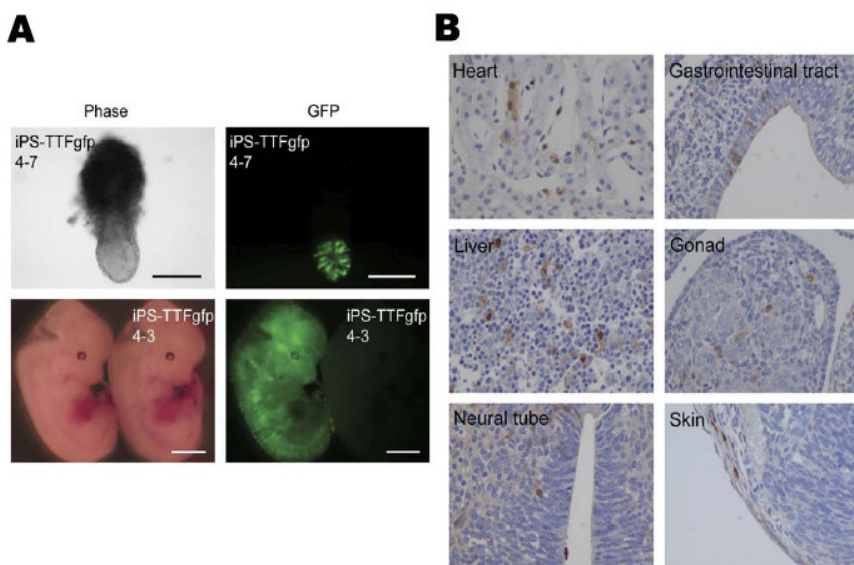
Al aparear a los ratones Oct4-LoxP con ratones TNAPCre que expresan a la recombinasa *Cre* en células germinales (Lomeli *et al.*, 2000), se logró retirar el fragmento de DNA que se encontraba entre los sitios loxP, permitiendo la expresión del Oct-4 transgénico en los gametos (TNAPCre/Oct4-loxP). Al aparear a estos ratones con silvestres, se obtuvieron ratones a los que llamaron tgO7 que expresaban Oct-4 de manera ubicua (Fig. 11). Estos animales mueren alrededor de E13-13.5 y presentaban defectos significativos en su desarrollo embrionario, detectados a partir de E9.5, como por ejemplo la presencia de una cabeza visiblemente más pequeña. Para E12.5, se podían encontrar malformaciones craneofaciales y un engrosamiento de la cola que se encontraba torcida dorsalmente y el tubo neural presentaba un cerrado defectuoso que se notaba en la región de la cola o como una línea media irregular en la región del tronco. En E13.5, estas anormalidades fueron encontradas en el tronco, donde se apreciaron alteraciones en la formación vertebral y usualmente se encontró una costilla extra (Ramos-Mejia *et al.*, 2005).

Otro dato interesante es que se encontraron alteraciones en la expresión de genes importantes para la inducción del mesodermo en los embriones transgénicos escindidos, como: disminución de la expresión de *otx* y *Gbx2* y un aumento en la expresión *fgf8*. También se observó un aumento en la expresión de *engrailed 2 (En2)* que es un gen involucrado en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas. Estos datos nos sugieren que puede haber alteraciones en el desarrollo de esta población provocadas por la expresión del transgén de Oct-4.

A pesar de los reportes de la expresión de Oct-4 en tejidos adultos, este factor parece estar directamente relacionado con la capacidad de proliferación de algunos tipos celulares, por lo que puede considerarse como uno de los factores clave en los procesos de inducción de pluripotencia. Esto ha quedado en evidencia con algunos trabajos recientes en donde se reprogramaron núcleos somáticos humanos para generar células madre pluripotentes inducidas utilizando los factores Oct-4, Sox-2, Nanog y LIN28 (Yu *et al.*, 2007) o en los que se realizó la inducción a células pluripotentes de fibroblastos embrionarios (Fig.12) y adultos de ratón (Fig. 13) y de humano al expresar en ellos los factores Oct-4, Sox-2, c-Myc y Klf4, bajo condiciones de cultivo de CTE, aunque en este caso se encontró que la expresión de Nanog era dispensable (Takahashi y Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007; Fig. 12A y B). Estas líneas celulares presentaban características fenotípicas similares a las de CTE y adicionalmente presentaban la capacidad de diferenciarse a tipos celulares de las tres capas embrionarias *in vitro* e *in vivo* (Figs. 12C-D y 13B); no obstante, estas células no fueron idénticas a las CTE en cuanto a sus patrones de expresión y su estado de metilación.



**Fig. 12. Células troncales pluripotentes inducidas (iPS) generadas a partir de fibroblastos embrionarios de ratón y humano (hiPS).** A y B) Las iPS y hiPS fueron capaces de formar cuerpos embrionarios con una morfología muy similar a la de los formados a partir de CTE que además eran positivos al marcaje contra el antígeno embrionario SSEA-1 y fosfatasa alcalina (A: iPS de ratón, B: hiPS humanas). B y C) Estas células tenían la capacidad de diferenciarse a tipos celulares de diferentes capas embrionarias *in vitro* (C, panel superior e inferior, iPS ) y al ser implantadas a ratones generaban teratomas en donde se observó la morfología de diferentes tipos celulares (C, paneles centrales iPS y D: hiPS). (Tomado de(Takahashi y Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007)



**Fig. 13. Contribución de iPS generadas a partir fibroblastos de ratón adulto al desarrollo embrionario de ratón.** A) Las iPS de adulto expresaban el gen reportero de GFP y fueron microinyectadas en blastocistos C57/BL6 y los embriones fueron analizados en E7.5 (figs. superiores) y E13.5 (figs. inferiores). Barras de escala: 200  $\mu$ m superior; 2 mm inferior. B) Los embriones quiméricos de 13.5 días fueron seccionados y teñidos contra GFP (café). Se encontró aportación de las iPS en prácticamente todos los tejidos de los embriones. (Takahashi y Yamanaka, 2006).

## **Justificación**

Los procesos que intervienen en el mantenimiento y la capacidad proliferativa de los diferentes tipos de CT están comenzando a comprenderse. Conocemos algunos factores y vías de transducción que funcionan como elementos clave bajo diferentes contextos, tal es el caso de Oct-4 en CT pluripotentes. Se ha visto que la expresión ectópica de Oct-4 en otros tejidos puede favorecer la proliferación o la inhibición de la diferenciación de precursores celulares. Por tanto resulta de gran interés analizar si esta proteína puede ser capaz de conferir las mismas funciones en CTN, o aumentar su capacidad para generar diferentes tipos celulares, pues es sabido que la capacidad de proliferación y generación de tipos celulares disminuye en las CT conforme avanza el estadio de desarrollo del que son obtenidas.

Por otro lado, ya que se han observado alteraciones en la expresión de los factores clave en la diferenciación del cerebro medio en ratones que expresan ubicuamente Oct-4, nos interesa también analizar la capacidad de las CTN para diferenciarse a neuronas DA al expresar ectópicamente Oct-4.

## Planteamiento del problema

A la proteína Oct-4 se le atribuye un papel primordial en el control de la proliferación y el estado indiferenciado durante el desarrollo temprano y en CT pluripotentes (Scholer *et al.*, 1989; Okamoto *et al.*, 1990; Rosner *et al.*, 1990; Palmieri *et al.*, 1994). La relación entre Sox2 y Oct-4 en estas CT se encuentra bastante estudiada (Tomioka *et al.*, 2002; Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005); en este contexto ambas proteínas se autorregulan y regulan a otros genes también implicados en la determinación del destino celular. Por otro lado, Sox2 se expresa también en CTN en donde se encuentra implicado en el mantenimiento de éstas células (Miyagi *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004; Miyagi *et al.*, 2006) y las regiones reguladoras que promueven la expresión del gen Sox2 en CT pluripotentes y CTN son las mismas (Miyagi *et al.*, 2004). La expresión ectópica de Oct-4 en tejidos epiteliales ha demostrado ser capaz de incrementar la capacidad proliferativa y de inhibir diferenciación celular en los progenitores de esos tejidos (Hochedlinger *et al.*, 2005).

Dado que en CTN se encuentran presentes elementos que pueden ser reconocidos por Oct-4, y que se cuenta con un modelo adecuado para su expresión en estas células (Ramos-Mejia *et al.*, 2005), resulta de gran interés analizar si al sobre-expresar esta proteína en CTN es posible conferir a estas células una mayor capacidad de proliferación o de diferenciación.



## **Hipótesis**

La sobre-expresión ectópica de Oct-4 en células troncales neurales fetales brindará una mayor capacidad de proliferación y/o modificará el potencial de diferenciación de éstas, ya sea manteniéndolas en un estado indiferenciado o brindándoles la capacidad de producir tipos de un linaje diferente al neural.

## **Objetivo general**

Establecer el efecto de la expresión ectópica de Oct-4 en los programas de proliferación y diferenciación de CTN fetales del mesencéfalo ventral de 12.5 días de gestación del ratón.

## **Objetivos particulares**

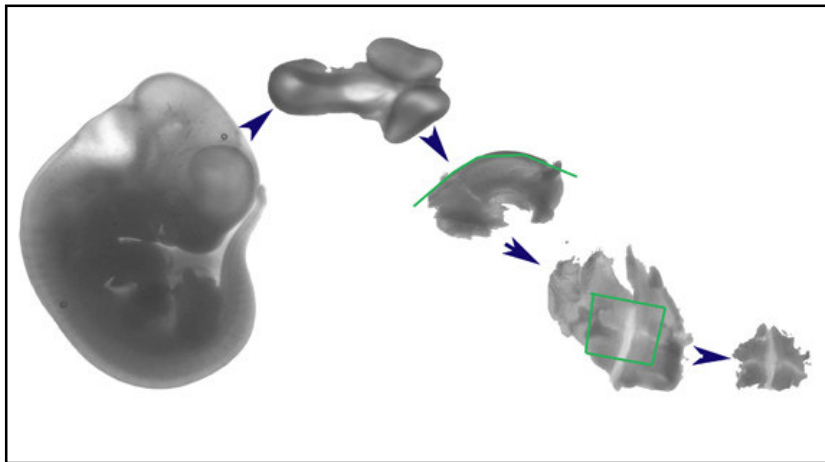
- Activar la expresión de Oct-4 en cultivos primarios de mesencéfalo ventral de 12.5 de gestación (E12.5) de ratones Oct4-LoxP mediante la transducción con retrovirus que expresan a la recombinasa de Cre fusionada con la proteína verde fluorescente.
- Analizar los niveles de expresión de RNA mensajero y proteína Oct-4 después de la transducción retroviral.
- Estudiar los efectos en proliferación y diferenciación de las CTN del mesencéfalo ventral de ratones E12.5 Oct4-LoxP, transducidas con los retrovirus.

## Metodología

### Estudio de la proliferación y diferenciación de CMN extraídas del mesencéfalo ventral de ratones Oct4-LoxP.

Se cruzaron hembras silvestres CD1 con machos Oct4-LoxP para obtener embriones transgénicos de E12.5. Los ratones y la mayoría de las cruces fueron proporcionados por la Dra. Leda Torres del Laboratorio de la Dra. Lomelí (Instituto de Biotecnología, UNAM).

Las madres fueron sacrificadas por luxación cervical y se extrajeron los embriones que fueron mantenidos en solución fisiológica de Krebs fría en todo momento. Se disecó la región del mesencéfalo ventral (Fig. 14) y el tejido obtenido de cada embrión se almacenó por separado en solución de Krebs para su posterior genotipificación por tinción con X-gal. Adicionalmente se tomó tejido no neural de cada



embrión  
(miembro  
anterior) para  
genotipificación  
por PCR.

**Fig. 14. Disección del mesencéfalo ventral de ratones de 12 días de**

**gestación.** En la imagen se muestra de izquierda a derecha el proceso mediante el cual se obtuvo el tejido del mesencéfalo en cada embrión, que fue utilizado en los cultivos primarios para expandir a las CTN.

El siguiente procedimiento fue realizado en el tejido obtenido de cada embrión por separado:

El tejido fue centrifugado a 200 x g a 4°C durante 5 min y se removió la solución de Krebs. Se agregó entre 300 y 500 µl de medio N2 y se disgregó mecánicamente el tejido de 6 a 8 veces con una punta P1000. Se dejó sedimentar el tejido no disgregado durante 3 a 5 min y se pasó la suspensión de células a un nuevo tubo.

La suspensión fue centrifugada a 200 x g a 4°C durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 500 µl de medio N2 fresco y sembrado en un pozo de 3.5 cm de diámetro en cajas de 6 multipozos previamente tratados con poli-ornitina (PLO) [15 µg/ml] y fibronectina (Fn) [1 µg/ml] con un volumen final de medio de 1.5 ml y 10 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). El medio se cambió cada 2 días y el bFGF se aplicó diariamente.

Al identificar a las células transgénicas, éstas fueron agrupadas y sembradas a una densidad de 10 000 a 20 000 células por pozo en cajas de 24 multipozos con cubreobjetos de vidrio pre-tratados con PLO y Fn, en un volumen final de 400 a 500 µl de N2 (cambiados cada 2 días) con 10 ng/ml de bFGF aplicado diariamente.

### **Genotipificación de ratones Oct4-LoxP: tinción con X-gal**

Los ratones Oct4-LoxP tienen insertado un transgén que contiene al gen de resistencia a neomicina fusionado con el gen de β-galactosidasa de pollo (β-Geo) flanqueado por sitios LoxP y seguido por el cDNA del gen *Oct-4*.

La proteína β-galactosidasa codificada por el gen LacZ, originario de *E. coli* es un reportero histoquímico clásico (Beckwith, 1980) que puede ser detectado utilizando una gran variedad de sustratos, los cuales tienen una galactosa ligada a alguna mitad por un enlace β-D-glicosídico, cuyas propiedades cambian después de la liberación de la galactosa (Wallenfels *et al.*, 1964). Muchos sustratos producen productos coloridos o fluorescentes que son útiles al medir la actividad de la β-galactosidasa o visualizando células transducidas en vivo (Krasnow *et al.*, 1991; Nirenberg y Cepko,

1993). El sustrato más común es un derivado del indol: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal).

Cuando  $\beta$ -gal rompe el enlace glucosídico en X-gal se produce galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol que se oxida no enzimáticamente. El índigo halogenado resultante es un compuesto azul muy estable e insoluble: 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo (Holt y Sadler, 1958). Las reacciones de dimerización y oxidación requieren la transferencia de un electrón que se facilita por aceptores de electrones del propio potencial redox (Holt y Sadler, 1958), para esto se utilizan iones férricos y ferrosos en las reacciones con X-gal.

Para genotipificar a los embriones Oct4-LoxP obtenidos mediante cruces de machos Oct4-LoxP en fondo CD1 con hembras silvestres de la misma cepa, se sembró una proporción (1/4 a 1/5) de las células obtenidas por cada embrión en cajas multipozos de 1.7 cm de diámetro por pozo, previamente tratadas con PLO y Fn. Uno a 2 días después las células fueron fijadas con la solución de X-gal (paraformaldehído 1%, glutaraldehído 0.2%,  $MgCl_2$ , 2 mM, EGTA 5 mM y NP 40 1% en PBS), por 20 minutos a 4°C. Se retiró la solución y se lavaron los pozos fijados 3 veces con 400  $\mu$ l de PBS x 5 min en cada caso. Después se colocaron 300 a 400  $\mu$ l de la solución de tinción para X-gal ( $MgCl_2$  2 mM, ferricianuro de potasio 2%, X-gal 10  $\mu$ g/ $\mu$ l, NP40 2% en PBS) a cada pozo y se dejaron incubar a 37°C toda la noche protegidos de la luz.

Al día siguiente se retiró la solución y se lavaron los pozos con PBS y se observaron al microscopio para detectar la formación del precipitado azul en las células provenientes de embriones transgénicos (Fig. 15B). Adicionalmente se realizó genotipificación por PCR para corroborar los datos de las tinciones con X-gal.

#### **PCR: Genotipificación de embriones Oct4-LoxP y control de la escisión por Cre**

Al momento de hacer las disecciones del mesencéfalo ventral se tomó una extremidad anterior de cada ratón la cual fue digerida en amortiguador de lisis EPB (50 mM KCl, 10 mM Tris pH=8.3, 2 mM  $MgCl_2$ , 0.01% gelatina, 0.45% NP-40, 0.45%

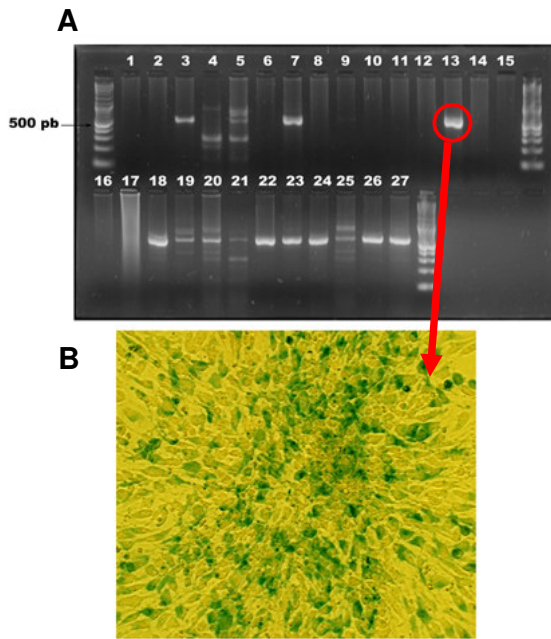
Tween 20 y 100 µg/ml de proteinasa K) a 50°C toda la noche, para obtener su ADN genómico. Para inactivar a la proteinasa K se incubó la solución con ADN a 95°C durante 15 min, se centrifugaron los tubos a 10 000 x g por 5 min y de cada muestra se utilizaron 2 µl para correr una reacción de PCR. Los primers utilizados en la reacción, BGPA y Oct4-3 amplifican un fragmento de 518 pb (Fig. 15A) localizado entre el exón 3 del gen β-galactosidasa de pollo y la secuencia de Oct-4. las secuencias de los primer utilizados se muestran en la tabla 1.

Adicionalmente se comprobó mediante PCR que se hubiera escindido el caset de β-geo en las células transgénicas, posterior al tratamiento con retrovirus que expresan la recombinasa de Cre (ver más adelante) con el par de primers CAGGS-1 y Oct4-1, detallados en la tabla 1, que amplifican un fragmento de 372 pb únicamente cuando la secuencia ubicada entre los 2 sitios LoxP del transgén (el gen de β-galactosidasa) no se encuentra presente.

**Tabla 1. Lista de oligonucleótidos para genotipificación**

Nombre	Secuencia	Fragmento	
Act1	GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG	230 pb	Actina
Act2	GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG		
Oct4-3	CCT ACA GCA GAT CAC TCA	518 pb	β-geo
BGPA	CAG AAG TCA GAT GCT CAA G		
Oct4-1	AGC CTG GTC CGA TTC CAG	372 pb	Escisión β-geo
CAGGS-1	GCT CTA GAG CCT CTG CTA AC		

Act1 y 2 fueron utilizados para amplificar un fragmento del exón 4 de β-actina. Oct4-3 y BGPA amplifican un fragmento del caset β-geo para la Genotipificación de los ratones Oct4-LoxP. Oct4-1 y CAGGS-1 amplifican únicamente cuando el caset β-geo ha sido escindido y por lo tanto se usan para la escisión con retrovirus en Oct4-LoxP

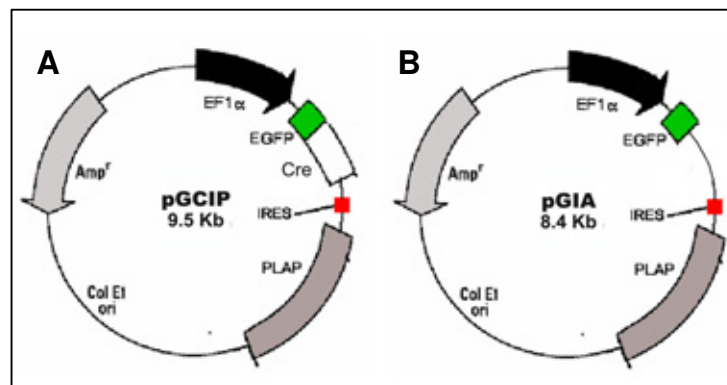


**Fig. 15. Genotipificación de ratones Oct4-7.**

**A)** La genotipificación por PCR, amplifica de un fragmento de 518 pb del caset  $\beta$ -geo. En el gel se muestra el resultado de la genotipificación de dos camadas de embriones de ratón E14, numerados del 1 al 27. **B)** Genotipificación por medio de la reacción con X-gal. En la imagen se muestra la genotipificación del embrión número trece que se muestra en el gel de la parte A. Las células que presentan el transgén de  $\beta$ -geo-Oct4 se tiñen de color azul.

## Preparación de vectores retrovirales

Los vectores retrovirales fueron construidos utilizando el sistema de expresión retroviral pantrópica de Clontech, mediante co-transfección transitoria en células empaquetadoras, de los vectores de expresión retroviral pGIA o pGCIP (proporcionados por el Dr. Nicholas Gaiano; Fig. 16) y el vector pVSV-G, que permite la expresión de la proteína VSV-G a partir del promotor de citomegalovirus (CMV).



**Fig. 16. Plásmidos utilizados para la construcción de vectores retrovirales.** **A) pGCIP** expresa una proteína de fusión de EGFP con CRE y a la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) bajo el promotor constitutivo del factor de elongación 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) de *Xenopus*. **B) pGIA** expresa únicamente a la EGFP y a PLAP bajo el promotor EF1 $\alpha$ , y fue utilizado como vector control para las transfecciones.

Las células empaquetadoras de la línea celular GP2-293, derivada de la línea celular HEK 293, incluida en el sistema de expresión retroviral pantrópica de Clontech, expresan establemente a los genes necesarios para la formación de vectores retrovirales pantrópicos deficientes de replicación, excepto las proteínas de la cubierta (que se expresaron por la co-transfección con el plásmido pVSV-G).

Para la preparación de los vectores retrovirales las células GP2-293 fueron sembradas en platos de cultivo de 15 cm de diámetro con 20 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/estreptomicina (DMEM + SFB) a 37°C con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Al alcanzar una confluencia de 90% aproximadamente, los cultivos fueron co-transfectados por el método de fosfato de calcio con el plásmido pVSV-G y el plásmido retroviral (pGIA o pGCIP). Las células transfectadas se dejaron incubar de 6 a 10 horas bajo las mismas condiciones de cultivo y al cabo de este tiempo se cambió el medio de cultivo por 13 ml de DMEM + SFB y las células se dejaron incubar nuevamente. Se repitió este procedimiento a las 12, 24 y 48 horas, recuperando el medio y almacenándolo a -70°C. Estos sobrenadantes fueron concentrados por ultracentrifugación y alicuotados para ser utilizados en la transfección de las células troncales neurales.

## **Titulación de los vectores retrovirales**

Para calcular la cantidad de partículas infectivas presentes en las alícuotas de los vectores GIA y CGIP, 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 éstos. De acuerdo con este método, la infectividad de los lotes retrovirales se expresa como unidades formadoras de placas, o en este caso colonias (u.f.c.) 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 u.f.c. Por tanto, al calcular la cantidad de u.f.c. 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.

### **Inmunotinciones**

Para realizar las inmunotinciones las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% a 4°C durante 20 min. Posteriormente, las muestras se bloquearon con 500 µl de solución de bloqueo: PBS con 10% de suero normal de cabra (NGS) y Tritón X-100 al 0.3 % durante una hora a temperatura ambiente (TA), con agitación continua. Se retiró la solución de bloqueo y las muestras fueron lavadas con 300 µl de PBS 3 veces durante 5 minutos cada vez, con agitación continua. Se aplicaron los anticuerpos primarios disueltos en 20 µl de PBS con 10% de NGS para cada pozo y se dejaron incubar 2 horas a TA o toda la noche a 4°C cubriendo cada muestra con un círculo de Parafilm. Los anticuerpos primarios fueron recuperados y



fueron recuperados hasta 2 veces más. Las muestras fueron lavadas con 300 µl de PBS 3 veces durante 5 minutos cada vez, con agitación. Posteriormente, se aplicaron los anticuerpos secundarios en 250 a 300 µl de PBS 10% NGS y se dejaron incubar durante 2 horas a TA agitación continua, protegiendo a las muestras de la luz. Se recuperaron los anticuerpos (que también pueden ser reutilizados hasta 2 veces más) y se lavaron las muestras con 300 µl de PBS 3 veces durante 5 minutos cada vez, con agitación. Las muestras se almacenaron con PBS a 4°C hasta ser montados en portaobjetos de vidrio con medio de montaje para fluorescencia a base de agua. Las preparaciones montadas fueron etiquetadas y se dejaron secar durante toda la noche protegidas de la luz.

### **Ensayos de incorporación de BrdU**

Para medir la proliferación en las células durante la fase de tratamiento con bFGF, las células fueron incubadas con 10 µM de Bromo-deoxiuridina (BrdU) durante 4 h. Un día después las células se fijaron con PFA 4% a 4°C por 20 min y al retirarse el fijador se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min en cada lavado. Después los pozos se trataron con HCl 1N en PBS a 37°C durante 15 min con agitación constante. Se neutralizó el HCl con amortiguador de boratos (borato de sodio 0.1M) durante 10 min a temperatura ambiente y se dieron 3 lavados más con PBS durante 5 min cada uno. Posteriormente se bloqueó durante una hora a TA con agitación continua (PBS 0.1% BSA más 10% NGS y 0.3% de Triton X-100) y se incubó con anti-BrdU (rata; 1:100) en PBS 0.1 % BSA y 10% NGS toda la noche a 4°C. El anticuerpo se recuperó y fue usado hasta una vez más. Las células se lavaron con PBS 0.1% BSA 3 veces por 5 min cada vez antes de colocar el anticuerpo secundario (Alexa 488 o 568 hecho en cabra, anti-rata 1:500) durante 2 h a temperatura ambiente, después se recuperó y se utilizó hasta 2 veces más. Los pozos se lavaron 3 veces con PBS 0.1% BSA por 5 min cada vez y se tiñeron los núcleos con Hoechst (100 µg/ml) o Dapi (10 µg/ml) durante 10 min con agitación constante. Las preparaciones se guardaron protegidas de la luz.

## **TUNEL**

El ensayo de TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling, por sus siglas en inglés), es un método utilizado para detectar la degradación de ADN en células apoptóticas, porque una de las marcas de fase tardía de la apoptosis es la fragmentación del DNA que resulta en una multitud de extremos 3'-hidroxil terminales. Esta propiedad puede ser utilizada para identificar células apoptóticas marcando estos extremos con nucleótidos desoxiuridin-trifosfato fluorescentes (F-dUTP). La enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) cataliza la adición independiente de templado de desoxiribonucleosido trifosfatos a los extremos 3' hidroxil-terminales de ADN de cadena doble o simple. La adición de F-dUTPs sirve para marcar los sitios de ruptura, una vez incorporado al ADN. Las células no apoptóticas no incorporan mucho del F-dUTP debido a la ausencia de extremos 3'-hidroxil libres en el ADN.

## **RT-PCR**

Para extraer RNA de los cultivos celulares, se agregó 1 ml de TRIZOL a los pozos de 1.5 cm de diámetro, raspando el fondo del pozo para despegar a las células. Se homogenizó y se recuperó el homogenizado. Posteriormente, los homogenizados se incubaron a 30°C por 15 min y se agregaron 200 µl de cloroformo por cada ml de TRIZOL. Se mezcló todo utilizando vortex durante 15 seg y se incubó nuevamente a 30 °C por 3 min. Después de esto, se centrifugaron las muestras a 4000 rpm (800 g) por 10 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregaron 500 µl de isopropanol. Se mezcló todo utilizando vortex durante 15 seg y se incubó a 30 °C por 10 min. Después se centrifugó nuevamente a 800 g por 10 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante con una pipeta pasteur. Se lavó el botón obtenido con etanol 75% agitando con vortex por 15 min y se volvió a centrifugar a 800 g por 5 min a 4 °C. Se

eliminó el etanol y se dejó secar el botón obtenido invirtiendo el tubo sobre una toalla de papel. Una vez seco se resuspendió el botón en 20  $\mu\text{l}$  de agua inyectable y se incubó a 60°C por 10 min. Se resuspendió nuevamente la muestra y se tomó 1  $\mu\text{l}$  para separar en un gel de agarosa al 1% para comprobar el buen estado del RNA y 1  $\mu\text{l}$  para calcular la concentración de RNA.

Se calculó la concentración de RNA obtenido mediante la lectura de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro. Se utilizaron entre 500 ng y hasta 1  $\mu\text{g}$  de RNA<sub>total</sub> para la reacción de transcripción reversa.

Se incubaron las muestras a 65°C por 15 min y después 5 min en hielo, se agregaron primers aleatorios (50  $\mu\text{M}$ ), dNTPs (10 mM de c/u) y se aforó la reacción a 13  $\mu\text{l}$  con agua inyectable. Se calentaron los tubos a 65 °C por 5 min y se enfriaron en hielo por 1 min. Se centrifugaron las mezclas brevemente y se agregó DTT, inhibidor de RNAsas (40 U) y transcriptasa reversa (200 U; Super Script III, ROCHE) en amortiguador para la reacción en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  de reacción. Se mezcló suavemente la reacción y se incubó a 25 °C por 5 min. Posteriormente se incubó a 50 °C por 1 hora y se inactivó la reacción a 70 °C por 15 min. Se cuantificó el cDNA obtenido mediante espectrofotómetro y se utilizaron 500 ng para la reacción de PCR.

La reacción de PCR se preparó de la siguiente forma: Se puso el cDNA en amortiguador Tris-HCl 200 mM (pH 8.4), KCl 500 mM, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada oligonucleótido y 5 U/ $\mu\text{l}$  de Taq polimerasa, aforando a 25  $\mu\text{l}$ . Se colocan las reacciones en la termocicladora con 95°C para desnaturalización por 15 min. El número de ciclos, el tiempo y las temperaturas óptimas se estandarizaron de acuerdo a la T<sub>m</sub> de los oligos utilizados y a las condiciones de trabajo. Se realizó un periodo final de extensión a 74°C y las reacciones se pasaron a hielo.

Posteriormente se realizó el análisis de la amplificación en geles de agarosa al 1.5% visualizando las bandas de ADN con bromuro de etidio.

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y t de Student-Newman-Keuls con un valor de confianza de 95%, para establecer diferencias estadísticamente significativas entre nuestras diferentes condiciones.

## Resultados

Las estrategias que nos planteamos inicialmente, fueron modificándose a medida que se desarrolló el trabajo experimental. Al inicio del trabajo se exploraron alternativas adicionales a las aquí presentadas. Primero nos planteamos la idea de utilizar cultivos primarios de CTN en E12 de ratones tgO7 que expresan ubicuamente Oct-4 (Ramos-Mejia *et al.*, 2005) para probar el efecto de diferentes condiciones de cultivo en la proliferación y diferenciación de estas células; no obstante estos ratones no estuvieron disponibles para nosotros durante el primer año del trabajo y fue por esta razón que nos centramos en la activación del transgén de Oct-4 en los ratones Oct4-LoxP.

Para la escisión de  $\beta$ -Geo *in vitro* se planteo inicialmente la posibilidad de electroporar a las CMN con un plásmido que expresara Cre y un caset de selección, por ejemplo la resistencia a algún antibiótico. Sin embargo, ya que la electroporación de CTN es una técnica difícil y no muy eficiente decidimos explorar otra posibilidad: el uso de vectores retrovirales que expresaran a Cre y algún reportero, como la proteína verde fluorescente (GFP), para identificar a las células transducidas.

En un principio nos planteamos la posibilidad de utilizar adenovirus que expresaran Cre y algún reportero para la escisión del caset *in vivo*, no obstante los vectores de este tipo son capaces de transducir no sólo a células en división si no quiescentes también, por lo que el uso de estos vectores no resultaría muy selectivo para activar Oct-4 únicamente en CTN. En este caso, la opción de utilizar vectores retrovirales nos resultó más conveniente ya que una particularidad de estos vectores, en específico los llamados oncovirales es que infectan únicamente a células en división.

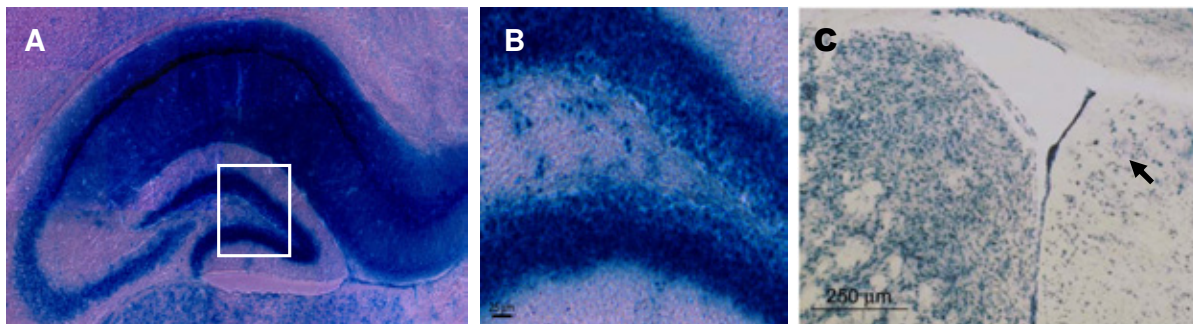
Dado lo anterior y ya que contábamos con diversos plásmidos que podrían sernos de utilidad para la construcción de los vectores retrovirales decidimos construir un vector retroviral para expresar a Cre tanto *in vivo* como *in vitro* junto con un gen

reportero. Durante el primer semestre del trabajo de Maestría se comenzó con la construcción de dicho vector; no obstante, la construcción no fue concluida pues como estrategia adicional, el Dr. Nicholas Gaiano del NIH nos donó las construcciones retrovirales que se utilizaron durante todo el trabajo y que se detallan en los métodos.

Por otro lado, en cuanto a los ratones que utilizamos, una ventaja que nos brindaban fue que no presentan un fenotipo letal a diferencia de los ratones tgO7, por lo que dentro de nuestros objetivos iniciales consideramos también establecer el efecto de la activación ectópica de Oct-4 en CTN adultas en estos ratones, en cultivos primarios (*in vitro*) e *in vivo*. Los experimentos con CTN adultas tanto *in vitro* como *in vivo* se realizaron paralelamente a los experimentos iniciales con CTN embrionarias.

Para el caso del análisis *in vitro* de las CTN, cultivos primarios de estas células extraídas de la zona subventricular y el hipocampo de ratonas Oct4-LoxP. Pues son estas las dos regiones bien identificadas de neurogénesis en el adulto. En estos cultivos, crecidos inicialmente en neuroesferas, fueron mantenidos en las mismas condiciones de diferenciación y proliferación que se detallan para los cultivos embrionarios pero tampoco fue posible la inmuno-detección de Oct-4.

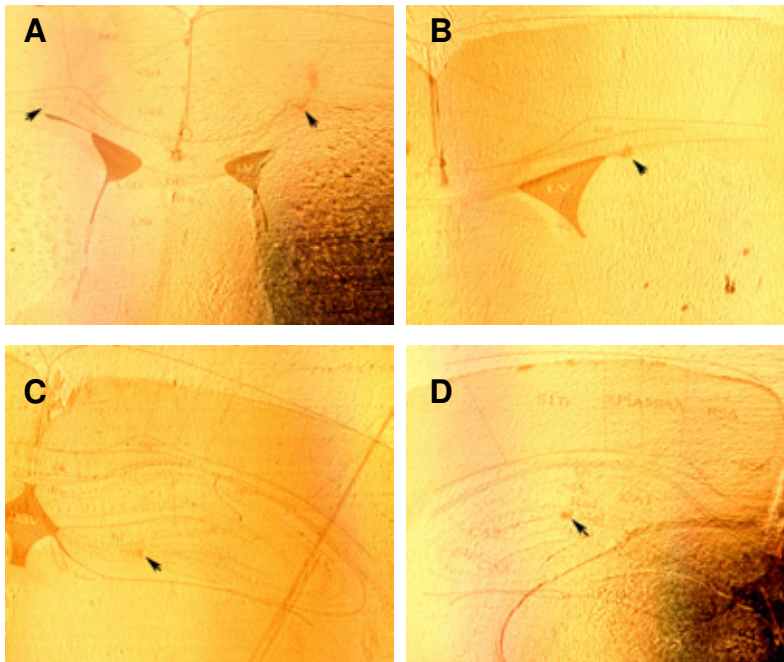
En cuanto a los experimentos *in vivo*, lo que pretendíamos era introducir el vector de expresión de Cre mediante inyección estereotáxica unilateral en ventrículo lateral y el giro dentado del hipocampo para activar la expresión de Oct-4 *in situ* en las regiones neurogénicas del cerebro adulto. En este punto comenzamos por establecer el nivel de expresión del transgén  $\beta$ -Geo/Oct-4 mediante tinciones con X-gal en cortes de



10  $\mu$ m de espesor en ambas regiones (Fig. 17).

**Fig. 17. Expresión del caset  $\beta$ -geo en células del hipocampo y zona subventricular de ratones Oct4-LoxP adultos.** **A)** Reconstrucción de secciones coronales tomadas a 20X del hipocampo de ratones Oct4.7 adultos. Se observa una alta expresión del transgén en todas las capas del hipocampo y sobre todo en el giro dentado (recuadro). **B)** En la imagen se muestra una ampliación de la región del giro dentado del hipocampo de ratones Oct4-7 adultos en donde se puede observar que la mayoría de las células expresan el caset  $\beta$ -geo. **C)** Sección coronal de la región ventricular lateral. Se puede observar una alta expresión del transgén en la zona subventricular.

Una vez identificada la presencia del transgén en ambas regiones, comenzamos por establecer las coordenadas estereotáxicas con respecto a Bregma para las inyecciones de los vectores de expresión de Cre realizando inyecciones con colorante en machos adultos de aproximadamente 30g de peso utilizando las coordenadas fijadas por Paxinos para las regiones de nuestro interés (Fig. 18). Las coordenadas finales de nuestras inyecciones se muestran en la tabla 2.



**Fig. 18. Secciones coronales de cerebros adultos de ratón que fueron inyectados con azul celestina.** **A y B)** Inyecciones en la zona del ventrículo lateral. (A) coordenada 3 de la tabla 2. (B) coordenada 2 de la tabla 2 **C y D)** Inyecciones en hipocampo. (C) coordenadas A de la tabla 2. (D) coordenadas B de la tabla 2. Las flechas indican el punto de la inyección, en donde se encontró el colorante

**Tabla 2. Coordenadas estereotáxicas probadas para las inyecciones de ventrículo lateral e hipocampo**

	Ventrículo lateral			Hipocampo	
	1	2	3	A	B
A-P	0	0.5	1	-1.8	-2.3
L	1	1	1	1	1.5

<b>D-V</b>	-2.5	-2.7	-2.3	-2	-2
------------	------	------	------	----	----

Se inyectaron ratas adultas de aproximadamente 30g con 0.5  $\mu$ l de colorante azul celestina, de manera bilateral. A-P, anteroposterior; L, lateral; D-V, dorso ventral

Dado que no se pudo detectar a la proteína Oct-4 en las inmunotinciones con CTN adultas no se continuó con este protocolo, no obstante las coordenadas ya fijadas pueden ser de utilidad en futuros trabajos. A continuación se detallan únicamente los resultados obtenidos con los cultivos primarios de CTN de mesencéfalo ventral en E12.

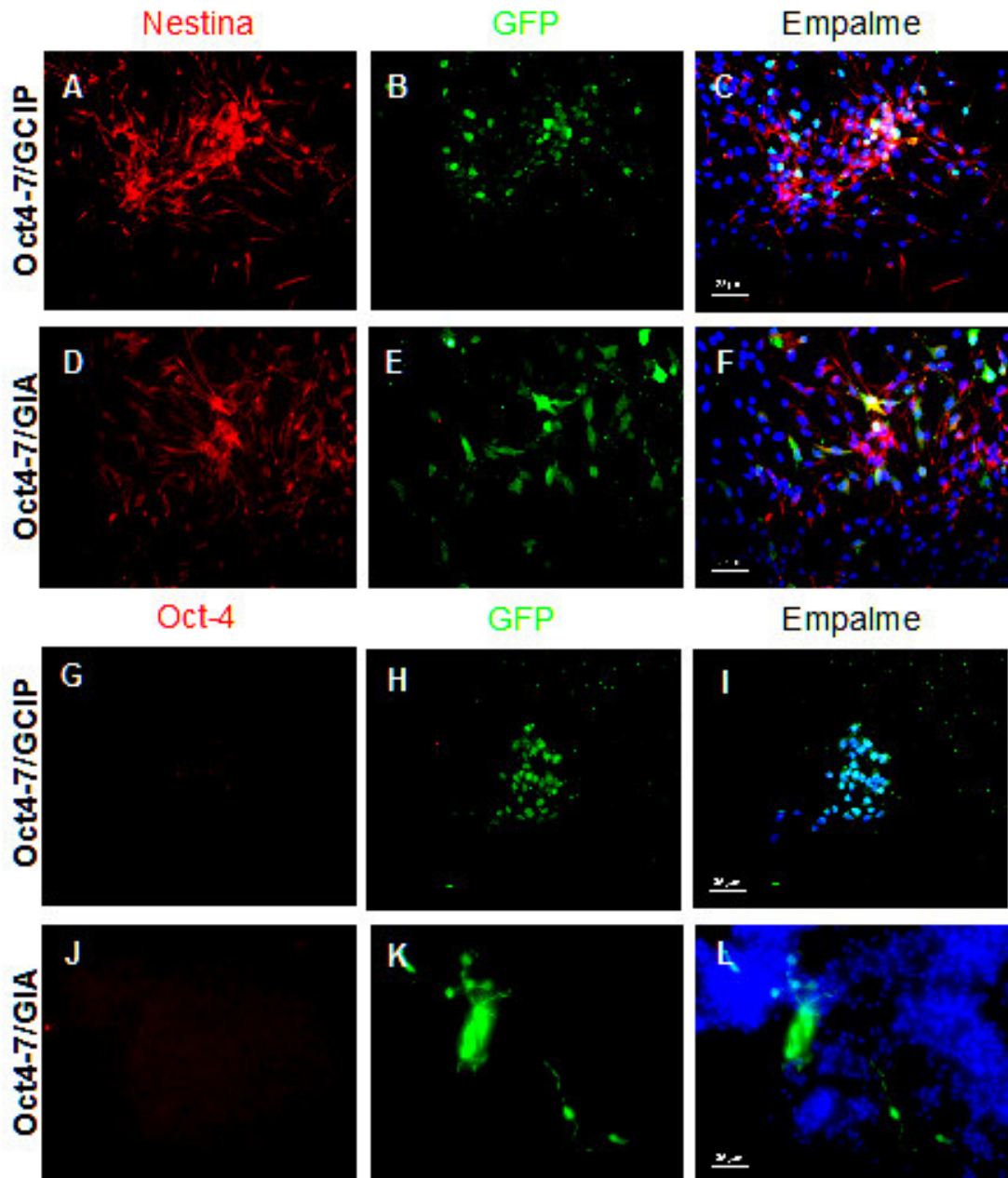
Para evaluar la activación del transgén de Oct-4 en CTN y sus efectos en la proliferación y diferenciación de estas células, inicialmente nos centramos en analizar la presencia de la proteína mediante inmunotinciones contra Oct-4 y marcadores de precursores neurales (nestina) y neuronas diferenciadas (TH) bajo diferentes condiciones de cultivo: condiciones estándar para cultivos de CTN y células neurales diferenciadas o condiciones de cultivo que son normalmente utilizadas para cultivo de CTE.

Las células (tanto transgénicas como no transgénicas en los primeros experimentos) fueron transducidas con 400 unidades formadoras de colonias (u.f.c.) de los virus con Cre, GCIP o el virus control GlA (Fig. 19) por pozo, en 400  $\mu$ l de medio, un día después de ser sembradas en medio N2 + bFGF (10 ng/ml) como mitógeno. El porcentaje de transducción fue de 26 y 23% para los virus GCIP y GlA, respectivamente. Posterior a la transducción, las células fueron dejadas 4 días más con N2 + bFGF en el caso de los controles, o bien fueron tratadas con diferentes condiciones, que se listan a continuación:



- 4 días de proliferación con N2 + bFGF (10 ng/ml) y 4 días de diferenciación en ausencia de bFGF y con 200  $\mu$ M de ácido ascórbico, las cuales son condiciones estándar para el cultivo de CTN.
- 4 días de proliferación con N2 + bFGF (10 ng/ml), FGF8, FGF20 (100 ng/ml) cada uno y Sonic Hedgehog (SHH) y 4 días de diferenciación en ausencia de dichos factores y con ácido ascórbico. Estas son condiciones para cultivo de CTN en presencia de factores de crecimiento que durante el desarrollo se han visto involucrados en la determinación de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio y que se sabe promueven también su diferenciación a partir de CTE.
- 4 días de proliferación con medio Knock Out (KO) en presencia de factor inhibidor de la leucemia (LIF; 1000 U/ml) y 6 días más en ausencia de LIF. Condiciones estándar para cultivo de CTE.
- 4 días de proliferación en medio KO con reemplazo de suero y LIF (1000 U/ml) y 6 días más en ausencia de LIF. Estas también son condiciones estándar para cultivo de CTE pero sin suero, que se sabe promueve diferenciación glial en CTN.

Se analizaron las células tanto al finalizar la fase de proliferación como la de diferenciación mediante inmunotinciones contra nestina y Oct-4 en el caso de la proliferación (Fig. 19) y TH/Oct-4 para la diferenciación.

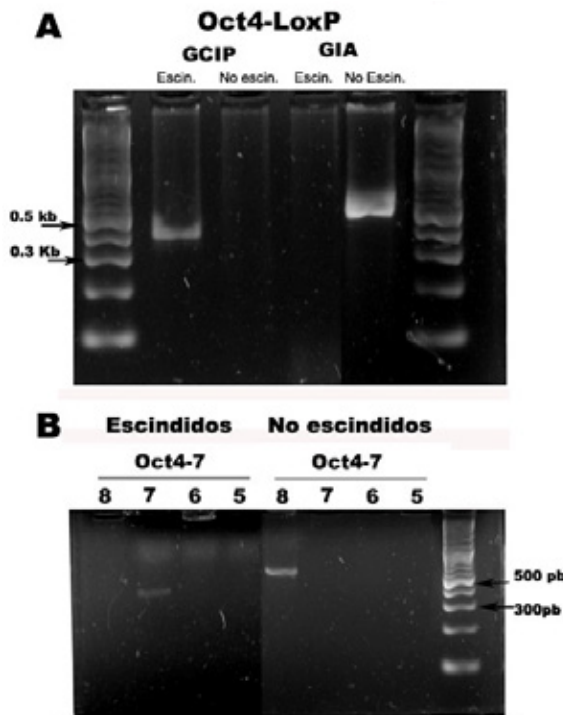


**Fig. 19. Análisis de los marcadores presentes en CTN Oct4-LoxP de mesencéfalo ventral E12 transducidas con los vectores retrovirales GCIP y GIA durante la fase de proliferación. A-C y G-I) CTN transducidas con el vector GCIP que expresa a Cre fusionada con la GFP. D-F y J-L) CNM transducidas con el vector control GIA que expresa GFP. Se realizaron inmunotinciones contra nestina (marcador de CTN), Oct-4 y GFP para identificar a las células transducidas. Los resultados mostrados son de células cultivadas en medio N2. En el resto de las condiciones tampoco se encontró presencia del marcador Oct-4.**

Durante la proliferación la mayoría de las células se mantienen expresando nestina (96.8% GCIP y 98.61 % GIA), que es un marcador de CTN; sin embargo, no se observó la expresión de Oct-4 en ninguna de las condiciones transducidas con el

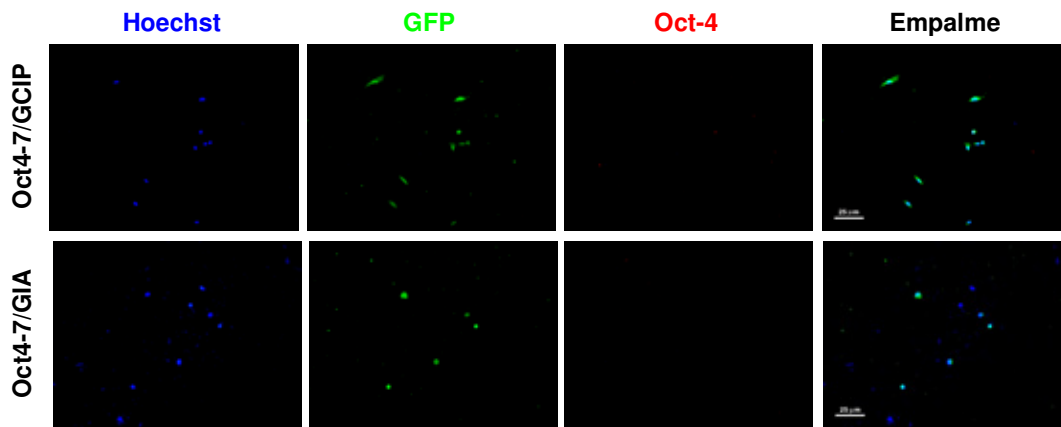
retrovirus que expresa Cre (Fig. 19). En el caso de las células que se dejaron 6 días para diferenciación tampoco observamos células que expresaran Oct-4, ni diferenciación hacia TH (datos no mostrados).

Para comprobar si nuestro vector retroviral expresaba eficientemente a Cre o bien Cre no era capaz de escindir el caset de  $\beta$ -geo, o algo le estaba ocurriendo a las células que eran escindidas, realizamos amplificaciones por PCR utilizando el par de oligonucleótidos Oct4-1 y CAGGS-1 (Tabla 1), que amplifican un fragmento de 372 pb únicamente si el caset de  $\beta$ -geo no se encuentra. Para tal motivo transdujimos células Oct4-LoxP con GFP-Cre y GFP y extrajimos ADN total para realizar la amplificación por PCR tanto con el par de oligos Oct4-3 y BGPA, que amplifican en la región del caset  $\beta$ -geo, como con los oligos para detectar la escisión (Tabla 1; Fig. 20A). Lo mismo se hizo, con otro grupo de células en las mismas condiciones que fueron separadas en un citómetro de flujo para separar a la población GFP<sup>+</sup> de la que no era fluorescente (Fig. 20B y 21).



**Fig. 20 Determinación de la escisión del caset  $\beta$ -geo en células Oct4-7. A)** Análisis por PCR de la escisión del caset  $\beta$ -Geo en CTN Oct4-7 transducidas con los vectores retrovirales GCIP (GFP-Cre) y GIA (GFP). En las células transducidas con el vector que expresa Cre se amplifica un fragmento de casi 400 pb con los oligos de escisión, mientras que en el caso del virus control sólo hay amplificación con el par para el caset no escindido. **B)** Amplificación por PCR de CTN Oct4-7 transducidas con los vectores retrovirales y separadas por citometría de flujo. Los carriles corresponden a lo siguiente: 5: Oct4-7/GIA/GFP<sup>+</sup>; 6: Oct4-7/GIA/GFP<sup>-</sup>; 7: Oct4-7/GCIP/GFP<sup>+</sup>; 8: Oct4-7/GCIP/GFP<sup>-</sup>.

Para separar la población transducida (fluorescente) de la no transducida en cada caso utilizamos una ventana con  $2 \times 10^3$  veces mayor fluorescencia que la basal, aunque cabe señalar que las dos poblaciones se veían claramente delimitadas en cuanto a su fluorescencia y la distribución por tamaño de ambas poblaciones fue muy similar en todos los casos.



**Fig. 21. Poblaciones GFP<sup>+</sup> de Oct4-7 de MV E12 obtenidas por separación con citometría de flujo.** Las células transgénicas fueron transducidas ya sea con el virus GCIP (GFP-Cre) o con el virus control GIA (GFP). Las poblaciones transducidas recuperadas corresponden al 7.6% del total de las células separadas para las células transducidas con GCIP y 10.6% para el caso de las control, de las cuales 83.3 % y 62.5 % de las células positivas a GFP, respectivamente al sembrarse en cajas de cultivo.

En el análisis por PCR de las células Oct4-LoxP transducidas con el vector control (GIA) sólo obtuvimos amplificación con el par de oligonucleótidos para el caset  $\beta$ -geo, mientras que en las células transducidas con el vector que expresa Cre sólo se amplificó un fragmento de cerca de 400 pb con los oligos que denotan escisión y que concuerda con lo esperado. Resultados similares se observan en las células que fueron separadas por citometría, la fracción GFP<sup>+</sup> transducida con el virus que expresa Cre fue la única que presentó el fragmento amplificado con los oligos para escisión (Fig. 20B) y la fracción no fluorescente de esta misma condición amplificó el fragmento no escindido.

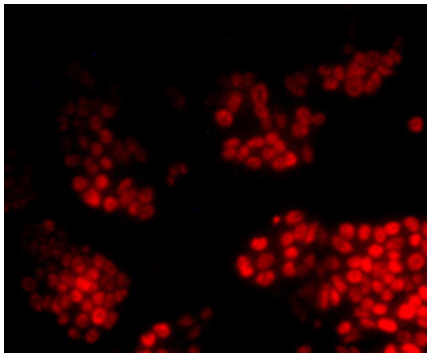
Sólo se encontró el fragmento amplificado con los oligonucleótidos que denotan escisión del caset  $\beta$ -geo en las células transgénicas transducidas con el virus que

expresa Cre, lo que sugiere que el transgén con Oct-4 puede ser expresado, no obstante, no se prueba que se traduzca la proteína, pues no fue posible detectarla mediante inmunofluorescencia.

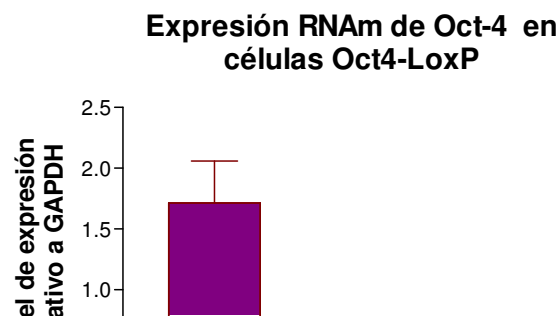
Propusimos dos posibles escenarios para explicar lo ocurrido:

- 1) Nuestro anticuerpo no estaba funcionando correctamente.
- 2) El nivel de expresión del transgén es muy bajo y el anticuerpo no es capaz de detectarlo por inmunofluorescencia

Descartamos la primera opción utilizando un control positivo para el anticuerpo contra Oct-4, realizando inmunotinciones en células troncales embrionarias de ratón de la línea R1, las cuales expresan Oct-4 (Fig. 22). Por otro lado, probamos si había producción de mensajero en primer lugar mediante RT-PCR con células de las diferentes condiciones (Fig. 23). En este caso observamos un nivel muy bajo de expresión del mensajero en las células transducidas con GCIP (GFP-Cre), equivalente a aproximadamente el 14.3 % y 18% (N2 y KORS respectivamente) en comparación con el nivel de expresión de Oct-4 en CTE de ratón (R1) que fueron usadas como nuestro control positivo (Fig. 23). Todos los niveles fueron normalizados contra el nivel endógeno de GAPDH en cada caso.



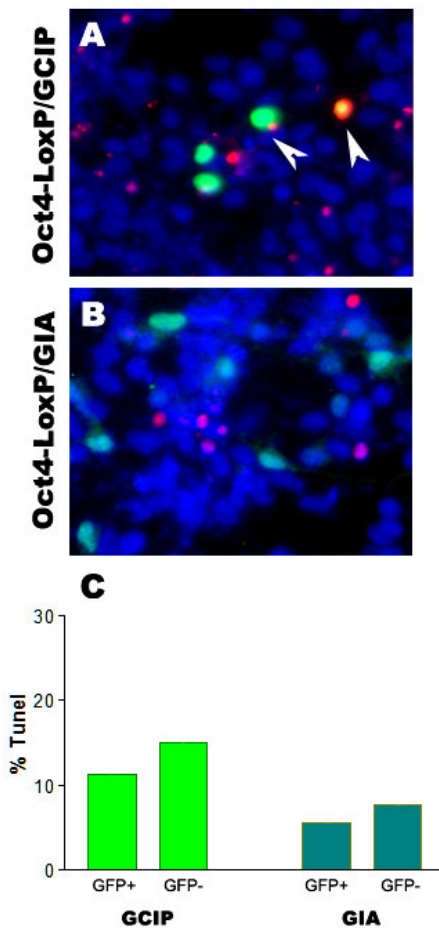
**Fig. 22. Tinción contra Oct-4 en células troncales embrionarias.** Para probar si el anticuerpo que utilizamos estaba funcionando correctamente, probamos un control positivo con células troncales embrionarias de la línea R1. Se puede observar marca para Oct-4 en todas las células.



**Fig. 23. Expresión relativa del RNAm de Oct-4 en células Oct4-LoxP transducidas con los vectores que expresan Cre.** El nivel de expresión del mensajero de las células cultivadas en medio N2+bFGF y medio KO con reemplazo de suero + LIF es 14 y 18% respectivamente con respecto a la expresión del RNAm Oct-4 en células ES de ratón. Los niveles de mensajero se normalizaron con respecto al nivel de GAPDH expresado en cada condición. n= 3.

En los primeros experimentos con células transducidas que fueron dejadas 4 días en proliferación y 6 en diferenciación en medio N2 notamos que la cantidad de células transgénicas en las que se expresaba Cre se reducía con el tiempo, en comparación al resto de las condiciones y en comparación a su cantidad inicial. Por lo tanto realizamos pruebas de TUNEL para medir la cantidad de muerte presente en nuestros cultivos.

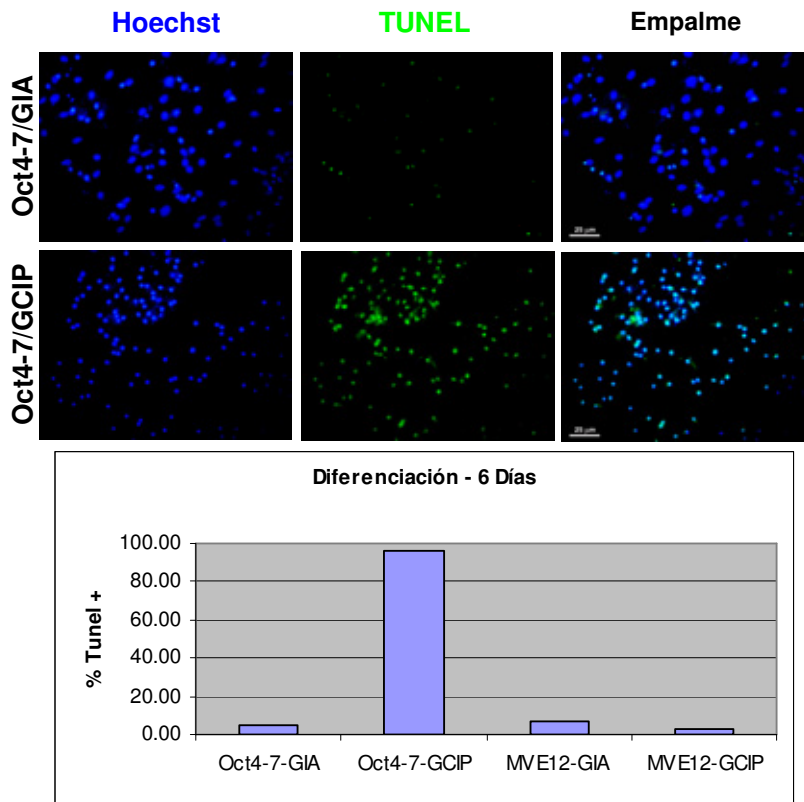
Después de 4 días de transducción y en condiciones de proliferación celular pudimos observar un aumento en la cantidad de células positivas a Tunel en las células Oct4-LoxP transducidas con el vector GCIP: 13.26% la población total y 11.35 de las células GFP+ (Fig. 24), en comparación con las condiciones que fueron transducidas con el virus control: 6.20% de las células totales y 5.57% de las células GFP+. Adicionalmente se cuantificó el total de muerte en cultivos de CTN no transgénicas transducidas con ambos virus, encontrando cantidades muy similares a las observadas en las células transgénicas transducidas con el vector control GlA, es decir que el vector GCIP no ocasionó un aumento significativo en la muerte celular en células no transgénicas



**Fig. 24. Cuantificación de la muerte celular en CTN Oct4-LoxP A y B)** Imágenes representativas del ensayo de TUNEL en células Oct4-LoxP transducidas con el vector GCIP (GFP-Cre) y GIA (GFP). **B)** Resultados del ensayo de TUNEL en CTN Oct4-LoxP transducidas con los vectores GCIP o GIA, después de 4 días de proliferación. Se analizaron también las células GFP- (no transducidas) como un control en cada cultivo. Se observa un aumento en la cantidad de células apoptóticas en general en el cultivo transducido con GCIP, comparado con el transducido con GIA. N=2.

También observamos que después de 6 días de diferenciación la muerte aumentaba aún más en las células Oct4-LoxP transducidas con los vectores GCIP en donde el 96.52% de las células en las condiciones transducidas con GCIP presentaban marca positiva para TUNEL. En contraste, la cantidad de células apoptóticas en las condiciones transducidas con el virus control y en cultivos sin virus se mantuvo sin cambio. Lo mismo ocurrió en el caso de células no transgénicas a las que se transdujo con ambos vectores, lo cual podría descartar que la muerte celular se

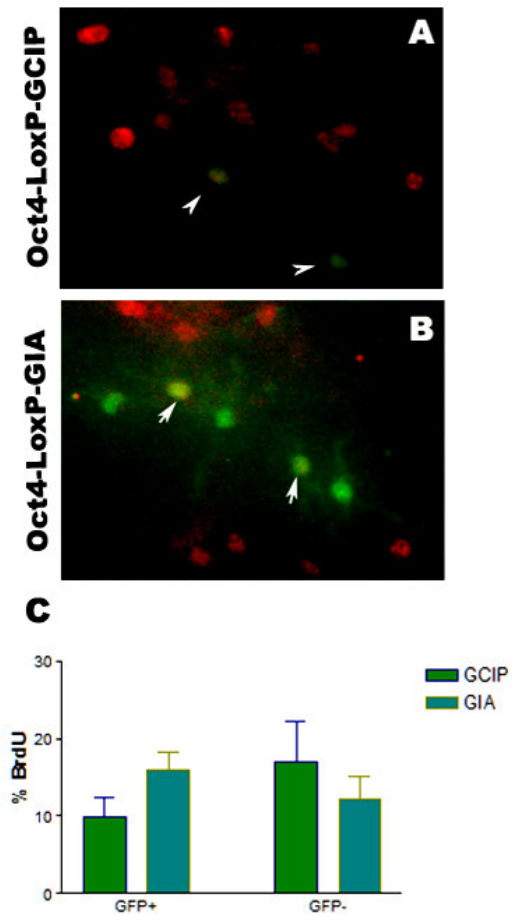
deba a la introducción del vector en sí o a la expresión de la proteína de fusión GFP-Cre en estas CTN (Fig 25).



**Fig. 25. Cuantificación de la muerte celular en CTN Oct4-LoxP y no transgénicas después de la diferenciación. A)** Imágenes representativas del ensayo de TUNEL en células Oct4-7 transducidas con el vector GCIP (GFP-Cre) y GIA (GFP) después de 6 días de diferenciación. **B)** Resultados del ensayo de TUNEL. Oct4-7 corresponde a las células Oct4-LoxP y MVE12 a células del mismo estadio no transgénicas, GIA: células transducidas con el virus control, GCIP: células transducidas con el virus que expresa Cre, Ctl: células sin transducir

Adicionalmente se analizó, mediante ensayos con BrdU, el nivel de proliferación en los cultivos transducidos con ambos virus y en este caso no encontramos ninguna diferencia significativa en el porcentaje de células positivas a este marcador en la población general ni en las células GFP+ transducidas con ambos virus (Fig. 26).





**Fig. 26. Análisis de la proliferación en CTN Oct4-LoxP.** **A y B)** Imágenes representativas de los cultivos transducidos con virus GCIP (GFP-Cre) y GIA (GFP) y marcados contra BrdU. **C)** Cuantificación del porcentaje de células BrdU+ que expresan GFP (GFP+) o no (GFP-) en los cultivos de CTN transducidas. No se observó ninguna diferencia significativa entre los cuatro grupos analizados. N=3 T-student Neuman-Keuls, Significancia 95%.

## Discusión

La inducción de la expresión Oct-4 en cultivos primarios de CTN de mesencéfalo ventral, mediante vectores retrovirales que expresan a la recombinasa de Cre fusionada con GFP no fue eficiente en ratones Oct4-LoxP de 12 días de gestación. Los análisis iniciales con inmunofluorescencia para detectar a la proteína no revelaron la presencia de ésta en ninguna de las condiciones probadas. Se realizaron varias pruebas con diferentes condiciones: con medio estándar para el crecimiento de CTN y condiciones más parecidas a las usadas para crecer CTE pues se ha mostrado en otros trabajos que la reprogramación de células en estadios más avanzados de diferenciación es posible bajo una combinación de inducción de expresión génica (entre ellos *oct-4*) y condiciones de cultivo para células pluripotentes (Takahashi y Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007).

La inmunofluorescencia es una técnica muy sensible para la detección de proteínas; por lo tanto, al no observar una tinción positiva contra Oct-4 lo primero que se hizo fue descartar si esto se debía más bien a que nuestro transgén no se estuviera expresando adecuadamente y la recombinasa de Cre no fuera capaz de escindir el caset  $\beta$ -geo para activar la expresión de Oct-4 en nuestras células Oct4-LoxP. En este caso comprobamos mediante PCR que las células transducidas con el virus GCIP estaban escindiendo el caset  $\beta$ -geo de forma exitosa, además de que observamos una expresión diferencial de GFP en las células transducidas con ambos virus; las células GIA+ (GFP) presentaron una expresión de GFP más o menos homogénea en todo el soma y prolongaciones de las células transducidas, mientras que en las CGIP+ (Cre-GFP) las GFP se encontraban preferentemente en el núcleo de las células transducidas. La recombinasa de Cre puede difundir por toda la célula junto con la GFP, no obstante su actividad favorece su localización nuclear, dado que es aquí donde reconoce las secuencias LoxP para la recombinación o escisión de fragmentos

de DNA. Tanto los datos de PCR como la localización de la proteína verde fluorescente en las células transducidas nos sugieren que la expresión del transgen retroviral Cre-GFP fue correcta y que la enzima era funcional.

Dado lo anterior, las siguientes posibilidades a analizar eran, si Cre estaba eliminando correctamente a  $\beta$ -geo, ¿qué ocasionaba que no se encontrara la proteína en la célula? Por lo que nos planteamos las siguientes posibilidades:

- 1) El nivel de expresión del transgén es muy bajo y el anticuerpo no es capaz de detectarlo en inmunofluorescencia
- 2) El gen se expresa pero no se traduce la proteína
- 3) Existe algún otro factor que inhiba la expresión del transgén.

Al analizar el nivel de expresión del RNAm en cultivos transducidos con GCIP, tanto en condiciones de cultivo que favorecen el crecimiento de CTN (medio N2 +bFGF) como en condiciones permisivas para CTE (medio KOSR + LIF), encontramos que en ambos casos las células transgénicas presentan un nivel de expresión del mensajero menor al 20% con respecto al nivel basal de Oct-4 expresado por CTE de ratón. Como ya se mencionó durante la introducción de este trabajo, el nivel de expresión de Oct-4 en células troncales pluripotentes es determinante para el mantenimiento de estas células, y tanto niveles más altos como menores al 50% de los niveles basales hacen que las CTE pierdan su capacidad de autorenovación (Niwa, 2001; Fig. 7).

Todo esto puede resumirse de la siguiente manera: por un lado, el vector retroviral expresa una Cre funcional que es capaz de escindir el fragmento de  $\beta$ -geo, que impide la expresión de Oct-4 en los embriones Oct4-LoxP. Los resultados de PCR nos confirman que después de la escisión el mensajero de Oct-4 comienza a transcribirse, pero el nivel de transcripción es muy bajo en comparación a los niveles normales que expresan las CTE, y aunque el nivel de mRNA no se correlaciona directamente con el nivel de proteína en todos los casos, es una buena medida para asegurar que la proteína que se genera a partir de esta cantidad de mensajero (si es

que realmente se genera), es realmente escasa y por esa razón no se detecta en las inmunotinciones y por ende no ejerce ningún efecto en las CTN que la expresan.

Otra opción es que el mensajero se degrade antes de poder producir a la proteína, no obstante, en los datos publicados por el grupo de la Dra. Lomelí, en donde se utilizó esta misma línea de transgénicos escindiendo  $\beta$ -geo desde el cigoto al cruzar con ratones que expresaban Cre en la línea germinal, pudo detectarse la presencia de la proteína en niveles comparables con los de CME desde el día 9 de gestación (Ramos-Mejía *et al.*, 2005). Adicionalmente, en datos de nuestro laboratorio trabajando con cultivos primarios de mesencéfalo ventral E12 de estos mismos embriones también se ha podido detectar inmunoreactividad contra Oct-4 después de 4 días de cultivo tanto con medio N2 + bFGF como KORS + LIF.

Por lo tanto, se sugiere que el transgén puede ser transcrito y el mensajero tiene la capacidad de traducirse, aunque el nivel inicial de expresión es muy bajo, por lo que podría requerirse de un tiempo mayor al que nosotros analizamos para conseguir que la proteína se acumule; no obstante no fue una opción en nuestro trabajo pues al cabo de 10 días de cultivo (4 en proliferación y 6 en diferenciación) la mayoría de las células mueren. Aunque algo que no probamos fue prolongar el tiempo de proliferación de las células pues si bien la muerte es mayor en los cultivos tratados con el virus que expresan Cre incluso después de cuatro días de proliferación, el porcentaje (10 a 15%) no era extremadamente alto como en el caso de las células después de la diferenciación.

Otro aspecto interesante que se pudo observar en las células transducidas con GCIP fue una disminución en la proporción de células GFP+ con respecto a las transducidas con el virus control GIA usando la misma cantidad de u.f.c en ambos casos. Al comparar el porcentaje de células en proliferación de ambos grupos no encontramos ninguna diferencia significativa, no obstante se observó un aumento en el número de células apoptóticas en las células GCIP+ en comparación con las transducidas con GIA.

Algo interesante es que este aumento en la apoptosis no se ve únicamente en las células GFP+ de los cultivos transducidos con GCIP, sino en la población general. Este efecto de aumento en la muerte se exagera al analizar los cultivos después de 6 días de diferenciación de las células. Esto podría sugerir que el virus *per se* tiene un efecto tóxico en las células, sin embargo, células no transgénicas de mesencéfalo ventral del mismo estadio transducidas con el virus GCIP presentaron niveles de muerte celular similares a los de células no transducidas y células Oct4-LoxP transducidas con GIA.

Hay reportes que indican que una expresión elevada de Cre en células de mamífero puede ser tóxica, provocando una elevada apoptosis durante el desarrollo (Baba *et al.*, 2005; Naiche y Papaioannou, 2007). No obstante, esto no explica el hecho de que el virus no haya tenido el mismo efecto apoptótico en células no transgénicas. Podría ser que la apoptosis sea ocasionada por la activación del transgén. En el trabajo del grupo de Lomelí se reportó también un incremento en la apoptosis en el cerebro anterior de embriones de estadio de 21 a 22 somitas (Ramos-Mejia *et al.*, 2005), además de que estos embriones no sobreviven más de 13 días de gestación, aunque no se ha investigado si su muerte se deba a un incremento más generalizado de la apoptosis. Aún queda por dilucidar el motivo que desencadena la apoptosis masiva en las células Oct4-LoxP transducidas con los virus que expresan Cre-GFP.

Finalmente, si la expresión del transgen es muy baja y no se consiguió la acumulación suficiente de Oct-4 para tener niveles detectables por inmunocitoquímica, y más aún para poder observar un efecto debido a su expresión en CTN, el aumento progresivo en la muerte celular de las células Oct4-LoxP escindidas pone en duda si al aumentar el tiempo de cultivo se conseguiría una población con suficiente proteína como para analizar un efecto de reprogramación en las CTN.

Estas células transducidas con los retrovirus que expresan Cre no resultaron ser un buen modelo para analizar el efecto de una expresión similar a la CTE de la

proteína Oct-4 en CTN, y dados los antecedentes no se descarta que esta proteína pueda tener un efecto importante en el programa de diferenciación de las células, pero se requiere de un nuevo enfoque para intentar cumplir los objetivos inicialmente planteados.

## Referencias

- 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.
- 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.
- Aoto T, Saitoh N, Ichimura T, Niwa H, Nakao M (2006) Nuclear and chromatin reorganization in the MHC-Oct3/4 locus at developmental phases of embryonic stem cell differentiation. *Dev Biol* **298**:354-367.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* **17**:126-140.
- Baba Y, Nakano M, Yamada Y, Saito I, Kanegae Y (2005) Practical range of effective dose for Cre recombinase-expressing recombinant adenovirus without cell toxicity in mammalian cells. *Microbiol Immunol* **49**:559-570.
- Barlow PW, Sherman MI (1972) The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy. *J Embryol Exp Morphol* **27**:447-465.
- Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ, Bergman Y (1998) Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol* **18**:1866-1878.
- Boiani M, Scholer HR (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:872-884.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**:947-956.
- 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.
- Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K (2005) Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* **309**:1369-1373.
- D'Ipollito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC (2004) Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* **117**:2971-2981.
- 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.
- Feldman N, Gerson A, Fang J, Li E, Zhang Y, Shinkai Y, Cedar H, Bergman Y (2006) G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol* **8**:188-194.
- Flint SJ (2000) Chapter 2. In: Principles of virology: molecular virology, pathogenesis and control., pp 28-33. Washington D. C.: ASM Press.
- Gardner RL, Brook FA (1997) Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *Int J Dev Biol* **41**:235-243.
- Gilbert SF (2003) Developmental Biology, Seventh Edition: 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.
- Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R (2005) Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* **121**:465-477.

- Holt SJ, Sadler PW (1958) Studies in enzyme cytochemistry. II. Synthesis of indigogenic substrates for esterases. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **148**:481-494.
- Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC, Jr., Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S (2004) Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* **5**:889-899.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**:41-49.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL (2005) Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* **122**:303-315.
- 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.
- Kandel RE, Schwartz JH, Jessell TM (1995) Essentials of neural science and behavior. In, pp 71-112: Appleton & Lane.
- 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.
- Krasnow MA, Cumberledge S, Manning G, Herzenberg LA, Nolan GP (1991) Whole animal cell sorting of *Drosophila* embryos. *Science* **251**:81-85.
- Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2006) A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* **20**:857-869.
- 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.
- Lenardo MJ, Staudt L, Robbins P, Kuang A, Mulligan RC, Baltimore D (1989) Repression of the IgH enhancer in teratocarcinoma cells associated with a novel octamer factor. *Science* **243**:544-546.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**:585-595.
- Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH (2006) The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* **38**:431-440.
- Lomeli H, Ramos-Mejia V, Gertsenstein M, Lobe CG, Nagy A (2000) Targeted insertion of Cre recombinase into the TNAP gene: excision in primordial germ cells. *Genesis* **26**:116-117.
- Majumder S, DePamphilis ML (1994) TATA-dependent enhancer stimulation of promoter activity in mice is developmentally acquired. *Mol Cell Biol* **14**:4258-4268.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**:841-847.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**:631-642.
- Miyagi S, Nishimoto M, Saito T, Ninomiya M, Sawamoto K, Okano H, Muramatsu M, Oguro H, Iwama A, Okuda A (2006) The Sox2 regulatory region 2 functions as a neural stem cell-specific enhancer in the telencephalon. *J Biol Chem* **281**:13374-13381.
- Miyagi S, Saito T, Mizutani K, Masuyama N, Gotoh Y, Iwama A, Nakauchi H, Masui S, Niwa H, Nishimoto M, Muramatsu M, Okuda A (2004) The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells. *Mol Cell Biol* **24**:4207-4220.
- Naiche LA, Papaioannou VE (2007) Cre activity causes widespread apoptosis and lethal anemia during embryonic development. *Genesis* **45**:768-775.



- Nakamura H, Watanabe Y (2005) Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon. *Int J Dev Biol* **49**:231-235.
- Nakamura H, Katahira T, Matsunaga E, Sato T (2005) Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development. *Brain Res Brain Res Rev* **49**:120-126.
- Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**:379-391.
- Nirenberg S, Cepko C (1993) Targeted ablation of diverse cell classes in the nervous system in vivo. *J Neurosci* **13**:3238-3251.
- Niwa H (2001) Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* **26**:137-148.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**:372-376.
- Niwa H, Masui S, Chambers I, Smith AG, Miyazaki J (2002) Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **22**:1526-1536.
- Nordhoff V, Hubner K, Bauer A, Orlova I, Malapetsa A, Scholer HR (2001) Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm Genome* **12**:309-317.
- Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H (1990) A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* **60**:461-472.
- Okazawa H, Okamoto K, Ishino F, Ishino-Kaneko T, Takeda S, Toyoda Y, Muramatsu M, Hamada H (1991) The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *Embo J* **10**:2997-3005.
- Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F (2005) Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem* **280**:5307-5317.
- Ovitt CE, Scholer HR (1998) The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol Hum Reprod* **4**:1021-1031.
- Palmieri SL, Peter W, Hess H, Scholer HR (1994) Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* **166**:259-267.
- Pesce M, Scholer HR (2001) Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* **19**:271-278.
- Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J, Prockop DJ (2004) Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* **103**:1647-1652.
- Pugh BF, Tjian R (1991) Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev* **5**:1935-1945.
- Ramos-Mejia V, Escalante-Alcalde D, Kunath T, Ramirez L, Gertsenstein M, Nagy A, Lomeli H (2005) Phenotypic analyses of mouse embryos with ubiquitous expression of Oct4: effects on mid-hindbrain patterning and gene expression. *Dev Dyn* **232**:180-190.
- Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M (2007) A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* **21**:860-867.
- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P (2005) Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* **280**:24731-24737.
- Rosner MH, De Santo RJ, Arnheiter H, Staudt LM (1991) Oct-3 is a maternal factor required for the first mouse embryonic division. *Cell* **64**:1103-1110.
- Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM (1990) A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* **345**:686-692.
- Saijoh Y, Fujii H, Meno C, Sato M, Hirota Y, Nagamatsu S, Ikeda M, Hamada H (1996) Identification of putative downstream genes of Oct-3, a pluripotent cell-specific transcription factor. *Genes Cells* **1**:239-252.

- Scholer HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P (1989) A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *Embo J* **8**:2543-2550.
- Schoorlemmer J, van Puijenbroek A, van Den Eijnden M, Jonk L, Pals C, Kruijer W (1994) Characterization of a negative retinoic acid response element in the murine Oct4 promoter. *Mol Cell Biol* **14**:1122-1136.
- Shimozaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T (2003) Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development* **130**:2505-2512.
- Silva J, Chambers I, Pollard S, Smith A (2006) Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature* **441**:997-1001.
- Smidt MP, Burbach JP (2007) How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat Rev Neurosci* **8**:21-32.
- Stemple DL, Anderson DJ (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* **71**:973-985.
- Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T (2001) Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* **11**:1553-1558.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**:663-676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**:861-872.
- Takeda J, Seino S, Bell GI (1992) Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res* **20**:4613-4620.
- Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada H, Jing N, Kondoh H (2004) Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells. *Mol Cell Biol* **24**:8834-8846.
- Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* **414**:112-117.
- Tomioka M, Nishimoto M, Miyagi S, Katayanagi T, Fukui N, Niwa H, Muramatsu M, Okuda A (2002) Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res* **30**:3202-3213.
- van der Walt JM, Noureddine MA, Kittappa R, Hauser MA, Scott WK, McKay R, Zhang F, Stajich JM, Fujiwara K, Scott BL, Pericak-Vance MA, Vance JM, Martin ER (2004) Fibroblast growth factor 20 polymorphisms and haplotypes strongly influence risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **74**:1121-1127.
- Wallenfels K, Mueller-Hill B, Dabich D, Streffer C, Weil R (1964) [Studies on Lactose-Splitting Enzymes. Xvi. The Number and Reactivity of the Sh-Groups of Beta-Galactosidase from E. Coli.]. *Biochem Z* **340**:41-55.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**:810-813.
- Ybot-Gonzalez P, Gaston-Massuet C, Girdler G, Klingensmith J, Arkell R, Greene ND, Copp AJ (2007) Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development* **134**:3203-3211.
- Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hubner K, Scholer HR (1996) Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* **122**:881-894.
- Yu H, Fang D, Kumar SM, Li L, Nguyen TK, Acs G, Herlyn M, Xu X (2006) Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* **168**:1879-1888.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**:1917-1920.
- Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L (1995) Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* **9**:2635-2645.