



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

LA PÉRDIDA DEL POTENCIAL NEUROGÉNICO DE LAS CÉLULAS
TRONCALES NEURALES DE LA MÉDULA ESPINAL EMBRIONARIA SE
ASOCIA CON EL DESCENSO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TELOMERASA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
JUAN CARLOS GONZÁLEZ OROZCO

TUTOR PRINCIPAL: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. HERMINIA PASANTES ORDÓÑEZ
[Instituto de Fisiología Celular](#)

DR. JAIME IVÁN VELASCO VELAZQUEZ
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MÉXICO, D. F. enero, 2016



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.

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina en el laboratorio B-220 del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Así mismo, la conclusión de esta no hubiese sido posible sin el importante apoyo técnico y académico brindado por el Dr. Jesús Ramírez Santos, la Lic. Leonora Olivos Cisneros, el Dr. Miguel Tapia Rodríguez, la Dra. Herminia Pasantes Ordoñez y el Dr. Iván Velasco Velázquez.

ÍNDICE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abreviaturas | 1 |
| Resumen | 3 |
| Introducción | 4 |
| Las células troncales neurales | 4 |
| Regulación de la proliferación y diferenciación de las células troncales neurales durante el desarrollo | 6 |
| La senescencia celular | 12 |
| Planteamiento del problema | 18 |
| Hipótesis | 19 |
| Objetivo general | 20 |
| Objetivos particulares | 20 |
| Materiales y métodos | 21 |
| Animales | 21 |
| Extracción de médula espinal embrionaria, obtención de neuroesferas y sus sub-cultivos | 21 |
| Evaluación de marcadores de células troncales neurales | 23 |
| Evaluación del potencial de diferenciación | 24 |
| Inmunofluorescencias | 24 |
| Cuantificación de la actividad de la enzima telomerasa mediante el ensayo de amplificación de repeticiones teloméricas | 25 |
| Transfección e inhibición de la actividad de la enzima telomerasa en las células troncales neurales cultivadas | 27 |
| Cuantificación de la longitud telomérica mediante slot blot | 27 |
| Análisis estadístico | 29 |
| Resultados | 30 |
| El patrón de desarrollo de las neuroesferas replica de manera cercana a aquél observado en la médula espinal in situ | 30 |
| El tratamiento de las células troncales neurales aisladas de la etapa E11 con el agente inhibidor de telomerasa reduce la actividad de esta enzima | 30 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| El tratamiento de las células troncales neurales de E11 con el agente inhibidor de enzima telomerasa reduce el potencial de diferenciación neurogénico | 32 |
| El potencial neurogénico de las células troncales neurales de la médula espinal embrionaria disminuye junto con la actividad de la enzima telomerasa conforme su desarrollo en cultivo avanza | 33 |
| Discusión | 37 |
| Conclusiones | 40 |
| Perspectivas | 40 |
| Referencias | 42 |

ABREVIATURAS

2'-O-MeRNA: 2'-O-metilo ácido ribonucleico.

Ars2: Proteína de resistencia a arsenito 2.

Ascl1: Complejo homólogo *achaete-scute* 1.

bHLH: Dominio estructural de proteínas hélice-vuelta-hélice básica.

BMPs: Proteínas morfogenéticas del hueso.

CBF1: Factor promotor de unión Notch.

CBP: Proteína de unión a CREB.

CHAPS: 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato.

c-Myc: Oncogén de mielocitomatosis.

CNTF: Factor neurotrófico ciliar.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DMEM: Medio Dulbecco modificado de Eagle.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

E11: Día 11 del desarrollo embrionario del ratón.

EGF: Factor de crecimiento epidermal.

FGF-2: Factor de crecimiento fibroblástico 2.

FOX: Familia de genes *forkhead box*.

FoxP2: *Forkhead box* P2.

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial.

HES: Familia de genes *hairy and enhancer* de división 1.

Jak/STAT: Cinasa Janus/Señal de transducción activadora de transcripción.

Klf4: Factor *Kruppel-like* 4.

LIF: Factor inhibidor de leucemia.

MAP2: Proteína asociada a microtúbulos 2.

Mash1: Homólogo mamífero del complejo *achaete-scute* 1.

p19ARF: Proteína p19ARF.

p21: Proteína p21.

p300: Proteína co-activadora de transcripción p300.

p53: Proteína p53.

Pax6: Proteína *paired box* 6.

PBS: Amortiguador salino de fosfatos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Rap1: Proteína relacionada a Ras 1.

RNA: Ácido ribonucleico.

S100B: Proteína de unión a calcio B.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SMAD: Proteínas intracelulares efectoras. El nombre resulta de la combinación de SMA y MAD.

Sox2: Región Y determinante del sexo *box-2*.

Sox9: Región Y determinante del sexo *box-9*.

SoxB1: Familia de factores de transcripción Región Y determinantes del sexo.

SSC: Amortiguador salino de citrato de sodio.

STAT3: Señal de transducción activadora de la transcripción 3.

TA: Temperatura ambiente.

Tbr2: Proteína del cerebro *T-box* 2.

TRAP: Protocolo de amplificación de las repeticiones teloméricas.

TRF2: Factor de unión a repeticiones teloméricas 2.

RESUMEN

Las células troncales neurales dan origen a los distintos linajes celulares que forman el sistema nervioso de los mamíferos. En etapas tempranas de la ontogenia estas células se diferencian principalmente en neuronas, sin embargo, con el transcurso del tiempo las células troncales neurales pierden su potencial neurogénico para comenzar a diferenciarse en células del linaje astrogial. Si bien se cree que esto se debe en parte a que las células troncales neurales poseen un programa que permite, después de un cierto número de divisiones, perder el potencial neurogénico y adquirir un potencial gliogénico, estudios previos en células mesenquimales sugieren que la disminución de la actividad de la enzima telomerasa, evento asociado con la senescencia celular, restringe su potencial de diferenciación. Con base en esta evidencia nosotros proponemos que la disminución de la enzima telomerasa pudiese limitar el potencial de diferenciación neurogénico de las troncales neurales durante el desarrollo embrionario, puesto que además previamente se ha observado que la actividad de la telomerasa se mantiene alta mientras las células conservan su potencial neurogénico.

En base a esto, evaluamos la posibilidad de que la disminución de la actividad de la telomerasa pudiese subyacer a la pérdida del potencial neurogénico mediante el estudio del efecto que produce la inhibición de esta enzima sobre el potencial de diferenciación de células troncales neurales cultivadas a partir de médula espinal embrionaria de ratón. De igual modo, estudiamos también los posibles cambios de la actividad de telomerasa en las células troncales neurales y su potencial de diferenciación después de varios pases en cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que el descenso en la actividad de la telomerasa se asocia con una disminución en el potencial neurogénico acompañado con un aumento en el potencial gliogénico, lo cual permite sugerir que la senescencia celular inducida por la ausencia de telomerasa pudiese estar regulando la pérdida del potencial neurogénico de las células troncales neurales, hipótesis que se apoya en la observación de que la molécula p19ARF, asociada al arresto celular durante la senescencia, incrementa sus niveles de expresión durante la transición neurogénesis/gliogénesis en la médula espinal embrionaria del ratón.

INTRODUCCIÓN

Las células troncales neurales.

Las células troncales se definen como células primordiales capaces de auto-renovarse y diferenciarse hacia varios linajes celulares. La auto-renovación es la capacidad que tienen las células troncales de generar al menos una célula hija con las mismas características fenotípicas que la célula progenitora como resultado de una división mitótica. Si la auto-renovación da como resultado dos células hijas idénticas a la célula progenitora se dice que la célula troncal efectuó una auto-renovación simétrica. En cambio, si la división resulta en una célula idéntica a la célula progenitora y otra célula con características más específicas, se dice que se efectuó una auto-renovación asimétrica [1].

El potencial de diferenciación es una de las propiedades de las células troncales que nos ha permitido clasificarlas en al menos tres grupos principales: células troncales totipotentes, pluripotentes y multipotentes [2]. En este contexto, se conoce como células troncales totipotentes a los blastómeros del embrión que se producen durante las primeras divisiones del cigoto y que pueden diferenciarse en tejidos embrionarios tanto como en tejidos extraembrionarios [3]. Las células troncales pluripotentes son derivadas de las células totipotentes, éstas provienen de la masa interna del blastocisto, y su potencial de diferenciación se limita a los tejidos embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo) que darán origen a todos los linajes celulares que conforman a un organismo adulto [4]. Finalmente, las células troncales multipotentes derivan de aquellas pluripotentes, pero su potencial de diferenciación está limitado a un cierto número de tipos celulares de tejidos específicos [5]. Es importante enfatizar que la presencia de las células troncales multipotentes no queda restringida a las etapas del desarrollo prenatal, sino que también pueden ser encontradas en los tejidos de órganos maduros (*i.e.*, células troncales adultas), en donde permiten la producción de precursores destinados a ser células de reemplazo del órgano del cual forman parte [6].

En los mamíferos, las células troncales neurales son células multipotentes provenientes del neuroectodermo embrionario que dan origen a la mayoría de las células que conforman el sistema nervioso central y periférico en un individuo

adulto [7]. El neuroectodermo es un tejido embrionario que surge a partir de las células del ectodermo, el cual puede ser identificado muy temprano en el desarrollo por la expresión de marcadores neurales específicos como los genes SoxB1 [8], Pax6, Nestina, Notch, entre otros [9]. Comúnmente, a estas células troncales neurales tempranas también se les refiere como células neuroepiteliales, pues se organizan en un epitelio de tipo pseudoestratificado que reviste la cavidad central del tubo neural. Es este neuroepitelio el que más tarde en la vida embrionaria/fetal dará origen a todas las neuronas y células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) del sistema nervioso, a excepción de las células de la microglía las cuales se originan en el sistema hematopoyético [10].

Durante el desarrollo del sistema nervioso las células troncales neurales atravesarán por distintas etapas. En un principio, las células neuroepiteliales generarán a las células de la glía radial de la zona ventricular, las cuales también son células multipotentes que pueden diferenciarse directamente en neuronas y en células gliales [11]. Sin embargo, después de cierto número de divisiones simétricas, las células de la glía radial también dan origen a las células progenitoras intermediarias, cuyo potencial de diferenciación se restringe en un principio más hacia el linaje neuronal y posteriormente hacia el glial dependiendo de la etapa del desarrollo que se observe [12]. Conforme el tejido neural se expande en el desarrollo, el grosor del neuroepitelio se reduce y aparecen la denominada zona subventricular y aquella subgranular hipocampal. La zona subventricular, junto con la zona subgranular del giro dentado del hipocampo se mantendrán como los dos únicos sitios neurogénicos presentes en el cerebro de la mayoría de los mamíferos durante su etapa adulta [13].

La “decisión” que toman las células troncales neurales para renovarse o diferenciarse está regulada, al menos en parte, por vías de señalización y transducción que regulan la expresión de factores de transcripción específicos (ver adelante). Estas vías de señalización y transducción se encuentran finamente reguladas espacio-temporalmente a lo largo del sistema nervioso embrionario/fetal, pues la ubicación y el microambiente en el que las células

progenitoras se encuentren, permitirán la correcta especificación de linajes y el establecimiento de identidades celulares en función del tiempo del desarrollo [14].

Regulación de la proliferación y diferenciación de las células troncales neurales durante el desarrollo.

El inicio del desarrollo del sistema nervioso durante la etapa embrionaria está marcado por la especificación de las células del ectodermo en neuroectodermo. Se piensa que la especificación de las células del ectodermo hacia células neurales se debe a un “estado pasivo” [15], ya que el resto de las células del ectodermo son inducidas “activamente” por BMPs para dar origen principalmente a las células precursoras de la epidermis y sus anexos [16]. Además, sabemos que el compromiso de las células del neuroectodermo se mantiene siempre y cuando la vía de señalización asociada con las BMPs sea inhibida en ellas, situación que se alcanza por la expresión de antagonistas de las BMPs como *Cordin* y *Noggin*, los cuales son secretados por la notocorda, estructura embrionaria que subyace al neuroectodermo [17] (Fig. 1).

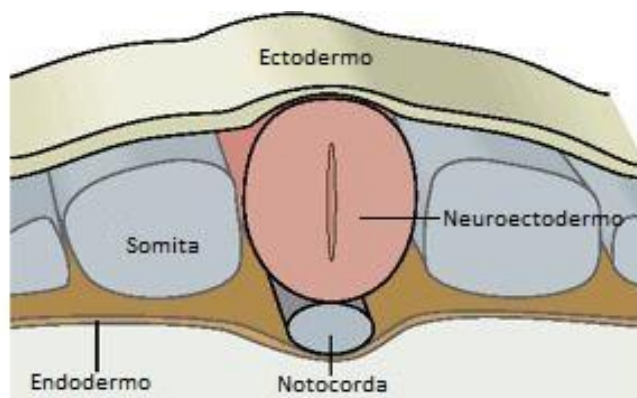


Fig. 1.- En los vertebrados superiores la notocorda es una estructura embrionaria con diversas funciones, entre ellas mantener el estado neural inducido en el neuroectodermo. El resto del ectodermo que no es especificado a tejido neural es inducido por BMPs para dar origen a la epidermis y sus anexos. Tomada y modificada de Gilbert [52].

Una vez que el tejido neural se ha especificado, las células troncales neurales proliferarán para expandir el tamaño del tejido para después diferenciarse hacia a un estado más maduro [18]. Este balance entre proliferación y diferenciación se

encuentra bajo el control de distintas vías de señalización y factores de transcripción que, como ya se mencionó, se expresan diferencialmente en el espacio y el tiempo. De este modo, durante el inicio del desarrollo neural, se ha identificado a la vía de señalización Notch como la principal responsable de regular el balance de la proliferación de las células troncales neurales y su diferenciación hacia neuronas. Los efectores primarios de esta vía son los factores Hes1 y Hes5, los cuales reprimen la diferenciación neuronal manteniendo la proliferación de las troncales neurales [19]. La expresión de la vía Notch y de los represores transcripcionales de genes proneurales Hes también se requiere para mantener el estado multipotente de las células neuroepiteliales, así como la multipotencia de la glía radial [20]. Esta vía es activada en respuesta a la estimulación del receptor Notch por sus ligandos Delta o Jagged. Una vez que el receptor Notch ha sido activado, su dominio intracelular interactúa con el efector citoplásmico *Notch C-promoter binding factor1* (CBF1), el cual formará un complejo transcripcional que se translocará al núcleo para activar la expresión de los represores transcripcionales ya mencionados [21]. Se ha observado que al dividirse, las células comparten equitativamente los factores Hes, lo que conduce a que ambas células hijas permanezcan como neuroepiteliales. La señalización por la vía de Notch también regula la proliferación de las células progenitoras intermedias, las cuales ya no son multipotentes pero sí neurogénicas [22]. Finalmente, si el receptor Notch o los factores Hes1/5 se encuentran ausentes en etapas tempranas del desarrollo neural, se promueve la diferenciación prematura de las células troncales neurales hacia neuronas [23, 24].

Al transcurrir el desarrollo, las células neuroepiteliales se convierten en células de la glía radial, las cuales siguen dependiendo de la actividad de los factores Hes para mantener las características de troncales multipotentes. Dependiendo del estado del desarrollo, las células de la glía radial pueden llevar a cabo divisiones simétricas como las células neuroepiteliales, o divisiones asimétricas, donde una de las células permanece como glía radial y la otra puede resultar en una progenitora intermedia más restringida o en una neurona completamente diferenciada [25, 26].

Además de las cascadas de señalización encargadas de mantener la proliferación, actualmente se sabe que las células troncales neurales se entrelazan por uniones adherentes constituidas por N-cadherina. Estas uniones ayudan a mantener las condiciones de multipotencia y auto-renovación de las células troncales neurales, sin embargo, en el transcurso del desarrollo estas uniones se van perdiendo gradualmente para permitir a las células comenzar con sus respectivos procesos de diferenciación. Algunos factores transcripcionales relacionados a este proceso han sido recientemente identificados e incluyen a miembros de la familia de genes FOX como es el caso de Foxp2, el cual reprime la expresión de N-cadherina [27]. Los miembros de la familia de factores transcripcionales SoxB1, principalmente Sox2, son de los marcadores más tempranos de las células troncales neurales [28], y al igual que los represores Hes, mantienen la auto-renovación de estas células [29]. Se cree que la expresión de Sox2 pudiera estar siendo activada por Ars2, un factor de transcripción recientemente identificado, el cual presuntamente también pudiera estar involucrado directamente en la auto-renovación de las células troncales neurales [30]. De igual modo, se cree que los miembros de la familia SoxB1 se mantienen en balance junto a los genes proneurales, esto con el fin de mantener un fino equilibrio entre proliferación y diferenciación [31]. No obstante existen otros factores claves en el mantenimiento del equilibrio entre proliferación y neurogénesis, como es el caso de Pax6 [32], siendo el nivel de expresión de este factor crítico para determinar hacia donde se inclina el balance. En verdad, se ha observado que Pax6 mantiene la auto-renovación, pero al alcanzar altos niveles, éste interactúa con genes proneurales (principalmente neurogeninas) para favorecer la neurogénesis [33].

A medida que el tiempo transcurre en el desarrollo, las divisiones simétricas de las células de la glía radial se reducen, dando paso paulatinamente a divisiones asimétricas, las cuales originan a las células progenitoras intermediarias. Al inicio, estas células se diferenciarán casi exclusivamente en neuronas, dando lugar a una fase que se conoce como la etapa neurogénica del desarrollo neural. Sin embargo, en etapas más avanzadas, las células progenitoras cambian su

potencial de diferenciación para generar a las células de la glía (astrocitos y oligodendrocitos) del sistema nervioso (Fig. 2) [12, 34].

La transición de células de la glía radial a células progenitoras intermediarias es alcanzada mediante la regulación negativa de algunos factores de transcripción como Sox2. Al tiempo, otros factores transcripcionales como Tbr2 son regulados positivamente [35, 36]. Se ha mostrado que la ausencia de Tbr2 en la glía radial conduce a una proliferación descontrolada, ya que Sox2 no es regulado negativamente, provocando un retraso y una disminución de la neurogénesis [37, 38]. Por último, la glía radial y las células intermediarias progenitoras pueden ser distinguidas por sus diferentes respuestas a la vía de Notch, pues ambos tipos celulares responden a la activación del receptor Notch, sin embargo, en las progenitoras intermediarias el efector CBF1 es atenuado, permitiendo así la diferenciación neuronal [39].

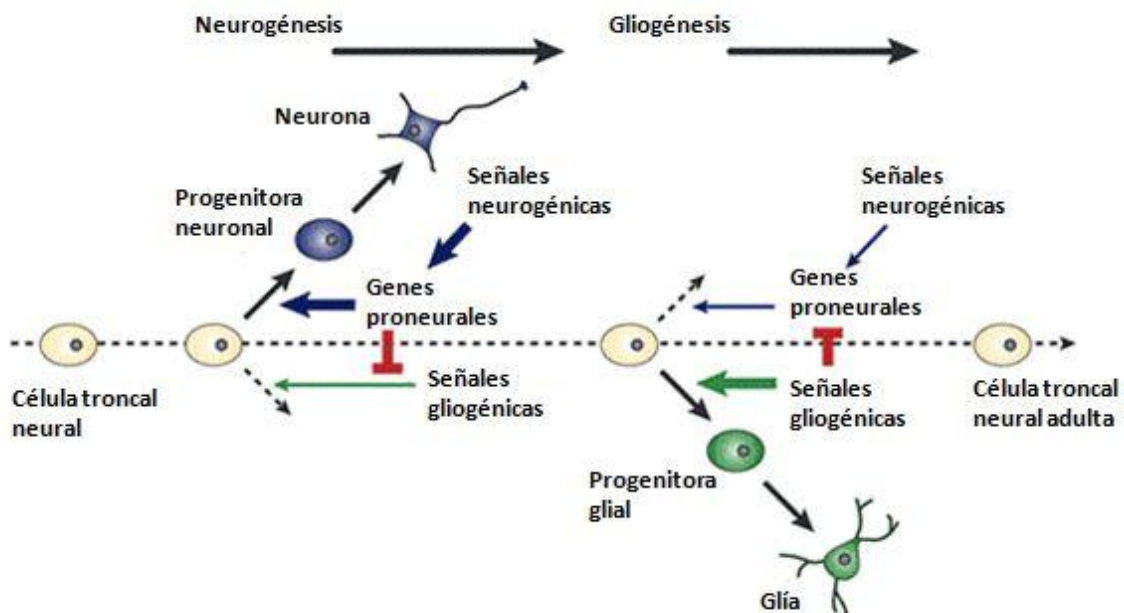


Fig. 2.- Esquema que ilustra el proceso de diferenciación de las células troncales neurales durante el desarrollo. Una vez formadas, las células progenitoras se diferencian predominantemente hacia el linaje neuronal. En fases más tardías del desarrollo, éstas se tornan sensibles a señales gliogénicas, pierden paulatinamente su potencial de diferenciación neurogénico, e inician la generación de células gliales. Tomado y traducido de Bertrand *et al*, 2002 [31].

Como ya se mencionó, el potencial de diferenciación de las células progenitoras intermediarias será neurogénico en un principio. Se cree que la neurogénesis

inicia una vez que algunos factores de transcripción involucrados inicialmente en la proliferación, como Pax6, aumentan su concentración dentro de las células para comenzar a inducir la expresión de los factores proneurales de la familia bHLH [40], principalmente Neurogeninas 1 y 2, Ascl1 y Mash1 [31, 41]. Durante el periodo neurogénico se observa que los factores proneurales se expresan muy activamente no solo para promover la diferenciación neuronal, sino también para inhibir una prematura diferenciación astrogliar [42]. Además, se sabe que estos factores pueden actuar en conjunto con otras vías de señalización para especificar el tipo neuronal de la célula de acuerdo a su posición espacial.

Al final del periodo neurogénico, las células progenitoras intermediarias llevarán a cabo una transición para adquirir un potencial de diferenciación gliogénico, permitiendo así la producción de los astrocitos y oligodendrocitos. En la fase neurogénica, la diferenciación glial es inhibida al menos en parte por la alta expresión de los factores proneurales bHLH [42, 43], los cuales pueden secuestrar directamente al complejo transcripcional CBP/p300/Smad que estimula la expresión de genes progliales, así como también pueden reprimir la vía de señalización JAK/STAT, la cual promueve la acetilación del gen GFAP [44], el cual se considera un marcador de astrocitos.

Se cree que después de varias rondas de divisiones, las células progenitoras intermediarias se tornan más sensibles a citocinas gliogénicas como BMPs, LIF y CNTF, provocando que pierdan su potencial neurogénico [45, 46]. Esta sensibilidad puede ser causada por la desmetilación de los sitios de unión del factor STAT3 en las regiones promotoras de genes progliales como GFAP y S100B, pues éstos permanecen hipermetilados durante las fases de proliferación y neurogénesis [47, 48, 49]. Del mismo modo, se han identificado factores de transcripción como Sox9 que promueven la diferenciación hacia astrocitos, principalmente en la sustancia gris de la médula espinal embrionaria. Por otro lado, la vía de Notch también tiene un rol durante la gliogénesis, pues se ha observado que las neuronas recién formadas pueden secretar los ligandos Delta y Jagged, los cuales se unen al receptor Notch de las aún células progenitoras intermediarias para inhibir en ellas la expresión de neurogeninas y por lo tanto la

diferenciación neuronal, permitiendo así una plena diferenciación y maduración glial [50].

Durante el desarrollo embrionario del ratón se ha identificado que la fase neurogénica comienza en la etapa embrionaria E10.5 una vez que el tubo neural se ha cerrado completamente a través de su eje antero posterior [51]. Aunque las células conservan su alta capacidad proliferativa y su multipotencia en esta etapa, la mayoría de las troncales neurales comienzan a restringir su potencial de diferenciación hacia el linaje neuronal, y hacia la etapa E11 e inicios de E12, las neuronas recién formadas a partir de estas células migran hacia afuera del centro del tubo neural para comenzar a formar dos capas: una capa interna densamente poblada de neuronas llamada capa del manto, la cual dará origen a la sustancia gris, y una capa externa llamada zona marginal compuesta principalmente de axones, la cual posteriormente será poblada mayoritariamente por células de la glía para dar lugar a la sustancia blanca [52]. Durante estas etapas (E10.5-E12.5), en la médula espinal embrionaria las células progenitoras neuronales darán lugar a las motoneuronas en la región ventral y a distintas interneuronas en la región dorsal. Las células progenitoras gliales, y los astrocitos y oligodendrocitos derivados de éstas serán originados a partir de la etapa E12.5 [53].

Si bien los mecanismos de la transición neurogénesis a gliogénesis no se encuentran aún del todo claros, en años recientes se ha sugerido que moléculas y vías de señalización encargadas de regular el ciclo celular y la senescencia celular pudiesen también tener un efecto sobre la regulación del potencial de diferenciación de las troncales neurales. De manera particular, se ha observado que el uso de fármacos inhibidores del ciclo celular puede inducir una prematura neurogénesis en embriones de ratón, sugiriendo que en condiciones normales las troncales neurales alargan su ciclo celular previo a su diferenciación [54]. De igual modo se ha visto que la vía de inhibidores del ciclo celular p19ARF-p53 puede modular la proliferación y la diferenciación de las células troncales neurales dependiendo de la etapa del desarrollo en la que se encuentren. En las etapas más tempranas, las células troncales neurales mantienen una baja expresión de la molécula p19ARF [55], cuya función es estabilizar la concentración del factor de

transcripción p53 en el núcleo por inhibición de la ubiquitina ligasa MDM2, esta última encargada de etiquetar a p53 para su degradación por el proteosoma [56], de este modo las células retienen su alta capacidad de proliferación y un amplio potencial de diferenciación neurogénico. Sin embargo, en etapas más avanzadas las troncales neurales elevan la expresión de p19ARF, provocando así una disminución de la proliferación en compañía de un potencial de diferenciación predominantemente glial. Así mismo, tanto la sobreexpresión del oncogén c-Myc, cuya función es promover el progreso del ciclo celular, como el silenciamiento de p19ARF en troncales neurales tardías revierten sus características, haciéndolas de nuevo altamente proliferativas y neurogénicas. Si al contrario, C-Myc es silenciado y p19ARF es sobreexpresado en troncales neurales más tempranas, se atenúa la proliferación y se induce una gliogénesis prematura [55].

La senescencia celular.

La senescencia celular se puede definir a grandes rasgos como un proceso por el cual el ciclo celular es arrestado de manera estable en respuesta a diferentes estímulos, siendo el principal de estos el daño al ADN genómico [57]. A diferencia de la quiescencia celular, las células mitóticas que entran en senescencia dejan de proliferar de manera irreversible, incluso en presencia de estímulos mitóticos, sin embargo estas células senescentes continúan metabólicamente activas y adquieren diversos cambios en la expresión de sus genes, los cuales conducen a las células a adquirir un fenotipo celular senescente que las caracteriza [58]; estas características que exhiben las células senescentes pueden ser utilizadas como marcadores para su identificación.

Se puede mencionar que una de las principales características de las células senescentes es el aumento del tamaño de la célula acompañado de un aumento del contenido lisosomal, lo cual permite visualizar células senescentes tanto en cultivo como en muestras de tejido por medio de un procedimiento que se basa en la detección de β -galactosidasa expresada a un pH óptimo de 6 [59]. Otros marcadores que exhiben las células senescentes son la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular, primordialmente p16, pues se ha visto que sus niveles de expresión aumentan considerablemente en células senescentes [60].

También es considerada como un marcador de senescencia la presencia de la variante de histona γ -H2AX que se encuentra en los sitios del genoma que presentan daño [61].

Las células senescentes con persistente daño al ADN secretan diversos factores de crecimiento, proteasas, citocinas y otras moléculas cuyas funciones autocrinas y paracrinas dependerán del contexto fisiológico en el que son liberadas [62]. Así pues, este fenotipo secretorio podría explicar de algún modo las funciones biológicas de las células senescentes. En primer lugar se piensa que la senescencia celular actúa como un mecanismo natural supresor de tumores, pues el daño al ADN genómico representa un estrés oncogénico que puede inducir la malignización de las células, así la senescencia previene la proliferación celular como un riesgo de transformación neoplásica [63]. También, se piensa que las células senescentes y su fenotipo secretorio puedan preparar al tejido y células circundantes para su reparación o eliminación en caso de ser necesario, pues se sabe que las células senescentes secretan las interleucinas IL-6 e IL-8, las cuales funcionan como citocinas proinflamatorias a la vez que pueden activar a macrófagos y células NK que servirán para eliminar células dañadas circundantes o a las mismas células senescentes [64], así como también se sabe que las células senescentes secretan el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el cual puede inducir una neo-vascularización en el tejido en reparación [65].

Se ha visto ampliamente que el tiempo es un factor importante en la inducción de la senescencia celular, pues la presencia de células senescentes en los organismos aumenta al avanzar la edad, razón por la cual a este proceso celular se le asocia comúnmente al envejecimiento. A pesar de que la senescencia no promueve por sí misma el envejecimiento de los organismos, esta sí puede promover la aparición de enfermedades relacionadas a la edad avanzada, pues se tiene evidencia de que el fenotipo secretorio de las células senescentes a la larga puede crear un microambiente de inflamación crónica según en el tejido que se encuentren. Además, y en ironía al rol biológico que se le atribuye a la senescencia, se ha propuesto que los factores de crecimiento y diversas citocinas

que las células senescentes secretan pueden inducir la malignización de las células que las circundan con el paso del tiempo [66].

Aunque la senescencia puede ser inducida por varios estímulos, el daño al ADN inducido por acortamiento telomérico puede ser considerado como el principal de estos [61]. Durante cada división mitótica, los extremos finales de los cromosomas llamados telómeros se van acortando gradualmente, condición que parece permitir a cierto tipo de células “estimar” el número de divisiones que han efectuado. Los telómeros en los vertebrados se componen de secuencias en tándem 5'-TTAGGG-3' altamente repetidas que protegen a los cromosomas de degradación por medio de su asociación a proteínas nucleares específicas [67]. Estas secuencias se acortan específicamente cada vez que las células replican su ADN en cada fase S del ciclo celular, lo cual se debe a la incapacidad de la ADN polimerasa de replicar completamente los extremos finales de los cromosomas [68]. En consecuencia a esto se estima que en cada división las células pierden entre 50 y 200 pares de bases de ADN telomérico, sin embargo, las células pueden dividirse varias veces antes de que sus telómeros se acorten lo suficiente como para señalar un daño al ADN genómico [69, 70].

Los telómeros cuya longitud se ha acortado críticamente después de varias divisiones pueden desencadenar una respuesta de daño al ADN [71]. Esta respuesta permite que los mecanismos de reparación del ADN localicen sitios dañados, principalmente rompimientos en la doble cadena, y mientras esto ocurre el ciclo celular es detenido logrando progresar solo y cuando el daño pueda ser reparado [72]. Aquellos cromosomas cuyos telómeros se han acortado de manera crítica representan un daño persistente al ADN genómico de las células, esto significa que no solo logran inducir el arresto de la proliferación, sino que también lo mantienen, ocasionando que las células ingresen a un estado de senescencia [73], pues los sitios del ADN que exhiben daño en células senescentes, (como los telómeros cortos), son sitios de unión de proteínas encargadas principalmente de regular el progreso del ciclo celular, cuya expresión forma parte de la respuesta celular ante el daño al ADN. Una de ellas es la proteína adaptadora 53BP1, la cual es la principal en mediar entre los sitios dañados del ADN y las proteínas que

arrestan el ciclo celular [74, 75], por lo que suele utilizársele como un marcador de senescencia.

Se ha propuesto que el arresto irreversible del ciclo celular en senescencia inducida por acortamiento telomérico se encuentra regulado esencialmente por la vía supresora de tumores p53/p21, la cual es activada por las cinasas ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) y CHK2 (Checkpoint Kinase 2), cuya expresión forma parte de la respuesta celular que se activa una vez que se ha detectado un daño al ADN genómico [61,76]. De este modo, la forma activa del factor de transcripción p53 induce la expresión de p21, proteína que funciona como un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas encargadas de la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular [77]. Al mismo tiempo, la erosión de los telómeros induce la expresión de la proteína p16, la cual actúa también como un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas a la vez que previene la hiperfosforilación de la proteína retinoblastoma (pRb), bloqueando así la salida de la fase G1 y por lo tanto reforzando la irreversibilidad del arresto celular [78].

Aunque es un hecho que en la mayoría de las células somáticas los telómeros se acortan cada vez que se efectúa una división, las células que proliferan muy activamente, como es el caso de las células troncales durante el desarrollo, deben mantener una longitud telomérica constante que les permita dividirse cuantas veces sea requerido sin poner en riesgo su integridad genómica. Estas células evaden este inconveniente por medio de la expresión de una enzima llamada telomerasa, la cual mantiene el largo de los telómeros añadiendo secuencias TTAGGG al final de los cromosomas durante cada replicación del ADN [79, 80] (Fig. 3).

La telomerasa actúa como una transcriptasa reversa, esto significa que polimeriza las secuencias teloméricas del ADN a partir de un templado de ARN que se encuentra incluido dentro de la misma enzima [81, 82]. Sin embargo, ambos componentes (transcriptasa reversa y templado) son codificados por distintos genes, a los que se suman otros que codifican proteínas que sirven para dar estabilidad a la enzima. Es debido a esta complejidad que aún no se ha podido esclarecer con exactitud los mecanismos que regulan la expresión y la actividad

de la telomerasa. No obstante, recientemente se ha sugerido que factores de transcripción encargados de mantener la auto-renovación y pluripotencia en células troncales embrionarias como c-Myc o Klf4 pueden también regular de manera positiva la expresión del gen que codifica para la transcriptasa reversa de la enzima [81, 83].

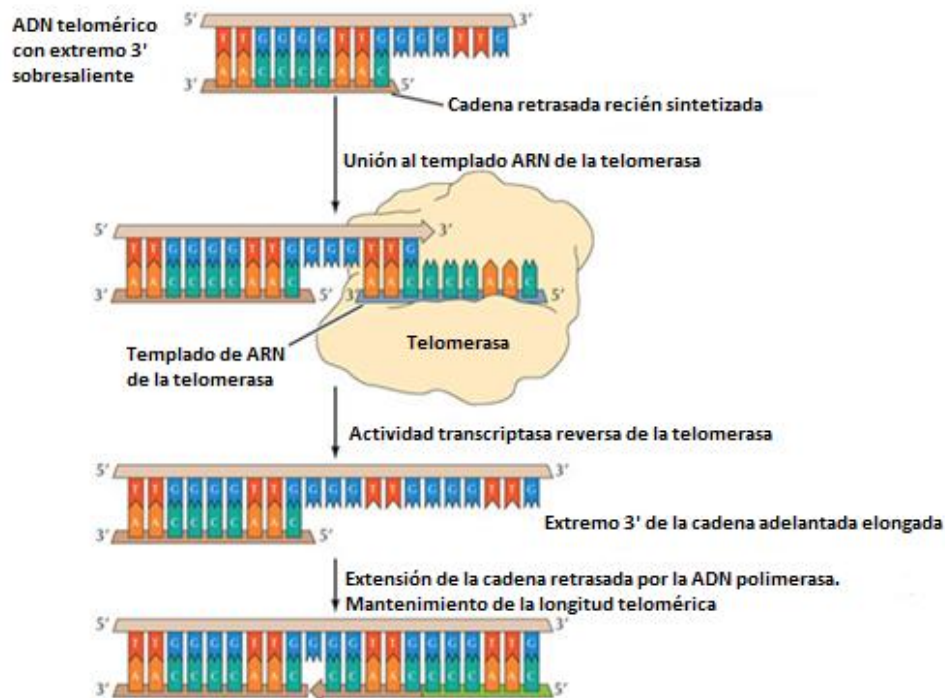


Fig. 3.- Al final de la replicación del ADN en cada fase S del ciclo celular, el extremo final de la cadena que recién se ha sintetizado de manera discontinua presenta un espacio sin ser completado debido a la separación del cebador que sirvió como iniciador del último fragmento de Okazaki sintetizado, provocando que la ADN polimerasa no pueda sintetizar ese extremo faltante a causa de la ausencia de un extremo 3'. Las células que expresan telomerasa pueden completar la síntesis de los extremos finales (telómeros) a través de la actividad transcriptasa reversa de esta enzima; en este caso, el templado de ARN incluido dentro de la misma enzima sirve como molde para elongar la cadena que se sintetizó de manera continua, permitiendo así la unión de un nuevo cebador de ARN que proporcionará un extremo 3' a la ADN polimerasa para que esta logre completar y finalizar la síntesis de la cadena discontinua. Tomada y modificada de Cooper, 2007 [84].

A pesar de que no se conocen los detalles de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de la telomerasa, existen técnicas que permiten monitorear su expresión y actividad tanto en tejido vivo como en células en cultivo. De este modo, se ha documentado que las células troncales pierden progresivamente la actividad de la telomerasa conforme el desarrollo avanza en distintos órganos del cuerpo, incluyendo al cerebro adulto [85, 86, 87].

Un aspecto central para nuestro estudio es el hecho de que, al menos en células troncales mesenquimales, la disminución progresiva de la actividad de la enzima telomerasa restringe el potencial de diferenciación, pues aquéllas células mesenquimales que poseen menor actividad de telomerasa limitan considerablemente su diferenciación adipogénica, osteogénica o condrogénica en comparación con aquéllas células que poseen mayor actividad [88, 89, 90]. En las células troncales neurales la actividad de esta enzima se mantiene alta mientras las células conservan su potencial neurogénico [87, 91]. Es por ello que nosotros proponemos que la actividad de la enzima telomerasa debe decrecer una vez que las células adquieren su potencial gliogénico. En apoyo a esta idea, en el laboratorio hemos mostrado que la concentración de la proteína p19ARF, asociada al arresto celular, se incrementa considerablemente al inicio de la etapa gliogénica en la médula espinal del ratón [92], sugiriendo de algún modo que la senescencia, junto a la disminución de la actividad de la telomerasa, pudiese participar en el proceso de la pérdida del potencial neurogénico de las células troncales neurales de la médula espinal del ratón al menos durante su vida prenatal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células troncales neurales pierden su potencial neurogénico conforme el desarrollo del sistema nervioso progresa. Si bien se han identificado factores de transcripción y vías de señalización que inducen a las células troncales neurales a perder su potencial neurogénico y adquirir un potencial gliogénico después de un cierto número de divisiones, estudios previos en células troncales mesenquimales sugieren que la disminución de la actividad de la enzima telomerasa, asociada a la senescencia celular, restringe su potencial de diferenciación. Estos hallazgos nos llevan a proponer que la disminución de la actividad de la enzima telomerasa pudiese también estar limitando el potencial neurogénico de las troncales neurales durante la fase de transición neurogénesis a gliogénesis durante el desarrollo neural.

HIPÓTESIS

El descenso de la actividad de la enzima telomerasa subyace a la pérdida del potencial neurogénico a la vez que aumenta el potencial gliogénico de las células troncales neurales de la médula espinal embrionaria del ratón.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la actividad de la enzima telomerasa subyace a la pérdida del potencial neurogénico de las células troncales neurales de la médula espinal embrionaria del ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.-Cultivar células troncales neurales como neuroesferas a partir de la médula espinal de ratones en la etapa de desarrollo embrionario E11 y verificar la expresión de los marcadores Nestin y Sox2 por inmunofluorescencia.

2.-Inhibir la actividad de la enzima telomerasa en las células troncales neurales cultivadas, evaluar su potencial de diferenciación antes y después de la inhibición mediante inmunofluorescencias para MAP2 y GFAP, y cuantificar la actividad de la enzima mediante el ensayo TRAP.

3.-Someter a las células troncales neurales a varios pases de cultivo, evaluar su potencial de diferenciación y cuantificar la actividad de la enzima telomerasa en ellas.

4.-Cuantificar la longitud telomérica en las células con inhibición y sin inhibición de enzima telomerasa, así como las que fueron sometidas a varios pases de cultivo mediante slot blot.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este estudio se usaron ratonas de la cepa CD1 de 11 días de gestación. Estas ratonas fueron apareadas durante 12 h para controlar la edad de los embriones, y fueron mantenidas en la unidad de modelos biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en cajas individuales con libre acceso a alimento y agua. Todos los animales usados en este estudio se manejaron y sacrificaron de acuerdo a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-199, "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio".

Extracción de médula espinal embrionaria, obtención de neuroesferas y sus sub-cultivos.

Se hicieron cultivos de células troncales neurales obtenidas a partir del segmento cervical (Fig. 4) de médulas espinales disecadas al día embrionario 11 (E11). Las ratonas gestantes se sacrificaron mediante una dislocación cervical, para posteriormente extraer los embriones a través de una laparotomía, siempre procurando de no romper el saco amniótico. Los embriones se colocaron en pozos de cultivo que contenían una solución de PBS fría, en la que se retiró la membrana amniótica, y consecutivamente en medio de cultivo (DMEM; Life Technologies®) frío, en el que se llevó a cabo la micro-extracción de los segmentos cervicales de la médula espinal. Para llevar a cabo dicha extracción, los embriones fueron fijados con agujas de acupuntura estériles sobre una caja de petri de 60 mm con agarosa al 1% solidificada. Los embriones se acomodaron de tal manera que la región ventral de estos quedase descubierta, y con apoyo de un par de pinzas de relojero estériles, se removía de ellos todo el tejido de origen mesodérmico hasta dejar descubierta la porción cervical de la médula espinal embrionaria. Esta era entonces cortada del resto de la médula y se le retiraba perfectamente cualquier rastro de meninges. Todo el tejido neural obtenido en este último paso fue colocado en medio DMEM adicionado con antibióticos. Posteriormente, las

muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos a TA. El precipitado se digirió con tripsina al 0.1% diluida en 0.5 mL de una solución de verseno al 0.02% a 37°C por 20 minutos. Al término de este lapso, y con el fin de inhibir la actividad de la tripsina, se agregaron 0.5 mL de una solución de verseno al 0.02% diluido con suero fetal bovino al 10%. Después, el tejido fue disgregado mecánicamente con ayuda de una micropipeta P1000 hasta obtener una suspensión homogénea, la cual se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos a TA. El precipitado fue entonces re-suspendido en 1 mL de medio definido N2, el cual consta de una mezcla de medio DMEM/F12 (1:1) suplementado con HEPES 3.5 mg/L, transferrina 4 mg/mL, insulina 4 mg/mL, heparina 100 µg/mL, putrescina 6mM, progesterona 100 µM, selenito de sodio 150 µM, L-glutamina 4 mM y antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL). Por último se realizó un conteo de viabilidad celular con azul de tripano en una cámara de Neubauer con el objetivo de sembrar aproximadamente 500,000 células en 2 mL de medio N2 por pozo en placas de cultivo de 12 pozos. Para lograr expandir las células clonalmente, se agregaron EGF y FGF-2 a una concentración de 20 ng/mL cada uno por pozo el día de inicio del cultivo, y posteriormente se siguieron agregando cada dos días. La formación de neuroesferas en suspensión era visible a partir del tercer y cuarto día de cultivo.

Una vez alcanzada la confluencia entre el sexto y octavo día del cultivo, las células fueron disgregadas para ser sub-cultivadas. Para ello, las neuroesferas en suspensión se levantaron con una micropipeta P1000 y el contenido de 6 pozos fue colectado en tubos cónicos de 15 mL para ser centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos a TA. Posteriormente, y retirado el sobrenadante, las neuroesferas fueron re-suspendidas e incubadas en 1 mL de verseno con tripsina al 0.025% durante 10 minutos a 37°C. Al término del periodo, se agregó 1 mL de verseno con suero fetal bovino al 10% y las células se disgregaron a través de una micropipeta P1000. A continuación las células fueron centrifugadas de nuevo a 3000 rpm por 5 minutos a TA. Retirado el sobrenadante, las células se re-suspendieron en 1 mL de medio N2 definido y luego se hizo un conteo del número de células empleando una cámara de Neubauer. Una vez finalizada la contabilización, se sembraron

150,000 células en placas de cultivo de 12 pozos e incubaron en 2 mL de medio N2 suplementado con EGF y FGF-2, ambos usados a una concentración de 20 ng/mL por pozo el día de inicio del subcultivo, y posteriormente cada dos días. La mayor parte de los experimentos realizados en este estudio fueron ejecutados utilizando células troncales neurales del segundo pase, lo cual significó un tiempo de cultivo de entre 12 y 16 días aproximadamente.

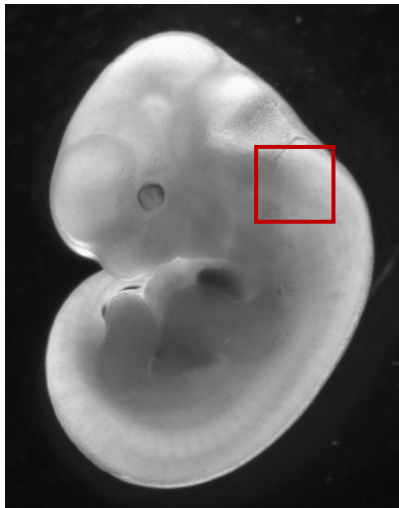


Fig. 4.- Segmento cervical del ratón al día embrionario 11 (E11).

Evaluación de marcadores de células troncales neurales.

Con el fin de verificar la expresión de los marcadores característicos de células troncales neurales Nestina y Sox2 por inmunofluorescencia, se transfirieron 100 μ L de la suspensión de neuroesferas formadas durante el subcultivo a placas de cultivo de 24 pozos con cubreobjetos de vidrio previamente tratados con una solución de poli-L-lisina al 0.01%. Posteriormente, se agregaron a cada pozo 100 μ L de medio fresco N2 definido. Las células se incubaron durante dos horas a 37°C para luego ser fijadas con una solución amortiguada de PBS con paraformaldehído al 2% durante 30 minutos a TA.

Evaluación del potencial de diferenciación.

Para evaluar el potencial de diferenciación de las células troncales neurales mediante inmunofluorescencia, se colocaron 100 μ L de la suspensión de neuroesferas en cajas de 24 pozos con cubreobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de medio N2 definido con suero fetal bovino al 10% sin factores de crecimiento a cada pozo. Después de una incubación de 48 horas a 37°C se fijaron con una solución amortiguada de PBS con paraformaldehído al 2% durante 30 minutos a TA. Los marcadores evaluados fueron MAP2 (neuronas) y GFAP (astrocitos) como se describirá en la sección siguiente.

Inmunofluorescencias.

Después de la fijación, las neuroesferas se lavaron en tres ocasiones con PBS durante cinco minutos a temperatura ambiente. La solución de lavado fue removida, y las células fueron permeabilizadas con PBS adicionado con 1% de Glicina, 0.2% de Tritón X-100 y 10% de suero de caballo. Posteriormente, las células se incubaron durante 12 horas a 4°C con anticuerpos primarios policlonales descritos en la tabla 1.

Tabla 1.- Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencias.

| <i>Anticuerpo</i> | <i>Origen</i> | <i>Marca</i> | <i>Dilución</i> |
|--------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| Sox2 | Conejo | R&D Systems® | 1:600 |
| Nestina | Ratón | Millipore® | 1:200 |
| MAP2 | Conejo | Millipore® | 1:500 |
| GFAP | Pollo | Millipore® | 1:500 |

Transcurrido el tiempo de incubación con los anticuerpos primarios correspondientes, se hicieron 3 lavados en PBS y se continuó con la incubación de las células en los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en solución de bloqueo durante 90 minutos a temperatura ambiente (Tabla 2). Después de incubar con los anticuerpos secundarios, las células se lavaron tres veces con PBS, para luego ser contrateñidas con una solución de DAPI (0.5 μ g/ml en PBS) durante 60 segundos. Los cubreobjetos con las células teñidas fueron

entonces montados sobre portaobjetos con medio de montaje Dako®. Las inmunotinciones fueron visualizadas con un microscopio de fluorescencia Olympus® BX-51WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) y fotografiadas con una cámara digital Hamamatsu EM-CCD (C9100).

Adicionalmente, y para validar la técnica inmunocitoquímica, se hicieron controles sin anticuerpos primarios en neuroesferas fijadas, así como también se hicieron controles positivos de todos los anticuerpos primarios en cortes coronales de cerebro de ratón (imágenes no mostradas).

Tabla 2.- Anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencias.

| Anticuerpo | Origen | Marca | Dilución |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|
| Alexa fluor 488 anti-IgG | Conejo hecho en burro | Life Technologies® | 1:250 |
| Alexa fluor 594 anti-IgG | Ratón hecho en burro | Life Technologies® | 1:250 |
| Anti-IgG biotinilado* | Pollo hecho en burro | Millipore® | 1:250 |

**Anticuerpo revelado con avidina fluorescente "Texas Red" (Vector Labs®)*

Cuantificación de la actividad de la enzima telomerasa mediante el ensayo de amplificación de repeticiones teloméricas.

Para cuantificar la actividad de la enzima telomerasa utilizamos el ensayo TRAP (por sus siglas en inglés), utilizando el producto comercial TRAPeze Telomerase Detection Kit (Millipore®). Este procedimiento se basa en la visualización de secuencias teloméricas generadas directamente por la enzima telomerasa extraída de las células a evaluar. El primer paso consiste en la obtención de la enzima telomerasa a partir de homogenados de las células troncales neurales cultivadas mediante una extracción total de proteínas. Para esto, las neuroesferas se levantaron y disgregaron tal y como se describe en los primeros pasos de la sección correspondiente al sub-cultivo celular. Después de estimar la viabilidad celular, se colocó un millón de células en tubos cónicos de 1.5 mL y se centrifugaban a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado resultante fue re-suspendido en 100 µL de amortiguador de lisis CHAPS, dejando incubar por 30 minutos a 4°C para luego centrifugar a 10,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Después de recuperar el sobrenadante, éste se alícuota para realizar una cuantificación de

proteína total mediante el método de Bradford. Posteriormente, se preparó una mezcla maestra para PCR cuyos componentes se describen en la tabla 3 de acuerdo a las instrucciones del kit provistas por el proveedor. Antes de correr la PCR, la mezcla maestra fue incubada por 30 minutos a 30°C con el fin de que la enzima telomerasa extraída de las células hiciera extensiones del oligonucleótido “TS” (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3) por medio de añadir secuencias teloméricas TTAGGG repetidamente.

Tabla 3.- Componentes de la mezcla maestra de PCR para el ensayo TRAP.

| Reactivo | Cantidad |
|-----------------------------------------------------------|-----------------|
| Amortiguador PCR 10X (200mM Tris-HCl pH 8.3; 630 mM KCl)* | 5 µL |
| 50X dNTP's Mix* | 1 µL |
| Oligonucleótido “TS”* | 2 µL |
| “TRAP Primer Mix”* | 1 µL |
| Taq Polimerasa de ADN (1U) | 0.4 µL |
| Agua ultrapura* | 38.6 µL |
| 500 ng de proteínas del extracto celular diluido en CHAPS | 2 µL |
| Volumen final | 50 µL |

**Proveídos por el kit.*

La amplificación por PCR de los productos extendidos por la telomerasa fue llevada a cabo en un termociclador MaxyGene II (Axygen®) bajo las siguientes condiciones: un primer paso a 94°C por 30 segundos, un segundo paso a 59°C por 30 segundos y un tercer paso a 72°C por un minuto durante 33 ciclos. Posteriormente los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 17% de 15 cm de largo, cuyo tiempo de corrimiento fue de 4 horas a 400 V. Al final, las bandas obtenidas se tiñeron con bromuro de etidio por 5 minutos y se observaron en un equipo fotodocumentador Typhoon Fla 7000 (GE®). La actividad de la enzima telomerasa se cuantificó de acuerdo al número de bandas obtenidas y la densidad de éstas en el gel. Teóricamente, entre mayor sea la actividad de la telomerasa, mayor será el número de productos extendidos durante el PCR. Los análisis de los geles fueron llevados a cabo con el software ImageJ (National Institute of Health) y graficados en Microsoft® Excel.

Transfección e inhibición de la actividad de la enzima telomerasa en las células troncales neurales cultivadas.

El agente inhibidor de enzima telomerasa utilizado en este estudio fue un oligonucleótido 2'-O-MeRNA con secuencia 5'-CAGUUAGGGUUAG-3', el cual inhibe la actividad de la enzima por medio de su unión anti-sentido al centro catalítico de RNA que la misma enzima utiliza para la síntesis de las secuencias teloméricas de DNA. Este inhibidor fue adquirido comercialmente bajo el nombre de "Telomerase Inhibitor VI, Sodium Salt" (Millipore®). Este oligonucleótido fue transfectado a las células con el producto Lipofectamina 2000 (Life Technologies®). Para ello, se cultivaron 100,000 células obtenidas por disgregación de neuroesferas del primer pase en placas de 24 pozos con 500 mL de medio N2 definido adicionado con factores de crecimiento. Las células fueron incubadas durante 48 horas previas a su transfección. El día de la transfección se mezclaron 12 µL de Lipofectamina con 3 µg del oligonucleótido inhibidor (proporción 2:1) en un volumen final de 50 µL de medio Optimem (Life Technologies®). La mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se reemplazó el medio de cultivo de las células por 200 µL de medio N2 definido sin antibióticos ni factores de crecimiento. En seguida se adicionaron 50 µL de la mezcla de transfección a cada pozo, se agitó levemente la placa y dejó incubar durante 4 horas en condiciones de cultivo. Al término de este tiempo el medio de las células fue reemplazado por medio N2 definido con antibióticos y factores de crecimiento. Las neuroesferas formadas a partir de estas células transfectadas se cosecharon después de 3 días para cuantificar su actividad de enzima telomerasa por medio del ensayo TRAP, así como para evaluar su potencial de diferenciación mediante inmunofluorescencia.

Cuantificación de la longitud telomérica mediante slot blot.

Para cuantificar la longitud telomérica, se extrajo DNA genómico de las células no tratadas y tratadas con el inhibidor de telomerasa, así como de las que fueron sometidas a varios pases de cultivo previamente concentradas en precipitados de aproximadamente un millón de células, utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit

(Qiagen®) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Después de cuantificar el ADN extraído por espectrofotometría UV en un equipo NanoDrop (Thermo Scientific®), se hicieron diluciones para obtener concentraciones de 50 ng en un volumen de 3.3 µL, el cual a su vez fue diluido en 16.5 µL de solución desnaturalizante (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M). Posteriormente, se dejó incubar la mezcla a 55°C por 30 minutos. Al término de este tiempo se agregaron 495 µL de solución neutralizante (Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M) a cada muestra, las cuales fueron colocadas en hielo mientras el aparato de micro-filtración para Slot Blot (Bio-Rad®) era montado de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se colocó en él, una membrana de nylon cargada positivamente previamente remojada en agua destilada.

Para transferir el ADN a la membrana, primero se lavó cada pozo del aparato con 200 µL de agua MiliQ. Después, se cargaron 156 µL de la muestra neutralizada, sometiendo la mezcla a vacío para permitir un correcto filtrado del líquido. Después de esto, los pozos fueron lavados con 200 µL de amortiguador salino de citrato de sodio 2X (SSC), el aparato fue desmontado y la membrana enjuagada 10 minutos en SSC 2X, dejándola secar al término de este tiempo. En seguida, y con la finalidad de fijar covalentemente el ADN a la membrana, esta fue expuesta a luz ultravioleta por ambos lados (120mJ/cm²). La membrana fue entonces pre-hibridada con una solución de Sarkosyl (SSC 5X, 1% reactivo de bloqueo (GE Healthcare®), SDS 0.1%) por 1 hora a 42°C en un horno de hibridación con movimiento de rotación constante y, durante este tiempo, se preparó la sonda diluyendo 100 ng de un oligonucleótido de 84 pb similar a las secuencias teloméricas (TTAGG x 14) en 10 µL de agua MiliQ. La mezcla fue incubada a baño maría por 5 minutos. La sonda fue centrifugada para concentrar todo el volumen, y después se le agregaron 10 µL de reactivo de marcaje ECL (GE Healthcare ®) y 10 µL de glutaraldehído (GE Healthcare ®), dejando incubar la mezcla 10 minutos a 37°C. Al concluir el tiempo de pre-hibridación, la membrana fue hibridada en la misma solución de Sarkosyl con los 30 µL de la sonda marcada con ECL durante toda la noche a 42°C con agitación constante.

Al día siguiente la membrana fue lavada tres veces a temperatura ambiente con una solución de SSC 2X y SDS al 0.1%; dos de los lavados se realizaron por 10 minutos y el último por 5 minutos con SSC 2X. Para detectar la sonda marcada, la membrana se colocó sobre papel plástico transparente en el que se adicionaron 3 mL de reactivo de detección, dispersando uniformemente la mezcla sobre la membrana y dejando incubar por 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se retiró el reactivo de detección y la membrana envuelta en plástico fue introducida en un cassette de detección con la cara cargada de ADN expuesta a una película para autoradiografía (Kodak®); el cassette fue cerrado por 10 minutos. Por último, la película fue removida del cassette y revelada en una solución de revelado GBX (Kodak®) por 1 minuto, luego enjuagada en agua corriente y fijada con fijador rápido de Kodak® por 1 minuto más. La película revelada fue digitalizada en un equipo Typhoon Fla 7000. El análisis y comparación de la longitud telomérica entre los grupos se llevo a cabo por densitometría con ayuda del software ImageJ.

Análisis estadístico.

Se realizaron varios experimentos independientes de diferentes ratonas preñadas. Los datos graficados son presentados como la media \pm desviación estándar de la media obtenida como resultado de tres experimentos independientes. Las gráficas y el análisis estadístico fueron generados usando el software Microsoft® Excel.

RESULTADOS

El patrón de desarrollo de las neuroesferas replica de manera cercana aquél observado en la médula espinal *in situ*.

Las células troncales neurales fueron aisladas a partir de segmentos cervicales de médulas espinales embrionarias de ratón en su etapa de desarrollo E11 para ser cultivadas. Durante los primeros días del cultivo estas células mostraron una morfología semejante a la de las células de la glía radial en compañía de una rápida expansión clonal de manera adherente (Fig. 5A), sugiriendo que estas células replican en términos generales el estado del desarrollo en el que fueron aisladas, el cual corresponde a una etapa de rápida proliferación del tejido neural durante el desarrollo, misma etapa en la cual las células conservan un potencial de diferenciación casi exclusivamente neurogénico. Más adelante, entre el tercero y cuarto día de iniciado el cultivo, se podía observar la formación de agregados esféricos que continuaban su expansión en libre suspensión, los cuales son comúnmente referidos como neuroesferas (Fig. 5B). Adicionalmente, para comprobar que estos agregados esféricos estuviesen enriquecidos de células troncales neurales propiamente dichas, se verificó en ellos la expresión de los marcadores característicos Nestina y Sox2 mediante inmunofluorescencia (Fig. 5C).

El tratamiento de las células troncales neurales aisladas de la etapa E11 con el agente inhibidor de enzima telomerasa reduce la actividad de esta enzima.

Con la finalidad de evaluar si la disminución de la actividad de la enzima telomerasa se asocia con la reducción del potencial de diferenciación neurogénico de las células troncales neurales de la médula espinal cervical del embrión del ratón, se requiere forzosamente inhibir la actividad de esta enzima durante una etapa del desarrollo neural que sea exclusivamente neurogénica. Con este objetivo en mente, en el presente trabajo estudiamos en un primer paso los efectos que produce la incubación de un inhibidor de telomerasa de tipo 2'-O-MeRNA sobre la actividad de esta enzima en neuroesferas obtenidas a partir de

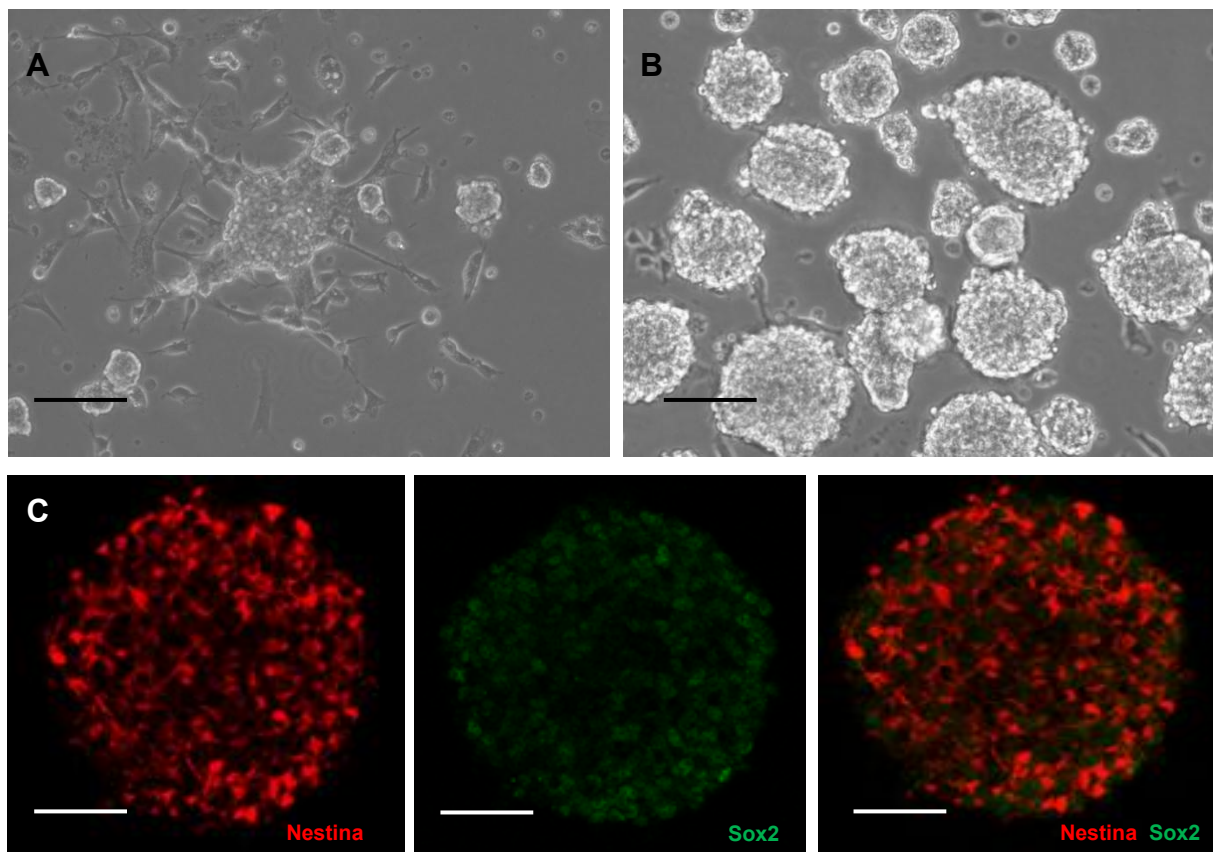


Fig. 5.- Cultivo de células troncales neurales como neuroesferas. A) Células troncales neurales de la médula espinal embrionaria de ratón cultivadas durante 3 días expandiéndose adherentemente. Barra de escala: 100 μm . B) Neuroesferas formadas a los 7 días de cultivo en suspensión libre vistas por microscopía de contraste de fases. Barra de escala: 100 μm . C) Neuroesfera del segundo pase expresando la proteína de filamentos intermedios Nestina y el factor de transcripción Sox2, ambos marcadores característicos de células troncales neurales. Barra de escala: 50 μm .

células troncales neurales aisladas de la médula espinal cervical a la edad de E11. De este modo, el ensayo TRAP permitió mostrar que la actividad de la telomerasa se disminuye hasta en un 80% ($\pm 15.6\%$) cuando las células troncales neurales obtenidas del segundo pase son incubadas con dosis relativamente altas del inhibidor (3 μg), observándose además que éste actúa de manera dosis dependiente al ensayar distintas concentraciones (Fig. 6).

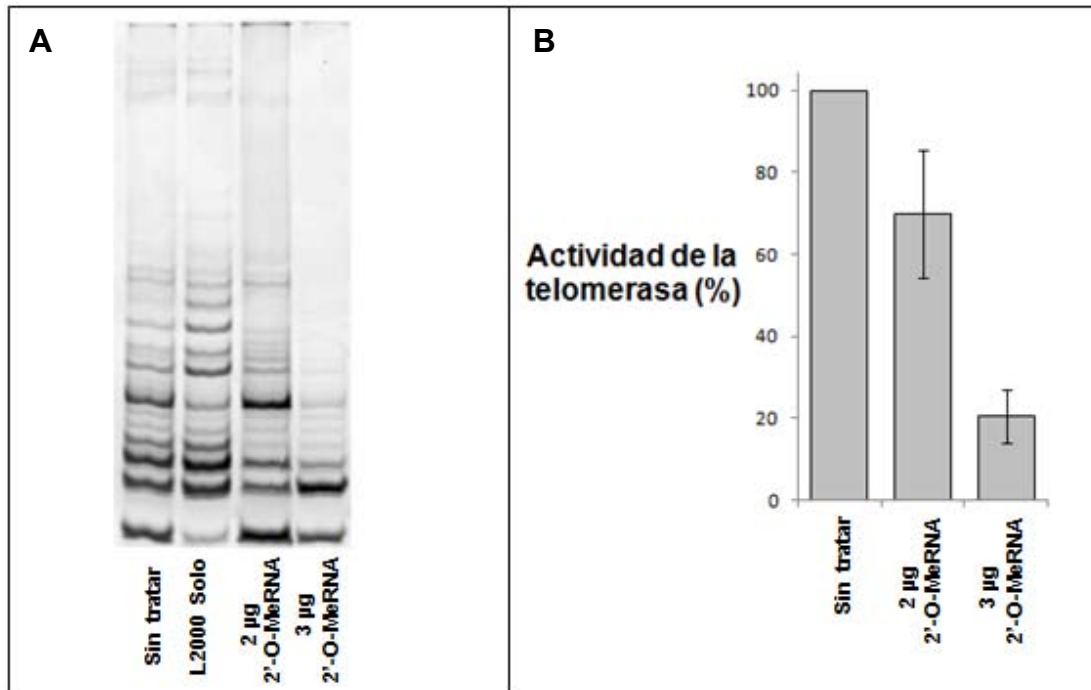


Fig. 6.- Inhibición de la actividad de la telomerasa. A) Patrones de bandeo obtenidos mediante el ensayo TRAP donde se aprecia la inhibición de la actividad de la telomerasa utilizando distintas concentraciones del oligonucleótido 2'-O-MeRNA introducido dentro de las troncales neurales de E11 en su segundo pase de cultivo con el transfectante Lipofectamine 2000. B) gráfica obtenida por densitometría de los patrones de bandeo que muestra el porcentaje de inhibición de la telomerasa, en la cual se puede apreciar una disminución de la actividad hasta en un 80% ($\pm 15.6\%$) al utilizar 3 μg del inhibidor.

El tratamiento de las células troncales neurales de E11 con el agente inhibidor de enzima telomerasa reduce el potencial de diferenciación neurogénico.

Como se mostró previamente, la secuencia de desarrollo responsable de conducir la generación de neuronas en la médula espinal cervical del embrión del ratón se replica de manera relativamente fiel en el ensayo de neuroesferas bajo las condiciones experimentales establecidas. Esta circunstancia nos permitió instrumentar una estrategia dirigida a evaluar si la inhibición de la actividad de la telomerasa en células troncales neurales de E11 reduce su potencial neurogénico, al mismo tiempo que promueve su potencial gliogénico. En concordancia a esta idea, la incubación de las células troncales neurales con 3 μg del oligonucleótido 2'-O-MeRNA redujo la inmunoreactividad para el marcador de neuronas MAP2 e incrementó sustancialmente el correspondiente a células astrogiales GFAP en las

células troncales neurales diferenciadas a partir de neuroesferas de E11 obtenidas en el segundo pase de cultivo (Fig. 7A y B).

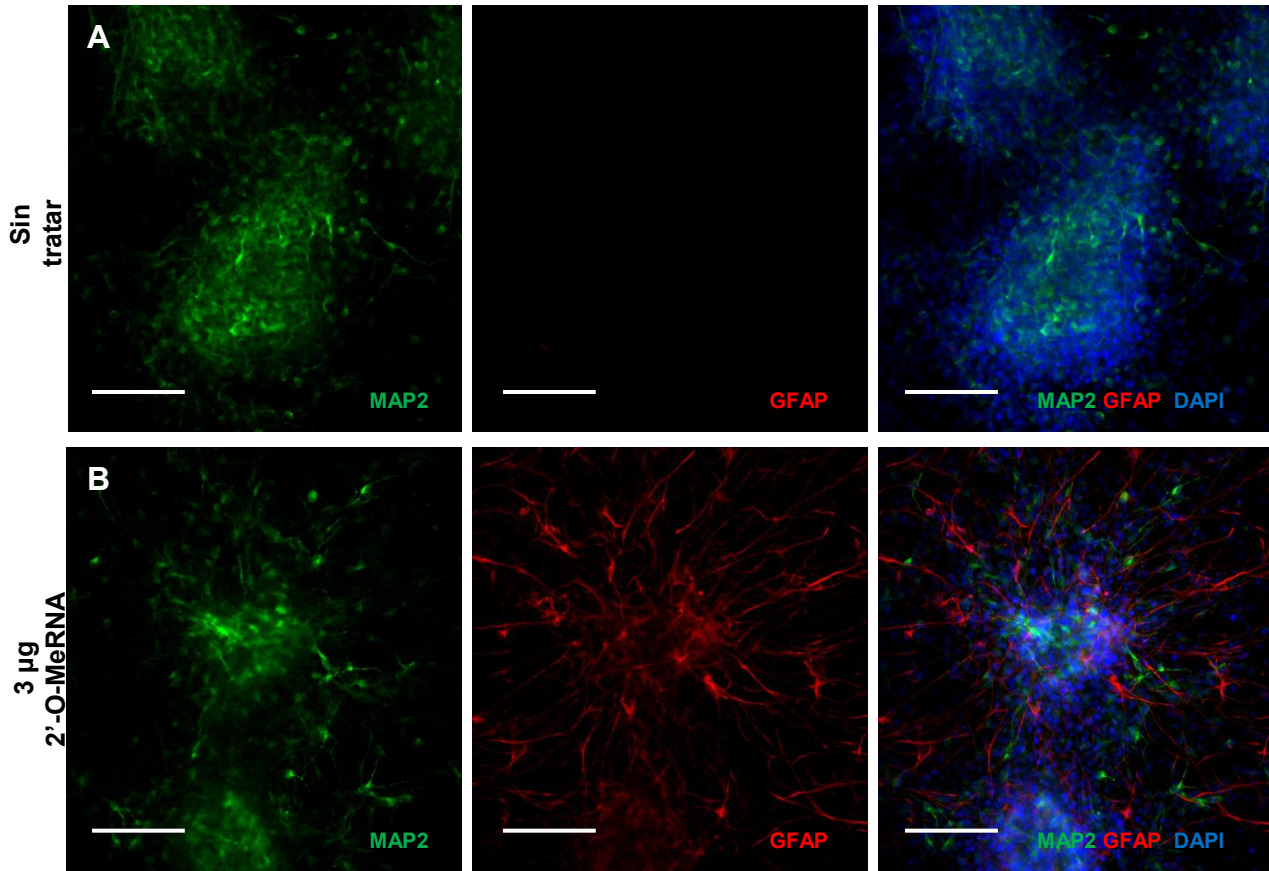
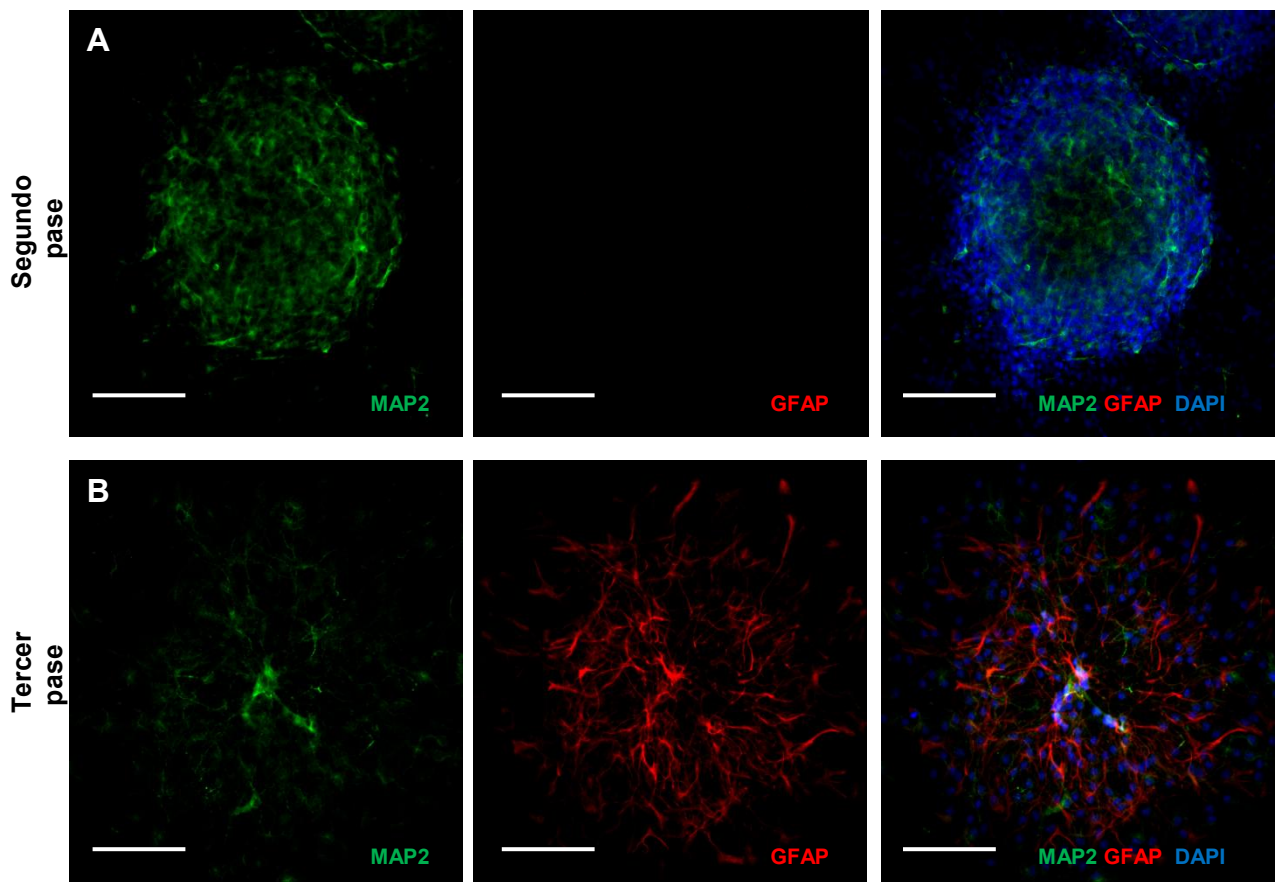


Fig. 7.- La inhibición de la telomerasa reduce el potencial neurogénico. A) Inmunofluorescencias para MAP2 y GFAP en células troncales neurales diferenciadas del segundo pase en donde se observa un potencial predominantemente neurogénico. B) Células diferenciadas tratadas previamente con 3 µg del inhibidor de telomerasa, las cuales, muestran un aumento sustancial en el potencial gliogénico. Barra de escala: 50 µm.

El potencial neurogénico de las células troncales neurales de la médula espinal embrionaria disminuye junto con la actividad de la enzima telomerasa conforme su desarrollo en cultivo avanza.

Conforme las células troncales se dividen, la actividad de enzima telomerasa en ellas se reduce y el potencial de diferenciación se restringe [88]. Para evaluar si esto ocurría con el potencial neurogénico en las células troncales neurales aisladas de la médula espinal cervical embrionaria del embrión, se generaron cultivos de neuroesferas a partir de este tipo de células obtenidas en la etapa de desarrollo E11. Si bien en el segundo pase de cultivo estas células mostraron ser

capaces de dar origen casi exclusivamente a neuronas, hacia el sexto pase (42 días de cultivo aproximadamente), se pudo notar que éstas redujeron considerablemente su potencial neurogénico originando preferentemente astrocitos (Fig. 8A y B). Es importante destacar que esta disminución en el potencial de diferenciación neurogénico de las células troncales se asoció con una reducción de hasta un 65% ($\pm 12.5\%$) de la actividad de enzima telomerasa vista con el ensayo TRAP (Fig. 8C).



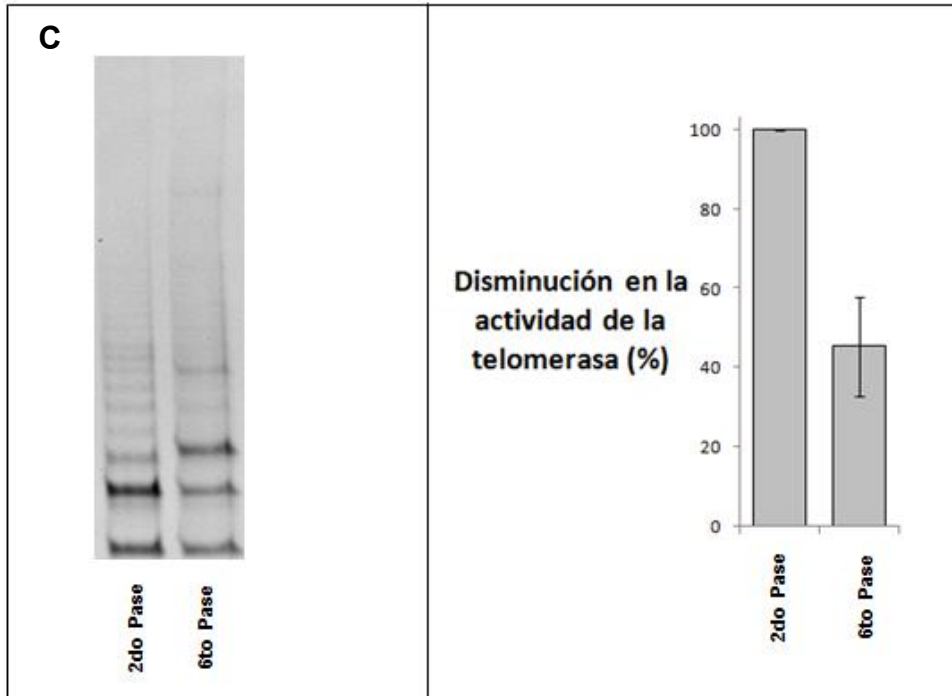
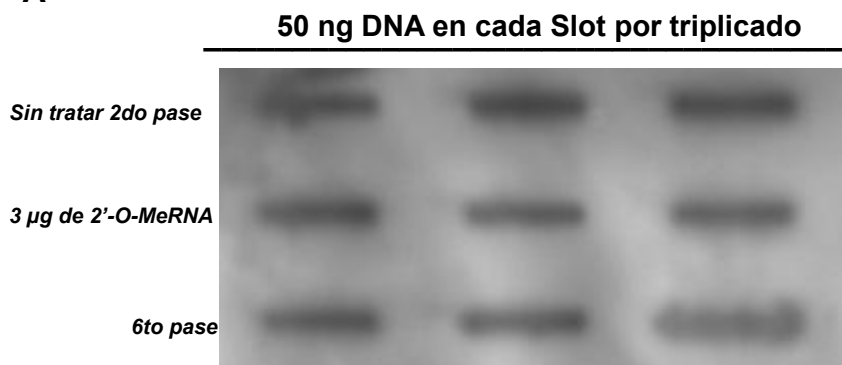


Fig. 8.-La actividad de la telomerasa y el potencial neurogénico disminuyen conforme el tiempo de cultivo avanza.

A) Inmunofluorescencias de células troncales neurales de E11 del segundo pase diferenciadas, donde se muestra que estas son exclusivamente neurogénicas B) Células diferenciadas del sexto pase (aprox. 42 días de cultivo), las cuales son principalmente astrogliogénicas. C) Ensayo TRAP que demuestra una disminución en la actividad de la telomerasa en hasta un 65% ($\pm 12.5\%$) en las células del sexto pase con respecto a las del segundo pase. Barra de escala: 50 μm .

Por último se evaluó el estado de la longitud telomérica en las células troncales neurales del segundo pase tratadas y no tratadas con el inhibidor de enzima telomerasa, así como en las células del sexto pase. A pesar de haber observado una caída en la actividad de la telomerasa en las células tratadas y las células del sexto pase, esta no se acompañó de acortamientos teloméricos demostrables por la técnica de slot blot empleada en este estudio (Fig. 9A y B).

A



B

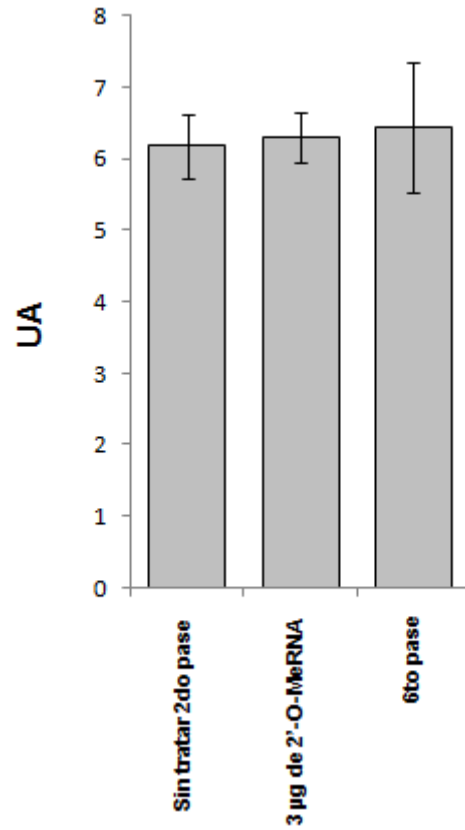


Fig. 9.- La cuantificación de la longitud telomérica por slot blot no mostró diferencias observables. A) Hibridación slot blot para cuantificar y comparar la longitud telomérica entre las células troncales neurales no tratadas del segundo pase, tratadas con 3 µg del inhibidor de telomerasa 2'-O-MeRNA del segundo pase, y las células del sexto pase. B) El análisis por densitometría no demuestra diferencias en la señal emitida.

DISCUSIÓN

Una de las características morfo-funcionales del sistema nervioso de los mamíferos adultos es la inhabilidad que muestra la mayor parte de las regiones que lo constituyen para generar y reemplazar neuronas una vez concluido el desarrollo neural. Este fenómeno se debe, al menos en parte, a que las distintas poblaciones de células troncales ubicadas a lo largo del sistema nervioso pierden su potencial neurogénico. Si bien se han descrito algunas vías de señalización y factores de transcripción involucrados en el proceso de pérdida del potencial neurogénico, generalmente asociado con la adquisición de potencial gliogénico, el hecho de que en células mesenquimales multipotentes el descenso de la actividad de la enzima telomerasa se asocie con la restricción de su potencial de diferenciación [88, 89, 90], sugiere que un proceso de senescencia celular pudiese regular el potencial de diferenciación de las células troncales en el organismo. En apoyo a esta conjetura, en el presente trabajo mostramos datos preliminares que sugieren que la pérdida del potencial neurogénico de las células troncales neurales obtenidas de los segmentos cervicales de la médula espinal embrionaria del ratón se relaciona con una caída natural o experimental de la actividad de la telomerasa. No obstante, nuestros hallazgos no lograron evidenciar el acortamiento telomérico durante la transición de neurogénesis a gliogénesis. Sin embargo datos obtenidos previamente en el laboratorio muestran que la proliferación celular y la actividad de la telomerasa en neuroesferas obtenidas de médula espinal en las edades E11, E14 y P1 disminuyen conforme el desarrollo avanza [92]. Por lo tanto el resultado negativo obtenido con relación al acortamiento telomérico podría explicarse por una inadecuada sensibilidad del ensayo aquí empleado.

Los resultados aquí expuestos demuestran que la disminución de la actividad de la telomerasa puede estar asociada a la pérdida del potencial neurogénico de las células troncales neurales espinales, sugiriendo así la posibilidad de que la senescencia celular, inducida por la ausencia de telomerasa, pueda estar regulando el potencial de diferenciación de estas células. Dado esto, resulta sumamente conveniente demostrar que efectivamente este tipo de células

adquieren un fenotipo senescente durante la transición neurogénesis/gliogénesis, y de ser así, quedaría por dilucidar en qué manera la senescencia pudiese estar regulando el potencial de diferenciación. Una explicación posible de cómo la senescencia podría regular la diferenciación surge a partir del concepto de “alargamiento del ciclo celular”, el cual sugiere que la proliferación y diferenciación de las células troncales neurales están acopladas durante la neurogénesis. Así, el alargamiento del ciclo celular favorece la neurogénesis y previene la proliferación de las células [54], por lo que en nuestro caso el concepto también podría explicar la transición neuro-gliogénica. En apoyo a esta posibilidad, previamente se ha observado que la vía de inhibidores del ciclo celular p19ARF-p53 participa en establecimiento de la fase gliogénica de las células troncales neurales del telencéfalo embrionario [55]. De igual modo, la expresión de p19ARF se incrementa durante la fase de transición neuro-gliogénica en las troncales neurales de la médula espinal cervical embrionaria del ratón (observaciones no publicadas). De manera conjunta, estas evidencias sugieren que estas células disminuyen gradualmente su actividad de telomerasa conforme el desarrollo avanza, esto con una posible compañía en el acortamiento de sus telómeros, el cual a su vez podría inducir la inhibición del ciclo celular ya mencionada que regula el inicio de la senescencia celular y así poder restringir el potencial de diferenciación neurogénico. En estas condiciones, el alargamiento del ciclo celular podría permitir que las citocinas y los factores de transcripción gliogénicos se acumulen en el microambiente para poder superar un cierto nivel umbral que al ser rebasado de inicio a la gliogénesis. También podría permitir la correcta desmetilación de los genes proglía que permanecen hipermetilados durante las fases de proliferación y neurogénesis del desarrollo neural [47].

En general, se tiende a pensar que los procesos que subyacen la progresión del desarrollo embrionario y fetal son todo menos eventos relacionados de alguna manera con el envejecimiento. Nuestros resultados, aunque preliminares, retan esta noción al proveer evidencia experimental que sugieren que la senescencia celular subyace a la pérdida del potencial neurogénico de las células troncales neurales de la médula espinal cervical del embrión/feto del ratón, pues este

proceso celular suele ser comúnmente asociado al envejecimiento. Si bien esta conclusión podría sorprender, recientemente se ha descubierto que la senescencia celular ocurre activamente en distintos sitios del organismo durante el desarrollo embrionario de los mamíferos, principalmente en la cresta del ectodermo apical de las extremidades en formación, el mesonefros, el saco endolinfático del oído interno y la zona de cierre del tubo neural en la parte craneal posterior. Estos descubrimientos llevaron a introducir el concepto de “senescencia celular programada” en el desarrollo [93, 94], de este modo, la senescencia no sólo constituiría un mecanismo natural supresor de tumores [66], sino que también parece ser un proceso modelador de la organogénesis durante la vida prenatal aunado a los proceso de proliferación, diferenciación, migración y muerte celular (mencionado en Muñoz-Espín *et al*, 2013).

CONCLUSIONES

-El patrón de desarrollo de las neuroesferas formadas a partir de células troncales neurales de la médula espinal embrionaria del ratón en etapa E11 replica de manera cercana el estado del desarrollo neural en el que fueron aisladas.

-El oligonucleótido inhibidor de telomerasa 2'-O-MeRNA reduce potentemente la actividad de esta enzima en células troncales neurales de E11 a concentraciones relativamente altas.

-El tratamiento de las células troncales neurales de E11 con el oligonucleótido inhibidor de telomerasa 2'-O-MeRNA en E11 reduce el potencial neurogénico y aumenta el potencial gliogénico.

-El potencial neurogénico de las células troncales neurales de la médula espinal embrionaria disminuye junto con la actividad de telomerasa conforme su desarrollo en cultivo avanza, esto en compañía de un aumento en el potencial de diferenciación gliogénico.

PERSPECTIVAS

Para fortalecer la hipótesis de que la disminución de la actividad de la telomerasa a través del acortamiento telomérico subyace a la pérdida del potencial neurogénico de las troncales neurales, es necesario cuantificar la longitud telomérica empleando una técnica de mayor sensibilidad a la aquí utilizada. Actualmente se encuentran descritas en la literatura técnicas basadas en la PCR cuantitativa y el Southern Blot que ofrecen cuantificar el largo de los telómeros a nivel de pares de bases, lo cual representa una importante herramienta para abordar este problema en futuras investigaciones.

De este mismo modo es necesario demostrar que efectivamente la disminución de la telomerasa induce senescencia celular en las troncales neurales estudiadas. Para ello sería conveniente evaluar marcadores considerados de senescencia,

como la detección de β -galactosidasa asociada al fenotipo senescente antes y después de la inhibición experimental de la telomerasa en las células cultivadas, así como después de haber sometido a estas mismas células a varios pases de cultivo.

Por último resulta importante demostrar que la senescencia celular regula la transición neurogénica a gliogénica de las células troncales neurales de la médula espinal embrionaria del ratón en condiciones *in vivo*, propósito que puede ser alcanzado mediante la identificación exacta de las etapas de diferenciación de estas células de acuerdo a la edad embrionaria. Una vez identificadas estas etapas (neurogénesis y gliogénesis) de acuerdo a la edad, se podría proceder a la evaluación de marcadores de senescencia, como la proteína p16, directamente de homogenizados obtenidos del tejido neural en cuestión, de esta manera se podría evidenciar si la senescencia subyace o no a la regulación del potencial de diferenciación de estas células en el embrión durante el desarrollo neural.

REFERENCIAS

1. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006, 441:1068-1074.
2. Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol*. 2008, 25: 57-9.
3. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2009, 114: 185-199.
4. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng*. 2005, 100(1): 12-27.
5. Biehl JK, Russel B. Introduction to stem cell therapy. *J CardiovascNurs*. 2009, 24(2): 98-105.
6. Graf T, Stadtfeld M. Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008, 3(5): 480-483.
7. Taupin P, Gage FH. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *Journal of Neuroscience Research*, 69(6):745-749.
8. Mizuzeki K, Kishi M, Matsumi M, Nakanishi S, Sasai Y. *Xenopus* Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development*. 1998, 125(4): 579-587.
9. Levine AJ, Brivanlou AH. Proposal of a model of mammalian neural induction. *Dev Biol*. 2007, 308(2): 247-256.
10. Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005, 6: 777-788.
11. Nat R, Nilbratt M, Narkilahti S, Winblad B, Hovatta O, Nordberg A. Neurogenic neuroepithelial and radial glial cells generated from six human embryonic stem cell lines in serum-free suspension and adherent cultures. *Glia*. 2007, 55(4): 385-399.
12. Saffary R, Xie, Z. FMRP regulates the transition from radial glial cells to intermediate progenitor cells during neocortical development. *J Neuroscience*. 2011, 26(4): 1427-1439.
13. Migaud M, Batailler M, Segura S, Duittoz A, Franceschini I, Pilon D. Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *European Journal of Neuroscience*. 2010, 32: 2042-2052.

14. Christie K, Emery B, Denham M, Bujalka H, Cate H, Turnley A. Transcriptional regulation and specification of neural stem cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013, 786.
15. Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, Kooy D. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: A primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron*. 2001, 30(1): 65-78.
16. Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature*. 1995, 376(6538):331-333.
17. Stemple DL. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development*. 2005, 132: 2503-2512.
18. Gaiano N, Fishell G. The role of Notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu Rev Neurosci*. 2002, 25:471-490.
19. Hatakeyama J, Kageyama R. Notch1 expression is spatiotemporally correlated with neurogenesis and negatively correlated with neurogenesis and negatively regulated by Notch1-independent Hes genes in the developing nervous system. *Cereb Cortex*. 2006, 16(1): 132-137.
20. Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. The hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development*. 2007, 134: 1243-1251.
21. Sanalkumar R, Indulekha CL, Divya TS, Anto RJ, Vinod B, Vidyanand S, Jagatha B, Venugopal S, James J. ATF2 maintains a subset of neural progenitors through CBF1/Notch independent Hes-1 expression and synergistically activates the expression of Hes-1 Notch-dependent neural progenitors. *J Neurochem*. 2010, 1113(4): 807-818.
22. Mizutani K, Yoon K, Dang L, Tokunaga A, Gaiano N. Differential notch signaling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature*. 2007, 449: 351-355.
23. Gaiano N, Nye JS, Fishell G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*. 2000, 26(2): 395-404.
24. Nakamura Y, Sakakibara S, Miyata T, Ogawa M, Shimazaki T, Weiss S, Kageyama R, Okano H. The bHLH gene hes1 as repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci*. 2000, 20(1): 283- 293.
25. Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Kriegstein AR. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2008, 508(1): 28-44.

26. Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol.* 2006, 18(6): 704-709.
27. Rousso DL, Pearson CA, Gaber ZB, Miguelajauregui A, Li S, Portera-Cailliau C, Morrisey EE, Novitch BG. Foxp-mediated suppression of N-cadherin regulates neuroepithelial character and progenitor maintenance in the CNS. *Neuron.* 2012, 74(2): 314-330.
28. Collignon J, Sockanathan S, Hacker, A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development.* 1996, 122(2): 509-520.
30. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron.* 2003, 39(5): 749-765.
31. Andreu-Agullo C, Maurin T. Ars2, an essential player in neural stem cell identity. *Med Sci.* 2012, 28(5):459-462.
32. Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci.* 2002, 3(7): 517-520.
33. Gotz M, Stoykova A, Gruss P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron.* 1998, 21(5): 1031-1044.
34. Sansom SN, Griffiths DS, Faedo A, Kleinjan DJ, Ruan Y, Smith, J, van Heyningen V, Rubenstein JL, Livesey FJ. The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet.* 2009, 5(6).
35. Rowitch DH, Kriegstein AR. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature.* 2010, 468: 214-222.
36. Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci.* 2005, 25(1): 247-251.
37. Hutton SR, Pevny LH. SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon. *Dev Biol.* 2011, 352(1): 40-47.
38. Arnold SJ, Huang GJ, Cheung AF, Era T, Nishikawa S, Bikoff EK, Molnár Z, Robertson EJ, Groszer M. The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev.* 2008, 22(18): 2479-2484.

39. Hodge RD, Nelson BR, Kahoud RJ, Yang R, Mussar KE, Reiner SL, Hevner RF. Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *J Neurosci*. 2012, 32(18): 6275-6287.
38. Pierfelice T, Alberi L, Gaiano N. Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron*. 2011, 69(5): 840-855.
40. Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells*. 2008, 26(7): 1663-1672.
41. Lo L, Dormand E, Greenwood A, Anderson DJ. Comparison of the generic neuronal differentiation and neuron subtype specification functions of mammalian achaete-scute and atonal homologs in cultured neural progenitor cells. *Development*. 2002, 129(7): 1553-1567.
42. Nieto M, Schuurmans C, Britz O, Guillemot F. Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron*. 2001, 29(2): 401-413.
43. Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X, Fan G, Greenberg ME. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell*. 2001, 104(3): 365-376.
44. He F, Ge W, Martinowich K, Becker-Catania S, Coskun V, Zhu W, Wu H, Castro D, Guillemot F, Fan G, de Vellis J, Sun YE. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis. *Nat Neurosci*. 2005, 8(5): 616-625.
45. MuhChyi C, Juliandi B, Matsuda T, Nakashima K. Epigenetic regulation of neural stem cell fate during corticogenesis. *Int J Dev Neurosci*. 2013, 31(6): 424-433.
46. Li H, Grumet M. BMP and LIF signaling coordinately regulate lineage restriction of radial glia in the developing forebrain. *Glia*. 2007, 55(1): 24-35.
47. Fan G, Martinowich K, Chin MH, He F, Fouse SD, Hutnick L, Hattori D, Ge W, Shen Y, Wu H, ten Hoeve J, Shuai K, Sun YE. DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development*. 2005, 132(15): 3345-3356.
48. Namihira M, Nakashima K, Taga T. Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in a immature astrocyte specific gene promoter. *FEBS Lett*. 2004, 572:184-188.
49. Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T. DNA methylation is a critical-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell*. 2001, 1(6): 749-758.

50. Zhou ZD, Kumari U, Xiao ZC, Tan EK. Notch as a molecular switch in neural stem cells. *IUBMB Life*. 2010, 62(8): 618-623.
51. Kawase-Koga Y, Otaegi G, Sun T. Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system. *Dev Dyn*. 2009, 238(11): 2800-2812.
52. Gilbert SF. *Developmental biology*. Sinauer. 2013, décima edición.
53. Rowitch DH. Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci*. 2004, 5: 409-419.
54. Calegari F, Huttner WB. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci*. 2003, 116(24): 4947-4955.
55. Nagao M, Campbell K, Bruns K, Kuan CY, Trumpp A, Nakafuku M. Coordinated control of self-renewal and differentiation of neural stem cells by Myc and the p19ARF-p53 pathway. *J Cell Biol*. 2008, 183(7): 1243-1257.
56. Tao W, Levine A. P19ARF stabilizes p53 by blocking nucleo- cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci*. 1999, 96: 6937-6941.
57. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature*. 2014,15: 482-496.
58. Byun H, Lee Y, Kim J, Yoon G. From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *BMB Rep*. 2015, Jul 1. pii: 3269.
59. Ravelojaona V, Robert A, Robert L. Expression of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) by human skin fibroblasts, effect of advanced glycation end-products and fucose- or rhamnose-rich polysaccharides. *Arch Gerontol Geriat*. 2009, 48:151–154.
60. Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest* 2004, 51:146–153.
61. Campisi J, d' Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature*. 2007, 8: 729-740.
62. Kuilman T, Michaloglou L, Vredeveld S, Douma R, van Doorn C, Desmet L, Aarden W, Mooi, Peeper D. Oncogene induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008, 133:1019–1031.

63. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology*. 2001, 192(4): 547-556.
64. Kuilman T, Michaloglu C, Vredeveld L, Douma S, van Doorn L, *et al.* Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008, 133:1019–1031.
65. Coppé J, Kauser K, Campisi J, Beausejour C. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*. 2006, 281:29568–29574.
66. Campisi J, Robert L. Cell senescence, role in aging and age related diseases. *Interdiscip Top Gerontol*. 2014, 39: 45-61.
67. Saeed H, Igtedar M. Stem cell function and maintenance- ends that matter: role of telomeres and telomerase. *J Biosci*. 2013, 38(3): 641-649.
68. Harley C, Futcher B, Greider C. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature*. 1990, 345: 458-460.
69. Martens U, Chavez E, Poon S, Schmoor C, Lansdorp P. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res*. 2000, 256: 291-299.
70. Hemann M, Strong M, Hao L, Greider C. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 2001, 107: 67–77.
71. Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol*. 2003, 13: 1549–1556.
72. d’Adda di Fagagna, F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003, 426: 194–198.
73. Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nature*. 2006, 6, 472–476.
74. Sedelnikova O, Horikawa I, Zimonjic D, Popescu N, Bonner W, Barrett J. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nature Cell Biol*. 2004, 6:168–170.
75. Carr S, Munro S, Fedorov O, *et al.* Lysine methylation-dependent binding of 53BP1 to the pRb tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci*. 2014, 111(31): 11341-11346.

76. Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, Brondello J, Dulic V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J.* 2004, 23, 2554–2563 .
77. Levine J, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* 2009, 9:749–758.
78. Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest* 2004, 51:146–153.
79. Ozturk S. Telomerase activity and telomere length in male germ cells. *Biol Reprodu.* 2015, 92(2).
80. Mengual-Gómez DL, Armando RG, Farina HG, Gímez DE. Telomerasa y telómero: Su estructura y dinámica en salud y enfermedad. *Medicina (B Aires).* 2014, 74(1): 69-76.
81. Kong F, Zhen CY, Xu DW. Telomerase as “stemness” enzyme. *Sci China Life Sci.* 2014, 57(6):564-570..
82. Lee J, Jo YS, Sung YH, Hwang IK, Kim H, Kim SY, Yi SS, Choi JS, Sun W, Seong JK, Lee HW. Telomerase deficiency affects normal brain functions in mice. *Neurochem Res.* 2010, 35(2): 211-218.
83. Zhang Y, Ling C, Shiming Y, Dianchun F. E2F1: A potential negative regulator of hTERT transcription in normal cells upon activation of oncogenic c-Myc. *Med Sci Monit.* 2012, 18(1): 12-15.
84. Cooper G, Hausman R. *The Cell: A molecular approach.* ASM Press. 2007, 4ta edición.
85. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *British Journal of Cancer.* 2007, 96: 1020-1024.
86. Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, Ohyashiki K. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene.* 2002, 21: 680-687.
87. Caporaso G, Lim D, Alvarez-Buylla A, Chao M. Telomerase activity in the subventricular zone of adult mice. *Molecular Cell Neuroscience.* 2003, 23:693-702.
88. Liu L, DiGirolamo C, Navarro P, Blasco M, Keefe D. Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research.* 2004, 294:1-8.

89. Kang SK, Putnam L, Dufour J, Ylostalo J, Jung JS, Bunnell BA. Expression of telomerase extends the lifespan and enhances osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells. *Stem Cells*. 2004, 22(7): 1356-1372.
90. Yamaguchi DT. "Ins" and "Outs" of mesenchymal stem cell osteogenesis in regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2014, 6(2): 94-110.
91. Cai J, Wuy T, Pierce J, Lucero M, Albertine K, Spangrude G, Rao M. Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Developmental Biology*. 2002, 251: 221-240.
92. Gutierrez-Ospina G. Estudio de algunos elementos citológicos y moleculares, extrínsecos e intrínsecos, que modulan la diferenciación de las células troncales neurales en el sistema nervioso central de roedores. Comunicación presentada en el "Primer Congreso Nacional de Células Troncales y Medicina Regenerativa", septiembre 2013, D.F., México.
93. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells M, DiGiacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes M. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*. 2013, 155: 1119-1130.
94. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155, 1104-1118.