



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la expresión de *SCL* en la diferenciación neural de células troncales embrionarias de humano

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB. José Luis Rodríguez Llamas

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Félix Recillas Targa
Instituto de Fisiología Celular

Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Noviembre, 2017



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

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Agradezco la orientación y consejos de mi comité tutor en la realización de este proyecto:

Dr. Félix Recillas Targa Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (Papiit-IN213716) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT Ciencia Básica 256092) por la financiación otorgada para la realización de este proyecto.

A CONACYT por el apoyo con una beca de maestría durante la realización de mis estudios (416449), además de una beca mixta (No. de Convocatoria 291062) para la realización de una estancia de investigación en el Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENyO), Granada, España.

Al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) de la UNAM, por el apoyo otorgado para la realización de mi estancia en el centro GENyO.

A la Sociedad Mexicana de Células Troncales y Medicina Regenerativa (SOMICET) por el apoyo proporcionado para la realización de mi estancia en el centro GENyO.

A la Dra. Verónica Ramos Mejía y al Dr. Pedro Real Luna, co-investigadores principales del laboratorio de Regulación Génica, Células Madre y Desarrollo del centro GENyO, por la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio.

Al Dr. Daniel Édgar Cortés Pérez y a la Dra. Itzel Escobedo Ávila del Instituto de Fisiología Celular, por todo el apoyo técnico proporcionado durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosa María Montes Lorenzo del centro GENyO, por todo el apoyo técnico brindado durante mi estancia en el centro.

A la Dra. Raquel Marrero Díaz y a Sara Moreno San Juan de la Unidad de Microscopía del centro GENyO, por todo su apoyo técnico y sus enseñanzas.

A Gustavo Tapia Urzúa por su ayuda y orientación en el uso de CRISPR/Cas9.

Al jurado de mi examen de grado por todos sus comentarios y sugerencias en la elaboración de mi tesis:

Dra. Leonor Pérez Martínez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Mayra Furlan Magaril	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Mónica Lamas Gregori	CINESTAV-Sede Sur
Dr. Alfredo Varela Echavarría	Instituto de Neurobiología, UNAM

Al Dr. Pedro Real Luna del centro GENyO, por la amable donación de las líneas H9 NEO y H9 SCL, además de los plásmidos con las secuencias interferentes *scramble* y de *SCL*.

Al Dr. Félix Recillas Targa del IFC de la UNAM, por la amable donación del plásmido pLentiCRISPR v2.

DEDICATORIAS

A mi madre, María de la Luz, por todo su amor y afecto, por el apoyo incondicional en todas mis decisiones y por ser el sustento de mi familia.

A mi padre, José Luis, por su amor, por aconsejarme e impulsarme a tomar las mejores decisiones de mi vida y por enseñarme el valor de la responsabilidad y la perseverancia.

A mi hermano, Ernesto, por ser mi mejor amigo, por toda la confianza y cariño, por todo el apoyo brindado y por siempre estar presente cuando lo necesito.

A Fabiola, por ser la compañera de mi vida, por compartir sus mejores momentos conmigo, por creer en mí e impulsarme a seguir adelante y sobre todo por todo su amor. Gracias por caminar siempre a mi lado.

Al Dr. Iván, por todo el apoyo académico, orientación y consejos, por su apoyo personal y por toda su ayuda.

A la Dra. Verónica, por el apoyo académico y sus consejos, por todas sus enseñanzas y por hacerme sentir parte de su familia.

A Omar, por ser mi segundo hermano, por estar siempre cuando lo he necesitado, por esa gran amistad.

A Adolfo, por ser mi maestro, por enseñarme todo lo necesario para sacar adelante mi proyecto, por todos sus consejos y en especial por su amistad.

A mis compañeros del laboratorio AI-101, en especial Xóchitl, Rolando y César, por su valiosa amistad, por hacer esta etapa, dentro y fuera del laboratorio, mucho más divertida y agradable.

A mis compañeros del laboratorio 7, en especial a María del Mar, Federico y Joan, por enseñarme que en la amistad no existen nacionalidades, por hacerme sentir como en casa cuando me encontraba lejos de ella.

A mi querido país, que, sin importar la distancia, siempre estaré orgulloso de ser mexicano.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. ABREVIATURAS.....	3
IV. INDICE DE FIGURAS.....	5
V. INTRODUCCIÓN.....	6
5.1 Formación del Tubo Neural y Desarrollo de Neuronas GABAérgicas	6
5.1.1 Primeras Etapas del Desarrollo	6
5.1.2 Formación y Regionalización del Tubo Neural	7
5.1.2.1 Definición del Eje Anterior-Posterior.....	8
5.1.2.2 Definición del Eje Dorsal-Ventral	9
5.1.3 Diferenciación en el Tubo Neural	10
5.1.4 Desarrollo de Neuronas GABAérgicas en el Sistema Nervioso Central	11
5.2 Células Troncales Pluripotenciales	13
5.2.1 Características de las Células Troncales Pluripotenciales	13
5.2.2 Células Troncales Embrionarias (ESC).....	14
5.2.3 Técnicas para Obtener Células Troncales Pluripotenciales	15
5.2.3.1 ESC Obtenidas por Trasplante Nuclear	15
5.2.3.2 Células Troncales por Fusión de Células Somáticas con ESC	15
5.2.3.3 Células Troncales Pluripotenciales Inducidas	16
5.2.3.4 Células Troncales Pluripotenciales Inducidas Químicamente	16
5.2.4 Distintos Estados de Pluripotencia en Células Troncales Embrionarias	17
5.2.5 Aplicaciones de las Células Troncales Pluripotenciales	18
5.3 Factor de Transcripción Stem Cell Leukemia (SCL)	20
5.3.1 Descubrimiento y Características del Gen <i>SCL</i>	20
5.3.2 Características del Factor de Transcripción <i>SCL</i>	22
5.3.3 Actividad Transcripcional de <i>SCL</i>	23
5.3.4 Genes Blanco de <i>SCL</i>	24
5.3.5 Control de la Expresión de <i>SCL</i>	25
5.3.6 Regulación de la Actividad Transcripcional de <i>SCL</i>	26
5.3.7 Función de <i>SCL</i> en el Sistema Hematopoyético y el Endotelio.....	26
5.3.8 Expresión de <i>SCL</i> en el Sistema Nervioso Central.....	28
5.3.9 Función de <i>SCL</i> en el Sistema Nervioso Central.....	29
VI. ANTECEDENTES.....	31
VII. JUSTIFICACIÓN.....	32
VIII. HIPÓTESIS.....	32
IX. OBJETIVO.....	32

9.1	Objetivo General.....	32
9.2	Objetivos Particulares.....	32
X.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
10.1	Cultivo de Células Troncales Mesenquimales de Humano (<i>feeders</i>).....	33
10.2	Cultivo de Células Troncales Embrionarias de Humano.....	33
10.3	Transducción Lentiviral.....	33
10.4	Edición Génica por CRISPR/Cas9.....	34
10.5	Diferenciación de hESC a Neuronas GABAérgicas.....	34
10.6	Inmunocitoquímicas y Cuantificación.....	35
10.7	Purificación de RNA, síntesis de cDNA y PCR Cuantitativo.....	36
10.8	Western Blot.....	36
10.9	Análisis <i>in silico</i>	36
10.10	Análisis Estadístico.....	37
XI.	RESULTADOS.....	38
11.1	Las Líneas H9 NEO y H9 SCL Mantienen Características de Células Troncales Embrionarias.....	38
11.2	Sobreexpresión de <i>SCL</i>	38
11.3	Diferenciación de hESC a Neuronas GABAérgicas.....	40
11.4	Expresión de Marcadores Durante la Diferenciación Neural.....	43
11.5	Efecto de la Sobreexpresión de <i>SCL</i> en la Diferenciación Neural de hESC.....	45
11.6	Análisis de Promotores de Genes Sobreexpresados en Células H9 SCL.....	49
11.7	Generación de líneas con pérdida de función de <i>SCL</i>	52
XII.	DISCUSIÓN.....	56
XIII.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	64
XIV.	BIBLIOGRAFÍA.....	65

I. RESUMEN

Las células troncales embrionarias (ESC) se caracterizan por ser células pluripotenciales, lo cual les confiere, en condiciones apropiadas, la capacidad de diferenciarse hacia cualquier tejido adulto. La manipulación de los niveles de expresión de genes en las ESC, así como su diferenciación a distintos linajes, permiten obtener información sobre el papel que juegan estos genes en la adquisición de diversos fenotipos.

El factor de transcripción Stem Cell Leukemia (*SCL*) ha sido implicado en la diferenciación hematopoyética. *SCL* también se expresa en el Sistema Nervioso Central (SNC). En roedores, *SCL* juega un papel esencial en la diferenciación de interneuronas GABAérgicas en el mesencéfalo y el rombencéfalo, así como de la región ventral de la médula espinal en desarrollo, donde además reprime el desarrollo de motoneuronas. Sin embargo, poco se conoce acerca de su función en el SNC humano.

En este estudio, se utilizó una línea de ESC humana sobreexpresante de *SCL* para explorar su función durante la inducción neuronal, a través de la diferenciación dirigida de células pluripotenciales hacia neuronas GABAérgicas. Se observó que la sobreexpresión de *SCL* acelera la aparición de las neuronas GABAérgicas. Hacia el final del protocolo de diferenciación, las células que sobreexpresan *SCL* generan una mayor cantidad de neuronas GABAérgicas, las cuales parecen presentar una mayor intensidad de tinción en las inmunocitoquímicas para detectar a GABA. Consistente con esto, las células que sobreexpresan *SCL* tienen una mayor expresión del factor de transcripción *GAD1*, detectada a través de RT-qPCR. Finalmente, a través de análisis *in silico*, determinamos que en las regiones promotoras de *NEUROD1* y *GAD1* existen sitios putativos de unión a *SCL*, los cuales además se encuentran conservados en distintos organismos. Estas observaciones señalan que *SCL* potencia la diferenciación hacia neuronas GABAérgicas de células troncales pluripotenciales humanas.

Palabras clave: Células Troncales Embrionarias Humanas, *SCL*, Neuronas GABAérgicas.

II. ABSTRACT

Human embryonic stem cells (hESC) are pluripotent cells. This property allows them, in proper conditions, to differentiate into any adult tissue. Manipulating the expression levels of genes on hESC, as well as its differentiation to distinct lineages, allows obtain information about of role of this genes in the acquisition of different phenotypes.

The transcription factor Stem Cell Leukemia (*SCL*) has been implicated in hematopoietic differentiation. This transcription factor is also expressed in the Central Nervous System (CNS). In rodents, it plays an essential role in the GABAergic interneuron differentiation in the midbrain and the hindbrain, as well as in the ventral region of the developing spinal cord, where it also represses the motoneuron development. Nevertheless, little is known about its function in the human CNS.

In this study, using a *SCL*-overexpressing human ESC line, we explored the role of *SCL* in neuronal induction via the directed differentiation of pluripotent cells to GABAergic neurons. *SCL* overexpression accelerates the emergence of GABAergic neurons. At the end of the differentiation protocol, *SCL* overexpressing cells generate more GABAergic neurons, as shown by GABA immunostaining. In agreement with this, *SCL*-overexpressing cells have higher expression of *GAD1* detected by RT-qPCR. Finally, through *in silico* analysis, we found putative binding sites for *SCL* in the promoter regions of *NEUROD1* and *GAD1*, which are conserved in different organisms. Altogether, these results indicate that *SCL* potentiates GABAergic neuron differentiation of human pluripotent stem cells.

Key Words: Human Embryonic Stem Cells, *SCL*, GABAergic Neurons.

III. ABREVIATURAS

AP	Anterior-Posterior
bFGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (del inglés)
bHLH	Motivo hélice-bucle-hélice (del inglés)
BMP	Proteínas Morfogénicas de Hueso (del inglés)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario (del inglés)
ChIP-Seq	Inmunoprecipitación de la Cromatina-Secuenciación (del inglés)
CiPSC inglés)	Células Troncales Pluripotenciales inducidas Químicamente (del
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (del inglés)
DV	Dorso-Ventral
EBs	Cuerpos Embrionarios (del inglés)
ECC	Células de Carcinoma Embrionario (del inglés)
EGC	Eminencia Ganglionar Caudal
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico (del inglés)
EGFP	Proteína Verde Fluorescente Potenciada (del inglés)
EGL	Eminencia Ganglionar Lateral
EGL	Eminencia Ganglionar Medial
ESC	Células Troncales Embrionarias (del inglés)
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos (del inglés)
GABA	Ácido γ -aminobutírico (del inglés)
GAD1/GAD67	Ácido Glutámico Descarboxilasa1/67 (del inglés)
GDF11	Factor de Crecimiento y Diferenciación 11 (del inglés)
gRNA	Guía de Ácido Ribonucleico (del inglés)
HD	Motivo Homeodominio
hESC	Células Troncales Embrionarias de humano (del inglés)
hMSC	Células Troncales Mesenquimales humanas (del inglés)
Hox	Genes Homeobox
HSC	Células Troncales Hematopoyéticas (del inglés)
ICM	Masa Celular Interna (del inglés)
iPSC	Células Troncales Pluripotenciales inducidas (del inglés)
MAP2	Proteína Asociada a Microtúbulos 2 (del inglés)

mESC	Células Troncales Embrionarias de ratón (del inglés)
miRNA	micro Ácido Ribonucleico (del inglés)
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero (del inglés)
Ngn1/2	Neurogenina1/2
OCT4	Factor de Transcripción de Unión a Octámeros 4 (del inglés)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés)
PSC	Células Troncales Pluripotenciales (del inglés)
qRT-PCR Cuantitativa (del inglés)	Cadena en Reacción de la Polimerasa-Retrotranscripción
RA	Ácido Retinoico (del inglés)
SCL	Stem Cell Leukemia (del inglés)
SCNT	Transferencia Nuclear de Célula Somática (del inglés)
SEM	Error Estándar de la Media (del inglés)
SHH	Sonic Hedgehog
SNC	Sistema Nervioso Central
SSEA	Antígenos Embrionarios Específicos de Etapa (del inglés)
TAL1	T-cell Acute Lymphocytic leukemia
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante β
TSS	Sitio de Inicio de la Transcripción
Vgat	Transportador Vesicular de GABA (del inglés)
WT	Silvestre (del inglés)
ZI	Zona Intermedia
ZM	Zona Marginal
ZSV	Zona Subventricular
ZV	Zona Ventricular

IV. INDICE DE FIGURAS

<i>Figura I. Primeras etapas en el desarrollo de mamíferos.</i>	6
<i>Figura II. Formación del tubo neural.</i>	7
<i>Figura III. Establecimiento del eje Dorsal-Ventral del tubo neural.</i>	9
<i>Figura IV. Dominios GABAérgicos en el SNC en desarrollo y sus patrones de expresión génica.</i>	12
<i>Figura V. Vías para la inducción de la pluripotencia.</i>	17
<i>Figura VI. Principales aplicaciones de las células troncales pluripotenciales.</i>	19
<i>Figura VII. Organización estructural del locus de SCL.</i>	211
<i>Figura VIII. Actividad transcripcional de SCL.</i>	217
<i>Figura IX. Papel de SCL en el desarrollo del sistema vascular.</i>	28
<i>Figura X. Papel de SCL en el desarrollo de interneuronas GABAérgicas y precursores astrocíticos en la región p2 de la médula espinal.</i>	30
<i>Figura 1. Mantenimiento de las características pluripotenciales en las líneas de trabajo.</i>	39
<i>Figura 2. Evaluación de la sobreexpresión de SCL en las células H9 SCL.</i>	400
<i>Figura 3. Diferenciación de hESC a neuronas GABAérgicas.</i>	41
<i>Figura 4. Obtención de precursores neurales.</i>	42
<i>Figura 5. Diferenciación y caracterización neuronal.</i>	43
<i>Figura 6. Análisis por qRT-PCR de los niveles de expresión génica durante la diferenciación neural.</i>	45
<i>Figura 7. La sobreexpresión de SCL genera una mayor cantidad de neuronas GABAérgicas.</i>	47
<i>Figura 8. Comparación de niveles de expresión génica en células H9 SCL y H9 WT.</i>	48
<i>Figura 9. Secuencias de reconocimiento de complejos transcripcionales conteniendo SCL.</i>	50
<i>Figura 10. Sitios putativos de unión de complejos transcripcionales conteniendo SCL en los promotores de los genes estudiados.</i>	51
<i>Figura 11. Alineamiento de regiones promotoras de los genes humanos y sus secuencias homólogas en distintas especies.</i>	54
<i>Figura 12. Generación de hESC con knockdown de SCL.</i>	54
<i>Figura 13. Mapa de localización de las secuencias de los RNA guías utilizados.</i>	55

V. INTRODUCCIÓN

5.1 Formación del Tubo Neural y Desarrollo de Neuronas GABAérgicas

5.1.1 Primeras Etapas del Desarrollo

La gran diversidad celular presente en un organismo adulto se origina a partir de una única célula totipotencial, el cigoto, producto de la fecundación del óvulo por el espermatozoide. A partir de esta célula, tienen lugar una serie de eventos que inician el desarrollo temprano del embrión. Inicialmente ocurre la segmentación, proceso mediante el cual el cigoto se divide progresivamente formando un grupo de células pequeñas llamadas blastómeras. Éstas se organizan formando el blastocisto, que contiene un grupo de células internas, la masa celular interna (ICM, *Inner Cell Mass*), rodeada por un grupo de células externas, cuyos descendientes formarán el trofoblasto, mientras que la ICM formará todos los tejidos que conformarán al embrión (Surani & Barton, 1984). Un segundo proceso, la gastrulación, somete a las blastómeras a movimientos y cambios que van a definir sus posiciones dentro del embrión. Como resultado de esta organización, se forman las tres capas germinales: el endodermo, el mesodermo y el ectodermo, este último siendo la capa que dará origen al tubo neural, estructura que posteriormente dará origen al sistema nervioso central (SNC) (Lawson et al., 1991). En la Figura I se muestra un esquema de los eventos tempranos que ocurren tras la fertilización.

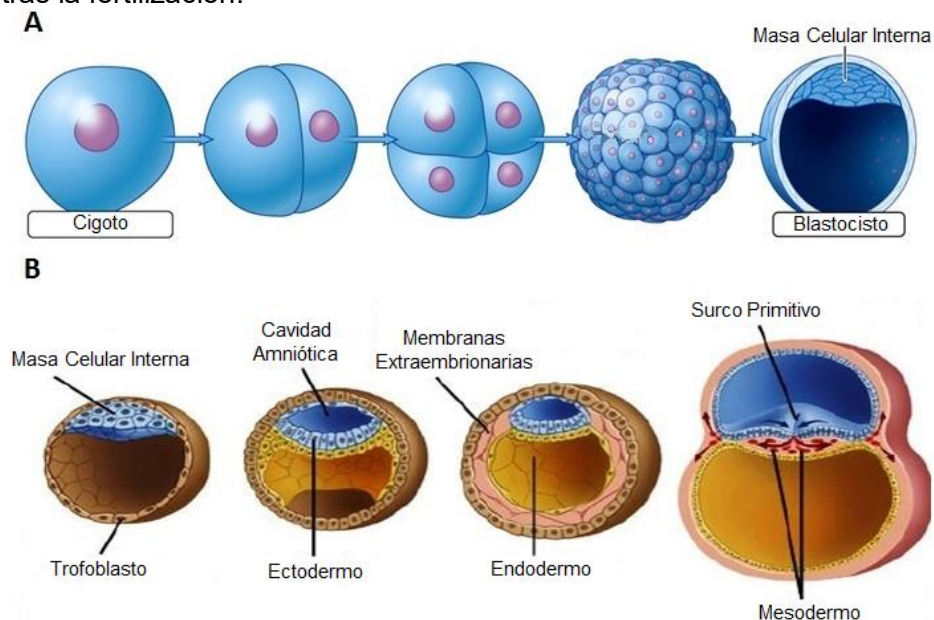


Figura I. Primeras etapas en el desarrollo de mamíferos. A. Representación de la división del cigoto, mostrando las blastómeras y la formación del blastocisto. **B.** Representación de la gastrulación. Las células de la ICM comienzan a migrar. Las células

que ingresan hacia la zona hueca del blastocisto forman el endodermo, las que no lo hacen forman el ectodermo, y entre estas capas se forma el mesodermo. El surco primitivo dirige la migración hacia el extremo anterior del embrión. Modificada de <http://unbc.biol312.ca/>, University of Northern British Columbia.

5.1.2 Formación y Regionalización del Tubo Neural

Una vez que se establecen las tres capas germinales, en el ectodermo de la región dorsal del embrión comienza la neurulación, en la cual se forma el tubo neural. El ectodermo recibe señales del mesodermo dorsal subyacente para formar la placa neural. Posteriormente, la placa neural se pliega dorsalmente y los pliegues neurales migran entonces hacia la línea media del embrión, que al fusionarse forman el tubo neural (Karfunkel, 1974). En la Figura II se muestra un esquema con los eventos antes mencionados.

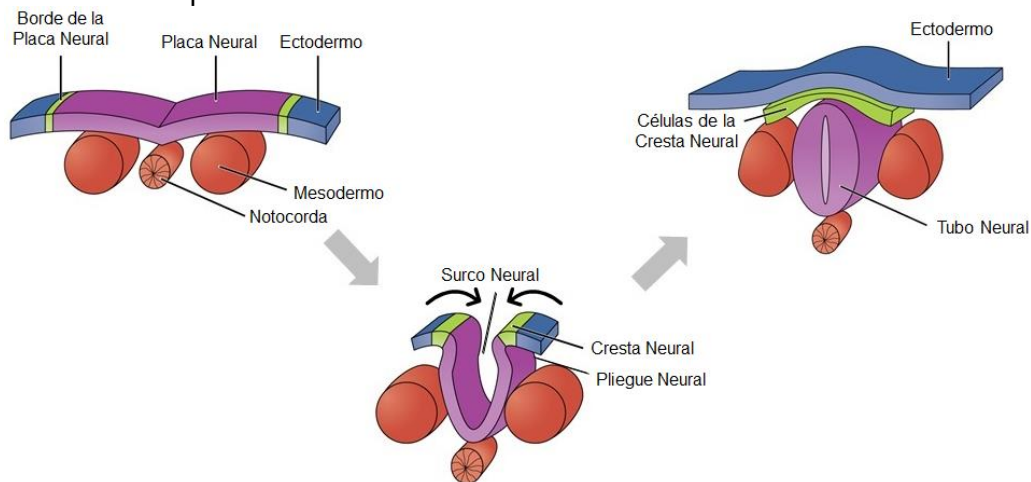


Figura II. Formación del tubo neural. La neurulación comienza cuando se forma la placa neural. Los pliegues neurales se extienden dorsalmente y forman el surco neural. Los pliegues finalmente se fusionan para formar el tubo neural. La región más dorsal del ectodermo neural da lugar a las células de la cresta neural. Modificada de <https://cnx.org/>, RICE University.

El correcto funcionamiento del SNC requiere de una amplia variedad de subtipos neuronales especializados, los cuales además deben ubicarse en posiciones específicas dentro de éste. Para lograr tal ubicación espacial, el tubo neural es sometido a una regionalización específica que se logra a través de la exposición a diferentes moléculas. Tales moléculas son sintetizadas y liberadas por diversas células que se agrupan para formar centros organizadores que gobiernan la diferenciación a lo largo de los ejes anterior-posterior (AP) y dorsal-ventral (DV). Estas moléculas, conocidas como morfógenos, forman gradientes de concentración que permiten que una célula en particular active una batería

única de factores transcripcionales, lo cual resulta en un fenotipo característico de acuerdo con su posición espacial en el tubo neural (Diez et al., 2003; Ribes & Briscoe, 2009).

5.1.2.1 Definición del Eje Anterior-Posterior

La parte anterior del tubo neural se subdivide rápidamente en las vesículas encefálicas primarias, que en posición AP son el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo, mientras que la región más posterior del tubo neural forma la médula espinal (Fernández et al., 2002). Posteriormente, el prosencéfalo se divide en el telencéfalo y el diencefalo, mientras que el rombencéfalo se divide en el metencéfalo y el mielencéfalo. Además, estas dos vesículas primarias se subdividen en unidades conocidas como neurómeras, que constituyen la unidad más pequeña a lo largo del eje AP del tubo neural (García-López et al., 2009). Estos dominios están definidos por la expresión de distintos genes codificantes de factores transcripcionales con el dominio funcional homeodominio (HD). Por ejemplo, el prosencéfalo y el mesencéfalo expresan *Otx2*, mientras que en el rombencéfalo se expresa *Gbx2*, ambos genes implicados en el establecimiento del patrón. En el lugar donde se establece el límite por estos genes surge un centro organizador, el istmo, que secreta los morfógenos FGF8 y WNT1, que son esenciales para el desarrollo adecuado del mesencéfalo y el rombencéfalo (Nakamura & Watanabe, 2005). Por su parte, el límite entre el diencefalo y el mesencéfalo se encuentra definido por la interacción represiva entre *Pax6* y *En1/Pax2*. *Pax6* es expresado en el prosencéfalo, mientras que *En1* y *Pax2* son expresados en el mesencéfalo y en el metencéfalo, la parte más anterior del rombencéfalo (Araki & Nakamura 1999; Matsunaga et al., 2000).

Por otro lado, tres gradientes de morfógenos gobiernan el establecimiento del patrón AP de la médula espinal, los cuales son el ácido retinoico (RA), producido por las somitas en el mesodermo paraxial, así como los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento y diferenciación 11 (Gdf11), ambos secretados desde el nodo primitivo y el mesodermo presomítico (Liu et al., 2001). La concentración de cada una de estas moléculas percibida por las células de la médula espinal activa la expresión de combinaciones de factores de transcripción homeobox (*Hox*), que son los responsables directos de la segmentación AP de la médula espinal. De esta manera, los genes *Hox4-Hox8* se expresan en los niveles cervical y braquial, *Hox8* y *Hox9* en niveles torácicos, mientras que los genes *Hox10-Hox13* se expresan en niveles lumbares (Dasen & Jessell, 2009).

5.1.2.2 Definición del Eje Dorsal-Ventral

Al igual que el eje AP, el eje DV se establece gracias a gradientes de morfógenos liberados a partir de centros organizadores, los cuales se ubican en las regiones dorsal y ventral. Los principales morfógenos implicados en el patrón de este eje son Sonic hedgehog (Shh), secretado por la notocorda y por la placa de piso, así como las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP, *Bone Morphogenic Proteins*), secretadas por el ectodermo dorsal y por la placa de techo (Jessell 2000; Liu & Niswander, 2005). El gradiente establecido a lo largo del eje DV por estas moléculas genera la división de la médula espinal en 5 dominios ventrales (p0-p2, pMN y p3), así como 7 dominios dorsales (pd1-pd4, pdIL, pd5 y pd6). Tales eventos se muestran en la Figura III. Estos dominios expresan una combinación característica de factores de transcripción HD, tales como los genes *Pax* y *Nkx*. Esta batería de factores de transcripción activa los genes corriente abajo en el proceso de diferenciación, lo que permite el surgimiento de motoneuronas y de una gran variedad de interneuronas a lo largo del eje DV de la médula espinal (Shirasaki & Pfaff, 2002; Lewis 2006).

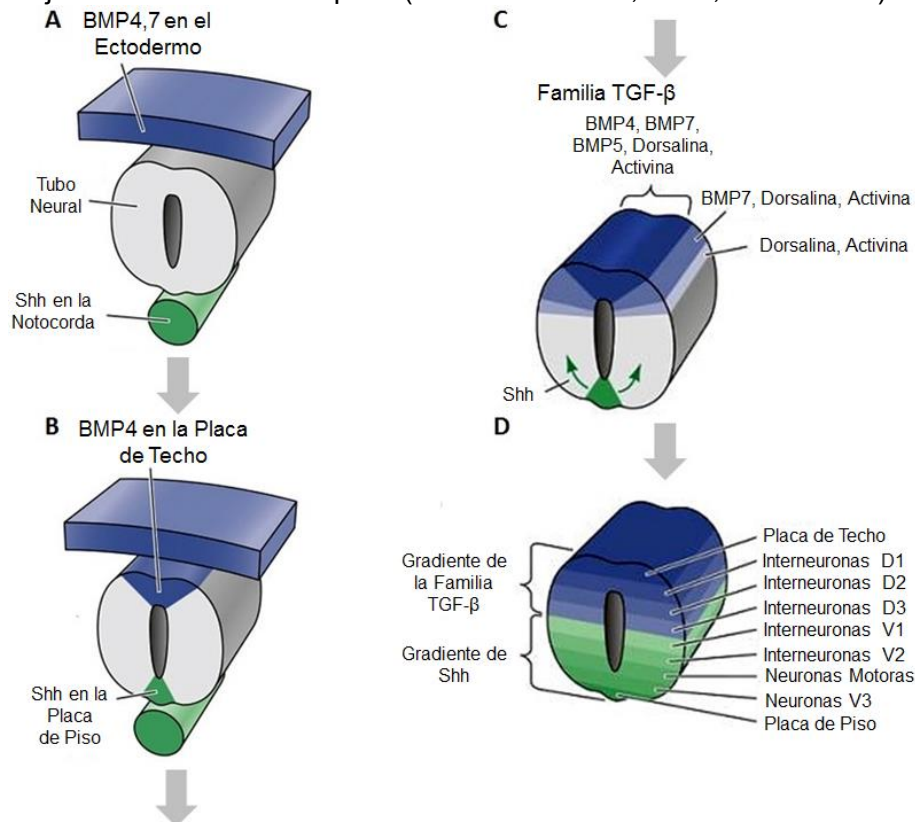


Figura III. Establecimiento del eje Dorsal-Ventral del tubo neural. A. El tubo neural recién formado es sometido a dos gradientes, el de Shh liberado por la notocorda en el extremo ventral, y el de las BMP liberadas por el ectodermo en el extremo dorsal. **B.** Ambos gradientes generan el establecimiento de centros señalizadores secundarios. La placa de

piso libera Shh, mientras que la placa de techo libera BMP4. **C.** Shh difunde hacia el extremo dorsal, mientras que las BMP, y otros miembros de la familia de TGF- β , difunden hacia el extremo ventral. **D.** La cantidad y tipos de moléculas presentes activan distintos factores de transcripción en las células, dependiendo de su posición en el tubo neural. En este caso, las neuronas de la médula espinal adquieren su fenotipo terminal de acuerdo con la exposición a estos gradientes. Modificada de Gilbert, 2010.

Como en el caso del eje DV de la médula espinal, Shh y las BMP son las moléculas encargadas de establecer el eje DV en el mesencéfalo. Al igual que en la médula espinal, Shh es secretado por la placa de piso, induciendo la expresión de los factores de transcripción *HNF3*, *ptc*, *Isl-1* y *Lim1/2* en la placa basal, todos ellos marcadores del extremo ventral (Watanabe & Nakamura, 2000). Por su parte, las BMP son expresadas por la placa de techo. En el extremo dorsal, éstas inducen la expresión de los factores de transcripción *Pax3*, *Pax7* y *Meis2*, delimitando la región de la placa alar (Bobak et al., 2009).

5.1.3 Diferenciación en el Tubo Neural

Transversalmente, el tubo neural está conformado por diversas capas que forman zonas funcional y molecularmente distintas, donde la diferenciación de los progenitores neurales ocurre de manera gradual. Las células en la zona más interna, aquellas en contacto con el lumen del tubo neural, constituyen el neuroepitelio. Éstas son células multipotentes que dan lugar a todas las neuronas y células gliales del SNC, es decir, los progenitores neurales. La región integrada por estas células es llamada zona ventricular (ZV) (Sauer 1935). La siguiente capa hacia el exterior del tubo neural es la zona subventricular (ZSV), la cual contiene también progenitores neurales. La ZSV se expande rápidamente una vez que las células proliferativas en la ZV declinan en número durante la embriogénesis (Bayer & Altman, 1991). Estas células proliferativas expresan genes proneurales, algunos de los cuales fomentan la proliferación, mientras que otros generan la salida del ciclo celular. Así, la decisión de permanecer o salir del ciclo depende de un balance entre los diversos genes proneurales. Una vez que los progenitores han salido del ciclo celular, comienzan a diferenciarse, además de migrar hacia las capas más externas. Localizada superiormente a la ZSV se encuentra la zona intermedia, o zona del manto (ZI), una región poblada por precursores neurales que han salido del ciclo celular, y que progresivamente adquieren su fenotipo terminal en esta región. Estos precursores activan la expresión de los genes selectores terminales, los cuales son factores de transcripción que tienen la capacidad de mantener su propia transcripción durante la diferenciación, reteniendo su actividad en las

neuronas maduras. La expresión de estos genes induce la adquisición de un fenotipo neuronal específico mediante la activación de genes de diferenciación terminal, tales como genes codificantes de enzimas implicadas en la síntesis de neurotransmisores, receptores y factores de transcripción, entre otras proteínas esenciales para el mantenimiento del fenotipo neuronal y que, por tanto, deben expresarse continuamente una vez que la neurona ha alcanzado su maduración. Una vez que las neuronas han madurado en la ZI, éstas hacen conexiones en este lugar, proyectando además axones fuera del tubo neural, creando una zona con baja densidad celular denominada zona marginal (ZM) (Gilbert, 2010).

5.1.4 Desarrollo de Neuronas GABAérgicas en el Sistema Nervioso

Central

Una vez que se han establecido los ejes a lo largo del tubo neural, diversos dominios adquieren la competencia para producir distintos tipos de neuronas. Las neuronas GABAérgicas son la principal fuente de señales inhibitorias en el SNC, por lo que a diferencia de otras poblaciones neuronales que están más restringidas en su distribución, tales como las neuronas dopaminérgicas o las motoras, las neuronas GABAérgicas muestran una amplia distribución, encontrándose prácticamente en todo el SNC, por lo que una gran cantidad de dominios son capaces de producirlas. Como en el caso de los dominios en los ejes AP y DV, los dominios capaces de producir neuronas GABAérgicas están definidos molecularmente por la expresión selectiva de factores transcripcionales HD (Achim et al., 2014). Si bien todas las neuronas GABAérgicas poseen como característica principal la expresión del neurotransmisor GABA, es posible definir subpoblaciones funcionalmente distintas, caracterizadas por la expresión de distintas proteínas, tales como las proteínas de unión a calcio parvalbúmina, calbindina o calretinina (Gonchar & Burkhalter, 1997). Esta diversificación funcional tiene lugar debido a la activación específica de ciertos genes proneurales en distintas regiones, que a su vez activan genes selectores terminales únicos, lo que permite generar una gran variedad de subtipos neuronales. En particular, en la región del telencéfalo, hay cuatro dominios que originan neuronas GABAérgicas: las eminencias ganglionares lateral, medial y caudal, así como el área preóptica. En estos dominios GABAérgicos se observa la expresión de los factores de transcripción HD *Gsx1/2*, *Nkx2-1/5-1/6-2* y *Dbx2*. Todos ellos inducen la expresión del gen proneural *Ascl1*, que activa la expresión de los genes selectores terminales *Dlx1* y *Dlx2* (Achim et al., 2014; Castro et al., 2011). Por su parte, en el diencefalo y en el mesencefalo,

además de la función de *Ascl1*, el gen proneural *Helt* desempeña un papel esencial en la producción adecuada de las neuronas GABAérgicas de esta región (Guimera et al., 2006, Peltopuro et al., 2010). Finalmente, en las regiones del rombencéfalo y de la médula espinal existen muchas subpoblaciones de neuronas GABAérgicas. En estas regiones, los genes proneurales fundamentales para la producción de las neuronas GABAérgicas son *Ascl1*, *Ngn1* y *Ngn2* (Henke et al., 2009; Mizuguchi et al., 2006). Como se mencionó previamente, a lo largo del eje DV de la médula espinal existen 12 subdominios molecularmente distintos. En la región ventral, los dominios vP0, vP1 y vP2 dan lugar a neuronas GABAérgicas molecularmente distintas, caracterizadas por la expresión de genes de diferenciación terminal diferentes, como el caso de las interneuronas V2b, que expresan *Gata2*, *Gata3* y *Scf*, o las interneuronas vP1, que expresan *En1* (Matise & Joyner, 1997; Smith et al., 2002). Por otra parte, en la región dorsal los dominios dP4 y dP6 generan neuronas GABAérgicas que expresan *Lbx1* y *Pax6* (Gross et al., 2002). Un esquema resumiendo estos eventos se presenta en la Figura IV.

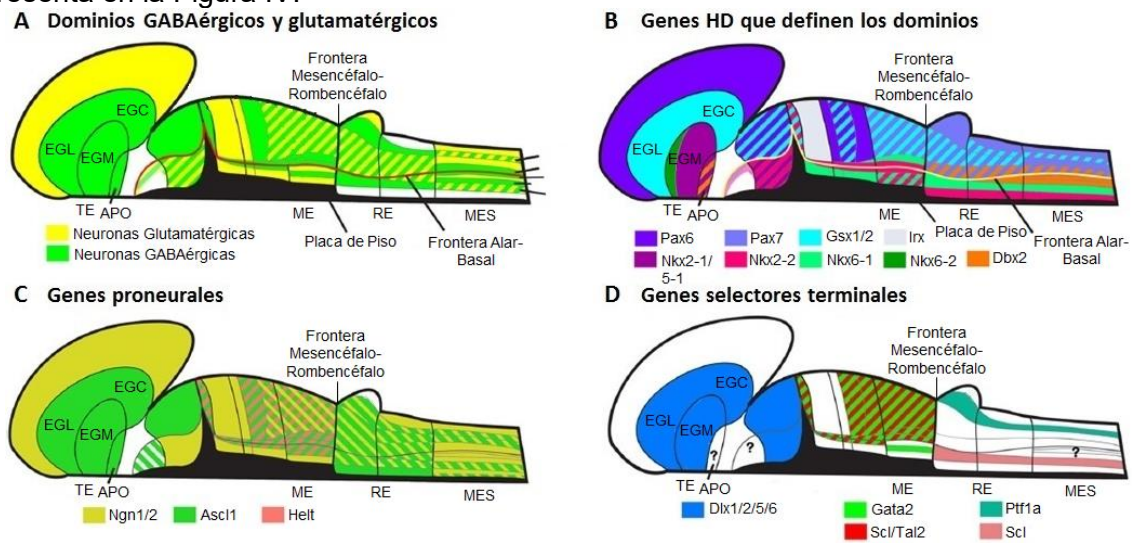


Figura IV. Dominios GABAérgicos en el SNC en desarrollo y sus patrones de expresión génica. **A.** Dominios productores de neuronas GABAérgicas. Se muestran también los dominios productores de neuronas glutamatérgicas. **B.** Expresión de factores de transcripción HD en progenitores proliferantes que definen estos dominios. **C.** Expresión de genes proneurales, los cuales controlan una variedad de aspectos de la neurogénesis, entre ellos la adquisición de un linaje en particular. **D.** Lugar de expresión de diversos genes selectores terminales, los cuales favorecen la diferenciación de los precursores postmitóticos. En algunos dominios no ha sido caracterizado ningún gen selector (signos de interrogación). Modificada de Achim et al., 2014. APO, Área Preóptica; ME, Mesencéfalo; MES, Médula Espinal, RE, Rombencéfalo; TE, Telencéfalo.

Es así como una combinación orquestada y jerárquica de factores transcripcionales lleva a la diferenciación de los progenitores neurales a diversos subtipos de neuronas GABAérgicas funcionalmente distintos. Así, los dominios del tubo neural que generarán a estas neuronas se establecen por la expresión de los genes HD, que a su vez activan a los genes proneurales, que favorecen la diferenciación neuronal, restringiendo además esta diferenciación hacia el linaje GABAérgico. Estos últimos a su vez activan a los genes selectores terminales, una batería molecular única que finalmente genera las diversas subpoblaciones neuronales. A pesar de estas diferencias moleculares y funcionales, todas las neuronas GABAérgicas sintetizan GABA para llevar a cabo su actividad, es decir, transmitir señales inhibitorias. Por tanto, todos los genes selectores terminales activan la expresión de los genes de diferenciación terminal específicos de las neuronas GABAérgicas (Achim et al., 2014). Tal es el caso de los factores transcripcionales *Lhx1* y *Lhx5*, cuya expresión es necesaria para el mantenimiento de la identidad GABAérgica en la región dorsal de la médula espinal, ya que la pérdida de función de estos genes genera una disminución en la expresión de *Gad1* y *Vgat* (Pillai et al., 2007). Finalmente, tanto *Gad1*, que codifica para la isoforma de 67 kDa de la glutamato descarboxilasa (GAD67), la enzima que sintetiza GABA a través de la descarboxilación de glutamato, como *Vgat*, que codifica para el transportador vesicular de GABA, son los genes clave en la función de las neuronas GABAérgicas. Ambos genes deben ser continuamente expresados para sintetizar GABA y empaquetarlo en las vesículas sinápticas, logrando de esta manera que las neuronas transmitan las señales inhibitorias (Bu & Tobin, 1994; McIntire et al., 1997).

5.2 Células Troncales Pluripotenciales

5.2.1 Características de las Células Troncales Pluripotenciales

Las células pluripotenciales representan un modelo ideal para el estudio de los eventos tempranos del desarrollo que, de otra manera, serían difíciles de estudiar *in vivo*. Este tipo de células y el potencial de su aplicación se conocen desde hace más de 40 años. Las células troncales pluripotenciales son células indiferenciadas, y sus dos características distintivas son la autorrenovación ilimitada, es decir, la capacidad para generar una célula hija idéntica a sí misma al dividirse, así como la potencialidad de generar todos los tipos celulares presentes en un organismo (Thomson et al., 1995). Las células pluripotenciales forman colonias compactas y bien delimitadas, con células pequeñas esféricas, con una relación núcleo/citoplasma elevada, así como un nucléolo prominente, la expresión de factores transcripcionales y marcadores de superficie característicos. Otra característica

esencial de estas células es su capacidad de formar teratomas al ser inyectadas en un ratón inmunocomprometido, además de poder contribuir a derivados de las tres capas germinales y a la línea germinal durante la formación de quimeras, ensayos *in vivo* que no involucran células humanas (Takahashi & Yamanaka, 2015).

5.2.2 Células Troncales Embrionarias (ESC)

Las primeras células troncales pluripotenciales aisladas fueron las células de carcinoma embrionario (ECC, *Embryonal Carcinoma Cells*), derivadas de teratocarcinomas desarrollados congénitamente en los testículos de ciertas cepas de ratón que contienen células embrionarias indiferenciadas. Sin embargo, este tipo de células troncales no poseen un cariotipo normal (Stevens, 1964). Posteriormente fue posible aislar y mantener en cultivo células troncales pluripotenciales con cariotipo normal a partir del cultivo de la ICM, derivada de blastocistos obtenidos de ratones. Fue entonces cuando surgió el término célula troncal embrionaria (ESC, *Embryonic Stem Cell*), para distinguir a estas células troncales obtenidas del embrión de las previamente conocidas ECC (Martin, 1981). Este logro notable sentó las bases para el mantenimiento a largo plazo *in vitro* de líneas de ESC, así como la posibilidad de obtener este tipo de células de otras especies de mamíferos. Sin embargo, cuestiones inherentes a la disponibilidad de embriones en primates no humanos, retrasaron el avance en este sentido, y no fue sino hasta 15 años después que se logró la obtención de ESC a partir del mono Rhesus (*Macaca mulatta*) (Thomson et al., 1995), lo que marcó la pauta para posteriormente lograr el aislamiento de ESC a partir de blastocistos humanos obtenidos de procesos de fertilización *in vitro* (Thomson et al., 1998). Una vez aisladas a partir de distintas especies, se identificaron algunas características propias de las ESC: i) derivación a partir de embriones en estado de pre o periimplantación, ii) alta capacidad de proliferación en estado indiferenciado, iii) potencial de diferenciación estable para formar derivados de las tres capas germinales, y iv) expresión de altos niveles de actividad de telomerasa (Thomson et al., 1998; Wright, 1996). Sin embargo, también se hizo evidente que existían diferencias entre las ESC de las distintas especies. En particular, se reconocieron moléculas de superficie distintivas en estas células, que, en el caso de las derivadas de ratón, expresan marcadamente SSEA-1 (*Stage-Specific Embryonic Antigen 1*), mientras no expresan SSEA-3 o SSEA-4. Por otra parte, las ESC derivadas de primates no expresan SSEA-1 (que por el contrario se expresa fuertemente en células diferenciadas), y expresan de manera importante SSEA-3 y SSEA-4, además de expresar los marcadores TRA-1-60, TRA-1-81 y fosfatasa alcalina (Kannagi et al., 1983; Solter & Knowles, 1978;

Thomson et al., 1995). El advenimiento de técnicas que permitieron el mantenimiento en cultivo de ESC humanas, así como el logro casi paralelo de realizar con éxito la diferenciación de ESC de ratón a tejidos particulares (células hematopoyéticas, neuronas y músculo cardíaco), abrió la posibilidad de su aplicación en la terapia celular (Klug et al., 1996; Thomson et al., 1998; Wiles & Keller, 1991).

5.2.3 Técnicas para Obtener Células Troncales Pluripotenciales

Aunque el uso de ESC y sus aplicaciones eran muy prometedoras, un impedimento para su investigación era el que se obtenían muy pocas células derivadas de la ICM, así como las controversias éticas que generaba la interrupción del desarrollo de los embriones humanos. Por estas razones, se buscaron alternativas para la producción artificial de células que tuvieran características similares a las ESC. Actualmente existe una variedad de técnicas para la obtención de estas células troncales pluripotenciales (PSC, *Pluripotent Stem Cells*).

5.2.3.1 ESC Obtenidas por Trasplante Nuclear

Una alternativa desarrollada tempranamente fue realizar la transferencia de un núcleo donador, a partir de células de un blastocisto partenogénico, a un ovocito fecundado o no, al que previamente se le había extraído el material nuclear (Hoppe & Illmensee, 1982). Posteriormente, se desarrolló la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, *Somatic Cell Nuclear Transfer*), en la que el núcleo donador provenía de una célula adulta diferenciada, y una vez transferido a un ovocito enucleado, se obtenía un blastocisto que era posteriormente implantado en una hembra receptora, logrando con éxito la producción de descendencia (Kato et al., 1998; Wakayama et al., 1998; Wilmut et al., 1997). El proceso de SCNT, seguido del aislamiento de ESC de los embriones clonados, se ha realizado con éxito en primates no humanos así como en humanos (Byrne et al., 2007; Hall et al., 2006; Mitalipov et al., 2002; Tachibana et al., 2013). Este enfoque es promisorio, pues implica que a partir de una célula diferenciada se pueden obtener PSC histocompatibles con el donador, con el potencial de desarrollo hacia cualquier linaje para utilizar en terapia celular.

5.2.3.2 Células Troncales por Fusión de Células Somáticas con ESC

Un tercer tipo de células troncales pluripotenciales son las células obtenidas por fusión de una célula somática con una ESC. Este procedimiento fue llevado a cabo fusionando timocitos o neuroesferas de ratón con ESC, llevando a la formación de células con un

cariotipo tetraploide (Do & Schöler, 2004; Tada et al., 2001). De esta manera, el núcleo de la célula somática sufre una reprogramación, lo que le permite adquirir características similares al núcleo de una ESC, entre ellas, la expresión de *Oct4*, marcador de pluripotencia por excelencia, la reactivación del cromosoma X inactivado, así como el potencial de desarrollo para formar derivados de las tres capas germinales. Además, este procedimiento también fue utilizado con éxito para reprogramar fibroblastos humanos (Cowan, 2005). Sin embargo, este proceso no era completo, ya que tras la reprogramación el núcleo de la célula somática no presentaba marcas epigenéticas características de las células pluripotenciales (Deb-Rinker et al., 2005; Tada et al., 2001).

5.2.3.3 Células Troncales Pluripotenciales Inducidas

Un tipo más reciente de PSC son las células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC, *induced Pluripotent Stem Cells*), las cuales se obtienen tras inducir a una célula diferenciada a adquirir un estado pluripotencial, proceso conocido como reprogramación. Ello se logra con la introducción de sólo 4 factores de transcripción, los cuales son *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Klf4*. Dicha reprogramación fue realizada en primer lugar en fibroblastos murinos (Takahashi & Yamanaka, 2006) y posteriormente en fibroblastos humanos (Takahashi et al., 2007). Una dificultad inherente al proceso de obtención de estas células es el posible potencial tumorigénico debido a la expresión constitutiva de los factores de transcripción, ya que éstos eran entregados a la célula con vectores retrovirales. Sin embargo, modificaciones epigenéticas pueden disminuir la expresión del transgen retroviral en las PSC, además de poder suprimirla tras la diferenciación (Yao, 2004). Posteriormente se han desarrollado una gran variedad de métodos para producir iPSC sin la inclusión de los vectores integrativos en el genoma, lo que podría solucionar la problemática del potencial tumorigénico (Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009; Yu et al., 2009).

5.2.3.4 Células Troncales Pluripotenciales Inducidas

Químicamente

Un quinto tipo de células pluripotenciales son las células troncales pluripotenciales inducidas químicamente (CiPSC, *Chemically induced Pluripotent Stem Cells*), las cuales se producen a partir de células somáticas de ratón sin la introducción de vectores virales (Hou et al., 2013). Dicha reprogramación fue posible mediante el tratamiento de las células somáticas con la combinación de cuatro moléculas pequeñas, las cuales fueron: CHIR, un inhibidor de la cinasa de glucógeno sintasa 3; FSK, un agonista de cAMP; 616452, un inhibidor del factor de crecimiento transformante β ; y DZNep, un inhibidor de la S-

adenosilhomocisteína hidrolasa. Al igual que sus homólogas, estas células expresan genes y marcadores de pluripotencia, poseen la capacidad de diferenciación hacia derivados de las tres capas germinales, además de diferenciarse y contribuir a la formación de todos los órganos y la línea germinal de ratones quiméricos (Hou et al., 2013).

En la Figura V se presenta un esquema que resume las distintas maneras en las que se pueden producir las células troncales pluripotenciales.

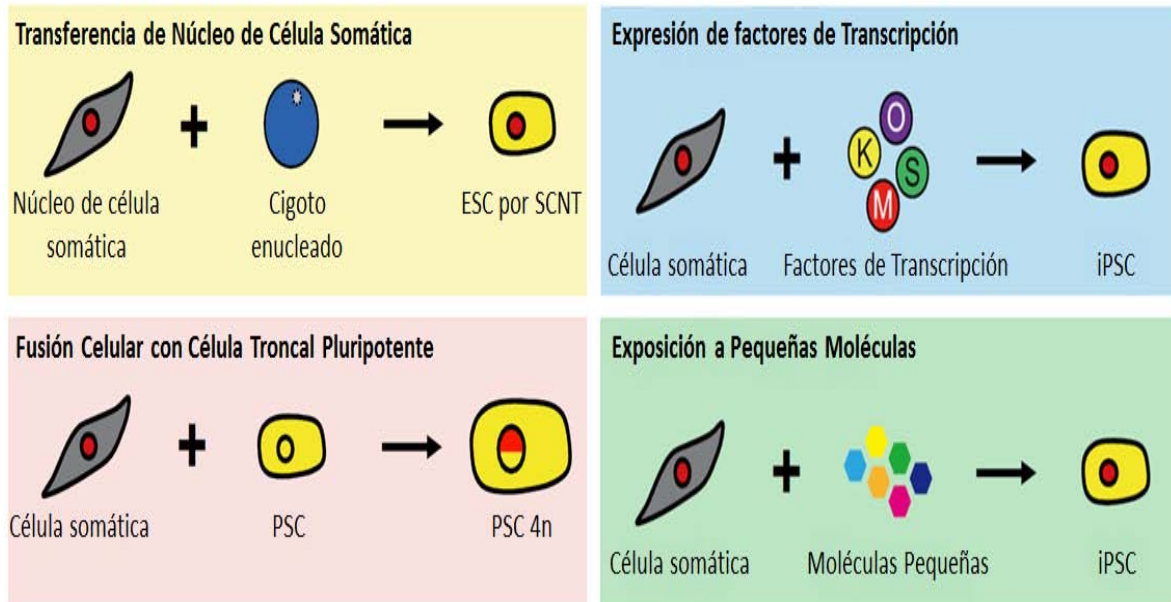


Figura V. Vías para la inducción de la pluripotencia. Tomada y modificada de Takahashi & Yamanaka, 2015.

5.2.4 Distintos Estados de Pluripotencia en Células Troncales

Embrionarias

Como se ha mencionado anteriormente, las primeras ESC se derivaron de blastocistos de ratón (mESC). Una vez que fue posible obtener ESC de otras especies, tales como el mono *Rhesus* o el ser humano, quedó de manifiesto que existían diferencias fundamentales entre las ESC de estos últimos y aquellas obtenidas de ratón. Morfológicamente, las mESC forman colonias en forma de domo, mientras las hESC forman colonias aplanadas. Ya mencionado anteriormente, los marcadores de pluripotencia característicos, como los antígenos SSEA, difieren entre ambas. Además, las hESC son altamente sensibles a la disociación individual, no así las mESC, que además dependen de las vías de señalización de LIF/BMP4 para el mantenimiento de la pluripotencia, mientras que las relacionadas a FGF/TGFβ promueven el estado indiferenciado en las hESC (Vallier et al., 2005).

El aislamiento de una línea de células pluripotentes designada como EpiSC a partir del epiblasto de ratón, (Brons et al., 2007), demostró que estas células poseían características similares a las hESC. Esto sugirió que, durante la derivación, las hESC obtenidas a partir de la ICM continuaban con su desarrollo, lo cual las configuraba en un estado más avanzado, similar a las EpiSC, estado conocido como “*primed*”. Por su parte, aquellas células con un estado de desarrollo más temprano, como las mESC, se encuentran en un estado “*naïve*”. Como podría esperarse, se observan diferencias funcionales, tales como su habilidad temporal para reentrar en el embrión en desarrollo, o aún en sus capacidades de diferenciación (Nichols & Smith, 2009).

Si bien hoy en día se han descrito con cierto detalle los estados de pluripotencia “*naïve*” y “*primed*”, aún existe controversia acerca de si las diferencias antes mencionadas se deben a diferencias entre especies, o simplemente a la derivación de las células en distintos estadios de desarrollo. En este sentido, diversos estudios han sugerido incluso, la existencia de otros estados de pluripotencia, establecidos tanto temporal como espacialmente (Wu & Izpisua, 2015).

5.2.5 Aplicaciones de las Células Troncales Pluripotenciales

Como se mencionó previamente, una característica inherente a las células troncales pluripotenciales, independientemente de su origen, es la capacidad de diferenciarse hacia cualquier linaje deseado. Ello es evidentemente prometedor como una fuente renovable de células para el uso en medicina regenerativa. En un número importante de estudios se ha comprobado la capacidad de las células troncales para diferenciarse y producir células de un tejido en particular, y a la fecha diversos trabajos han utilizado estas células inducidas para el tratamiento de algunos padecimientos. Por ejemplo, ciertos tipos neuronales obtenidos a partir de ESC, tales como las neuronas dopaminérgicas, han sido trasplantadas eficientemente en ratones parkinsonianos, tras lo cual lograron una mejoría notoria de los síntomas característicos del padecimiento (Kriks et al., 2011). Igualmente, el trasplante de neuronas GABAérgicas a ratones con alteraciones en la locomoción mejora su condición (Hwang et al., 2015). Estas estrategias se han probado también en otros tejidos, tales como el cardíaco (Klug et al., 1996). Este tipo de procedimientos se han realizado con los diversos tipos de células troncales, y cada tipo en particular tiene ventajas inherentes a su origen. Por ejemplo, las iPSC y las células troncales obtenidas por SCNT tienen la ventaja de poseer un genoma nuclear exactamente igual a la célula original o a la célula donadora, respectivamente. Evidentemente ello evitaría reacciones de rechazo del injerto por parte

del receptor del trasplante, lo cual es prometedor como terapia de reemplazo para una diversidad de enfermedades humanas.

Sin embargo, el potencial tumorigénico de las iPSC es una cuestión que limita su aplicación. Por su parte, las células troncales obtenidas por SNCT han mostrado recientemente un uso promisorio en el tratamiento de las enfermedades mitocondriales, tal como la enfermedad de Leigh, en donde la transferencia del núcleo de una célula afectada al citoplasma de una célula no afectada permite la recuperación del fenotipo normal en la célula resultante (Ma et al., 2015). Otra aplicación de las iPSC derivadas de humanos con enfermedades particulares es el estudio de los mecanismos de reacciones adversas a fármacos, en particular en los tipos celulares afectados. Dichos estudios se han llevado a cabo en una variedad de tejidos, tales como el tejido hepático, el sistema nervioso, el sistema cardiovascular y el tejido pancreático (Stocco et al., 2015). Así, este enfoque permite no sólo esclarecer los mecanismos de toxicidad celular de un fármaco sobre los distintos tipos celulares, sino que además permite evaluar un fármaco en las células de un paciente en particular y sus posibles reacciones adversas, permitiendo así optimizar la terapia e individualizarla, aminorando los riesgos y los efectos secundarios de cualquier tratamiento farmacológico. La Figura VI presenta un esquema con las principales aplicaciones de las células troncales pluripotenciales.

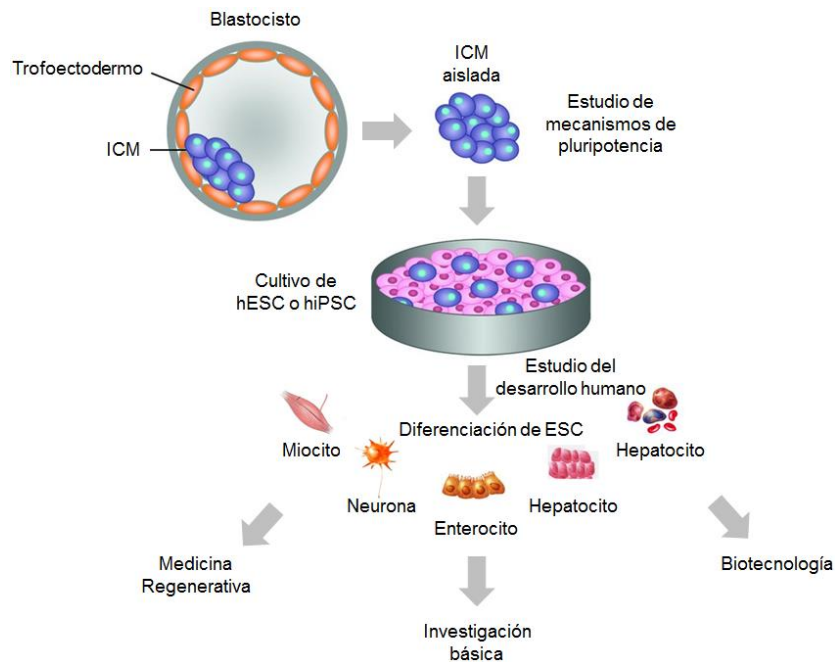


Figura VI. Principales aplicaciones de las células troncales pluripotenciales.

Como puede apreciarse, el estudio de las células troncales pluripotenciales ha sido muy activo durante las últimas décadas, y dadas las aplicaciones mencionadas, aunadas a otras posibles, como el estudio del desarrollo temprano, el desarrollo a través de los diversos linajes, el modelado de enfermedades, así como la evaluación dirigida de posibles tratamientos farmacológicos, hacen de esta área del conocimiento una rama en constante cambio y avance. Evidentemente cada uno de los diversos tipos de células pluripotenciales tendría ventajas en su uso para distintos objetivos particulares. Sin embargo, a pesar de los avances, evidencia epigenética sugiere que la reprogramación no ha logrado ser total, por lo que las ESC son hasta ahora las células troncales pluripotenciales por excelencia, y su estudio no ha declinado a pesar del surgimiento de alternativas de obtención de PSC.

5.3 Factor de Transcripción Stem Cell Leukemia (SCL)

5.3.1 Descubrimiento y Características del Gen *SCL*

El locus del gen *SCL* (*Stem Cell Leukemia*) se encuentra en la región 33 del brazo pequeño del cromosoma 1, y tiene un tamaño de 15 977 pares de bases (pb). En su isoforma más común, codifica para una proteína de 331 aminoácidos, con un peso molecular de 34 kDa (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TAL1>).

Inicialmente, el gen *SCL* fue identificado a través de una mutación implicada en el desarrollo de leucemia de células troncales, caracterizada por la proliferación exacerbada de células de linaje tanto linfoide como mieloide. Se encontró entonces que esta mutación de *SCL* promueve el desarrollo de leucemia a través de la translocación cromosómica t(1;14) (p33;q11.2), la cual lleva a la fusión de la región codificante de *SCL* con la secuencia de diversidad Δ del receptor de linfocitos T (*TCR D δ*). Se identificó que la expresión del gen *SCL* intacto no es ubicua, y que dentro del tejido hematopoyético sólo se expresa en precursores de linfocitos T y del linaje mieloide, así como en células con características de células troncales, más no en células de otros tejidos, como hígado, timo o cerebro. Además, se encontró que las células hematopoyéticas malignas expresan una isoforma trunca de manera mucho más abundante que la isoforma normal (Begley et al., 1989). Muy pronto también se asociaron otras mutaciones de *SCL* con el desarrollo de leucemia aguda de linfocitos T (TAL, por lo que también se le conoce comúnmente como *TAL1*) (Brown et al., 1990; Carroll et al., 1990).

El hallazgo de la implicación de *SCL* en el desarrollo de leucemias llevó a un análisis mucho más detallado de su locus. El análisis estructural evidenció que el gen *SCL* consiste de seis

exones distribuidos a lo largo de sus casi 16 kb. Cabe señalar que los límites entre exones e intrones contienen secuencias canónicas, es decir, los dinucleótidos GT y AG, donador y aceptor del empalme, respectivamente. Su región 3' es estructuralmente sencilla y contiene los exones IV, V y VI, los cuales codifican la proteína completa. Por el contrario, la región 5' es compleja, tal que permite diferentes formas de procesamiento, produciendo de esta manera algunas especies diferentes de mRNA. Esta región está caracterizada por poseer una isla CpG, en la que se encuentran los exones I, II, ambos subdivididos en las regiones a y b, y el exón III. Se encontró que mientras las células con multipotencialidad de desarrollo inician la transcripción en los exones Ia y Ib, los linfocitos T sólo inician la transcripción en el exón Ib. A excepción del evento de empalme que liga a los exones Ia y V, el resto de eventos de empalme alternativo convergen en el exón III. Se demostró también que la isla CpG está en un estado no metilado en células que expresan *SCL* y metilado en células que no lo expresan. Precisamente esta región es la que se interrumpe en la translocación que llevó a la identificación del gen, por lo cual la regulación normal de la región 5' es anulada, llevando a la región codificante bajo la influencia del enhancer de *TCR D δ* . La forma trunca de 155 aminoácidos, también llamada scl- β (mientras que la isoforma completa también es conocida como scl- α), conserva el dominio bHLH y es codificada por el mRNA en el que se ha ligado el exón Ia con el V, y representa el 20-30% del total de mRNA de *SCL*. Además de estas isoformas se encontraron formas de 37 y 42 kDa, más grandes que la predicha de 34 kDa, lo cual sugería que la proteína *SCL* es sometida a modificaciones postraduccionales. Finalmente, funcionalmente hablando, se identificó que la proteína *SCL* posee un motivo de tipo bHLH (basic Helix-Loop-Helix), así como una región rica en prolina cerca de su amino terminal, que es un motivo común encontrado en los dominios de activación de algunos factores transcripcionales. Esto reforzó la idea de que *SCL* es un factor de transcripción (Aplan et al., 1990). En la Figura VII se presenta un esquema simplificado de la organización estructural del locus de *SCL*, incluidas algunas regiones reguladoras.

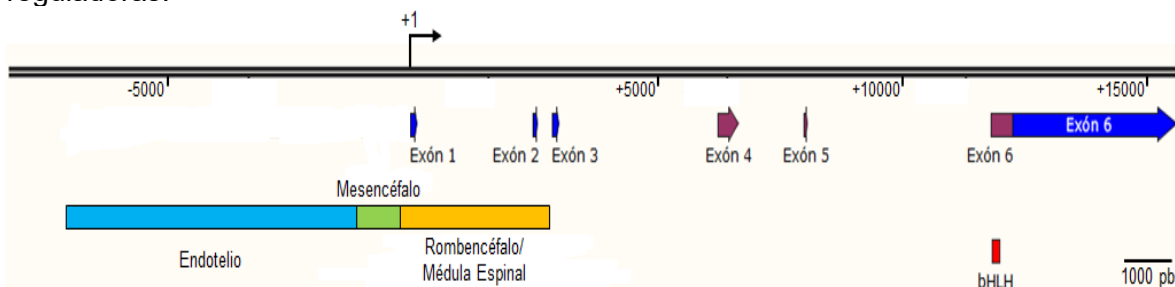


Figura VII. Organización estructural del locus de *SCL*. Se muestran los exones con flechas. Las flechas azules representan los exones no codificantes, mientras que las flechas

moradas los codificantes. La caja roja representa el dominio funcional bHLH dentro del exón 6. El lugar de inicio de la transcripción también es indicado. Finalmente, se muestran las distintas regiones promotoras que llevan a su expresión en el endotelio, el mesencéfalo y el rombencéfalo/médula espinal. Otras secuencias reguladoras no son mostradas.

5.3.2 Características del Factor de Transcripción SCL

Posterior a la caracterización de la organización estructural del locus de *SCL*, se definieron las características funcionales de la proteína que codifica. Se identificó como un factor de transcripción con un dominio bHLH, el cual es homólogo al encontrado en todos los miembros de la familia de factores transcripcionales bHLH, que están implicados en el control de la proliferación y la diferenciación celular. La región de homología es de aproximadamente 60 aminoácidos, formando dos hélices α anfipáticas separadas por un bucle, motivo que permite la dimerización, además de un conjunto de aminoácidos básicos en el extremo amino flanqueante del dominio HLH que posibilita el reconocimiento específico de la secuencia de DNA (Ledent & Vervoort, 2001).

Los factores transcripcionales de la familia de factores transcripcionales bHLH se unen de manera específica a la secuencia consenso CANNTG, conocida como caja E (E-box), que puede variar ligeramente para cada factor en específico. La unión al DNA puede ocurrir como homodímero o como heterodímero, lo cual amplifica la cantidad de secuencias reconocidas. La clasificación clásica de esta familia la divide en siete clases: clase I, agrupa a aquellos factores que se expresan en un amplio espectro de tejidos y tipos celulares, e incluye las proteínas E12, E47, HEB, E2-2 y Daughterless; clase II, agrupa a aquellos expresados en un grupo restringido de linajes celulares, y que en su mayor parte no forman homodímeros; clase III y IV, relacionados con la familia Myc; clase V, que agrupa a reguladores negativos de las clases I y II, como las proteínas Id; clase VI, con una región rica en prolina en su región básica; y clase VII, caracterizadas por la presencia del dominio bHLH-PAS (Massari & Murre, 2000).

El reconocimiento de SCL como un miembro de la familia bHLH permitió identificar que puede unirse a las proteínas de la clase I E12 y E47 a través de su dominio bHLH, formando un heterodímero con capacidad de unión al DNA. Sin embargo, los homodímeros de SCL no tienen dicha habilidad, lo que sumado a su patrón de expresión restringido antes visto, confirmó que SCL pertenece a la clase II de la familia de factores de transcripción con el dominio bHLH (Hsu et al., 1991). Además, se identificó la secuencia que reconoce el heterodímero que forma SCL con las proteínas E, lo que permite la unión secuencia-

específica al DNA. El heterodímero se une a una E-box con la secuencia consenso AACAGATGGT, donde la proteína E reconoce la secuencia AACAG, mientras que SCL reconoce la secuencia ATGGT. Asimismo, se encontró que las proteínas E dimerizan preferentemente con SCL en lugar de formar homodímeros, así como que SCL es capaz de interactuar con las proteínas Id1 e Id2 (Hsu et al., 1994). Finalmente, se describió que SCL se localiza dentro del núcleo, característica dependiente de su dominio bHLH, reforzando así su papel como factor transcripcional. Igualmente se observó que los productos proteicos de 42 y 37 kDa previamente descritos son formas fosforiladas en distinto grado, lo cual ocurre sobre residuos en la región carboxilo terminal de la proteína (Goldfarb et al., 1992). Como se mencionó previamente, SCL es un factor de transcripción clase II de la familia bHLH, lo que implica que su expresión está restringida a ciertos tejidos y solo a algunas células dentro de éstos. Usando anticuerpos dirigidos contra las diferentes isoformas de SCL, se observó que en el humano SCL se expresa en el hígado fetal y en la médula ósea, en particular en células eritroides y en megacariocitos, con poca expresión en otros tejidos (Pulford et al., 1995). Utilizando una cepa de ratón en la cual se llevó a cabo el “*knock-in*” del gen *lacZ* en la secuencia codificante de *Scl*, se observó en el embrión la expresión de SCL en algunas regiones del SNC, como la médula espinal y el mesencéfalo, así como en el tejido hematopoyético y el endotelio vascular (Elefany et al., 1999).

5.3.3 Actividad Transcripcional de SCL

En cuanto al papel funcional de la proteína SCL y los heterodímeros que forma con las proteínas E, existen estudios *in vitro* que demuestran que, de acuerdo con las condiciones celulares en un momento dado, SCL puede actuar como un modulador positivo o negativo de la transcripción. Dado que los homodímeros de E47 son activadores transcripcionales más potentes que los heterodímeros SCL-E47, en un primer momento se pensó que la expresión de SCL podría reprimir la transcripción por reclutar los polipéptidos E47 en complejos con menor actividad transcripcional, pues como se mencionó anteriormente, en la presencia de SCL los polipéptidos E47 forman preferencialmente heterodímeros. Por otra parte, los homodímeros de E47 son disociados más fácilmente por las proteínas Id que los heterodímeros SCL-E47. Por lo tanto, en presencia de las proteínas Id, la expresión de SCL podría activar la transcripción debido a la formación de los heterodímeros que, aun siendo activadores menos potentes, son relativamente resistentes a la disociación causada por las proteínas Id. Así, la actividad transcripcional de SCL sobre un gen dado dependería de la presencia o ausencia de las proteínas Id (Hsu et al., 1994). Sin embargo, posteriormente

se observó que la actividad transcripcional de SCL es mediada por la presencia de otras proteínas que interactuaban con el heterodímero SCL-proteína E. Dos de esas proteínas son LMO2 y GATA1, que pertenecen a la familia de factores transcripcionales con el motivo dedos de zinc. GATA1 se une al DNA a través de su dedo de zinc a la secuencia GATA. El dominio dedo de zinc media interacciones con otras proteínas. En células eritroides se encontró la formación de un complejo multimérico, constituido por SCL, E47, GATA1, LMO2 y LDB1, el cual se une de manera específica a una secuencia consenso conteniendo el llamado motivo E-box-GATA, integrado por la E-box CAGGTG, localizada 9 pb corriente arriba de un sitio GATA. La función de los dos últimos miembros del complejo es actuar como puentes moleculares que facilitan la interacción del complejo SCL-E47 con la proteína GATA1 (Wadman et al., 1997). Posteriormente, se encontró que en células eritroides, megacariocitos y mastocitos, las cinco proteínas del complejo son reclutadas invariablemente a todos los sitios donde GATA1 activa la transcripción, mientras que SCL no es reclutada a los sitios donde GATA1 actúa como represor, por lo que de esta manera SCL actúa como parte de un complejo activador transcripcional en estos linajes celulares (Tripic et al., 2009). Por otro lado, un complejo multimérico muy similar al previamente descrito, con excepción de que GATA1 es sustituido por el represor transcripcional ETO-2, se encuentra en células eritroides y en megacariocitos en etapas tempranas de diferenciación, reprimiendo así la expresión de genes importantes para la maduración (Schuh et al., 2005). Un tipo adicional de proteínas que interactúan con SCL son los modificadores de la cromatina. Los coactivadores PADI4, CBP/P300 y P/CAF, así como los correpresores SIN3A y LSD1, determinan en última instancia si SCL actuará como un activador o como un represor transcripcional (Kolodziej et al., 2014). (Figura VIII A y B).

5.3.4 Genes Blanco de SCL

Los blancos transcripcionales de SCL en el desarrollo del linaje eritroide y del endotelio vascular han sido bien estudiados, sin embargo, se conoce poco acerca de sus blancos en el tejido nervioso. No obstante, diversos estudios han identificado secuencias de unión para SCL y las proteínas E asociadas en los promotores de una gran cantidad de genes, entre los que se encuentran genes relacionados con receptores y moléculas de superficie, elementos de transducción de señales, factores de transcripción y proteínas asociadas al DNA, así como a su reparación, secreción de factores de crecimiento, desarrollo celular, crecimiento y proliferación, entre otros (Kassouf et al., 2010; Palomero, 2006). Más recientemente se identificaron genes no codificantes de proteína que son blanco de

regulación por SCL. Estos genes codifican para los micro RNA miR-146b y miR-545, que disminuyen la expresión de algunos protooncogenes, y son regulados negativamente por SCL; por el contrario, SCL aumenta la expresión de miR-135a, miR223 y miR-330, cuya función es disminuir la expresión de algunos genes supresores de tumores. En su conjunto, estos efectos promueven la supervivencia y la proliferación celular (Correia et al., 2013).

5.3.5 Control de la Expresión de SCL

Una vez sabido que la expresión de SCL está altamente restringida a ciertos tejidos, se buscaron las secuencias responsables del control de su expresión. Se encontró que una región de 940 pb ubicada corriente arriba del exón 1a, es necesaria para la expresión de SCL en el mesencéfalo y el diencefalo. Se observó también que algunos factores de transcripción de la familia GATA, en especial GATA2 y GATA3, que se expresan en un patrón espacial y temporal similar a SCL en el SNC, regulan la expresión de SCL al unirse al promotor 1a en este tejido, además, el sitio GATA en la posición -37 es el encargado de promover la expresión de SCL en todas las regiones del SNC donde se expresa. Por otro lado, una región de 2.9 kb es necesaria para promover la expresión de SCL dentro del rombencéfalo y la médula espinal. Por el contrario, en el tejido hematopoyético, GATA1 es el encargado de activar el promotor 1a, y el sitio GATA -37 es crítico para promover su actividad. Finalmente, una región de 6.1 kb es la encargada de dirigir la expresión de SCL a las células endoteliales y hematopoyéticas (Sinclair et al., 1999).

Posteriormente se identificaron otras regiones reguladoras de la expresión de SCL que son tejido específicas. El enhancer de células troncales +18/19 (distancia en kb respecto al sitio de inicio del exón 1a) dirige la expresión de SCL en las células troncales hematopoyéticas (HSC, *Hematopoietic Stem Cells*) y progenitores de este tejido en embriones y en adultos, así como en el endotelio embrionario (Silberstein et al., 2005). Por su parte, el enhancer -4 es activo en células endoteliales y hematopoyéticas embrionarias, pero inactivo en tejidos adultos (Gottgens et al., 2004). Por otro lado, el enhancer +40 dirige la expresión de SCL a células hematopoyéticas, así como en las neuronas localizadas en el mesencéfalo. Asimismo, este enhancer confiere a SCL una vía de autorregulación positiva (Ogilvy et al., 2007). Como puede apreciarse, el locus de SCL es una región con regulación compleja, que posee distintos promotores, así como una variedad de enhancers, silencers e insulators, que controlan no sólo el inicio de la transcripción, sino también la conformación local de la cromatina. En su totalidad, el regulón de SCL parece tener una extensión de 88

kb, comprendiendo desde el elemento corriente arriba -31 hasta el elemento corriente abajo +57 (Dhami et al., 2010).

Es interesante que el locus de *SCL* es sometido a rearrreglos de la cromatina dependientes del factor de transcripción GATA1. Estos rearrreglos llevan a un acercamiento físico de los diversos elementos reguladores en *cis*. La integridad del bucle formado de esta manera es esencial para un control adecuado de la expresión de *SCL*, así como el de sus genes flanqueantes *STIL* y *MAP17* (Zhou et al., 2013).

5.3.6 Regulación de la Actividad Transcripcional de SCL

La proteína SCL es objeto de varias modificaciones postraduccionales que regulan su actividad transcripcional. SCL cuenta con varios residuos que son blanco de fosforilación, como la serina 122, que es un sitio de fosforilación de la isoforma completa, lo que incrementa la actividad del dominio de activación transcripcional. Este aminoácido es fosforilado por la cinasa ERK1 en respuesta a señales extracelulares, tales como el EGF, así como en respuesta a la hipoxia (Chenget al., 1993). La serina 172, que se localiza cerca del dominio de unión al DNA, es fosforilada por la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA), lo que afecta la actividad de unión de SCL (Prasad & Brandt, 1997). La treonina en la posición 90 es fosforilada por Akt, lo que causa una redistribución de la proteína dentro del núcleo, inhibiendo así su actividad como represor transcripcional (Palamarchuk et al., 2005). Esta fosforilación, que es inducida por TGF- β , desencadena la asociación de SCL con la ubiquitina ligasa E3 CHIP, provocando su poliubiquitinación y degradación posterior en el proteasoma. Cabe señalar que la proteína E47 impide la asociación de CHIP con SCL, proporcionando así protección a la degradación por esta vía (Terme et al, 2009). La activación de la vía de señalización de Notch también desencadena la degradación de SCL, efecto mediado por las ubiquitina ligasas E3 CHIP y SKP2, ello tras la fosforilación de la serina 300 (Nie et al, 2008). (Figura VIIC).

5.3.7 Función de SCL en el Sistema Hematopoyético y el Endotelio

Observaciones iniciales demostraron que los ratones carentes de *Scf* no se desarrollaban más allá del día embrionario (E) 9.5, debido a la ausencia de eritropoyesis en el saco vitelino, lugar donde se lleva a cabo este proceso en los embriones a partir de E7.5 (Robb et al., 1995). Usando como modelo un ratón mutante nulo de *Scf*, que expresa *Scf* específicamente en el linaje hematopoyético debido a su inclusión en un transgen, se demostró que este factor también es esencial en el desarrollo del endotelio vascular durante

la embriogénesis (Visvader et al., 1998). Posteriormente se observó que SCL es crucial en la eritropoyesis temprana, así como en la iniciación de los programas hematopoyético y vascular. Esta función, empero, no depende de la unión al DNA de SCL, probablemente debido a que SCL funciona dentro de un complejo multiproteico con otros activadores transcripcionales. Por otro lado, la unión al DNA es indispensable para la producción de números normales de progenitores eritroides, así como para la apropiada maduración de precursores eritroides y megacariocíticos (Porcher et al., 1999). Además, SCL se describió como un factor esencial en la formación de HSC (Mikkola et al., 2003). También se demostraron papeles particulares para las distintas isoformas de SCL. En el pez cebra se observó que Scl- β es esencial para que un grupo de células de la aorta dorsal, que es el equivalente de la aorta-gónada-mesonefros de mamíferos, sufra la transición al linaje hematopoyético, es decir, el endotelio hemogénico. Por su parte, una vez que surgen las HSC, Scl- α es indispensable para el mantenimiento de esta población (Zhen et al., 2013). Además de su papel durante el desarrollo embrionario, SCL es vital tanto en la eritropoyesis como en la megacariopoyesis (Hall et al., 2003). SCL estimula la diferenciación de precursores eritroides al promover la expresión de algunos genes característicos de los eritrocitos, tales como *KLF1*, *GATA1*, *EPB42*, *GYP A*, β -globina y la proteína banda 4.2 (Tripic et al., 2009).

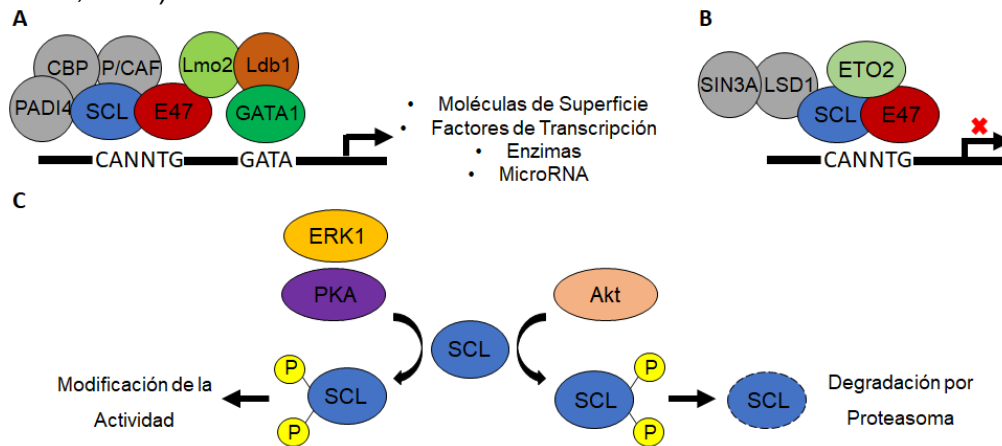


Figura VIII. Actividad transcripcional de SCL. **A.** Modelo del complejo de activación transcripcional conteniendo GATA1. Se muestran algunos de los blancos transcripcionales de SCL. **B.** Modelo del complejo de represión transcripcional conteniendo ETO2. En ambos casos se muestran algunos de los modificadores de la cromatina que interactúan con SCL, promoviendo o reprimiendo la transcripción, respectivamente. **C.** Regulación de la actividad de SCL. La fosforilación de SCL por las cinasas ERK1 y PKA modifica la actividad transcripcional, mientras que la fosforilación por la cinasa Akt marca a SCL para la adición de residuos de ubiquitina para su posterior degradación por el proteasoma.

Por otra parte, SCL se une directamente y estimula la transcripción de los genes *HOXA9* y *SOX7*, ambos factores transcripcionales que son reguladores esenciales de las células endoteliales (Bruhl et al., 2004; Costa et al., 2012). Adicionalmente, SCL regula la progresión a través del ciclo celular y la proliferación durante la monocitopoyesis, para lo cual la unión al DNA es indispensable (Dey et al., 2010). SCL también regula la diferenciación de los osteoclastos a partir de progenitores monocíticos, suprimiendo la expresión del regulador maestro de la fusión celular *DC-STAMP*. La inhibición de la transcripción de este gen lleva a la inhibición de la fusión celular, un proceso clave tanto en la diferenciación como en la actividad de los osteoclastos (Courtial et al., 2012). Más recientemente se ha implicado a SCL en la determinación del destino del mesodermo, previniendo el desarrollo de cardiomiocitos ectópicos en tejidos hemogénicos. Esto se logra a través de la unión diferencial a enhancers específicos de tejido y, en particular, SCL parece actuar como un silenciador de los enhancers para factores cardiacos, impidiendo su unión (Org et al., 2015). En la Figura IX se presenta un modelo del papel que desempeña SCL en el desarrollo del sistema vascular.

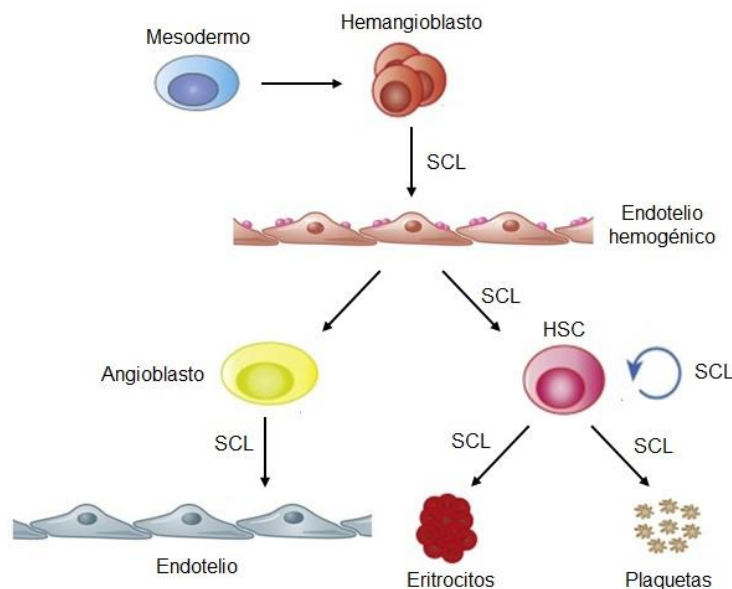


Figura IX. Papel de SCL en el desarrollo del sistema vascular. Se muestran los lugares donde se ha comprobado la participación de SCL en el proceso indicado.

5.3.8 Expresión de SCL en el Sistema Nervioso Central

La expresión de SCL en el tejido nervioso en desarrollo se reconoció tan pronto se había identificado como un factor transcripcional, y detectado en neuronas postmitóticas en el metencéfalo y en el techo del mesencéfalo (Green et al., 1992). Sin embargo, debido al papel primario que se le asignó a SCL en el desarrollo del sistema hematopoyético y del

endotelio vascular, así como a que varios estudios no evidenciaron su expresión en el tejido nervioso, su papel en el desarrollo de este tejido fue ignorado por muchos años.

El estudio previamente mencionado en el que se llevó a cabo el “*knock-in*” del gen *lacZ* en la secuencia codificante de *Scl*, corroboró la expresión de *Scl* en la médula espinal ventral y en el mesencéfalo en desarrollo, además de la expresión postnatal en los colículos superior e inferior (Elefanty et al., 1999). Un grupo de neuronas que contribuyen con axones pertenecientes a las comisuras posterior e intertectal fueron identificadas como células positivas para *Scl*. Debido a que estas regiones están implicadas en coordinar el control de la posición de los ojos en respuesta a varios estímulos, así como en el reflejo pupilar y los ajustes requeridos para una percepción precisa, se pensó que *Scl* era un factor importante que facilitaba el establecimiento de los circuitos neuronales dentro de estas vías (Sinclair et al., 1999). Posteriormente, un estudio mucho más detallado utilizando el mismo modelo de “*knock-in*”, evidenció lugares más específicos de expresión de *Scl*. Este estudio ratificó su expresión en el mesencéfalo, pero además demostró su expresión en el rombencéfalo, así como las regiones lateral y dorsocaudal del tálamo. De igual manera, se demostró que es expresado en el neuroepitelio intermedio, la zona marginal del acueducto y el cuarto ventrículo, mientras que no se observó su expresión en la región del prosencéfalo (van Eekelen et al., 2003).

5.3.9 Función de SCL en el Sistema Nervioso Central

Aunque ya se habían descrito con cierta precisión los lugares de expresión de SCL dentro del SNC, no fue sino hasta años después que comenzó a entenderse su función en el SNC. En particular, se observó que SCL es esencial para el desarrollo normal en ratones, así como para la supervivencia a largo plazo. La ausencia de ciertas poblaciones neuronales en mutantes con pérdida de función sugirió un papel fundamental en la generación y/o supervivencia de estas poblaciones, entre ellas, las interneuronas GABAérgicas de algunas regiones, como el sistema caudal de rafe (Bradley et al., 2006). La pérdida de estas neuronas se relacionó con un defecto en la modulación de la actividad motora, ya que estos ratones presentaban hiperreactividad. Posteriormente se encontró que SCL, dentro del dominio p2 de la médula espinal en desarrollo, estimulaba la diferenciación preferencial de precursores gliales hacia astrocitos sobre la de oligodendrocitos, así como el desarrollo de interneuronas V2b inhibitorias (neuronas GABAérgicas) sobre el de V2a excitatorias (neuronas glutamatérgicas). Concomitante a la inhibición de la formación de los precursores de oligodendrocitos, SCL reprime el desarrollo de motoneuronas (Muroyama et al., 2005).

Mientras tanto, la vía de Notch activada por Delta4 es la encargada de determinar si los progenitores bipotentes p2, que son neuronas postmitóticas inmaduras, formarán interneuronas excitatorias o inhibitorias. Estos progenitores, que expresan *Lhx3*, *Gata2*, *Mash1* y *FoxN4*, tienen dos destinos de elección: pueden disminuir la expresión de *Gata2*, mantener la de *Lhx3* y activar la de *Chx10*, adoptando así el destino de interneurona V2a, o bien, pueden disminuir la expresión de *Lhx3*, mantener la de *Gata2* y activar la de *Scf* y *Gata3*, adoptando así el destino de interneurona V2b. La señalización Delta4-Notch regula esta decisión, y aquellas células que reciben esta señal activarán el código transcripcional que las llevará a adquirir el fenotipo inhibitorio, a través de inducir la expresión de *Scf* (Peng et al., 2007). Finalmente, en un estudio cuyo objetivo fue la identificación de biomarcadores moleculares relacionados con el inicio de la enfermedad de Parkinson, *SCL* se identificó en un núcleo de 7 genes que podrían tener un importante papel en esta etapa de la enfermedad. Sin embargo, *SCL* no se expresa diferencialmente en pacientes con la enfermedad, aunque está implicado en la regulación de genes cuya expresión está alterada, como es el caso de STAT4 (Diao et al., 2012).

La Figura X muestra el papel de *SCL* en la región de p2 de la médula espinal.

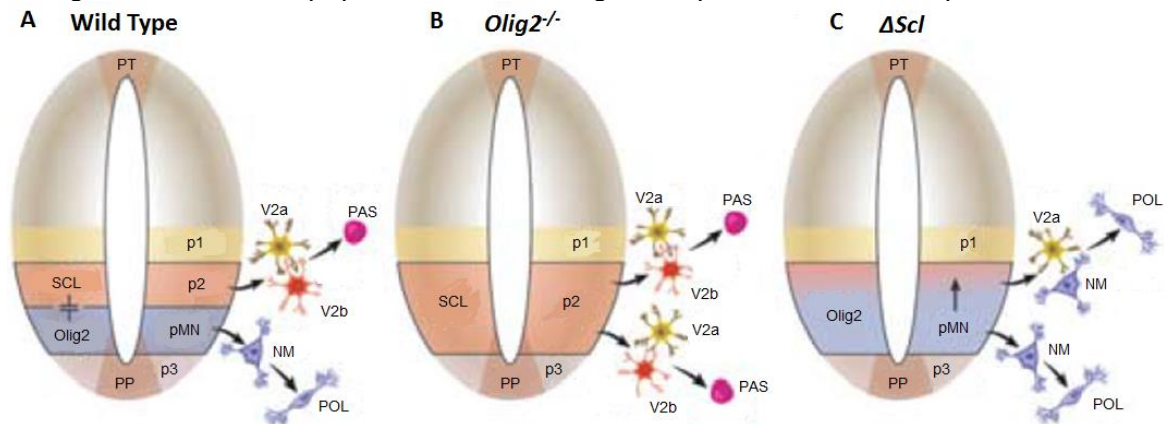


Figura X. Papel de SCL en el desarrollo de interneuronas GABAérgicas y precursores astrocíticos en la región p2 de la médula espinal. A. La interacción antagónica entre SCL y Olig2 mantiene niveles normales de precursores y sus derivados. **B.** La pérdida funcional de *Olig2* provoca la expansión ventral de la expresión de *Scf*, con la aparición sucesiva de PAS e interneuronas V2a y V2b. **C.** En mutantes de *Scf* en el tubo neural, la expresión de *olig2* se expande dorsalmente, y con ello las neuronas motoras y los POL, con la desaparición de las interneuronas V2b. NM, Neuronas motoras; PAS, Precursores astrocíticos; POL, Precursores oligodendrocíticos; PP; Placa de piso; PT, Placa de Techo. Tomada y modificada de Muroyama et al., 2005.

VI. ANTECEDENTES

La producción de diversos subtipos neuronales funcionales ha sido lograda a partir de la inducción neural de ESC humanas. En particular, interneuronas GABAérgicas de distintas regiones del SNC han sido generadas a través de la aplicación de diversas moléculas señalizadoras (Ma et al., 2012).

El efecto de *SCL* durante la diferenciación de ESC humanas fue evaluado previamente mediante diferenciación hematopoyética. De esta manera se demostró que la manipulación de los niveles de *SCL* en las ESC, en particular su sobreexpresión, genera una mayor cantidad de precursores y de células hematopoyéticas totales, lo que cabría esperar dado su papel en este tejido (Real et al., 2012).

SCL participa en el establecimiento de diversas subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas en varias regiones del SNC. La ausencia de función de *SCL* y la consecuente pérdida casi exclusiva de neuronas GABAérgicas en algunas regiones del rombencéfalo, sugieren que, como determinante del destino celular, este gen no participa como un gen proneural, sino que estaría involucrado en eventos de diferenciación celular tardía o en la especificación del subtipo neuronal (Bradley et al., 2006). La interacción antagónica mutua entre *Scf* y *Olig2* en el establecimiento de subtipos neuronales específicos en la región ventral de la médula espinal refuerza esta hipótesis. En esta región, estos genes favorecen la diferenciación hacia neuronas GABAérgicas y motoneuronas, respectivamente, (Muroyama et al., 2005). Finalmente, *SCL* participa en el desarrollo de una subpoblación de precursores postmitóticos en el dominio ventrolateral del neuroepitelio r1, los cuales migran posteriormente al mesencéfalo ventral, estableciendo una población de neuronas GABAérgicas que expresan *Scf* y *Gata3*, las cuales se asocian con los núcleos dopaminérgicos de esta región, es decir, el área tegmental ventral y la sustancia nigra, en donde controlan la actividad de las vías dopaminérgicas (Achim et al., 2012).

Debido al reconocido papel de *SCL* en la especificación de algunas subpoblaciones de neuronas GABAérgicas de distintas regiones del SNC, en este trabajo llevamos a cabo la diferenciación de hESC a este fenotipo neuronal para demostrar si *SCL* está involucrado en su especificación. Para evaluar dicho efecto, se compararon las líneas celulares control y sobreexpresantes de *SCL*, permitiendo así evaluar directamente el papel de este factor transcripcional en la diferenciación de las hESC hacia neuronas GABAérgicas.

VII. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que *SCL* está involucrado en el desarrollo del SNC del ratón, poco se conoce acerca de su función en el desarrollo del SNC humano. El efecto de *SCL* en la especificación neuronal de ESC no ha sido abordado en ningún modelo de mamífero. Tampoco se ha estudiado el patrón temporal de expresión de *SCL* durante la diferenciación neural de hESC. Por estos motivos, en este trabajo pretendemos realizar estudios en células troncales embrionarias humanas *in vitro* que nos permitan identificar el papel de *SCL* en la definición y desarrollo de neuronas GABAérgicas.

VIII. HIPÓTESIS

SCL juega un papel importante en el desarrollo de neuronas GABAérgicas, por lo que su sobreexpresión en células troncales embrionarias de humano afectará la diferenciación hacia este linaje, llevando al incremento en la cantidad de este tipo de neuronas.

IX. OBJETIVO

9.1 Objetivo General

Realizar estudios de ganancia de función del factor de transcripción *SCL* para establecer su efecto en la diferenciación neuronal de células troncales embrionarias de humano.

9.2 Objetivos Particulares

9.2.1 Determinar el perfil de expresión de *SCL* durante la diferenciación neural de hESC.

9.2.2 Determinar el efecto de *SCL* sobre la diferenciación de hESC hacia neuronas GABAérgicas.

X. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Cultivo de Células Troncales Mesenquimales de Humano (*feeders*)

Las células troncales mesenquimales humanas (hMSC, *human Mesenchymal Stem Cells*), se cultivaron en medio conteniendo 80% de DMEM (Gibco) y 20% de FBS (Gibco). Cuando fue necesario fueron subcultivadas utilizando Tripsina-EDTA al 0.05% (Gibco). Posteriormente, las hMSC se sometieron a radiación ionizante, a una dosis de 40 Gy. Las hMSC irradiadas, que se utilizaron como una capa de *feeders*, se cultivaron en el medio mencionado. En ambos casos fueron incubadas a 37 °C y 5% de CO₂.

10.2 Cultivo de Células Troncales Embrionarias de Humano

Las líneas celulares de hESC H9 NEO y H9 SCL fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Pedro Real del Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENyO, Granada, España). Las hESC indiferenciadas fueron mantenidas en cultivo sobre una capa de *feeders* en medio de hESC, que consta de KO DMEM suplementado con 20% de KSR, 2 mM de GlutaMAX, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 0.1 mM de 2-mercaptoetanol (todos de Gibco) y 8 ng/mL de bFGF humano, mantenidas a 37 °C y 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió diariamente, mientras que los cultivos confluentes se subcultivaron utilizando colagenasa IV (200 U/mL, Gibco). La línea H9 WT fue mantenida en condiciones similares. Además, esta línea fue mantenida indiferenciada en un cultivo libre de *feeders*, en frascos T25 cubiertos con Matrigel (BD Biosciences) en medio E8 (Chen et al., 2011). Los cultivos confluentes se subcultivaron con EDTA al 0.05% en PBS (Gibco).

10.3 Transducción Lentiviral

Los vectores lentivirales pLVTHM, conteniendo las secuencias *scramble* o interferentes de *SCL*, fueron proporcionados por el Dr. Pedro Real. Las células 293T fueron transfectadas con pLVTHM *scramble* o con pLVTHM sh*SCL*, junto con los plásmidos empaquetadores psPAX y pMD2.G, mediante el protocolo de transfección con fosfato de calcio. Dos días después, las partículas virales en el sobrenadante fueron colectadas y aplicadas directamente a hESC H9 WT, las cuales fueron infectadas toda la noche el día del pasaje en la presencia de polibreno a 8 µg/mL (Sigma). Al día siguiente, se retiró el sobrenadante conteniendo los virus, y las células se lavaron con medio fresco y mantenidas en cultivo. Tres días después de la transducción, las células se separaron mediante *sorting* por la expresión de EGFP y sembradas sobre placas de 6 pocillos cubiertas con Matrigel. Las

secuencias interferentes fueron las siguientes: shSCL 1: GAATGAGATCCTCCGCCTG; shSCL 2: CACCACCAACAATCGAGTGAA; shSCL 3: CCTGCTGAACGGCGTCGCCAA; shScramble: GGTGCCGTTTAGTAGTACA.

10.4 Edición Génica por CRISPR/Cas9

Para la generación de una línea de hESC *knockout* de SCL, se utilizó el sistema CRISPR/Cas9. La herramienta de diseño para CRISPR (<http://crispr.mit.edu>) se utilizó para el diseño de los RNA guías. Se seleccionaron secuencias dirigidas a la región codificante de SCL, en particular, los exones 5 y 6. La secuencia de los guías es la siguiente: gRNA2 Ex5: 5'-TCTCCTCTTCACTCGATTGT-3'; gRNA3 Ex5: 5'-CTCCCCAAAGAACCCGCTGT-3'; gRNA1 Ex6: 5'-GAAGATACGCCGCACAACCTT-3'; gRNA15 Ex6: 5'-GCGGCAGCAGAATGTGAACG-3'. Posteriormente, los guías se clonaron en el plásmido pLentiCRISPR v2, que fue amablemente proporcionado por el Dr. Félix Recillas Targa del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El plásmido con la secuencia adecuada se transfectó en células 293T para producir las partículas virales. Finalmente, las partículas virales fueron transducidas en células H9 WT. Detalles de ambos procesos fueron descritos en la sección anterior.

10.5 Diferenciación de hESC a Neuronas GABAérgicas

La diferenciación hacia neuronas GABAérgicas se realizó como se había previamente establecido (Ma et al., 2012). Las hESC creciendo sobre *feeders* se disociaron en pequeños cúmulos de células por incubación con Dispasa (Gibco) por 20 minutos a 37 °C, y fueron sembrados en placas de cultivo de ultra baja adherencia (Corning) para permitir la formación de cuerpos embrioides (EBs). Durante los tres primeros días, los EBs fueron mantenidos en medio DMEM/F12 (Gibco) suplementado con 20% de KSR, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de GlutaMAX y 0.1 mM de 2-mercaptoetanol. Al día 4 se transfirieron a medio de inducción neural, formado por DMEM/F12, suplemento N2 (Gibco), 2 mM de GlutaMAX y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales. Al día 7, los EBs fueron depositados en placas tratadas con laminina (1 µg/mL, Gibco) y mantenidos en medio de inducción neural. En el día 12, se agregó pumorfamina 0.65 µM (Sigma) al medio durante 14 días. Durante este periodo, las células fueron despegadas y sembradas en placas de cultivo de ultra baja adherencia para permitir la formación de neuroesferas en suspensión. Al día 26, las neuroesferas se disociaron utilizando TrypLE Express (Gibco), y sembradas sobre cubreobjetos o portaobjetos con cámara de 8 pocillos (Nalge Nunc) a 1-5x10⁵ células/pocillo, ambos cubiertos con poli-L-ornitina (0.01%, Sigma)-laminina (1

µg/mL)/fibronectina (5 µg/mL, Gibco) en medio de maduración neural, conteniendo medio Neurobasal, suplementado con B27 (Ambos de Gibco), 2 mM de GlutaMAX y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, con la adición de 10 µM de ácido valproico (Sigma) durante 7 días, seguido por la adición de 20 ng/mL de BDNF, 10 ng/mL de GDNF e IGF1, 1 µM de cAMP (todos de Gibco), así como 200 µM de ácido ascórbico (Sigma) por 14 días adicionales. De esta manera, alrededor del día 35 aparecen las neuronas GABAérgicas.

10.6 Inmunocitoquímicas y Cuantificación

Los cultivos celulares fueron fijados con paraformaldehído al 4% por 5 minutos a temperatura ambiente, lavados con PBS e incubados con solución de bloqueo, consistente de 5% de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.3% de Triton X-100 en PBS, por 60 minutos a temperatura ambiente. Tras el ello, los anticuerpos primarios listados en la Tabla 1 fueron incubados con 5% de BSA en PBS toda la noche a 4°C. Tras los lavados con BSA al 0.1% en PBS, las preparaciones se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con compuestos fluorescentes para revelar los sitios de unión de los anticuerpos primarios, en BSA al 5% en PBS por 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron con BSA al 0.1% en PBS y montados con Vectashield con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Labs). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal LSM710 (Zeiss). La cuantificación de las poblaciones celulares se realizó con el software ImageJ. Al menos 3 campos se seleccionaron al azar para cada grupo, y al menos tres experimentos fueron realizados de manera independiente. Los datos son representados como promedio ± el error estándar de la media (SEM).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en las inmunocitoquímicas.

Anticuerpo	Hospedero	Dilución	Marca
NANOG	Conejo	1:1000	Prepotech (500-P236)
SSEA4	Ratón	1:400	Abcam (ab16287)
SOX2	Conejo	1:500	Abcam (ab97959)
OCT4	Ratón	1:250	BD (611202)
NESTINA	Ratón	1:1000	Millipore (MAB5326)
MAP2	Ratón	1:1000	Millipore (MAB378)
GABA	Conejo	1:1000	Sigma (A2052)
TH	Conejo	1:1000	Pel-freez (P40101)

10.7 Purificación de RNA, síntesis de cDNA y PCR Cuantitativo

El RNA total fue purificado a partir de las células en cultivo con High Pure RNA Isolation Kit (Roche), y el cDNA preparado a partir de 1 µg de RNA usando Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), el cual se analizó por PCR cuantitativo (qPCR) utilizando el iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las secuencias de los primers utilizados son las siguientes: OCT4: 5'-AGTGAGAGGCAACCTGGAGA-3' y 5'-ACACTCGGACCACATCCTTC-3'; NEUROD1: 5'-ACGAGGAATTGCCCCACGCA-3' y 5'-AACGCTCCAGGCGAGCCTTA-3'; MAP2: 5'-GACATGCAAGGCACAGAAGA-3' y 5'-TTTTCCCTCATGGGAGTCAG-3'; GAD1: 5'-CCTCAC AAGATGATGGGCGT-3' y 5'-GGCCACACTGAATTGCCTTG-3'; SCL: 5'-GGATGCCTTCC CTATGTTCA-3' y 5'-GGTGTGGGGACCATCAGTAA -3'; GAPDH: 5'-TGCACCACCAACT GCTTAGC-3' y 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'. El gen GAPDH se utilizó para normalizar los datos y la expresión relativa fue calculada usando el método de $\Delta\Delta C_T$. Las condiciones del qPCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

10.8 Western Blot

Las hESC en cultivo fueron dissociadas utilizando colagenasa IV y lisadas en buffer RIPA (Sigma), suplementado con coctel inhibidor de proteasas (Roche) e inhibidores de fosfatasa (Sigma). Un gel de electroforesis de SDS- poliacrilamida al 12% se cargó con 50 µg de proteína y se transfirió a membrana de fluoruro de polivinilideno. La proteína SCL fue detectada usando anti-SCL (clon C-21, Santa Cruz), y la actina, utilizada como control de carga, fue detectada usando anti-actina (clon AC-15, Sigma). Ambas fueron visualizadas con el sistema de imagen Odyssey (Li-Cor).

10.9 Análisis *in silico*

Las secuencias de DNA de humano de los genes de interés, así como sus homólogos en el mono Rhesus, el ratón y la rata, fueron obtenidas a partir de Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Para todos los genes, en promedio, 3 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción se consideraron como región promotora, de acuerdo con secuencias previamente reportadas. Se utilizó la herramienta MatInspector 8.4 (<https://www.genomatix.de>), para determinar las matrices de factores transcripcionales en las cuales SCL está presente, con el fin de acotar la búsqueda de sitios de unión en las secuencias promotoras. Una vez determinadas todas las matrices posibles, mediante

MatInspector definimos todos los sitios de unión posibles para las matrices de interés en las regiones promotoras de los genes en las cuatro especies estudiadas. Posteriormente, utilizando la herramienta de alineamiento de secuencias Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk>), determinamos cuales secuencias de unión estaban conservadas entre las distintas especies. Finalmente, sólo aquellas secuencias con un valor de similitud superior al umbral optimizado para cada matriz, conservadas entre las distintas especies, fueron consideradas como sitios de unión putativos suficientemente confiables.

10.10 Análisis Estadístico

Todos los datos se muestran como promedio \pm SEM. Las comparaciones estadísticas se realizaron con el software SigmaPlot. La prueba *t* de Student, así como un ANOVA de una vía, con la prueba de Tukey o la prueba de Dunnett, fueron usados para comparar los grupos experimentales. En todos los análisis, la significancia estadística fue establecida como un valor de $p < 0.05$, donde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

XI. RESULTADOS

11.1 Las Líneas H9 NEO y H9 SCL Mantienen Características de Células Troncales Embrionarias

La línea celular H9 NEO, que se utilizó como control, fue generada a través de la transducción del vector lentiviral pRRL, al cual se le introdujo la secuencia del gen de resistencia a neomicina bajo el promotor constitutivo de la 3-fosfoglicerato cinasa (PGK) (vector vacío, EV). La línea H9 SCL fue producida de manera similar, con la secuencia de EGFP-2A-FLAG-SCL bajo el promotor constitutivo del factor de elongación 1 α (EF1 α). Ambas líneas fueron donadas por el Dr. Pedro Real (Real et al., 2012). Una representación de los vectores lentivirales utilizados se muestra en la Figura 1A.

Previo a la evaluación del efecto de SCL sobre la diferenciación neural de las hESC, se verificó que las líneas celulares aún mantuvieran las características propias de las células pluripotenciales. Con este objetivo, las líneas fueron descongeladas y cultivadas sobre una capa de *feeders*. Ambas líneas mantuvieron la morfología característica de las células pluripotenciales, con colonias bien delimitadas, células esféricas con relación núcleo/citoplasma elevada y nucléolo prominente (Figura 1B). Posteriormente, mediante inmunocitoquímica, se verificó la expresión de los marcadores asociados a la pluripotencia SOX2, OCT4 y NANOG, así como el marcador de superficie SSEA4, característico de las hESC. Como puede apreciarse, ambas líneas mantienen la expresión de los marcadores mencionados (Figura 1C y 1D). De esta manera, comprobamos que la sobreexpresión de SCL no afecta el fenotipo pluripotente de las hESC, lo cual sugiere que, aun cuando puede participar en la especificación de precursores hematoendoteliales (Visvader et al., 1998), SCL no desempeña ninguna función en etapas muy tempranas del desarrollo.

11.2 Sobreexpresión de SCL

Una vez comprobado que ambas líneas celulares mantenían las características propias de las células pluripotenciales, corroboramos la sobreexpresión de SCL en la línea H9 SCL. Mediante qRT-PCR, observamos que la línea sobreexpresa SCL a niveles elevados, comparada con las líneas H9 WT y H9 NEO (Figura 2A), lo cual fue confirmado con un análisis de western blot (Figura 2B), usando como control positivo la línea K562, una línea de leucemia mieloide conocida por la expresión elevada de SCL. Con estos datos confirmamos que H9 SCL sobreexpresa de manera notoria el gen SCL, y procedimos a evaluar la influencia de su sobreexpresión sobre la diferenciación neuronal de las hESC.

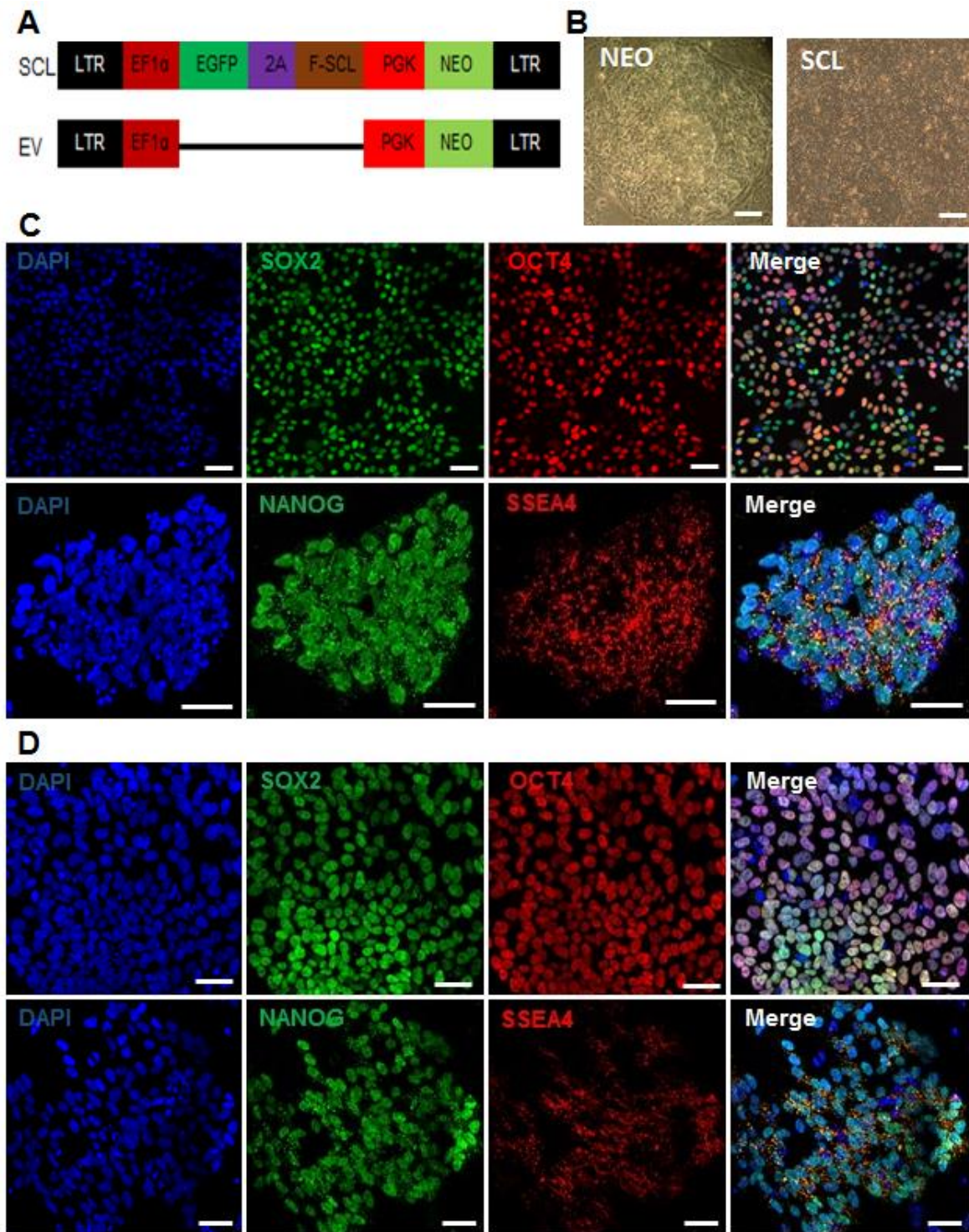


Figura 1. Mantenimiento de las características pluripotenciales en las líneas de trabajo. **A.** Representación esquemática de los vectores lentivirales usados. **B.** Líneas en cultivo sobre *feeders* que muestran las características típicas de células pluripotenciales. **C.** Expresión de los marcadores de pluripotencia en la línea H9 NEO. **D.** Expresión de los marcadores de pluripotencia en la línea H9 SCL. Las barras de escala representan 50 μ m.

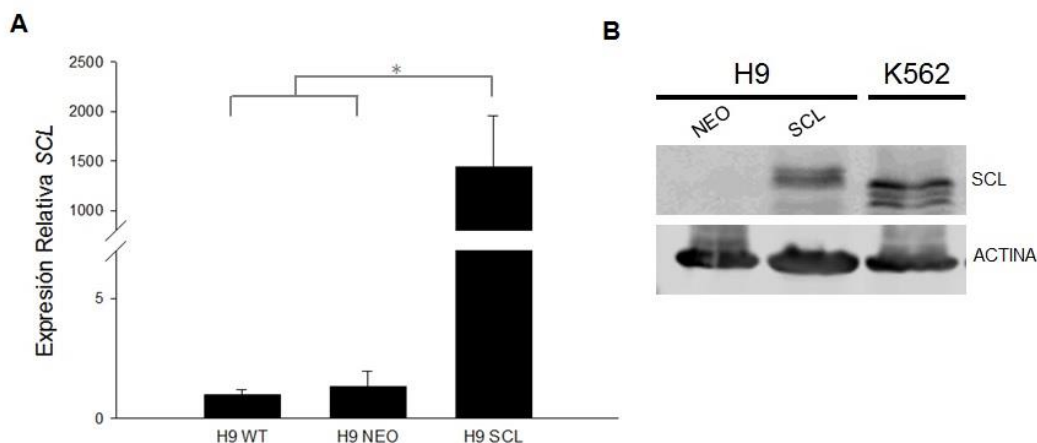


Figura 2. Evaluación de la sobreexpresión de SCL en las células H9 SCL. A. Análisis por qRT-PCR, demostrando la sobreexpresión de *SCL*. Los datos se normalizaron con células H9 WT, que presentan niveles casi indetectables de *SCL*. Los resultados son el promedio \pm el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes. La significancia estadística fue evaluada usando un ANOVA con la prueba de Tukey. * $p < 0.05$. **B.** Detección por western blot de la proteína SCL en la línea H9 SCL. La línea K562 se utilizó como control positivo.

11.3 Diferenciación de hESC a Neuronas GABAérgicas

Para evaluar la influencia de la sobreexpresión de *SCL* sobre la diferenciación neuronal de las hESC, diferenciamos ambas líneas a neuronas GABAérgicas, las cuales son especificadas por *SCL* en ciertas regiones del SNC. La diferenciación a dicho subtipo neuronal se realizó como se describe en la literatura (Ma et al., 2012). En la Figura 3A se muestra un esquema del procedimiento de diferenciación utilizado, además de un mapa temporal de la morfología de las células H9 NEO a lo largo del proceso (Figura 3B-G). Como puede apreciarse, a medida que transcurre el proceso, la morfología característica del linaje neural se hace evidente, con la formación de precursores neurales con procesos en ambos polos celulares, además de la aparición de neuronas tras la disociación de las neuroesferas y la exposición a neurotrofinas, con evidentes neuritas de longitud importante. Por su parte, las células H9 SCL muestran una gran similitud con las células H9 NEO durante la diferenciación, formando cuerpos embrioides y neuroesferas de tamaño equivalente, así como precursores neurales y neuronas con morfología similar (Figura 3H-K).

De manera característica, los precursores neurales expresan SOX2 y NESTINA. Tal como puede observarse en la Figura 4A, al día 15 de diferenciación existe una clara colocación de estos dos marcadores en las células, si bien su expresión es observada a lo largo de toda la diferenciación (Figura 4C). Es interesante observar que algunas neuronas maduras

(día 42 y día 47) mantienen la expresión de SOX2 y de NESTINA (Figura 4B y 4D). Tales resultados parecen discordantes con el momento de expresión característico de estos genes. Sin embargo, estudios previos han observado el mantenimiento de la expresión de estos genes en neuronas maduras, tanto *in vitro*, como en distintas regiones del encéfalo adulto (Cavallaro et al., 2008; Hendrickson et al., 2011).

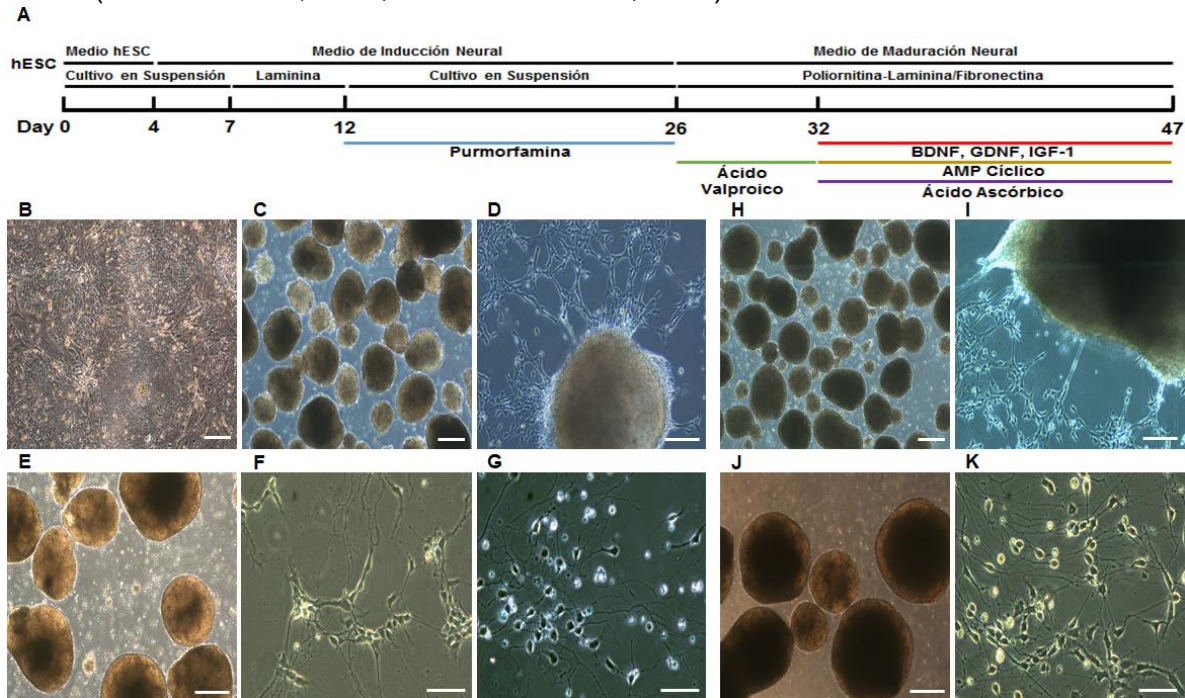


Figura 3. Diferenciación de hESC a neuronas GABAérgicas. **A.** Esquema del proceso de diferenciación utilizado. **B-G.** Imágenes representativas de la diferenciación de células H9 NEO. **B.** Células troncales en cultivo que fueron utilizadas para la diferenciación. **C.** Cuerpos embrioides al día 7, creciendo en suspensión con las características esperadas. **D.** Día 8. Precusores neurales adheridos en laminina. **E.** Día 17. Morfología típica de neuroesferas en suspensión. **F.** Día 30. Neuronas inmaduras adheridas en poli-L-ornitina-laminina/fibronectina. **G.** Día 40. Neuronas con un mayor número de neuritas. **H-K.** Imágenes representativas de la diferenciación de células H9 SCL. **H.** Cuerpos embrioides al día 7. **I.** Día 8. Precusores neurales. **J.** Día 17. Neuroesferas en suspensión. **K.** Día 40. Neuronas maduras sobre poli-L-ornitina-laminina/fibronectina. Nótese la morfología similar a las células H9 NEO en todos los casos. Las barras de escala representan 50 μ m.

Finalmente, al día 42 de diferenciación, las neuronas H9 NEO maduras presentan gran cantidad de neuritas y expresan MAP2 ($79.70 \pm 5.97\%$), proteína del citoesqueleto neuronal (Figura 5A). En este momento, la mayoría de las neuronas expresan GABA ($70.64 \pm 4.03\%$), neurotransmisor característico de las interneuronas GABAérgicas, como evidencia la

colocalización con MAP2; por el contrario, muy pocas neuronas expresan tirosina hidroxilasa ($2.07 \pm 1.38\%$), enzima clave en el proceso de síntesis de dopamina en las neuronas dopaminérgicas (Figura 5B y 5C). Estos resultados son también observados en las células H9 SCL, como se describe en secciones posteriores.

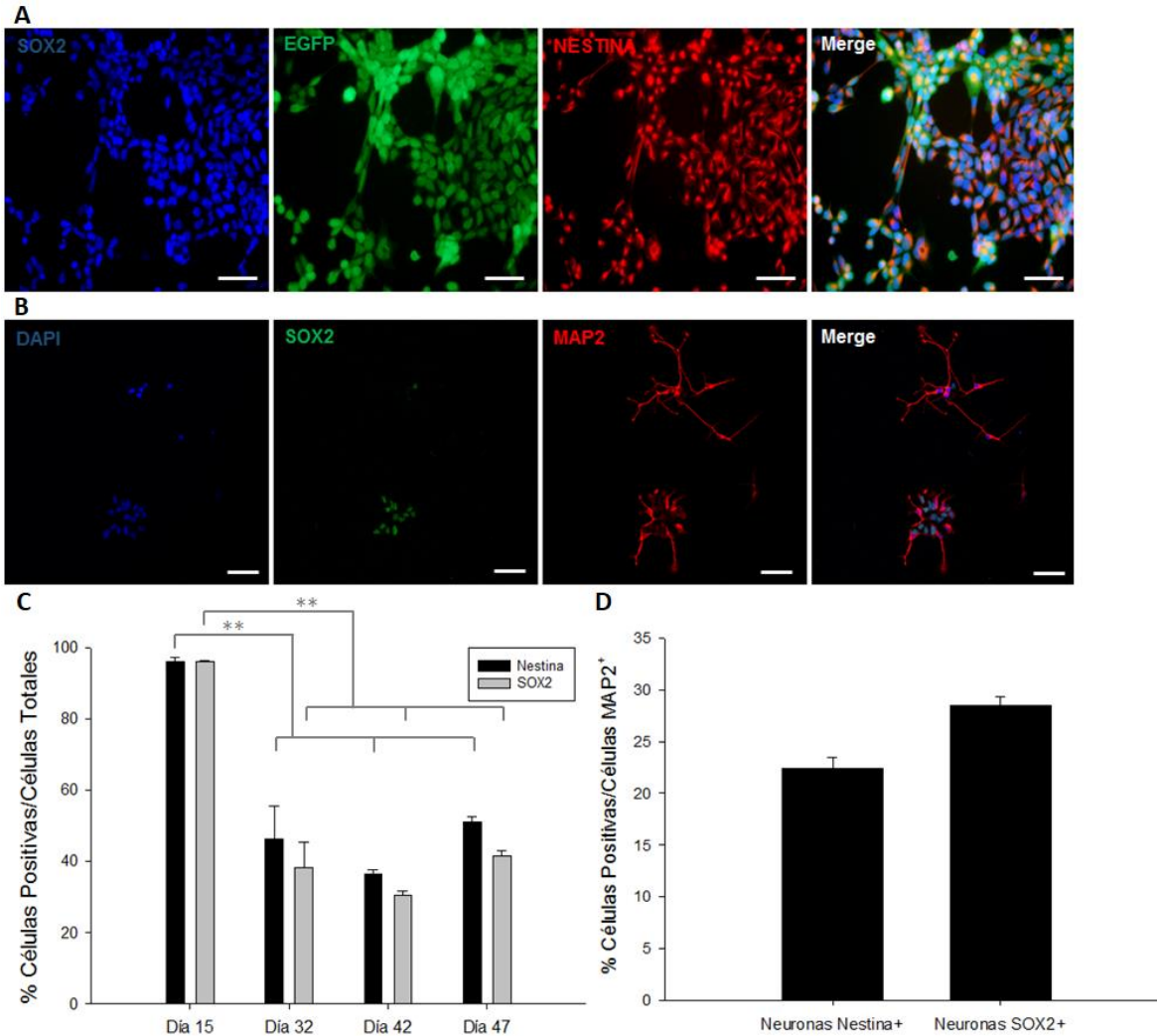


Figura 4. Obtención de precursores neurales. **A.** Diferenciación de células H9 GFP. La inmunocitoquímica al día 15 de diferenciación muestra la alta proporción de precursores neurales obtenidos. **B.** Neuronas H9 NEO. Algunas de las neuronas obtenidas mantienen la expresión de SOX2 al día 32 de diferenciación. **C.** Cuantificación de células por inmunocitoquímica que expresan los marcadores característicos de precursores neurales en los días de diferenciación señalados. **D.** Cuantificación de neuronas H9 NEO al día 32 de diferenciación. Nótese que un porcentaje importante de neuronas mantiene la expresión de los marcadores NESTINA y SOX2. Los datos representan promedio \pm SEM de dos o tres experimentos independientes. La significancia estadística fue evaluada usando un ANOVA con la prueba de Tukey. $**p < 0.01$. Las barras de escala representan $50 \mu\text{M}$.

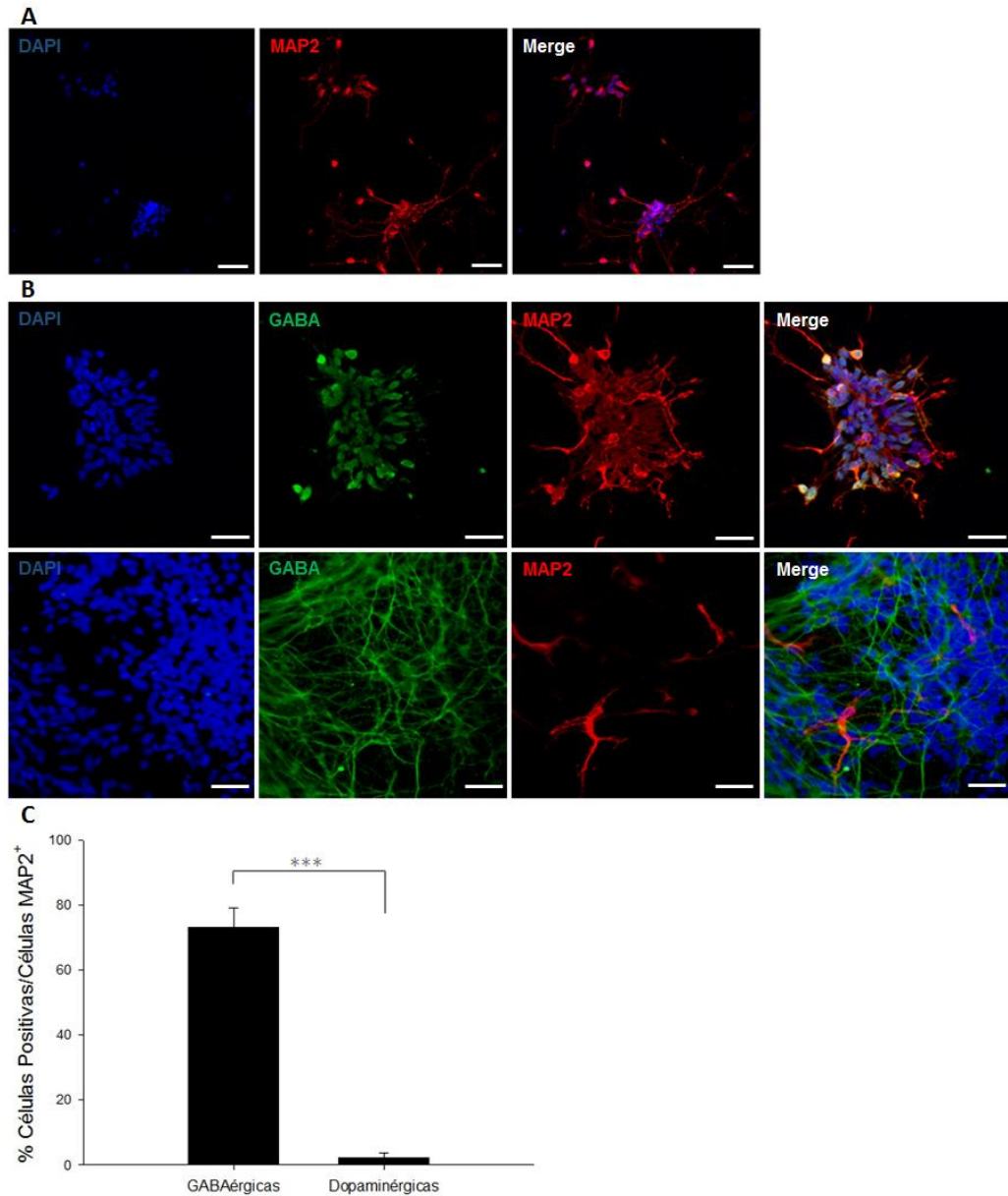


Figura 5. Diferenciación y caracterización neuronal. Diferenciación de células H9 NEO. **A.** Inmunocitoquímica al día 42 de diferenciación, mostrando la gran cantidad de neuronas obtenidas. **B.** Inmunocitoquímica mostrando que la mayoría de las neuronas obtenidas son GABAérgicas, con muy pocas neuronas dopaminérgicas. **C.** Cuantificación de las poblaciones GABA⁺ y TH⁺ entre las neuronas MAP2⁺. Los datos son promedios \pm SEM de dos o tres experimentos independientes. Las barras de escala corresponden a 50 μ m.

11.4 Expresión de Marcadores Durante la Diferenciación Neural

A pesar de que la función de SCL en el SNC se ha caracterizado en cierta medida, sus blancos moleculares en este tejido, así como su patrón de expresión durante la

diferenciación neural, han sido poco estudiados. Con el fin de abordar esta cuestión, decidimos evaluar por qRT-PCR la expresión de distintos marcadores que nos permitieran analizar temporalmente el proceso de diferenciación, así como la expresión de *SCL* durante este proceso en células H9 WT. Los días de diferenciación seleccionados para tal fin fueron los días 0 (células pluripotenciales), 7 (precursores neurales), 12 (previo a inicio de tratamiento con pumorfamina), 20 (50% del tiempo de tratamiento con pumorfamina), 26 (previo a inicio de tratamiento con ácido valpróico), 32 (previo a inicio de tratamiento de maduración), y 42 (neuronas maduras) (Figura 6A). Dicha evaluación también se realizó en células H9 SCL para observar el efecto de la sobreexpresión de *SCL* (Figura 6B). Como puede observarse en la Figura 6, ambas líneas se comportan de manera muy similar. *OCT4*, marcador de células pluripotenciales, tiene una disminución notoria al transcurrir la diferenciación, si bien las células H9 SCL presentan un ligero aumento transitorio, que finalmente desaparece. *NEUROD1*, marcador de precursores neurales, presenta su máxima expresión entre los 7 y 12 días de diferenciación, como cabría esperar de acuerdo a la morfología celular observada durante este lapso, tras lo cual disminuye su expresión. Vale la pena señalar que los niveles de *NEUROD1* en las células H9 SCL son mucho más altos que los vistos en las H9 WT, lo cual podría indicar una aceleración en la salida del ciclo celular y la diferenciación de los precursores H9 SCL (Zhang & Jiao, 2015). *MAP2*, proteína característica del citoesqueleto neuronal, tiene un comportamiento interesante, ya que aumenta su expresión durante los primeros 12 días de diferenciación, disminuye en días posteriores, para aumentar de manera muy importante hacia el final de la diferenciación, lo que podría indicar una ligera expresión en precursores neurales, seguido de una disminución en las neuronas inmaduras, para finalmente expresarse predominantemente en las neuronas maduras. *GAD1* (Glutamato Descarboxilasa 1), el gen que codifica la isoforma de 67 kDa de la descarboxilasa del ácido glutámico, enzima responsable de la síntesis de GABA, principalmente en el tejido nervioso (Asada et al., 1997), tiene un comportamiento muy similar a *MAP2*, expresándose ligeramente en precursores y aumentando a su nivel de expresión máximo en las neuronas maduras. A pesar de que su expresión en precursores no tiene una explicación inmediata, esto ha sido previamente observado (Nat et al., 2007). Para ambos genes, los niveles de expresión alcanzados son recurrentemente más elevados en las células H9 SCL durante el curso de la diferenciación. Finalmente, *SCL* se expresa de manera importante en los precursores neurales, disminuye al día 20 de diferenciación, aumenta nuevamente al día 26, para finalmente disminuir en las neuronas maduras. La expresión de *SCL* en las neuronas

inmaduras (día 26), como se esperaba, sustenta su papel como gen selector terminal (Achim et al., 2013). Sin embargo, la expresión en los precursores neurales es interesante, pues previamente no se le ha atribuido alguna función en este estadio de desarrollo, si bien cabe señalar que esto no se ha estudiado con detalle.

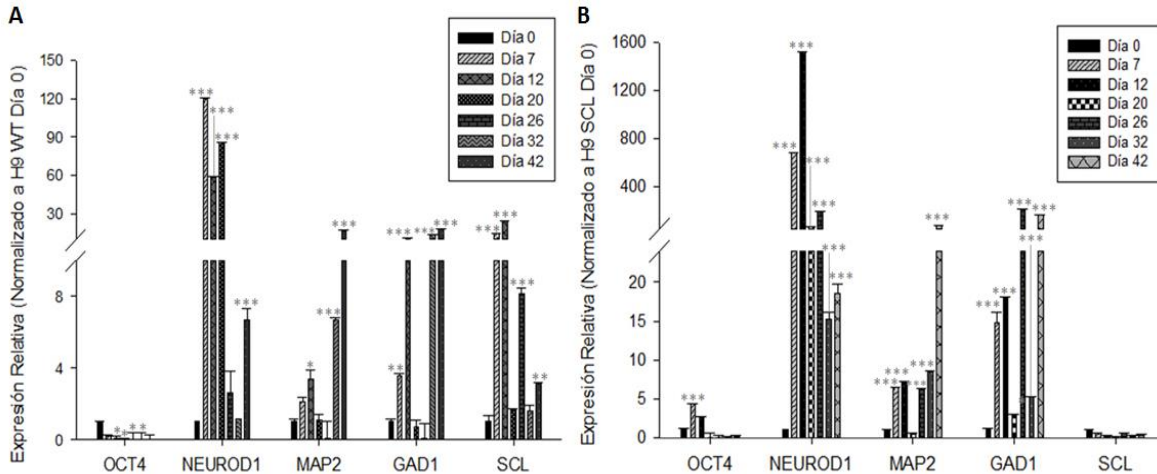


Figura 6. Análisis por qRT-PCR de los niveles de expresión génica durante la diferenciación neural. A. Expresión de los genes señalados en las células H9 WT. **B.** Expresión de los genes señalados en las células H9 SCL. Nótese que el nivel de expresión de *SCL* no cambia debido a que la sobreexpresión se mantiene durante toda la diferenciación. Los niveles de expresión son relativos a H9 WT día 0 y H9 SCL día 0, respectivamente. Los datos son promedios \pm SEM de dos o tres experimentos independientes. La significancia estadística fue evaluada usando un ANOVA con la prueba de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

11.5 Efecto de la Sobreexpresión de *SCL* en la Diferenciación Neural de hESC

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de *SCL* en la diferenciación neural, analizamos la obtención de neuronas GABAérgicas a partir de la línea sobreexpresante. Nuestros resultados muestran que el porcentaje de neuronas totales no se ve incrementado por la sobreexpresión de *SCL*, encontrándose al día 34 de diferenciación para H9 NEO y H9 SCL $78.08 \pm 3.62\%$ y $80.79 \pm 2.22\%$ de neuronas, respectivamente, mientras que al día 42 se encuentran $79.70 \pm 5.97\%$ y $85.78 \pm 2.45\%$ (Figura 7C). Sin embargo, la sobreexpresión de *SCL* genera una mayor cantidad de neuronas GABAérgicas al día 42 de diferenciación, observando en la línea H9 SCL un $96.67\% \pm 3.33\%$, en comparación con el $70.64 \pm 4.03\%$ observado en H9 NEO (Figuras 7B y 7D). Además, *SCL* parece también acelerar el surgimiento de las neuronas GABAérgicas, ya que al día 34 de diferenciación observamos para H9 NEO y H9 SCL un $48.47\% \pm 4.90\%$ y un $94.32\% \pm 3.41\%$, respectivamente (Figuras

7A y 7D). Cabe señalar que, en general, las neuronas H9 SCL parecen presentar una tinción más intensa para GABA que las neuronas H9 NEO, lo que podría ser resultado de una mayor síntesis del neurotransmisor en las células que sobreexpresan SCL (Figura 7A y 7B). Por otra parte, es interesante mencionar que las neuronas H9 SCL parecen tener una mayor cantidad de neuritas, como muestra su aparente mayor arborización individual. Además, como se muestra en la Figura 7E, las neuronas H9 SCL mantienen niveles muy elevados de SCL, mientras que las H9 NEO no presentan niveles detectables de la proteína, posiblemente debido a que los niveles de expresión de transcrito alcanzados no son suficientemente elevados. Así, la sobreexpresión de SCL genera una mayor cantidad de neuronas GABAérgicas, lo cual podría esperarse dada su habilidad para promover su diferenciación en el SNC.

Debido a que la sobreexpresión de SCL genera una mayor cantidad de neuronas GABAérgicas, además de acelerar su surgimiento, decidimos comparar el nivel de expresión en las células H9 SCL de los genes antes estudiados con su expresión correspondiente en las células H9 WT. La Figura 8 muestra un análisis comparando la expresión de los 5 genes en los diversos días mencionados. Debido a la sobreexpresión constitutiva, las células H9 SCL expresan niveles más altos de SCL durante todo el transcurso de la diferenciación. *OCT4* se expresa ligeramente más en las células H9 SCL a los días 7 y 12, aunque su expresión al final de la diferenciación se reduce a niveles similares a los observados en las células H9 WT. Los niveles de expresión de *NEUROD1* en las células H9 SCL, excepto al día 20, son consistentemente más elevados, aunque en las neuronas maduras los niveles son prácticamente idénticos a los de las células H9 WT.

Por su parte, los genes *MAP2* y *GAD1* presentan diferencias muy interesantes. En el caso de *MAP2*, las células H9 SCL muestran hacia el final de la diferenciación niveles superiores de expresión, aunque el número de neuronas, visualizado a través de inmunocitoquímica, no se ve modificado. Debido a que *MAP2* se expresa principalmente en las neuritas, esta expresión superior puede ser resultado de la mayor cantidad de neuritas presentes en estas células (Fischer et al., 1986). Finalmente, *GAD1* presenta un patrón alterno, presentando mayores niveles en las células H9 WT a los días 12 y 32, aunque el incremento es de 6 y 10 veces más, respectivamente, mientras que a los días 26 y 42 las células H9 SCL expresan niveles considerablemente más elevados, de 60 y 30 veces más, respectivamente. La mayor expresión en las células H9 SCL al día 26 de diferenciación sustenta el hecho de que SCL parece acelerar el surgimiento de las neuronas

GABAérgicas, además de que la mayor expresión en las neuronas H9 SCL maduras es consistente con el mayor número de neuronas GABAérgicas observado en esta línea, así como una aparente mayor inmunoreactividad para GABA.

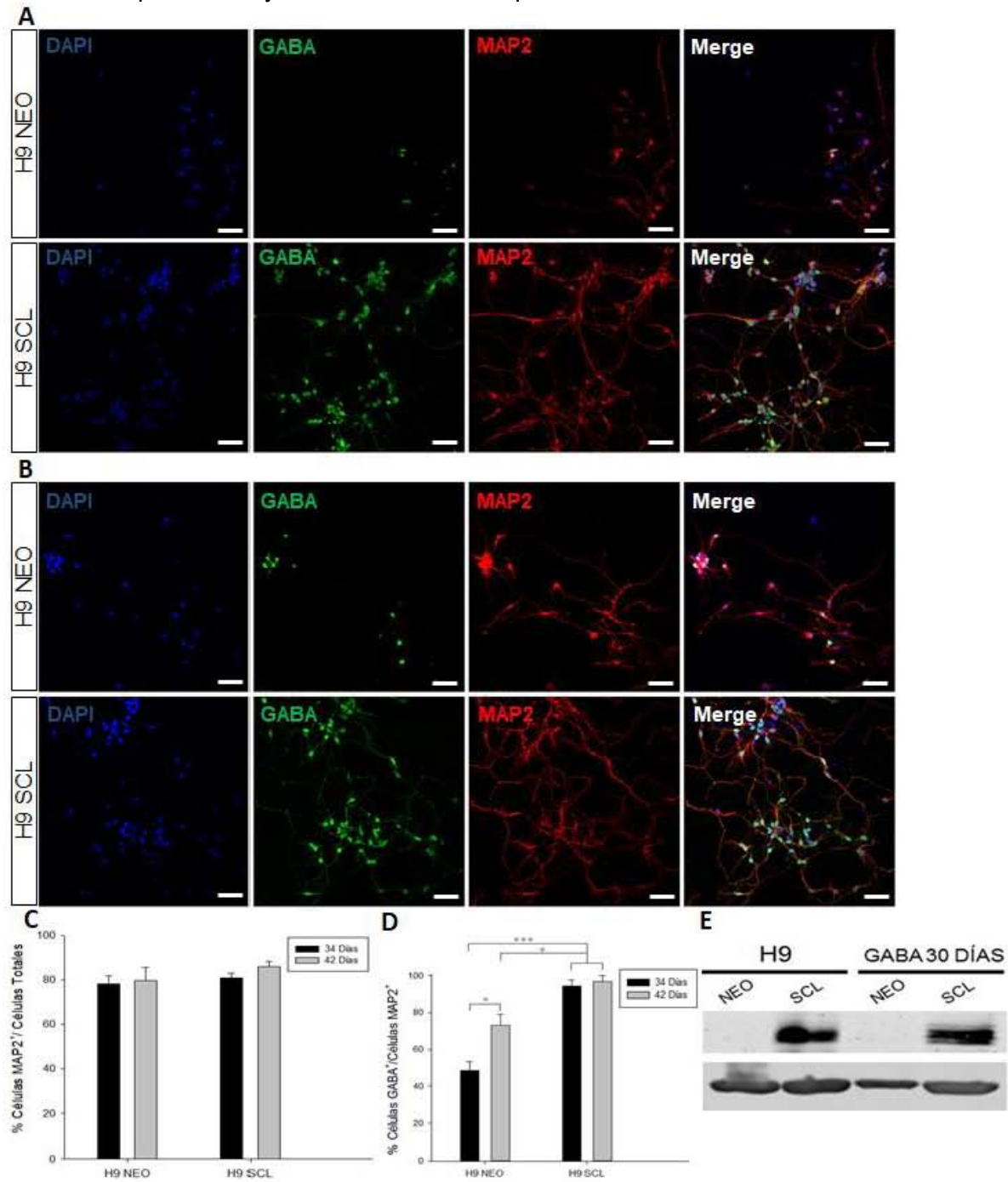


Figura 7. La sobreexpresión de SCL genera una mayor cantidad de neuronas GABAérgicas. A. Inmunocitoquímica de neuronas H9 NEO y H9 SCL al día 34 de diferenciación. **B.** Inmunocitoquímica de neuronas H9 NEO y H9 SCL al día 42 de diferenciación. Nótese la mayor cantidad de neuronas GABAérgicas en las neuronas H9

SCL, además de una aparente tinción más intensa para GABA. **C.** Cuantificación mediante inmunocitoquímica de neuronas totales a los 34 y 42 días de diferenciación para ambas líneas. **D.** Cuantificación de neuronas GABAérgicas a los 34 y 42 días de diferenciación para ambas líneas. **E.** Detección por western blot de SCL de manera exclusiva en las neuronas H9 SCL. Se muestra la detección en las células pluripotenciales con fines comparativos. Los datos representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. La significancia estadística fue evaluada usando un ANOVA con la prueba de Tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Las barras de escala corresponden a 50 μ M.

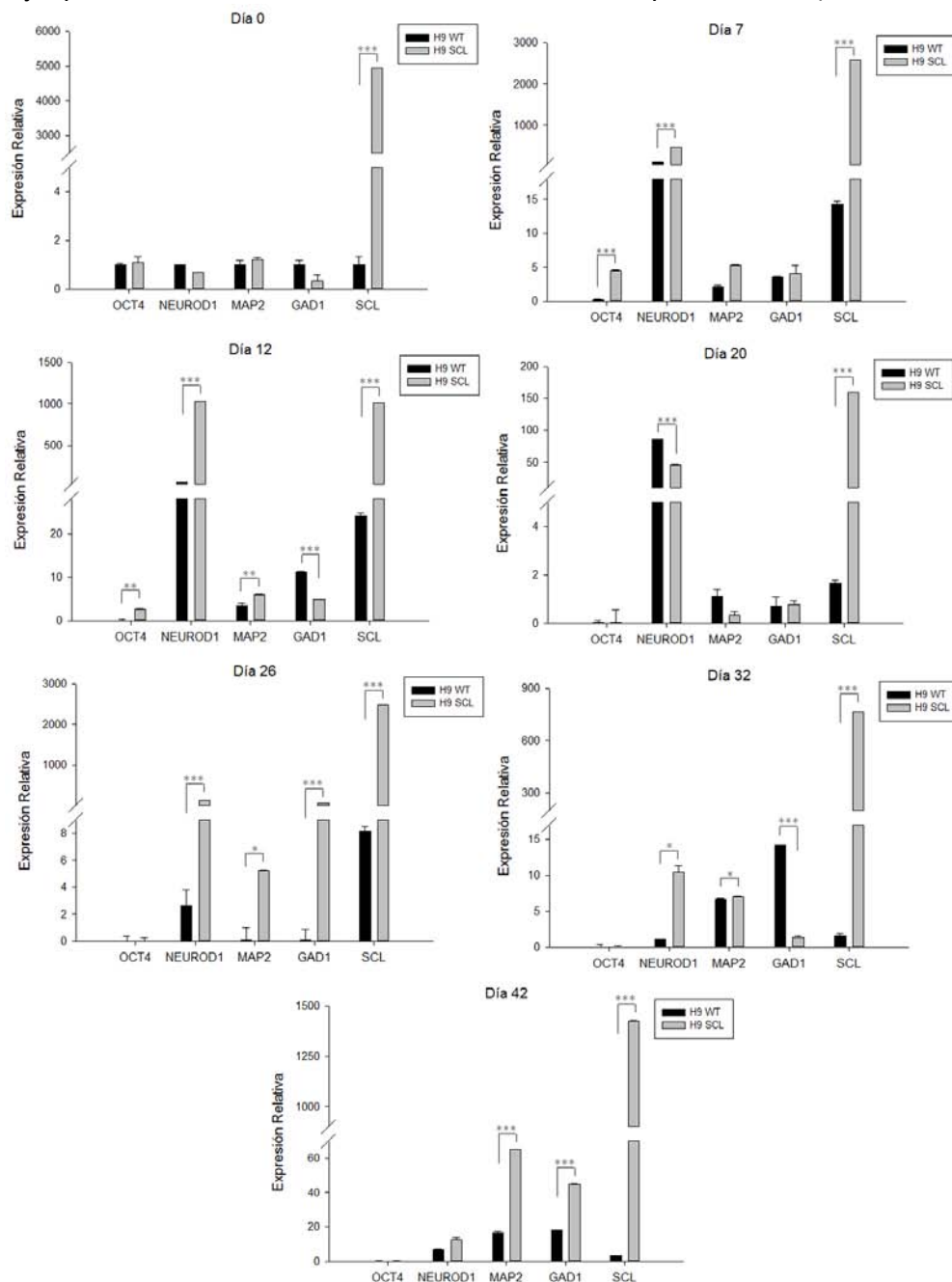


Figura 8. Comparación de niveles de expresión génica en células H9 SCL y H9 WT.

Comparación temporal de la expresión de los genes señalados en las células H9 SCL y H9 WT. Los datos fueron relativizados a H9 WT Día 0 y son promedios \pm SEM de dos o tres experimentos independientes. La significancia estadística fue evaluada con una prueba *t* de Student, comparando la expresión en las células H9 SCL contra la expresión en las células H9 WT para cada gen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

11.6 Análisis de Promotores de Genes Sobreexpresados en Células H9 SCL

El análisis previo muestra que los tres genes analizados para la evaluación del progreso de la diferenciación neuronal, es decir, *NEUROD1*, *MAP2* y *GAD1*, se encuentran sobreexpresados en las células H9 SCL en comparación con las células H9 WT, ello durante distintas etapas de la diferenciación. Este resultado podría ser consecuencia de la sobreexpresión de *SCL*, ya sea mediante una función directa o una función indirecta. Para evaluar dichas posibilidades, decidimos realizar un análisis *in silico* en las regiones promotoras de estos genes con el fin de buscar posibles secuencias de reconocimiento de *SCL*, o de alguno de sus cofactores transcripcionales. Como se mencionó previamente, *SCL* no puede unirse como un monómero o como un homodímero al DNA. En su lugar, forma complejos transcripcionales con algunas proteínas E, tales como E2A y E47, así como con factores de la familia GATA, entre ellos GATA1. Mediante el análisis con MatInspector, determinamos que en el humano existen seis matrices de complejos transcripcionales donde *SCL* participa como una subunidad, y que pertenecen a dos familias distintas. La familia HAND, compuesta de factores transcripcionales bHLH clase B pertenecientes a la subfamilia TWIST, contiene tres matrices en donde *SCL* esta presente. Las matrices que se encuentran presentes en los promotores analizados son SCL_E2A.01, compuesta por *SCL*, E2A, LMO2 y GATA1, así como SCL α _E47.01 y SCL β _E47.01, ambas formadas por *SCL* y E47. Por otra parte, la familia GATA, compuesta de los factores de unión GATA, contiene la matriz GATA1.06, que al igual que la matriz SCL_E2A.01, está constituida por *SCL*, E2A, LMO2 y GATA1. Como puede apreciarse en la Figura 9, el complejo formado por *SCL* y las proteínas E reconoce la secuencia CAnnTG, donde los nucleótidos CA y TG son invariables y necesarios para el reconocimiento por el complejo. Por su parte, la matriz GATA1.06 reconoce, al igual que otros factores GATA, la secuencia GATA, la cual es invariable y requerida para el reconocimiento por GATA1.

Una vez que definimos las matrices en las cuales *SCL* forma parte, procedimos a analizar las secuencias promotoras de *NEUROD1*, *MAP2* y *GAD1* en busca de sitios de unión de

SCL. La región promotora analizada fue identificada a partir de secuencias previamente reportadas (Bhat et al., 2006; Chen et al., 2011; Kuwabara et al., 2009). En promedio, 3 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS, *Transcriptional Start Site*) fueron evaluadas en MatInspector, acotando las matrices de búsqueda a las antes mencionadas. En el caso de *NEUROD1* identificamos tres sitios probables de unión para matrices de la familia HAND, dos sitios para SCL α _E47.01, en las posiciones -2250 y -215, así como un sitio para SCL_E2A en la posición -1706 (Figura 10A). Para *MAP2*, identificamos sitios posibles para la unión de la matriz SCL α _E47.01, así como para la matriz SCL β _E47.01 en las posiciones -1237 y -358, respectivamente, además de un sitio para GATA1.06 en la posición -2266 (Figura 10B). Finalmente, para *GAD1* fueron identificados cuatro sitios posibles de unión para la matriz SCL_E2A. Estas secuencias se encuentran en las posiciones -1620, -1068, -861 y -435 respecto al TSS. Además, un posible sitio para la unión de la matriz GATA1.06 se encuentra en la posición -1154 respecto al TSS (Figura 10C). Cabe mencionar que todos los sitios probables de unión mencionados presentan una similitud de secuencia superior al umbral optimizado para cada matriz, es decir, el valor mínimo para excluir resultados falsos positivos, por lo que todos los sitios encontrados representan con una alta probabilidad secuencias que se desempeñan como secuencias regulatorias. Dicho valor es único para cada matriz y es proporcionado por la plataforma empleada en el análisis.

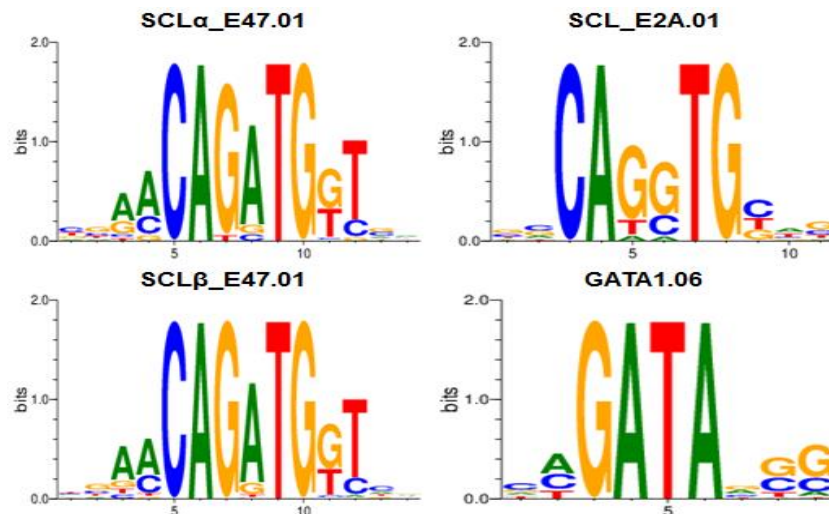


Figura 9. Secuencias de reconocimiento de complejos transcripcionales conteniendo SCL. Los gráficos de logo de secuencia muestran las secuencias de reconocimiento preferentes distintos complejos transcripcionales que contienen SCL. Nótese que para todos los complejos de SCL y proteínas E, la secuencia CAnnTG es invariable. Modificada de <https://www.genomatix.de>.

MATRIZ A NEUROD1

SCL α /E47 -2274 TCGGGCG----TCCCTCTTGCTCAAGAACATCTGACTCCACCATAATTCTCCTG-----T -2224
-242 CAGGTCCGCGGAGTCTCTAACTGGCGACAGATGGGCCACTTTCTTCTGGCCACAAAGGGG -183

SCL/E2A -1725 TAGA-TTAGTACTGTGCAGGGAAGGCTGCACCTGCTACCTTCAGACACCGGGGATC---- -1679

B MAP2

SCL α /E47 -1265 AGAA-GGAAAAAAAAAAAAAGAAACATATCATCTGTCTC--TCAATTCCTTCCCTGTAG -1209
SCL β /E47 -385 TGTGTCTGGCATTAAACACAAAGGAGACCAGATGATGACATTATA-----GGCTG-- -336
GATA1 -2293 --TAGACATCAAAAAAAGCAGTATGACCCTATCTATAGAT-GAGTTAATCCAAAAGCATT -2237

C GAD1

SCL/E2A -1640 CTTGAATGATT-----AGCACTGGCACCTGGCTCCCTGATTGGTGCAGCGTCTCGT -1588
-1095 CGCATAAATAACCCCTGCGTGCTGCACCACCTGGGGAGAGGGGGAGGACCACGGTAAATA -1036
-887 GCGCGTAACCGTCTGGCCAGCAGCTCCAGGTGTGGGCTCCGCTCGGGCGCTGGCGGAGA- -829
-462 TGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGTGGCCAGGTGTGGTACTTTGATGGGGCCAGGGCTGGA -403

GATA1 -1181 TGTTTCCATTGTGTGTGGTGAAGGCCGATAAGGCATTCAAAGA-AAACGGACGGGCCTC -1123

Figura 10. Sitios putativos de unión de complejos transcripcionales conteniendo SCL en los promotores de los genes estudiados. A. Sitios de unión encontrados en el promotor de *NEUROD1*. **B.** Sitios de unión probable en el promotor de *MAP2*. **C.** Sitios de unión posibles en el promotor de *GAD1*. En todos los casos se muestran los sitios posibles de unión subrayados con una línea negra. La flecha roja señala los sitios de unión que se encuentran en la cadena complementaria. Los números a la izquierda y a la derecha de las secuencias representan el número de pares de bases respecto al TSS. Se muestra el nombre de la matriz a la cual pertenece cada sitio de unión identificado

Finalmente, para evaluar de forma más rigurosa los posibles sitios de unión encontrados en los genes de humano, realizamos un análisis comparativo de las regiones promotoras estudiadas con las secuencias homólogas de tres organismos distintos, el mono Rhesus, el ratón y la rata, con el fin de determinar cuáles sitios de unión se encuentran conservados entre las diferentes especies y, por tanto, podrían actuar como secuencias reguladoras con más probabilidad. Para los tres organismos mencionados, consideramos en promedio 3 kb río arriba a partir del primer exón como secuencia promotora, en donde buscamos los sitios de unión posibles para las matrices estudiadas previamente. Al igual que en el caso de los sitios identificados en humano, todos los sitios encontrados en estos organismos presentan una similitud de secuencia superior al umbral optimizado. Una vez determinados tales sitios, procedimos a realizar un alineamiento de estas secuencias con la región promotora de humano, con el fin de verificar si los sitios encontrados están conservados en posiciones homólogas en esos organismos y el humano. A pesar de que encontramos varios sitios de probable unión a las matrices estudiadas, el análisis posterior solo se realizó para aquellos sitios conservados en el promotor de humano. De esta manera encontramos que, en el

caso de *NEUROD1*, los sitios de unión en las posiciones -2250 y -1706 se encuentran conservados en el mono Rhesus, mientras que el sitio en la posición -215 se encuentra conservado tanto en el mono Rhesus como en la rata (Figura 11A). En el caso de *MAP2*, ninguna de las cajas E encontradas en la región promotora de humano se encuentra conservada en alguno de los organismos evaluados. La secuencia de la caja GATA encontrada en la posición -2266 del promotor humano se encuentra conservada en la rata; sin embargo, dado que esta región no parece ser blanco de unión de GATA1, ya que esta secuencia no es clasificada como un sitio de unión putativo, probablemente no desempeñe un papel regulatorio en este organismo (Figura 11B). Finalmente, de las cajas E encontradas en *GAD1*, el sitio ubicado en la posición -1068 no se encuentra conservado en ninguno de los organismos estudiados, mientras que los ubicados en las posiciones -1620 y -435, así como la caja GATA localizada en la posición -1154, se encuentran conservados en el mono Rhesus. La secuencia de esta caja GATA se encuentra también conservada en la rata, sin embargo, como en el caso anterior, esta secuencia no parece ser reconocida por GATA1 ya que no es clasificada como sitio de unión putativo. Es de interés el que la secuencia de la caja E localizada en el sitio -861 se encuentra conservada en las cuatro especies estudiadas, además de que el complejo transcripcional mantiene el potencial de unión a todos estos motivos.

En conjunto, estos resultados indican que los tres genes estudiados presentan sitios putativos de reconocimiento por complejos transcripcionales que contienen SCL. Sin embargo, derivado del análisis de alineamiento, parece que sólo algunas secuencias son potenciales sitios de unión, es decir, aquellos sitios que se mantienen entre los distintos organismos, los cuales podrían representar motivos conservados funcionalmente activos como regiones reguladoras de la transcripción. A pesar de ello, un análisis de inmunoprecipitación de la cromatina será necesario para identificar de manera concluyente los sitios de unión funcionales.

11.7 Generación de líneas con pérdida de función de SCL

Una vez evaluado el efecto de la sobreexpresión de SCL sobre la diferenciación GABAérgica, decidimos abordar las consecuencias de la inhibición de la expresión de SCL endógeno a través de dos enfoques distintos. En primer lugar, en caso de que SCL juegue un papel esencial en la supervivencia o diferenciación celular, generamos un *knockdown* de SCL. Para este propósito, se clonaron tres secuencias interferentes de manera individual en el vector pLVTHM, que expresa de manera constitutiva la secuencia de interés, así como

la EGFP. Las hESC fueron transducidas ya sea con una combinación de todos ellos, o con un vector portando una secuencia scramble. Tres días después de la transducción, las células que expresaron la EGFP se purificaron mediante citometría para su análisis, siendo éstas alrededor de un 15% del cultivo original. En la Figura 12 se observan las células tras la transducción, en las que se observa que mantienen la morfología de células pluripotenciales, así como la aparición de células EGFP⁺. Tras este proceso de enriquecimiento, diferenciaciones y su análisis se realizarán en células EGFP⁺.

MATRIZ A		NEUROD1	
SCL α /E47	Human -2274	TCGGGCG---TCCCTCTTGCTCAAGAACATCTGACTCCACCATAATTCTCCTG-----T	-2224
	Rhesus -2389	TCGGGCG---TCCCTCTTGCCCAAGAACATCTGACTCCACCATAATTCTCCTG-----T	-2339
	Mouse -2324	TAAAATTCTCTCTCTACTATGAAATAATCTGCCAGCTTCTCTAGAAATAAGTTTCCAG	-2265
	Rat -2259	CCGG-CC---AGGGTCAGGGGCCCGGCGCCGACCTTCTCCGAGCGTTCCGTGTTCCAG	-2205
		* * * * *	
	Human -242	CAGGTCGCGGAGTCTCTAACTGGCGACAGATGGGCCACTTTCTTCTGGCCACAAAGGGG	-183
	Rhesus -345	CAGGTCGCGGAGTCTCTAACTGGCGACAGATGGGCCACTTTCTTCTGGCCACAAAGGGG	-286
	Mouse -334	AAA-----GAACTTCTAACA--TCATTTCAACAAACAGAGA	-299
	Rat -388	CAGGTCGCGGAGTCTCTAACTGGCGACAGATGGGCCACTTTCTTCTGGCCACAAAGGGG	-329
		* * * * *	
SCL/E2A	Human -1725	TAGA-TTAGTACTGTGCGAGGGAAGGCTGCACCTGTCTACCTTCAGACACCGGGGATC----	-1679
	Rhesus -1828	TAGA-TTTGTACTGTGCGAGGGAAGGCTGCACCTGCCACCTTCAGACACCGGGGATC----	-1774
	Mouse -1798	-----TTCATAAATTAACCTTCCCTGCA-----	-1774
	Rat -1767	TGTGCTTAAACCTTCGAGGTTTTTCTGAGGCTCCAGGATTTAACTCAGCACTCCAAA	-1708
		* * * * *	
B		MAP2	
SCL α /E47	Human -1265	AGAA-GGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAACATATCATCTGTCTC--TCAATTCCTTCCTGTAG	-1209
	Rhesus -1198	GCACGTGAAACTGTACAAGCCACACCTCAGAATGTTGGCTGACCTTAAAAACACC--T	-1141
	Mouse -1222	GAAATTCAT-----CTCCTCGATATGGGGGTGATTTTAAAAATACGATC	-1177
	Rat -1301	AAAA-GGAAAAATTT-----TAGTCGTATTCTTGCTAAATTA--ATTACTGAAC	-1254
		* * * * *	
SCL β /E47	Human -385	TGTGCTGGCATTAAACACAAAGGAGACCAGATGATGACATTGATA-----GGCTG--	-336
	Rhesus -439	C-GCCTC-ACAGCGACACAGGGGAGGGGAGCCG-GGGGTCTCTG-----AGGTTGCTC	-389
	Mouse -475	--GATTCAGCTGTGATACAAAGGAAAGGAAAGCAGCGTCTAAGACAGGCGACCCCTCCA	-418
	Rat -518	TTTTTCCAGCA-----GAAGCCAG--AGTGACTTTCAGG-----TTTTGGA	-480
		* * * * *	
GATA1	Human -2293	--TAGACATCAAAAAAGCAGTATGACCCATCTATAGAT-GAGTTAATCCAAAAGCATT	-2237
	Rhesus -2301	TTTTCACT--CTCAGCTTGTGGAGGACCTCCAGCATTATTATCTTT-----CTCCAG-	-2250
	Mouse -2202	-----TGAGCAAGACCT-----GGGTA--ATCATA-----ACACCAG-	-2173
	Rat -2298	----CACATTG-----TGACTATG-CCCTATCCTGTTGT-CTGTTGCAACACACCACT	-2251
		* * * * *	
C		GAD1	
SCL/E2A	Human -1640	CTTGAATGATTT-----AGCACTGGCACCTGGCTCCCTGATTGGTGGGAGGCTCTCGT	-1588
	Rhesus -1659	CTTGAATGATTT-----AGCACTGGCACCTGGCTCCCTGATTGGTGGCAGGCTCTCGT	-1607
	Mouse -1597	CTTGAGTGATT-GACATTAGTCAGTGACACCAGATTCTCTACTGATGTCACTATATCTT	-1539
	Rat -1803	CTTGAGTGATTAGGGATTAATCAGTGACACCCAG-TTCCTGATTGATGTCACTACATCTT	-1745
		* * * * *	
	Human -1095	CGCATAAATAACCCCTGCGTGCTGCACCACCTGGGAGAGGGGAGGACCACCGTAAATA	-1036
	Rhesus -1090	CGCATAAATAACCCCTGCGTGCTGCACCACCGGGGAGAGGGGAGGACCACCGTAAATA	-1031
	Mouse -1053	CACATGAATAAACCG-GTCTGCTGCTCCACAATATGAGG-----GAAATCTCTATGAAA	-1000
	Rat -1250	CACAATAATAAACCC-GTCTGCTGCGCCACAATTGAGA-----GAAATCACTATGAAA	-1197
		* * * * *	
	Human -887	GCGCGTAACCGTCTGGCCAGCAGCTCCAGGTGGGCTCCGCTCGGGCGTGGCGGAGA-	-829
	Rhesus -880	GCGCGTAACCGCTGGCCAGCAGCTCCAGGTGGGCTCCGCTCGGGCGTGGCGGAGA-	-822
	Mouse -856	TTACAGA--GCCTTTCGGGCATCTCCAGGTGTTGTCT-----AGGCGCACAGGGGAAA	-805
	Rat -1077	TTACAGA--GCCTTTCGGGCATCTCCAGGTGATGTGT-----GGGCGCACAGGGGAAA	-1026
		* * * * *	
	Human -462	TGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGTGGCCAGGTGGTACTTTGATGGGGCCAGGGCTGGA	-403
	Rhesus -454	TGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGTGGCCAGGTGGTACTTTGATGAGGCCAGGGCTGGA	-395
	Mouse -460	TTGT---GGTGCCAGGTAGCTGTGTTCAACGAGGTAGTGTGGAGAT-----GGAAGTGA	-409
	Rat -678	TTTT---GGTACCAGGTAGCTGTGTTCAACGAGGTAGTGTGGAGAT-----GAACTGGA	-627
		* * * * *	
GATA1	Human -1181	TGTTTCCATTGTGTTGTGGTGAAGGCGATAAGGCATTCAAAGA-AAACGGACGGGCTC	-1123
	Rhesus -1176	TGTTTCCATTGTGTTGTAGTGAAGGCGATAAGGCATTCAAAGA-AAACGGACGGGCTC	-1118
	Mouse -1140	TGTTTCCGTTGAGTGGTGAAGAGTGCCTAAGATGGTCAAAAAAGAGACAGGCTG	-1081
	Rat -1336	TGTTTCCGTTGAGTGGTGAAGAGTGCCTAAGACAGTCATAGA-AAAGAGACAGGCTG	-1278
		* * * * *	

Figura 11. Alineamiento de regiones promotoras de los genes humanos y sus secuencias homólogas en distintas especies. **A.** Alineamiento del promotor de *NEUROD1*. **B.** Alineamiento de la región promotora de *MAP2*. **C.** Alineamiento del promotor de *GAD1*. Todas las secuencias de humano se presentan alineadas con sus secuencias homólogas en el mono Rhesus, el ratón y la rata. Las secuencias subrayadas en azul representan sitios localizados solo en el humano. Las subrayadas en verde se encuentran conservadas en dos organismos. Finalmente, las secuencias subrayadas en rojo muestran sitios conservados en al menos tres de los organismos. Los números a la izquierda y derecha representan, en el caso de humano, la posición relativa respecto TSS. En los tres organismos restantes representan la posición relativa respecto al primer exón. Se muestra el nombre de la matriz con probable unión a los sitios subrayados. Los asteriscos debajo de cada alineamiento indican los nucleótidos conservados en los cuatro organismos.

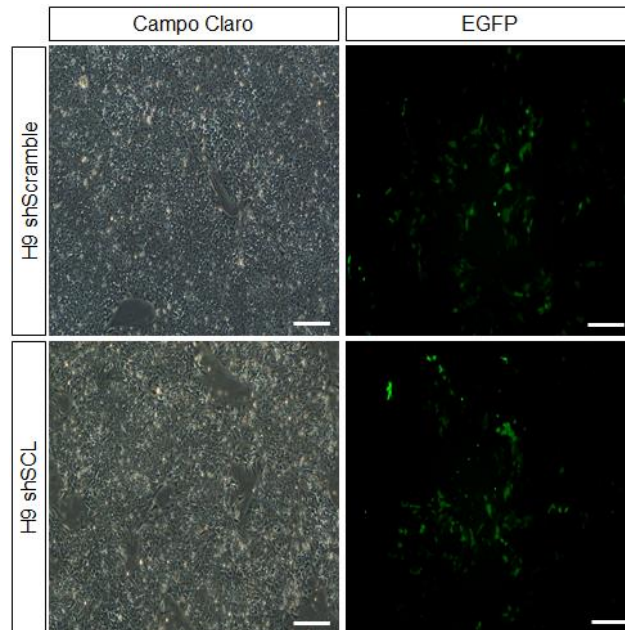


Figura 12. Generación de hESC con *knockdown* de SCL. Imágenes de campo claro y de fluorescencia de la línea H9, la cual fue transducida con las tres secuencias interferentes, o bien con la secuencia *scramble*. Nótese que sólo alrededor del 15% de las células expresan la EGFP. Las barras de escala corresponden a 50 μ M.

Como segunda estrategia, y para abordar de manera más directa el papel de SCL en la diferenciación de hESC hacia neuronas GABAérgicas, decidimos generar una línea *knockout* de SCL, obtenida a través del sistema CRISPR/Cas9. Con este fin, la herramienta <http://crispr.mit.edu> fue utilizada para el diseño de los RNA guías. Como se mencionó previamente, las diferentes isoformas funcionales de SCL contienen invariablemente el

exón 5 y el exón 6, este último codificando el dominio funcional bHLH. Por esta razón, decidimos dirigir los guías a esta región en el DNA. Las secuencias seleccionadas como guías presentan las siguientes características: complementariedad en el extremo 5' del exón, un score elevado, es decir, una probable alta eficiencia de corte, al menos 3 *mismatches* con cualquier otra secuencia del genoma y que sus blancos inespecíficos más probables no fuesen secuencias codificantes. Un mapa de la localización de la secuencia blanco de los guías puede observarse en la Figura 13. Posteriormente, los guías seleccionados fueron clonados individualmente en el vector lentiviral lentiCRISPR v2 (Addgene), insertando la secuencia de interés en los sitios *BsmBI*. Previo a la generación de las partículas lentivirales, los vectores generados fueron secuenciados.

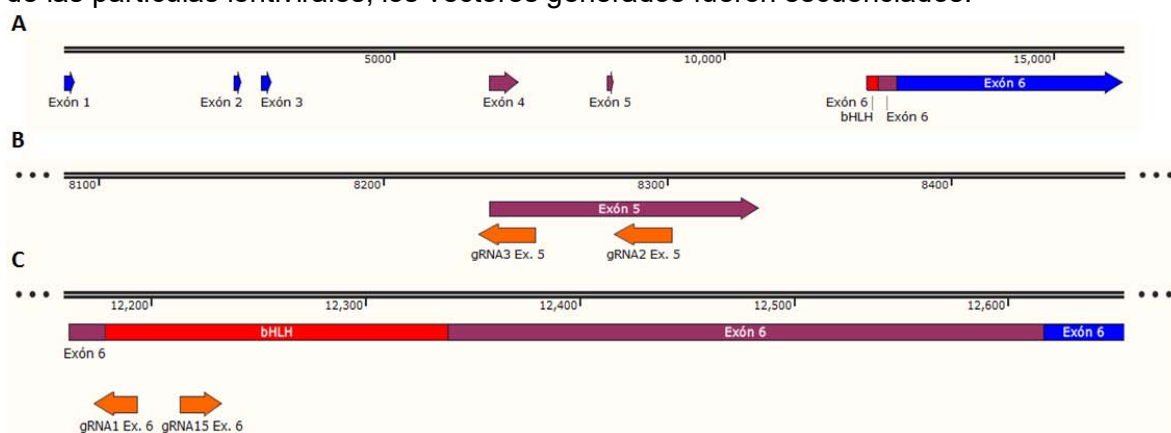


Figura 13. Mapa de localización de las secuencias de los RNA guías utilizados. A. Diagrama del gen *SCL*. Los exones se muestran en azul, mientras que la región codificante se muestra en morado. El dominio bHLH se muestra en rojo. **B.** Detalle de los RNA guía dirigidos al exón 5. Nótese que el gRNA3 tiene complementariedad en la región vecina al intrón 4. **C.** Detalle de los RNA guía dirigidos al exón 6. Nótese que ambos guías presentan complementariedad con la región codificante del dominio funcional bHLH. En ambos casos los guías se resaltan en anaranjado, y la dirección de la flecha hacia la derecha o izquierda indica si el guía se encuentra en la cadena plus o en la cadena minus, respectivamente.

Por tanto, hasta el momento hemos generado la línea con expresión disminuida de *SCL* mediante RNA interferentes, si bien la comprobación del *knockdown* aún debe realizarse. Por otra parte, partículas lentivirales con los vectores necesarios para producir la línea con *knockout* de *SCL* mediante el sistema CRISPR/Cas9 ya han sido generados y transducidos en células H9 WT. La selección de las clonas de interés se está llevando a cabo actualmente. Ambos enfoques de evaluación serán utilizados y con ellos se planea evaluar el efecto de la disminución de la actividad de *SCL* en la diferenciación hacia neuronas GABAérgicas.

XII. DISCUSIÓN

La caracterización de *SCL* como un factor transcripcional indispensable en el surgimiento del linaje hematopoyético, así como en el establecimiento del endotelio durante el desarrollo embrionario, han centrado los estudios funcionales en estos linajes. Sin embargo, recientemente se ha observado la importancia de este gen en el sistema nervioso central, gracias a estudios realizados en organismos como el ratón o el pollo. No obstante, poco es conocido acerca de las funciones que *SCL* podría desempeñar en el desarrollo del sistema nervioso humano, ya que no existen estudios en este sistema. Con este propósito, en este trabajo evaluamos el papel funcional de *SCL* a través de la diferenciación de líneas de células troncales embrionarias de humano hacia el linaje de neuronas GABAérgicas.

Es sabido que *SCL* es imprescindible para la aparición de neuronas GABAérgicas en la región p2 de la médula espinal en desarrollo, así como en algunas regiones del mesencéfalo, en particular la sustancia nigra y el núcleo tegmental ventral del ratón (Achim et al., 2012; Muroyama et al., 2005). Si bien se ha caracterizado a nivel molecular la manera en que esto sucede, el patrón temporal de expresión de *SCL* durante este proceso no ha sido estudiado con detalle (Peng et al., 2007). Para explorar el patrón de expresión de *SCL* en células humanas durante la diferenciación hacia neuronas GABAérgicas, nosotros abordamos esta cuestión a través de la diferenciación de células H9 WT. Como puede apreciarse en la Figura 6A, *SCL* presenta un aumento en su expresión al día 26 de diferenciación, es decir, cuando las neuronas se encuentran en un estado aún inmaduro, evidenciado por la baja expresión de *MAP2*. De esta manera, parece que *SCL* podría conducir a las neuronas inmaduras a adquirir su fenotipo maduro terminal, en este caso, el GABAérgico. Así, los resultados *in vitro* concuerdan con diversos estudios que han considerado a *SCL* como un gen selector terminal (Achim et al., 2013).

Un resultado interesante de nuestro estudio fue mostrar que *SCL* presenta un aumento en su expresión a los días 7 y 12 de diferenciación, es decir, durante el estadio de precursores neurales. Tal aumento es inesperado, dado que los estudios previos no proveen indicios de alguna función de *SCL* durante la diferenciación neural temprana. En un análisis detallado de la expresión de *SCL* en el SNC en desarrollo, se observó su expresión en ciertas zonas del neuroepitelio, en particular en la ZV del cuarto ventrículo, así como en la ZI del mesencéfalo (van Eekelen et al., 2003). La ZV del tubo neural es una zona bien establecida de neurogénesis, donde residen los precursores neurales. Las células en la ZI son precursores postmitóticos que aún no han alcanzado su diferenciación terminal, pero que

la adquieren a medida que migran a través de esta zona (Morest & Silver, 2003). La expresión de SCL en estas zonas del tubo neural podría indicar que es importante en etapas progenitoras durante el desarrollo neural, si bien aún no ha sido determinada una función en particular. Adicionalmente, el aumento en la expresión de SCL coincide con el aumento en la expresión de *NEUROD1*. *NEUROD1* es un marcador de diferenciación neuronal temprana, y su expresión se detecta en el mesencéfalo tan pronto como el día embrionario 9.5 del ratón en desarrollo, momento en el cual la neurogénesis se encuentra en sus etapas iniciales (Lee, 1997). Su expresión conjunta sugiere, por tanto, una posible función de SCL durante la neurogénesis temprana. Esto concuerda con la observación de que la delección condicional de *Scf* en los precursores neurales, produce la pérdida casi total de la expresión de un gen reportero en el mesencéfalo y el rombencéfalo, zonas con expresión característica de *Scf*. Esto se observa ya en el día E12.5 de desarrollo de ratón, sugiriendo que las células se perdieron durante la neurogénesis temprana, además de que la pérdida neuronal se relaciona con una aparente disminución en el número total de neuronas en estas regiones (Bradley et al., 2006). A pesar de que nuestros datos apoyan una posible función durante esta etapa, otros estudios han mostrado que la mutación dirigida de *Scf* en el tejido nervioso no provoca una disminución en el número total de neuronas en la zona p2 de la médula espinal en desarrollo, sino una reasignación del destino final de dichas células (Muroyama et al., 2005). Además, la activación de *Scf* sucede posterior a la activación del gen proneural *Ngn2*, una vez que los precursores neurales han salido del ciclo celular y se transforman en precursores postmitóticos (Herberth et al., 2005). Tales resultados implican que su presencia no es determinante para el establecimiento o para el mantenimiento de los precursores neurales. Estos estudios en su conjunto muestran datos contradictorios, por lo que para determinar la función precisa de SCL en esta etapa del desarrollo neural será necesario llevar a cabo estudios adicionales.

Estudios previos utilizando un mutante nulo de *Olig2*, así como la expresión forzada de *Scf* en el tubo neural, demostraron que *Scf* es suficiente para que neuronas originalmente destinadas a otros subtipos neuronales adopten un fenotipo GABAérgico (Muroyama et al., 2005). Por otra parte, estudios se han llevado a cabo para analizar el efecto de la sobreexpresión de SCL durante la diferenciación hematopoyética a partir de hESC. En el reporte de Real et al. (2012) se demostró que su sobreexpresión genera una mayor cantidad de progenitores hematopoyéticos, así como una mayor cantidad de células sanguíneas, poblaciones celulares en cuyo surgimiento SCL juega un papel crítico (Hall et al., 2003). De manera similar, utilizando el mismo sistema de sobreexpresión en hESC,

nosotros demostramos a través de inmunocitoquímica y de qRT-PCR, que la sobreexpresión de *SCL* no sólo aumenta de manera importante la cantidad de neuronas GABAérgicas hacia el final de la diferenciación, sino que también acelera el surgimiento de este linaje durante el proceso (Figuras 7 y 8). Esto último también fue observado durante la diferenciación hematopoyética. Adicionalmente, dos tipos de resultados de nuestro trabajo favorecen la conclusión de que las neuronas GABAérgicas H9 *SCL* sintetizan mayor cantidad del neurotransmisor GABA. En primer lugar, estas neuronas parecen ser más reactivas a la inmunotinción de GABA, cuando se comparan con las neuronas H9 NEO. En segundo lugar, la expresión de *GAD1*, analizada por qRT-PCR, es significativamente más alta en las neuronas sobreexpresantes al compararlas con las neuronas H9 WT. Si bien ambos resultados favorecen esta deducción, será necesario un análisis cuantitativo de liberación de GABA para demostrar esto de manera concluyente.

En nuestro estudio observamos un aumento transitorio en la expresión de *GAD1* en los precursores neurales, que disminuye en las neuronas inmaduras, para aumentar finalmente hasta sus niveles máximos en neuronas maduras. Este resultado parece incongruente, pues el producto que codifica, es decir, GAD67, es la enzima responsable de la producción de GABA, que debería sintetizarse de manera exclusiva en etapas muy tardías de la diferenciación. Sin embargo, tal observación coincide con otros estudios de diferenciación *in vitro*, en los cuales se observó el inicio de la expresión de *GAD1* muy pronto en la diferenciación, coincidiendo con el inicio de la expresión de *PAX6* y *MASH1*, ambos marcadores de neurogénesis muy temprana (Zhang & Jiao, 2015). Si bien esto es lo que se observa, la expresión de *GAD1* aumenta gradualmente hasta alcanzar su máximo en las neuronas maduras, lo cual coincide con nuestros resultados (Nat et al., 2007). En este sentido, algunos estudios han mostrado la función de GABA durante la neurogénesis temprana en el telencéfalo, en donde incrementa la proliferación de los progenitores neurales en la ZV (Haydar et al., 2000). Sin embargo, la fuente de este GABA no parecen ser los propios precursores neurales de la ZV, sino las células presentes en la placa cortical, zona que presenta alrededor de un 85% de neuronas, algunas de las cuales expresan *GAD1* (Behar et al., 1998). No obstante, esto parece tener poco en común con *SCL*, dado que no se le ha atribuido función alguna en esta región. Estas observaciones, aunadas a nuestros resultados, sugieren que, al menos en cultivo, los precursores neurales comienzan a expresar *GAD1*, lo cual indica la necesidad de llevar a cabo estudios detallados *in vitro* acerca del inicio de la expresión de las enzimas sintetizadoras del neurotransmisor, con el fin de caracterizar fielmente el inicio de su expresión durante la diferenciación neural.

Adicionalmente, la sobreexpresión de *SCL* parece acelerar el curso de la diferenciación neural, como se aprecia al comparar el nivel de expresión de *NEUROD1* y el inicio de la maduración neuronal. Las células H9 *SCL* y las H9 *WT* presentan un aumento importante en la expresión de los genes evaluados en momentos similares. Sin embargo, como puede apreciarse en la Figura 8, la mayoría de los marcadores evaluados presentan una expresión significativamente superior en las células H9 *SCL*. Si bien *OCT4* presenta un aumento transitorio, éste es muy pequeño, y rápidamente decrece. A pesar de que un ligero aumento en la expresión de *OCT4* se relaciona con la diferenciación hacia mesodermo y endodermo (Niwa et al., 2000), el rápido aumento de *NEUROD1* evidencia la diferenciación hacia el linaje neural, por lo que el aumento en la expresión de *OCT4* parece no tener consecuencias remarcables. Más importante es el aumento en la expresión de *NEUROD1*, que llega a expresarse hasta 20 veces más en los precursores neurales H9 *SCL*. Este incremento no se relaciona con un aumento en la cantidad de precursores neurales, pues en este momento alrededor del 96% de las células se encuentran en este estado de diferenciación de manera normal (Figura 4). La expresión de *NEUROD1* señala el inicio de la determinación neuronal, al inducir a los precursores neurales a salir del ciclo celular (Zhang & Jiao, 2015). Por tanto, este aumento parece obedecer a una aceleración en el inicio de la diferenciación de estos precursores, si bien un análisis del porcentaje de células que aún están ciclando en este momento es necesario para confirmar esta hipótesis. Esto último parece coincidente con el hecho de que las células H9 *SCL* presentan niveles de *MAP2* ligeramente mayores cuando comienza su expresión. Finalmente, hacia el final de la diferenciación, las neuronas H9 *SCL* muestran niveles superiores de *MAP2*, siendo estos alrededor de 3 veces más altos que en las neuronas H9 *WT*. Debido a que el porcentaje de neuronas totales no se ve modificado al sobreexpresar *SCL*, tal aumento podría deberse a una mayor formación de neuritas. Como se aprecia en la Figura 7, las neuronas H9 *SCL* parecen presentar una mayor cantidad de neuritas, evidenciado por la presencia de una arborización individual mayor que en las neuronas H9 *NEO*. Debido a que *MAP2* es una proteína de unión a microtúbulos, la cual se expresa principalmente en el cuerpo celular y en las dendritas, su mayor expresión parece señalar una estructura neuronal con un mayor número de conexiones (Fischer et al., 1986; Goedert et al., 1991). Si bien los resultados de reacciones inmunocitoquímicas revelan una mayor cantidad de procesos en las neuronas H9 *SCL*, es necesario realizar un análisis cuantitativo para determinar si efectivamente esto está ocurriendo.

Derivado de los mayores niveles de expresión observados en las células H9 *SCL*, realizamos un análisis *in silico* para determinar posibles sitios de unión a *SCL* en los

promotores de *NEUROD1*, *MAP2* y *GAD1*. Este análisis muestra que todos los promotores analizados presentan secuencias que tienen el potencial de unión a complejos transcripcionales que contienen SCL. Estas secuencias se presentan en dos formas distintas, ya sea como cajas E, o bien como cajas GATA. Como se mencionó anteriormente, los factores transcripcionales de la familia bHLH, en la cual se encuentra SCL, se unen preferentemente como dímeros a las cajas E y, por tanto, estos motivos son directamente reconocidos por el motivo básico presente en SCL (Hsu et al., 1994). Por otra parte, las cajas GATA no son directamente reconocidas por SCL, sino por GATA1. De esta manera, se reclutan a estas secuencias los complejos transcripcionales que contienen GATA1 y SCL (Wadman et al., 1997). Diversos estudios han mostrado que SCL puede activar la transcripción sin unirse directamente al DNA, por lo que ambos motivos son sitios posibles de regulación transcripcional por SCL (Kassouf et al., 2010; Porcher et al., 1999). Posteriormente, y dado que es bien conocido que los elementos biológicamente importantes y funcionales suelen mantenerse conservados entre diferentes especies (Frazer et al., 2004), realizamos un análisis de alineamiento de secuencias de estas regiones promotoras con las secuencias homólogas en otros organismos, para así definir de manera más precisa los sitios que más probablemente desempeñen funciones reguladoras. De esta manera, encontramos que varios sitios se encuentran conservados entre los distintos organismos evaluados, el humano, el mono Rhesus, la rata y el ratón. De particular interés fueron dos motivos altamente conservados. En el promotor de *NEUROD1* se localiza una caja E en la posición -215, la cual se encuentra conservada tanto en el mono Rhesus como en la rata. Además, en ambas especies se conserva el potencial de unión al dímero SCL α /E47. En el caso del promotor de *GAD1*, encontramos una caja E localizada en la posición -861, que de manera notable se encuentra conservada en los cuatro organismos estudiados, en donde se mantiene el potencial de unión al dímero SCL/E2A. Por tanto, los niveles evidentemente superiores de *NEUROD1* y *GAD1* observados en las células H9 SCL podrían ser producto de una mayor activación de la transcripción de estos genes, ello debido a la expresión elevada de SCL que estaría disponible en gran cantidad para unirse a estas posibles regiones reguladoras. Diversos datos sustentan el hecho de que estos sitios podrían ser efectivamente secuencias reguladoras blanco de SCL. En primer lugar, varios estudios de unión de factores de transcripción a secuencias reguladoras, corroboran la utilidad de la herramienta MatInspector en la identificación de sitios de reconocimiento confiables. En particular, los sitios de unión putativos para el factor de transcripción C/EBP α fueron identificados de esta manera en el promotor del miRNA let-

7a-1 en líneas celulares de cáncer de pulmón. Cuando se llevaron a cabo ensayos reporteros con luciferasa utilizando como promotores estos posibles sitios de unión, se observó que éstos efectivamente inducían la actividad de la luciferasa tras la unión de C/EBP α (Lin et al., 2016). De una manera similar, estudiando la región promotora de BRD7, se localizaron sitios putativos de unión a c-Myc, un factor de transcripción que, al igual que SCL pertenece a la familia bHLH. Posteriormente, a través de un ensayo de movilidad electroforética (EMSA, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), se comprobó que c-Myc reconoce esos sitios y se une a ellos (Liu et al., 2008). Por lo tanto, al igual que en estos estudios, los sitios posibles de unión aquí detallados podrían representar efectivamente sitios de regulación funcionales. En segundo lugar, el alto grado de conservación en las secuencias de estos sitios entre los organismos estudiados podría indicar que tales secuencias desempeñan funciones reguladoras. Esto debido a que, con frecuencia, en análisis de comparaciones de secuencias se ha observado que aquellas secuencias no codificantes funcionales se encuentran más altamente conservadas que aquellas que no cumplen funciones reguladoras (Frazer et al., 2003). En tercer lugar, un estudio previo identificó los blancos moleculares funcionales de SCL en el genoma humano utilizando células eritroides primarias, a través de un análisis ChIP-Seq, es decir, la inmunoprecipitación de la cromatina con un anticuerpo dirigido contra SCL, y la posterior secuenciación de todos los fragmentos de cromatina encontrados (Kassouf et al., 2010). Debido al tipo de células utilizadas en el análisis, este estudio solo encontró blancos moleculares con funciones conocidas o potenciales en la eritropoyesis. Sin embargo, uno de los genes en los cuales se encontró a SCL unido en la región promotora es *EPOR*, el receptor de eritropoyetina. De un análisis similar a los anteriores en MatInspector, determinamos que, en el promotor de este gen, en particular en una región de 1 kb río arriba del TSS, se encuentran 2 sitios de unión putativos para SCL. Debido a que el análisis de ChIP-Seq corrobora la unión a la región promotora de este gen, es muy posible que estas sean las secuencias a las cuales se une SCL. En cuarto lugar, se ha demostrado que otro gen selector terminal de neuronas GABAérgicas, *Ptf1a*, el cual actúa en la retina, es capaz de activar directamente a *GAD1* (Dullin et al., 2007). En un análisis de búsqueda en MatInspector encontramos que en la región promotora de *GAD1* existe una secuencia de reconocimiento para PTF1A, la cual probablemente genera esta activación de *GAD1*. A pesar de que no se han definido blancos moleculares precisos de SCL en el linaje GABAérgico, su papel fundamental en el desarrollo de este linaje está bien establecido. Así, genes críticos en este proceso, tales como *GAD1*, deben ser activados por SCL. Por tanto,

tomando en consideración todos estos datos, es altamente probable que los posibles sitios de unión a SCL o a GATA1 sean efectivamente reconocidos por estos factores, participando así como secuencias reguladoras activadoras de la transcripción, si bien es necesario demostrar la unión directa de SCL a estas secuencias en células neurales a través de análisis similares a los realizados en las células eritroides primarias.

En este sentido, a pesar de que las células H9 SCL también expresan de niveles más altos de *MAP2*, el análisis de alineamiento de secuencias muestra que los elementos encontrados en la región promotora de humano no están conservados en los organismos comparados. A pesar de que la caja GATA identificada está conservada en secuencia con la rata, en ésta no parece actuar funcionalmente para la unión de GATA1. Sin embargo, los sitios localizados en los promotores de *NEUROD1* y *GAD1* que sólo se encuentran conservados en humano y en el mono Rhesus, así como los sitios en el promotor de *MAP2* localizados únicamente en humano, podrían representar regiones reguladoras que divergieron evolutivamente entre las diferentes especies, evento que ha sido observado en otras regiones reguladoras (Cuadrado et al., 2001). Por lo tanto, a pesar de que estos posibles sitios reguladores no se encuentran conservados, la elevada expresión de *MAP2* en las células sobreexpresantes de *SCL* podría indicar que estas regiones efectivamente participan en el reclutamiento de SCL, actuando como secuencias reguladoras especie-específicas, por lo que, como se mencionó anteriormente, será necesario llevar a cabo estudios de CHIP-Seq para demostrar si dichas secuencias son funcionales.

Finalmente, el comportamiento de algunos genes muestra un patrón interesante, si bien estos patrones no obedecen a un efecto causado por SCL. En particular, *NESTINA* y *SOX2*, que clásicamente se han utilizado como marcadores de precursores neurales (Zhang & Jiao, 2015). De acuerdo a nuestros resultados, como se observa en la Figura 4, algunas neuronas maduras mantienen la expresión de *SOX2* y *NESTINA*, indicando que dichos marcadores no desaparecen por completo una vez las neuronas han madurado. Esto concuerda con algunos datos obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha observado que durante la diferenciación *in vitro* de neuroesferas obtenidas a partir de la zona subventricular de ratones adultos, las células que expresan *MAP2* o β III-Tubulina mantienen la expresión de *Sox2*, aunque con una disminución clara en la intensidad de fluorescencia comparada con los precursores neurales (Cavallaro et al., 2008). En relación con *nestina*, un análisis detallado de su expresión en el cerebro adulto de rata y de humano reveló que, a lo largo del encéfalo, diversas regiones contienen neuronas (marcadas por la expresión de NeuN o

β III-Tubulina) que expresan también nestina. Tales neuronas parecen encontrarse sólo en regiones del encéfalo involucradas en procesos cognitivos superiores, lo cual sugiere que estas células podrían someter su citoesqueleto a remodelación a través de la expresión de nestina, logrando con ello la plasticidad neural requerida para esas funciones (Hendrickson et al., 2011). Tanto *SOX2* como *NESTINA* se expresan en las células pluripotenciales. *SOX2* es un factor clave en la regulación de la pluripotencia (Zhang, 2014), mientras que la expresión de *NESTINA* es baja en estas células (Noisa et al., 2010). Sin embargo, nosotros observamos niveles de expresión similares a aquellos presentes en los precursores neurales. Por tanto, ambos marcadores parecen mantener una expresión considerable en todo momento de la diferenciación, por lo cual no serían evidencia del surgimiento de los precursores neurales. Por ello, decidimos utilizar el gen *NEUROD1* para rastrear dicha población. Como se observa en la Figura 6, la cantidad detectada en las células pluripotenciales fue prácticamente nula, y durante la diferenciación terminal, que coincide con el aumento en la expresión de *MAP2*, que caracteriza a las neuronas maduras, la expresión disminuye considerablemente, si bien aún se observan niveles bajos, lo que coincide con la observación de que en algunas regiones del cerebro adulto se mantiene una ligera expresión (Lee, 1997). De esta manera, consideramos que *NEUROD1* es un marcador más confiable de la aparición y diferenciación de los precursores neurales.

En este estudio observamos también que el inicio de la expresión de *MAP2* coincide con el aumento de la expresión de *NEUROD1*. A pesar de que los niveles alcanzados son considerablemente más bajos que los vistos en neuronas maduras, esta observación indica que los precursores neurales también expresan *MAP2*. Además, las neuronas inmaduras parecen expresar cantidades inferiores de *MAP2*, como muestra el hecho de que a los 20 y 26 días de diferenciación los niveles son menores a los vistos en los precursores neurales. Esto coincide con resultados obtenidos utilizando otros protocolos de diferenciación, en donde *MAP2* aumenta rápidamente tras el inicio de la diferenciación, aunque en niveles inferiores a los observados en neuronas maduras (Kim et al., 2010; Sundberg et al., 2009). La expresión transitoria de *MAP2* en los precursores neurales concuerda con algunos reportes acerca de que éstos, antes de comprometerse a su destino final, expresan provisionalmente algunos marcadores de neuronas y/o neuroglia, tales como GFAP, GLAST o β III-Tubulina (Morest & Silver, 2003). Debido al gran aumento en *MAP2* que observamos una vez que emergen las neuronas maduras, la expresión de éste permanece como un excelente marcador del surgimiento del linaje neuronal.

XIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo demostramos que el factor transcripcional *SCL* acelera el surgimiento de neuronas GABAérgicas a partir de la diferenciación de hESC, además de incrementar su número al final del proceso de diferenciación utilizado. En ese momento, las células en general parecen presentar una mayor inmunoreactividad para GABA. Además, la sobreexpresión de *SCL* provoca un aumento en la expresión de *NEUROD1* y *GAD1*, genes que además contienen sitios de unión putativos a *SCL* en sus regiones promotoras. Por tanto, *SCL* parece afectar la diferenciación al promover la salida del ciclo celular de los precursores neurales, además de favorecer selectivamente la adquisición del fenotipo GABAérgico en etapas tardías de la diferenciación, como previamente se ha descrito.

Estudios complementarios serán necesarios para establecer de manera concluyente el papel de *SCL* durante la diferenciación neural de hESC. Análisis cuantitativos de liberación de GABA a través de HPLC están siendo llevados a cabo con el fin de observar si efectivamente la sobreexpresión de *SCL* provoca un aumento en la síntesis y liberación de GABA. Dos cuestiones más tendrán que ser abordadas. La primera será tratar de observar si la disminución en la expresión de *SCL* provoca efectos contrarios a los observados con su sobreexpresión, es decir, una disminución en la cantidad de neuronas GABAérgicas. Dicho análisis será llevado a cabo a través de la diferenciación de la línea con *knockdown* generada, así como la línea con *knockout* de *SCL* que se producirá mediante el sistema CRISPR-Cas. La segunda será analizar los efectos que tiene la manipulación de los niveles de *SCL* en la diferenciación hacia neuronas motoras, linaje en el cual se ha observado un efecto represivo de *SCL*. Tales estudios han comenzado a llevarse a cabo, mostrando resultados alentadores hasta el momento. Finalmente, un análisis de inmunoprecipitación de la cromatina, seguido de secuenciación, será necesario para demostrar la unión directa de *SCL* a los sitios de unión putativos en los promotores de los genes evaluados.

Debido a que las interneuronas GABAérgicas constituyen la principal fuente de señales inhibitorias en el SNC, diversas enfermedades neurodegenerativas se asocian con su pérdida. En particular, la degeneración de neuronas GABAérgicas en los ganglios basales en la enfermedad de Huntington, provoca las disfunciones motoras características. Por tanto, la generación de una terapia celular para esta enfermedad requerirá fuentes capaces de producir este tipo neuronal en grandes cantidades. Además, tales esfuerzos se han visto reflejados ya en modelos animales. Así, la generación de grandes cantidades de neuronas GABAérgicas en cultivos como el nuestro permitirán el avance en este campo.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

Achim, K., Peltopuro, P., Lahti, L., Li, J., Salminen, M., Partanen, J. (2012). Distinct developmental origins and regulatory mechanisms for GABAergic neurons associated with dopaminergic nuclei in the ventral mesodiencephalic region. *Development*, 139(13), 2360-2370.

Achim, K., Peltopuro, P., Lahti, L., Tsai, H.-H., Zachariah, A., Astrand, M., ... Partanen, J. (2013). The role of Tal2 and Tal1 in the differentiation of midbrain GABAergic neuron precursors. *Biology Open*, 2(10), 990-997.

Achim, K., Salminen, M., Partanen, J. (2014). Mechanisms regulating GABAergic neuron development. *Cell Mol Life Sci.*, 71(8), 1395-1415.

Aplan, P. D., Begley, C. G., Bertness, V., Nussmeier, M., Ezquerra, A., Coligan, J., Kirsch, I. R. (1990). The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Molecular and Cellular Biology*, 10(12), 6426–6435.

Araki, I., & Nakamura, H. (1999). Engrailed defines the position of dorsal di-mesencephalic boundary by repressing diencephalic fate. *Development*, 126(22), 5127-5135.

Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R. G., Kanbara, N., ... Obata, K. (1997). Cleft palate and decreased brain γ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 6496-6499.

Bayer, S. A., & Altman, J. (1991). Neocortical development. Raven, New York.

Begley, C. G., Aplan, P. D., Denning, S. M., Haynes, B. F., Waldmann, T. A., Kirsch, I. R. (1989). The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 10128–10132.

Behar, T. N., Schaffner, A. E., Scott, C. A., O'Connell, C., Barker, J. L. (1998). Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. *Journal of Neuroscience*, 18(16), 6378–6387.

Bhat, K. M. R., Maddodi, N., Shashikant, C., Setaluri, V. (2006). Transcriptional regulation of human *MAP2* gene in melanoma: role of neuronal bHLH factors and Notch1 signaling. *Nucleic Acids Res.*, 34(13), 3819-3832.

- Bobak, N., Agoston, Z., Schulte, D. (2009). Evidence against involvement of Bmp receptor 1b signaling in fate specification of the chick mesencephalic alar plate at HH16. *Neurosci Lett.*, 461(3), 223-228.
- Bradley, C. K., Takano, E. A., Hall, M. A., Göthert, J. R., Harvey, A. R., Begley, C. G., van Eekelen, J. A. M. (2006). The essential haematopoietic transcription factor Scl is also critical for neuronal development: Conditional Scl-knockout in mouse brain. *European Journal of Neuroscience*, 23(7), 1677-1689.
- Brons, I. G. M., Smithers, L. E., Trotter, M. W. B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva, S. M., ... Vallier, L. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448(7150), 191-195.
- Brown, L., Cheng, J. T., Chen, Q., Siciliano, M. J., Crist, W., Buchanan, G., Baer, R. (1990). Site-specific recombination of the tal-1 gene is a common occurrence in human T cell leukemia. *The EMBO Journal*, 9(10), 3343.
- Bruhl, T., Urbich, C., Aicher, D., Acker-Palmer, A., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (2004). Homeobox A9 transcriptionally regulates the EphB4 receptor to modulate endothelial cell migration and tube formation. *Circulation research*, 94(6), 743–751.
- Bu, D. F., & Tobin, A. J. (1994). The exon-intron organization of the genes (GAD1 and GAD2) encoding two human glutamate decarboxylases (GAD67 and GAD65) suggest that they derive from a common ancestral GAD. *Genomics*, 21(1), 222-228.
- Byrne, J. A., Pedersen, D. A., Clepper, L. L., Nelson, M., Sanger, W. G., Gokhale, S., ... Mitalipov, S. M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 450(7169), 497-502.
- Castro D. S., Martynoga, B., Parras, C., Ramesh, V., Pacary, E., Johnston, C., ... Guillemot, F. (2011). A novel function of the proneural factor Ascl1 in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes Dev.*, 25(9), 930-945.
- Cavallaro, M., Mariani, J., Lancini, C., Latorre, E., Caccia, R., Gullo, F., ... Nicolis, S. K. (2008). Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development*, 135(3), 541-557.

- Chen, G., Gulbranson, D. R., Hou, Z., Bolin, J. M., Routti, V., Probasco, M., D., ... Thomson, R. W. (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature Methods*, 8(5), 424-431.
- Chen, Y., Dong, E., Grayson, D. R. (2011). Analysis of the GAD1 promoter: Trans-acting factors and DNA methylation converge on the 5' untranslated region. *Neuropharmacology*, 60(7-8):1075-1087.
- Cheng, J. T., Cobb, M. H., Baer, R. (1993). Phosphorylation of the TAL1 oncoprotein by the extracellular-signal-regulated protein kinase ERK1. *Molecular and Cellular Biology*, 13(2), 801–808.
- Correia, N. C., Durinck, K., Leite, A. P., Ongenaert, M., Rondou, P., Speleman, F., ... Barata, J. T. (2013). Novel TAL1 targets beyond protein-coding genes: identification of TAL1-regulated microRNAs in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 27(7), 1603-1606.
- Costa, G., Mazan, A., Gandillet, A., Pearson, S., Lacaud, G., Kouskoff, V. (2012). SOX7 regulates the expression of VE-cadherin in the haemogenic endothelium at the onset of haematopoietic development. *Development*, 139(9), 1587-1598.
- Courtial, N., Smink, J. J., Kuvardina, O. N., Leutz, A., Gothert, J. R., Lausen, J. (2012). Tal1 regulates osteoclast differentiation through suppression of the master regulator of cell fusion DC-STAMP. *The FASEB Journal*, 26(2), 523-532.
- Cowan, C. A. (2005). Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells. *Science*, 309(5739), 1369-1373.
- Cuadrado, M., Sacristán, M., Antequera, F. (2001). Species-specific organization of CpG island promoters at mammalian homologous genes. *EMBO Rep.*, 2(7), 586-592.
- Dasen, J. S., & Jessell, T. M. (2009). Hox networks and the origins of motor neuron diversity. *Current Topics in Developmental Biology*, 88, 169–200
- Deb-Rinker, P., Ly, D., Jezierski, A., Sikorska, M., Walker, P. R. (2005). Sequential DNA Methylation of the Nanog and Oct-4 Upstream Regions in Human NT2 Cells during Neuronal Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6257-6260.
- Dey, S., Curtis, D. J., Jane, S. M., Brandt, S. J. (2010). The TAL1/SCL Transcription Factor Regulates Cell Cycle Progression and Proliferation in Differentiating Murine Bone Marrow Monocyte Precursors. *Molecular and Cellular Biology*, 30(9), 2181-2192.

- Dhami, P., Bruce, A. W., Jim, J. H., Dillon, S. C., Hall, A., Cooper, J. L., ... Vetrie, D. (2010). Genomic Approaches Uncover Increasing Complexities in the Regulatory Landscape at the Human SCL (TAL1) Locus. *PLoS ONE*, 5(2), e9059.
- Diao, H., Li, X., Hu, S., Liu, Y. (2012). Gene Expression Profiling Combined with Bioinformatics Analysis Identify Biomarkers for Parkinson Disease. *PLoS ONE*, 7(12), e52319.
- Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., Storey, K. (2003). Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neuron pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron*, 40(1), 65-79.
- Do, J. T., & Schöler, H. R. (2004). Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem cells*, 22(6), 941–949.
- Dullin, J. P., Locker, M., Robach, M., Henningfeld, K. A., Parain, K., Afelik, S., ... Perron, M. (2007). Ptf1a triggers GABAergic neuronal cell fates in the retina. *BMC Dev Biol.*, 7:110.
- Elefanty, A. G., Begley, C. G., Hartley, L., Papaevangeliou, B., Robb, L. (1999). SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood*, 94(11), 3754–3763.
- Fernández-Garre, P., Rodríguez-Gallardo, L., Gallego-Díaz, V., Alvarez, I. S., Puellas, L. (2002). Fate map of the chicken neural plate at stage 4. *Development*, 129(12), 2807-2822.
- Fischer, I., Shea, T. B., Sapirstein, V. S., Kosik, K. (1986). Expression and distribution of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in neuroblastoma and primary neuronal cells. *Developmental Brain Research*, 390(1), 99-109.
- Frazer, K. A., Elnitski, L., Church, D. M., Dubchak, I., Hardison, R. C. (2003). Cross-species sequence comparisons: a review of methods and available resources. *Genome Res.*, 13(1), 1-12.
- Frazer, K. A., Tao, H., Osoegawa, K., de Jong, P. J., Chen, X., Doherty, M. F., Cox, D. R. (2004). Noncoding sequences conserved in a limited number of mammals in the *SIM2* interval are frequently functional. *Genome Res.*, 14(3), 367-372.
- García-López, R., Pombero, A., Martínez, S. (2009). Fate map of the chick embryo neural tube. *Dev. Growth Differ.*, 51(3), 145-165.

- Gilbert, S. F. (2010). *Developmental biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Goedert, M., Crowther, R. A., Garner, C. C. (1991). Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends in Neurosciences*, 14(5), 193-199.
- Gonchar, Y., & Burkhalter, A. (1997). Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex*, 7(4), 347-358.
- Gottgens, B., Broccardo, C., Sanchez, M.J., Deveaux, S., Murphy, G., Gothert, J. R., ... Green, A. R. (2004). The scl +18/19 Stem Cell Enhancer Is Not Required for Hematopoiesis: Identification of a 5' Bifunctional Hematopoietic-Endothelial Enhancer Bound by Fli-1 and Elf-1. *Molecular and Cellular Biology*, 24(5), 1870-1883.
- Guimera, J., Weisenhorn, D. V., Wurst, W. (2006). Megane/Heslike is required for normal GABAergic differentiation in the mouse superior colliculus. *Development*, 133(19), 3847-3857.
- Gross, M. K., Dottori, M., Goulding, M. (2002). Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron*, 34(4), 535-549.
- Hall, M. A., Curtis, D. J., Metcalf, D., Elefanty, A. G., Sourris, K., Robb, L., ... Begley, C. G. (2003). The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 992-997.
- Hall, V. J., Compton, D., Stojkovic, P., Nesbitt, M., Herbert, M., Murdoch, A., Stojkovic, M. (2006). Developmental competence of human in vitro aged oocytes as host cells for nuclear transfer. *Human Reproduction*, 22(1), 52-62.
- Haydar, T. F., Wang, F., Schwartz, M. L., Rakic, P. (2000). Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *Journal of Neuroscience*, 20(15), 5764-5774.
- Hendrickson, M. L., Rao, A. J., Demerdash, O. N. A., Kalil, R. E. (2011). Expression of Nestin by Neural Cells in the Adult Rat and Human Brain. *PLoS ONE*, 6(4), e18535.
- Henke, R. M., Savage, T. K., Meredith, D. M., Glasgow, S. M., Hori, K., Dumas, J., ... Hohnson, J. E. Neurog2 is a direct downstream target of the Ptf1a-Rbpj transcription complex in dorsal spinal cord. *Development*, 136(17), 2945-2954.

Herberth, B., Minkó, K., Csillag, A., Jaffredo, T., Madarász, E. (2005). SCL, GATA-2 and Lmo2 expression in neurogenesis. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(5), 449-463.

Hoppe, P. C., & Illmensee, K. (1982). Full-term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei into fertilized mouse eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(6), 1912–1916.

Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., ... Deng, H. (2013). Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science*, 341(6146), 651-654.

Hsu, H. L., Cheng, J. T., Chen, Q., Baer, R. (1991). Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 11(6), 3037–3042.

Hsu, H. L., Huang, L., Tsan, J. T., Funk, W., Wright, W. E., Hu, J. S., ... Baer, R. (1994). Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 14(2), 1256–1265.

Jessell, T. M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet.*, 1(1): 20-29.

Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 458(7239), 771-775.

Kannagi, R., Cochran, N. A., Ishigami, F., Hakomori, S., Andrews, P., Knowles, B. B., Solter, D. (1983). Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and-4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *The EMBO Journal*, 2(12), 2355.

Karfunkel, P. (1974). The mechanisms of neural tube formation. *Int Rev Cytol.*, 38(0), 245-271.

Kassouf, M. T., Hughes, J. R., Taylor, S., McGowan, S. J., Soneji, S., Green, A. L., ... Porcher, C. (2010). Genome-wide identification of TAL1's functional targets: Insights into its mechanisms of action in primary erythroid cells. *Genome Research*, 20(8), 1064-1083.

- Kim, Y. H., Chung, J.-I., Woo, H. G., Jung, Y. S., Lee, S. H., Moon, C. H., ... Baik, E. J. (2010). Differential regulation of proliferation and differentiation in neural precursor cells by the Jak pathway. *Stem cells*, 28(10), 1816–1828.
- Klug, M. G., Soonpaa, M. H., Koh, G. Y., Field, L. J. (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *Journal of Clinical Investigation*, 98(1), 216.
- Kolodziej, S., Kuvardina, O. N., Oellerich, T., Herglotz, J., Backert, I., Kohrs, N., ... Lausen, J. (2014). PADI4 acts as a coactivator of Tal1 by counteracting repressive histone arginine methylation. *Nature Communications*, 5:3995.
- Kriks, S., Shim, J. W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., ... Studer, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 480(7378), 547-551.
- Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D. C., ... Gage, F. H. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci.*, 12(9), 1097-1105.
- Lawson, K. A., Meneses, J. J., Pedersen, R. A. (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*, 113(3), 891-911.
- Ledent, V., & Vervoort, M. (2001). The basic helix-loop-helix protein family: Comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res.*, 11(5), 754-770.
- Lee, J. E. (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol.*, 7(1), 13-20.
- Lewis, K. E. (2005). How do genes regulate simple behaviours? Understanding how different neurons in the vertebrate spinal cord are genetically specified. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 361(1465), 45-66.
- Lin, Y., Zhao, J., Hu, X., Wang, L., Liang, L., Chen, W. (2016). Transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha up-regulates microRNA let-7a-1 in lung cancer cells by direct binding. *Cancer Cell Int.*, 16:17.
- Liu, A., & Niswander, L. A. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci.*, 6(12), 945-954.

Liu, H., Zhou, M. Luo, X., Zhang, L., Niu, Z., Peng, C., ... Li, G. (2008). Transcriptional regulation of BRD7 expression by Spl and c-Myc. *BMC Mol Biol.*, 9:111.

Liu, J. P., Laufer, E., Jessell, T. M. (2001). Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron*, 32(6), 997-1012.

Ma, H., Folmes, C. D. L., Wu, J., Morey, R., Mora-Castilla, S., Ocampo, A., ... Mitalipov, S. (2015). Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease. *Nature*, 524(7564), 234-238.

Ma, L., Hu, B., Liu, Y., Vermilyea, S. C., Liu, H., Gao, L., ... Zhang, S. C. (2012). Human Embryonic Stem Cell-Derived GABA Neurons Correct Locomotion Deficits in Quinolinic Acid-Lesioned Mice. *Cell Stem Cell*, 10(4), 455-464.

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7634–7638.

Massari, M. E., & Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), 429–440.

Matise, M. P., & Joyner, A. L. (1997). Expression patterns of developmental control genes in normal and Engrailed-1 mutant mouse spinal cord reveal early diversity in developing interneurons. *J Neurosci.*, 17(20), 7805-7816.

Matsunaga, E., Araki, I., Nakamura, H. (2000). Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development*, 127(11), 2357-2365.

McIntire, S. L., Reimer, R. J., Schuske, K., Edwards, R. H., Jorgensen, E. M. (1997). Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*, 389(6653), 870-876.

Mitalipov, S. M., Yeoman, R. R., Nusser, K. D., Wolf, D. P. (2002). Rhesus monkey embryos produced by nuclear transfer from embryonic blastomeres or somatic cells. *Biology of Reproduction*, 66(5), 1367–1373.

Mizuguchi, R., Kriks, S., Cordes, R., Gossler, A., Ma, Q., Goulding, M. (2006). Ascl1 and Gsh1/2 control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons. *Nat Neurosci.*, 9(6), 770-778.

Morest, D. K., & Silver, J. (2003). Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: What are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia*, 43(1), 6-18.

Muroyama, Y., Fujiwara, Y., Orkin, S. H., Rowitch, D. H. (2005). Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube. *Nature*, 438(7066), 360-363.

Nakamura, H., & Watanabe, Y. (2005). Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon. *Int J Dev Biol.*, 49(2-3), 231-235.

Nat, R., Nilbratt, M., Narkilahti, S., Winblad, B., Hovatta, O., Nordberg, A. (2007). Neurogenic neuroepithelial and radial glial cells generated from six human embryonic stem cell lines in serum-free suspension and adherent cultures. *Glia*, 55(4), 385-399.

Nichols, J., & Smith, A. (2009). Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell*, 4(6), 487-492.

Nie, L., Wu, H., Sun, X. H. (2008). Ubiquitination and Degradation of Tal1/SCL Are Induced by Notch Signaling and Depend on Skp2 and CHIP. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 684-692.

Niwa, H., Miyazaki, J. I., Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4), 372-376.

Noisa, P., Urrutikoetxea-Uriguen, A., Li, M., Cui, W. (2010). Generation of Human Embryonic Stem Cell Reporter Lines Expressing GFP Specifically in Neural Progenitors. *Stem Cell Reviews and Reports*, 6(3), 438-449.

Ogilvy, S., Ferreira, R., Piltz, S. G., Bowen, J. M., Gottgens, B., Green, A. R. (2007). The SCL +40 Enhancer Targets the Midbrain Together with Primitive and Definitive Hematopoiesis and Is Regulated by SCL and GATA Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 27(20), 7206-7219.

Org, T., Duan, D., Ferrari, R., Montel-Hagen, A., Van Handel, B., Kerényi, M. A., ... Mikkola, H. K. (2015). Scl binds to primed enhancers in mesoderm to regulate hematopoietic and cardiac fate divergence. *The EMBO Journal*, 34(6), 759-777.

Palamarchuk, A., Efanov, A., Maximov, V., Aqeilan, R. I., Croce, C. M., Pekarsky, Y. (2005). Akt phosphorylates Tal1 oncoprotein and inhibits its repressor activity. *Cancer Research*, 65(11), 4515-4519.

- Palomero, T. (2006). Transcriptional regulatory networks downstream of TAL1/SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 108(3), 986-992.
- Peltopuro, P., Kala, K., Partanen, J. (2010). Distinct requirements for Ascl1 in subpopulations of midbrain GABAergic neurons. *Dev Biol.*, 343(1-2), 63-70.
- Peng, C. Y., Yajima, H., Burns, C. E., Zon, L. I., Sisodia, S. S., Pfaff, S. L., Sharma, K. (2007). Notch and MAML Signaling Drives Scl-Dependent Interneuron Diversity in the Spinal Cord. *Neuron*, 53(6), 813-827.
- Pillai, A., Mansouri, A., Behringer, R., Westphal, H., Goulding, M. (2007). Lhx1 and Lhx2 maintain the inhibitory-neurotransmitter status of interneurons in the dorsal spinal cord. *Development*, 134(2), 357-366.
- Porcher, C., Liao, E. C., Fujiwara, Y., Zon, L. I., Orkin, S. H. (1999). Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development*, 126(20), 4603–4615.
- Prasad, K. S., & Brandt, S. J. (1997). Target-dependent effect of phosphorylation on the DNA binding activity of the TAL1/SCL oncoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), 11457–11462.
- Pulford, K., Lecointe, N., Leroy-Viard, K., Jones, M., Mathieu-Mahul, D., Mason, D. Y. (1995). Expression of TAL-1 proteins in human tissues. *Blood*, 85(3), 675–684.
- Rao, M. S., & Jacobson, M. (2005). *Developmental neurobiology*. Kluwer Academic/Plenum, New York.
- Real, P. J., Ligeró, G., Ayllón, V., Ramos-Mejía, V., Bueno, C., Gutiérrez-Aranda, I., ... Menéndez, P. (2012). SCL/TAL1 Regulates Hematopoietic Specification From Human Embryonic Stem Cells. *Molecular Therapy*, 20(7), 1443-1453.
- Ribes, V. & Briscoe, J. (2009). Establishing and interpreting graded sonic hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1(2): a002014.
- Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Köntgen, F., Harvey, R. P., ... Begley, C. G. (1995). Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(15), 7075–7079.

- Sauer, F. C. (1935). Mitosis in the neural tube. *J Comp Neuro.*, 61(2), 377-405.
- Schuh, A. H., Tipping, A. J., Clark, A. J., Hamlett, I., Guyot, B., Iborra, F. J., ... Porcher, C. (2005). ETO-2 Associates with SCL in Erythroid Cells and Megakaryocytes and Provides Repressor Functions in Erythropoiesis. *Molecular and Cellular Biology*, 25(23), 10235-10250.
- Shirasaki, R., & Pfaff, S. L. (2002). Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu Rev Neurosci.*, 25, 251-281.
- Silberstein, L., Sánchez, M. J., Socolovsky, M., Liu, Y., Hoffman, G., Kinston, S., ... Göttgens, B. (2005). Transgenic Analysis of the Stem Cell Leukemia +19 Stem Cell Enhancer in Adult and Embryonic Hematopoietic and Endothelial Cells. *Stem Cells*, 23(9), 1378-1388.
- Smith, E., Hargrave, M., Yamada, T., Begley, CG., Little, M. H. (2002). Coexpression of SCL and GATA3 in the V2 interneurons of the developing mouse spinal cord. *Dev Dyn*, 224(2), 231-237.
- Solter, D., & Knowles, B. B. (1978). Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(11), 5565–5569.
- Sundberg, M., Jansson, L., Ketolainen, J., Pihlajamäki, H., Suuronen, R., Skottman, H., ... Narkilahti, S. (2009). CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 2(2), 113-124.
- Surani, M., & Barton, S. C. (1984). Spatial distribution of blastomeres is dependent on cell division order and interactions in mouse morulae. *Dev Biol.*, 102(2), 335-343.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., ... Mitalipov, S. (2013). Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell*, 153(6), 1228-1238.
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology*, 11(19), 1553–1558.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861-872.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663-676.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2015). A developmental framework for induced pluripotency. *Development*, 142(19), 3274-3285.

Terme, J. M., Lhermitte, L., Asnafi, V., Jalinot, P. (2009). TGF- induces degradation of TAL1/SCL by the ubiquitin-proteasome pathway through AKT-mediated phosphorylation. *Blood*, 113(26), 6695-6698.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147.

Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7844–7848.

Tripic, T., Deng, W., Cheng, Y., Zhang, Y., Vakoc, C. R., Gregory, G. D., ... Blobel, G. A. (2009). SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes. *Blood*, 113(10), 2191-2201.

Vallier, L., Alexander, M., Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 118(19), 4495-4509.

van Eekelen, J. A. ., Bradley, C. ., Göthert, J. ., Robb, L., Elefanty, A. ., Begley, C. ., Harvey, A. . (2003). Expression pattern of the stem cell leukaemia gene in the CNS of the embryonic and adult mouse. *Neuroscience*, 122(2), 421-436.

Visvader, J. E., Fujiwara, Y., Orkin, S. H. (1998). Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes & Development*, 12(4), 473–479.

Wadman, I. A., Osada, H., Grütz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A., & Rabbitts, T. H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid,

DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *The EMBO Journal*, 16(11), 3145–3157.

Watanabe, Y., & Nakamura, H. (2000). Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by Sonic hedgehog. *Development*, 127(5), 1131-1140.

Wiles, M. V., & Keller, G. (1991). Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development*, 111(2), 259–267.

Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., ... Nagy, A. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458(7239), 766-770.

Wright, W. E. (1996). Telomerase Activity in Human Germine and Embryonic Tissues and Cells. *Developmental genetics*, 18, 173–179.

Wu, J., & Izpisua, J. C. (2015). Dynamic Pluripotent Stem Cell States and Their Applications. *Cell Stem Cell*, 17(5), 509-525.

Yao, S. (2004). Retrovirus Silencing, Variegation, Extinction, and Memory Are Controlled by a Dynamic Interplay of Multiple Epigenetic Modifications. *Molecular Therapy*, 10(1), 27-36.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., Thomson, J. A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science*, 324(5928), 797-801.

Zhang, J., & Jiao, J. (2015). Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *BioMed Research International*, 2015:727542, 1-14.

Zhang, S. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 305.

Zhen, F., Lan, Y., Yan, B., Zhang, W., & Wen, Z. (2013). Hemogenic endothelium specification and hematopoietic stem cell maintenance employ distinct Scl isoforms. *Development*, 140(19), 3977-3985.

Zhou, Y., Kurukuti, S., Saffrey, P., Vukovic, M., Michie, A. M., Strogantsev, R., ... Vetrie, D. (2013). Chromatin looping defines expression of TAL1, its flanking genes, and regulation in T-ALL. *Blood*, 122(26), 4199–4209.