



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ABLACIÓN GENÉTICA DE LA CINASA REGULADA POR SEÑAL DE  
APOPTOSIS 1 (ASK1) EN NEURONAS HUMANAS DERIVADAS DE CÉLULAS  
TRONCALES EMBRIONARIAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Nuri Acevedo Garduño

TUTOR PRINCIPAL  
[Dr. Luis B. Tovar y Romo](#)  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
[Dra. Paula Licona Limón, Instituto de Fisiología Celular](#)  
[Dr. Adolfo López Ornelas, Hospital Juárez de México](#)

Ciudad de México. Mayo, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*“All these things had to be worked and learned through errors and trials, burnt fingers and fetid clouds that sent me running outside to cough in the garden.”*

- Madeline Miller, CIRCE

## Agradecimientos académicos

Este proyecto se realizó bajo la dirección del Dr. Luis B. Tovar y Romo en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (A1-S-13219) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (PAPIIT IN214723).

Durante mis estudios de maestría en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas recibí la beca nacional del CONACyT (1145636). Adicionalmente, recibí un apoyo por el Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para llevar a cabo una estancia de investigación en el laboratorio del Dr. Francisco Quintana en el Hospital Brigham and Women's Hospital de la Facultad de Medicina de Harvard en Boston, Massachusetts, Estados Unidos, durante el periodo de abril a junio de 2023.

Agradezco las facilidades brindadas para la realización del trabajo experimental de la Q.F.B Cristina Aranda Fraustro, de la Dra. Blanca Ruiz Medina, de la Dra. Ruth Rincón Heredia de la Unidad de Imagenología y de la Dra. Laura Ongay-Larios de la Unidad de Biología Molecular del IFC.

Quiero expresar mi gratitud hacia el Dr. Luis Tovar por su orientación y el excelente grupo de investigación al que tuve el honor de unirme, ya que esto ha sido de gran ayuda para mi formación académica.

Asimismo, deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Ricardo Tapia, quien, a pesar de las difíciles circunstancias mundiales y personales, fue un excelente tutor durante el tiempo en que formé parte de su grupo de investigación.

También quiero expresar mi agradecimiento por las valiosas contribuciones que realizaron los Dres. Paula Licona Limón y Adolfo López Ornelas, miembros de mi Comité tutorial, en el desarrollo y mejora de mi proyecto de investigación.

Por último, quisiera expresar mi agradecimiento hacia el Jurado de Grado, conformado por los Dres. Iván Velasco Velázquez, Mayra Furlan Magaril, Gohar Gevorgyan, Gustavo Pedraza Alva y Angélica Zepeda Rivera, por la revisión y los valiosos comentarios realizados a mi tesis.

## Agradecimientos personales

Quiero agradecer a toda mi familia por su apoyo incondicional en las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida personal y académica, ya que su respaldo ha sido fundamental para lograr mis objetivos. En especial, agradezco a mi mamá por estar siempre presente para mí y por ser un modelo a seguir como mujer. A mi papá por su preocupación y cuidado hacia mí, y a mi abuelo por compartir sus consejos y experiencias, sin las cuales nada tendría sentido. Les agradezco a cada uno de ellos su paciencia y amor incondicional al llevarme al laboratorio los fines de semana y esperar a que hiciera el cambio de medio, particularmente a Uri.

A Morgan, quien fue y siempre será el amor de mi vida. Sin ti, no estaría donde estoy ahora, siempre te recordaré con mucho amor y cariño. A Bonnie por hacerme muy feliz y, de paso, ayudarme a dormir y aliviar el estrés con sus ocurrencias. Por último, a Lorenza por ser tan tierna e hiperactiva.

A mí porque que no fue fácil llegar a este punto de mi vida. A veces me frustraba cuando las células se contaminaban, no se editaban o cuando un reactivo tardaba meses en llegar. A pesar de eso, ahora no me imagino haciendo otra cosa en la vida.

Quisiera agradecer a Fernando por estar para mí en las buenas y en las malas. A pesar de los desafíos que se presentaron en el laboratorio, sus consejos y experiencia fueron fundamentales para llevar a cabo los experimentos y sobrellevar el fracaso. Sin embargo, lo más valioso de nuestra relación es la oportunidad de estar con alguien con quien puedo ser yo, además de compartir momentos de risas y diversión (guiño).

Gracias también a todas las integrantes del círculo de lectura ya que me hicieron sentir parte de una comunidad donde podía compartir mis ideas y sentimientos libremente.

Por último, agradezco a todos mis amigos, en especial a Fer, Emilio, Hector, Chars, Mariana y Vale, así como al hombrecillo, al tren, a la chancera y a la fani, ya que ser parte de la organización fue la mejor cosa que me pasó durante la carrera y la maestría. Aprecio profundamente su disposición a escucharme cuando lo necesité, así como su paciencia con mis horarios y mis planes desorganizados. Su amistad ha sido fundamental para mantenerme motivada y feliz a lo largo de este camino



## Índice

<b>Agradecimientos académicos</b> .....	<b>I</b>
<b>Agradecimientos personales</b> .....	<b>II</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>3</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>6</b>
<b>Isquemia cerebral</b> .....	<b>6</b>
Epidemiología .....	6
Fisiopatología .....	7
<b>Apoptosis</b> .....	<b>10</b>
<b>Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs)</b> .....	<b>11</b>
<b>Cinasa regulada por señal de apoptosis 1 (ASK1)</b> .....	<b>12</b>
Función.....	12
Estructura.....	13
Interacciones.....	14
<b>Modelos experimentales</b> .....	<b>16</b>
<b>Células troncales embrionarias humanas</b> .....	<b>17</b>
<b>CRISPR-Cas9</b> .....	<b>20</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>22</b>
<b>ASK1 en la isquemia</b> .....	<b>22</b>
<b>VEGF y ASK1 en la isquemia</b> .....	<b>22</b>
<b>Akt y ASK1 en la isquemia cerebral</b> .....	<b>23</b>
<b>ASK1 y la sobrevivencia celular tras la isquemia</b> .....	<b>23</b>
<b>Antecedentes del laboratorio</b> .....	<b>24</b>
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>27</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>27</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>27</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>Diseño Experimental</b> .....	<b>28</b>

<b>Expansión de hESC</b> .....	<b>28</b>
<b>Criopreservación</b> .....	<b>28</b>
<b>CRISPR-Cas9</b> .....	<b>28</b>
Diseño de guías .....	29
Formación de los complejos de RNP .....	29
Nucleofección de los complejos de RNP preformados .....	29
Validación.....	30
<b>Inmunocitoquímica</b> .....	<b>33</b>
<b>Diferenciación de hESC a neuronas dopaminérgicas</b> .....	<b>34</b>
<b>Inducción de privación de glucosa y oxígeno (OGD)</b> .....	<b>35</b>
<b>Viabilidad celular a partir de actividad metabólica:</b> .....	<b>35</b>
<b><i>Resultados</i></b> .....	<b>36</b>
<b>Edición genética en hESC con el sistema CRISPR-Cas9</b> .....	<b>36</b>
<b>Pluripotencia de la línea H9 editada</b> .....	<b>40</b>
<b>Off-targets</b> .....	<b>41</b>
<b>Diferenciación a neuronas dopaminérgicas</b> .....	<b>41</b>
<b>OGD y actividad metabólica de neuronas</b> .....	<b>44</b>
<b><i>Discusión</i></b> .....	<b>45</b>
<b><i>Perspectivas</i></b> .....	<b>49</b>
<b><i>Conclusión</i></b> .....	<b>52</b>
<b><i>Referencias</i></b> .....	<b>53</b>
<b><i>Apéndice</i></b> .....	<b>64</b>
<b>Caracterización de la activación de ASK1</b> .....	<b>64</b>



## Resumen

El infarto cerebral isquémico es la segunda causa de discapacidad a nivel mundial, representando un problema de salud pública. Se produce como resultado de la obstrucción temporal de una o varias arterias que irrigan al cerebro, lo que reduce temporal o permanentemente el flujo sanguíneo, limitando así el paso de oxígeno y nutrientes hacia el área cerebral afectada. La disfunción en los procesos energéticos desencadena múltiples mecanismos y vías de señalización en las regiones afectadas, incluyendo la apoptosis, una de las vías de muerte celular que se activan en respuesta a la isquemia. Diversas proteínas, como la cinasa regulada por señal de apoptosis 1 (ASK1), están implicadas en este proceso. ASK1 se activa en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que lleva a apoptosis a través de la activación de las vías de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) p38 y cinasa c-Jun N-terminal (JNK). Sin embargo, la naturaleza multidomínios de ASK1 le confiere la capacidad de interactuar con múltiples proteínas que regulan su función, de tal forma que es posible que actúe como un switch molecular entre vías de muerte y supervivencia celular. Para evaluar esta posibilidad, planteamos la construcción de un modelo knockout (KO) del gen de ASK1 en células troncales embrionarias humanas (hESC) utilizando el sistema CRISPR-Cas9. Nuestra estrategia de edición consistió en la introducción de dos guías RNA (gRNA). Debido a la baja eficiencia de edición en las hESC, llevamos a cabo varias rondas de edición, lo que resultó en una disminución gradual de la expresión de ASK1 incluso en una población heterogénea. Además, demostramos que nuestra metodología no afectó el estado de pluripotencia de las hESC. En resumen, la combinación de esta línea celular con su posterior diferenciación a un linaje neuronal, mediante un protocolo de diferenciación dopaminérgica de placa de piso, nos permitirá evaluar el papel de ASK1 en la fisiología de la muerte neuronal por isquemia en un modelo con mayor validez fisiológica.

## Abstract

Ischemic stroke is the second leading cause of global disability, representing a significant public health concern. It occurs because of temporary or permanent obstruction of one or more arteries that supply blood to the brain, thereby reducing cerebral blood flow and limiting oxygen and nutrient supply to the affected brain area. Dysfunction in energy processes triggers multiple signaling mechanisms and pathways in the penumbra zone, including apoptosis, one of the cellular death pathways activated in response to ischemia. Various proteins, such as apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1), are implicated in this process. ASK1 is activated in the presence of reactive oxygen species (ROS), leading to apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathways. However, the multidomain nature of ASK1 confers it with the ability to interact with other proteins that regulate its function, potentially acting as a molecular switch between cell death and cell survival pathways. To approach the role of ASK1 in ischemia, we created a knockout (KO) model of the ASK1 gene in human embryonic stem cells (hESCs) using the CRISPR-Cas9 system. Our editing strategy involved introducing two RNA guides (gRNA). Due to the low editing efficiency in hESCs, we performed multiple editing rounds resulting in a gradual decrease in ASK1 expression even in a heterogeneous population. Additionally, we demonstrated that our methodology did not affect hESC pluripotency. In summary, combining this cell line with floor plate dopaminergic differentiation protocol will allow us to evaluate the role of ASK1 in neuronal death triggered by ischemia in a physiologically relevant model.

## Abreviaturas

**aa** aminoácidos

**ASK1** apoptosis signal-regulating kinase 1, cinasa regulada por señal de apoptosis 1

**ATP** adenosin trifosfato

**BAX** Bcl-2-associated X protein, proteína X asociada a Bcl-2

**BMP** bone morphogenetic proteins, proteínas morfogenéticas óseas

**BSA** bovine serum albumin, albúmina de suero bovino

**BDNF** brain-derived neurotrophic factor, factor neurotrófico derivado del cerebro

**Ca<sup>2+</sup>** calcio

**cAMP** adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, N<sup>6</sup>,O2'-dibutyryl-, sodium salt

**CC** coiled coil domain, dominio de colas enrolladas

**CD** catalytic domain, dominio catalítico

**CRISPR-Cas** clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins, repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas-proteínas asociadas a CRISPR

**CRR** central regulatory region, región reguladora central

**crRNA** CRISPR RNA

**DMSO** dimetilsulfóxido

**DNA** deoxyribonucleic acid, ácido desoxirribonucleico

**DSB** double strand break, corte de doble cadena

**DMEM** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**ERK** extracellular signal-regulated kinase, cinasa regulada por señal extracelular

**EVC** evento vascular cerebral

**FACS** Fluorescence-activated cell sorting, clasificación celular activada por fluorescencia

**FGF** fibroblast growth factor, factor de crecimiento de fibroblastos

**gDNA** DNA genómico

**GDNF** glial cell line-derived neurotrophic factor, factor neurotrófico derivado de la glía

**GFAP** glial fibrillary acidic protein, proteína ácida fibrilar glial

**gRNA** Guía RNA

**HIF-1 $\alpha$**  Hipoxia-inducible factor 1, Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$

**hPSC** human pluripotent stem cells, células pluripotentes humanas

**hESC** human embryonic stem cells, células troncales embrionarias humanas

**HDR** homology-directed repair, reparación dirigida por homología

**IDT** Integrated DNA Technologies

**INEGI** Instituto nacional de estadística y geografía

**JNK** c-Jun N-terminal kinase, cinasa c-Jun N-terminal

**KI** knockin

**KO** knockout

**MAPK** mitogen-activated protein kinase, proteína cinasa activada por mitógeno

**MAP3K** mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAP cinasa cinasa cinasa

**MAP2K** mitogen-activated protein kinase kinase, MAP cinasa cinasa

**MAP3K5** mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5, proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógeno 5

**MCA** middle cerebral artery, arteria cerebral media

**mRNA** ribonucleic acid messenger, ácido ribonucleico mensajero

**MTT** 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide assay, ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio

**NHEJ** non-homologous end joining, unión de extremos no homólogos

**NMDAR** receptores N-methyl-D-aspartato

**NOXA** phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato

**NSCs** neural stem cells, células troncales neuronales

**OGD** oxygen and glucose deprivation, privación de oxígeno y glucosa

**PAM** protospacer adjacent motif, motivo adyacente al protoespaciador

**pb** pares de base

**PBS** phosphate buffered saline, buffer fosfato salino

**PCR** reacción en cadena de la polimerasa

**PI3k** phosphoinositide-3-kinase, Fosfoinositol 3-cinasa

**PKB o Akt** Protein kinase B, proteína cinasa B

**PMSF** phenylmethanesulfonyl fluoride, fluoruro de fenilmetanosulfonilo

**PPI** protein-protein interaction, interacciones proteína-proteína

**PRMTs** Protein arginine methyltransferases, proteínas arginina metiltransferasas

**PRMT1** Protein arginine methyltransferase 1, proteína arginina metiltransferasa 1

**PTMs** post-translational modifications, modificaciones postraduccionales

**PUMA** p53 upregulated modulator of apoptosis, modulador de apoptosis regulado al alza por p53

**P53** proteína supresora de tumores p53

**p53AIP1** p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1, proteína inductora de apoptosis 1 regulada por p53

**RIPA** Radioimmunoprecipitation assay buffer, buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación

**RNA** ribonucleic acid, ácido ribonucleico

**RNP** ribonucleoprotein, ribonucleoproteína

**ROCK** Rho kinase inhibitor, inhibidor de la cinasa Rho

**ROS** reactive oxygen species, especies reactivas de oxígeno

**SAM** S-adenosil-L-metionina

**Shh** sonic hedgehog

**SNC** sistema nervioso central

**SN** sistema nervioso

**TBS** Tris Buffered Saline, Solución salina tamponada Tris

**TGF- $\beta$**  transforming growth factor beta, factor de crecimiento transformante beta

**TH** tyrosine hydroxylase, tirosina hidroxilasa

**tracerRNA** Transactivating CRISPR RNA

**TRAF** tumor necrosis factor receptor-associated factor, proteínas del factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

**Trx** tioredoxina

**VEGF** vascular endothelial growth factor, factor de crecimiento vascular endotelial

**VEGFR2** vascular endotelial growth factor 2, receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2

**WT** wildtype, silvestre

# Introducción

## Isquemia cerebral

### Epidemiología

El evento vascular cerebral (EVC) es la segunda causa de discapacidad en todo el mundo, representando un problema de salud pública (revisado en Saini *et al.*, 2021). Se clasifica en dos tipos: accidente cerebrovascular hemorrágico, causado por la ruptura de un vaso sanguíneo que irriga el parénquima cerebral; y accidente cerebrovascular de tipo isquémico, que se produce por la obstrucción temporal de una o varias arterias que irrigan al cerebro (revisado en [The GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators, 2018](#)). La oclusión cerebral puede ser causada por un trombo que se forma en un vaso sanguíneo del cerebro o del cuello, o por un émbolo que se origina en otra parte del cuerpo y se desplaza hasta llegar al cerebro (revisado en Campbell *et al.*, 2019; Radu *et al.*, 2017).

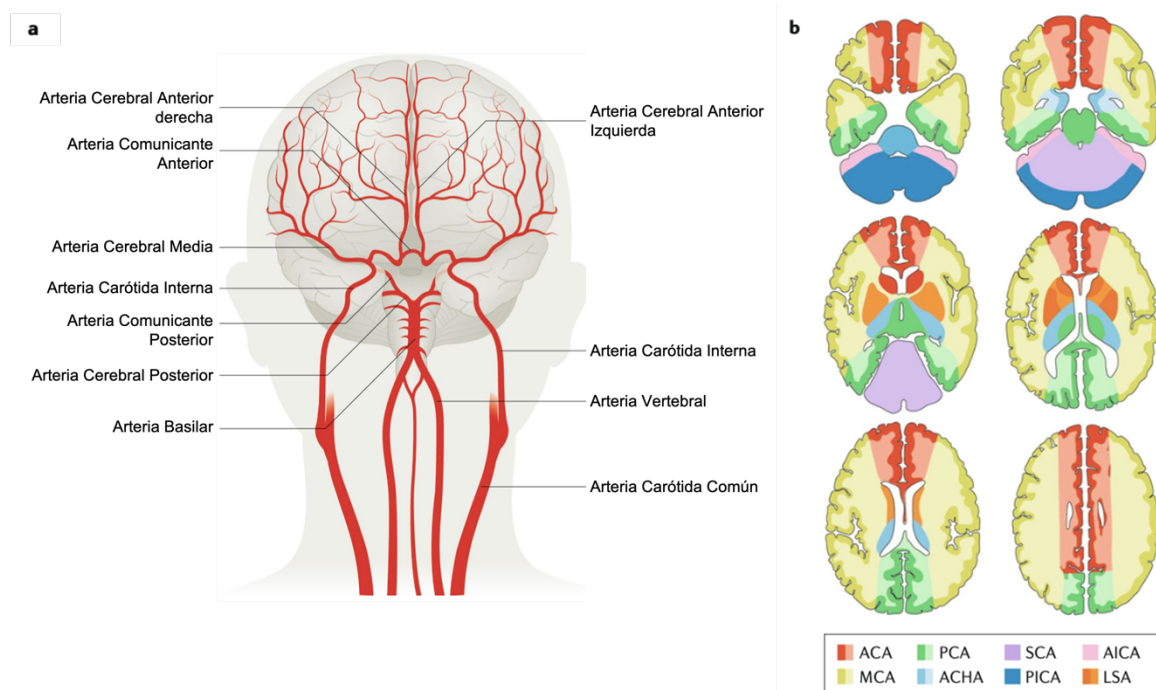
El evento de tipo isquémico es la causa más común de EVC, representando cerca del 87% de todos los casos a nivel global (revisado en Saini *et al.*, 2021). En México, esta patología representa entre el 50 y 70% de los casos, sin embargo, los datos epidemiológicos disponibles son muy limitados (revisado en Choreño-Parra *et al.*, 2019). De acuerdo con la Secretaría de Salud, se estima que la incidencia es de 118 casos por cada 100,000 habitantes, siendo los adultos mayores a 60 años la población que se ve más afectada. Según el INEGI, la mortalidad por esta causa es de 28.8 por cada 100,000 habitantes (INEGI, 2021; Secretaria de Salud, 2022).

Los factores de riesgo no modificables relacionados con la isquemia incluyen la edad, el sexo, y los factores genéticos (revisado en Campbell *et al.*, 2019). No obstante, otros factores como la hipertensión, alimentos procesados, el tabaquismo, el sedentarismo, un alto índice de masa corporal, entre otros, también pueden promover la incidencia de un evento isquémico (Alloubani *et al.*, 2018; revisado en Ouriques Martins *et al.*, 2019). A pesar de que no hay una diferencia significativa entre los factores de riesgo a nivel global, es posible que estos factores se modifiquen entre países por factores ambientales (ej. la contaminación del aire), esperanza de vida, estilo de vida y servicios de salud (IHME, 2016; revisado en Ouriques Martins *et al.*, 2019; revisado en Verhoeven *et al.*, 2021). En la población mexicana, la hipertensión es el principal factor de riesgo para sufrir un EVC, seguido de la diabetes mellitus (revisado en Choreño-Parra *et al.*, 2019).

## Fisiopatología

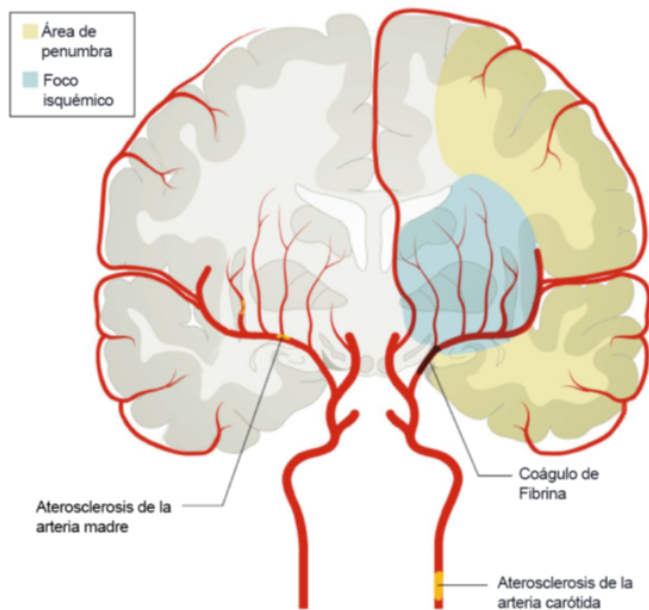
Como se mencionó anteriormente, el infarto isquémico resulta de la oclusión de cualquiera de las principales arterias cerebrales, lo que lleva a la reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo, limitando el paso de oxígeno y nutrientes hacia el área cerebral irrigada por la arteria ocluida (revisado en Campbell *et al.*, 2019). Las células residentes del cerebro, es decir, neuronas, astrocitos, microglia, oligodendrocitos, células endoteliales y pericitos que conforman la región lesionada sufren daños celulares y moleculares provocando déficits neurológicos, los cuales dependerán de la zona cerebral afectada (revisado en Lee *et al.*, 2018).

La oclusión de la arteria cerebral media (MCA) es la causa de más del 50% de los eventos isquémicos (revisado en Maciel & Sheth, 2015). Cuando esta arteria se obstruye, puede provocar en los pacientes debilidad y/o entumecimiento unilateral, caída facial y déficits del habla, ya que irriga los lóbulos frontal, parietal y temporal, así como partes del diencefalo (Fig. 1) (revisado en Franklin, 2017; revisado en Gao *et al.*, 2021; revisado en Prince & Ahn, 2013).



**Fig. 1 Arterias cerebrales y áreas que irrigan.** a) Las principales arterias del cerebro b) los territorios que irrigan. ACA, arteria cerebral anterior; ACHA, arteria coroidea anterior; AICA, arteria cerebelosa anteroinferior; LSA, arteria lenticuloestriada; MCA, arteria cerebral media; PCA, arteria cerebral posterior; PICA, arteria cerebelosa posterior inferior; SCA, arteria cerebelosa superior. Tomada y modificada de Campbell *et al.*, (2019).

Hay dos regiones de lesión en el parénquima cerebral; el foco isquémico y el área de penumbra (Fig. 2). El foco isquémico es la región que sufre un daño irreversible debido a la falta de glucosa y oxígeno, lo que altera la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) y conduce a la falla de los procesos dependientes de energía. Por otro lado, la penumbra, que abarca la región circundante al foco isquémico, presenta alteraciones eléctricas pero conserva un metabolismo energético, lo que la convierte en una región potencialmente rescatable siempre y cuando se restaure el flujo sanguíneo, ya que de lo contrario, se incorporará al foco isquémico (revisado en Cassidy & Cramer, 2017; Sodaei & Shahmaei, 2020).



**Fig. 2 Clasificación de área lesionada tras la obstrucción del flujo sanguíneo.** La obstrucción del vaso sanguíneo puede deberse a un trombo o un émbolo. La región proximal irrigada por la arteria obstruida se conoce como foco isquémico (azul), el tejido que conforma esta región presenta un daño irreversible; el área circundante al foco isquémico es la región de penumbra (amarillo), la cual mantiene su metabolismo energético, por lo que puede ser rescatada si se restaura el flujo sanguíneo. Tomada y modificada de Campbell *et al.*, (2019).

Los procesos que se afectan principalmente tras la falta de energía son la repolarización de la membrana neuronal y la actividad sináptica (revisado en Harris *et al.*, 2012; Ventura-Antunes & Herculano-Houzel, 2022). La alta demanda metabólica de las neuronas, que va entre el 75 a 80 % de la energía producida en el cerebro, las hace particularmente vulnerables a la isquemia (revisado en Harris *et al.*, 2012; revisado en Tymianski, 2011; revisado en Watts *et al.*, 2018).

La falta de energía provoca la despolarización anóxica de las neuronas llevando a la liberación de glutamato al medio extracelular. El glutamato sobreactiva los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR), lo que provoca la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol y la mitocondria, así como la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  de las reservas intracelulares. Estos eventos



activan una plétora de vías de señalización que desencadenan procesos que pueden llevar a la muerte celular, como el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplásmico, la liberación de radicales libres, entre otros (Aoki *et al.*, 2003; revisado en Qin *et al.*, 2022).

Asimismo, todas las demás células se afectan diferencialmente a consecuencia de la despolarización anóxica de las neuronas (revisado en Campbell *et al.*, 2019; revisado en Harris *et al.*, 2012; revisado en Qin *et al.*, 2022). Entre los mecanismos que se activan destacan la neuroinflamación, y la alteración de la barrera hematoencefálica (Cekanaviciute *et al.*, 2014; revisado en George & Steinberg, 2015; Jiao *et al.*, 2011; revisado en Qin *et al.*, 2022). Por lo que el infarto isquémico no solo resulta en la disfunción y muerte de las neuronas sino también de la disfunción y muerte de todas las células residentes del cerebro (revisado en Tiedt *et al.*, 2022).

Los mecanismos y las vías de señalización que inducen la muerte celular no son las únicas que toman lugar en la fisiopatología de la isquemia, sino que conforme evoluciona la lesión, nuevas vías y procesos se activan, llevando a la reparación endógena del daño (revisado en Grefkes & Fink, 2020; revisado en Tovar-y-Romo *et al.*, 2016). Los cambios estructurales y funcionales generados tras la oclusión en el área lesionada, así como en todo el cerebro, evolucionan con el tiempo, por lo que es posible clasificar esta progresión en fases.

La fase hiperaguda que abarca las primeras 24 horas; la fase aguda, los primeros 7 días; la fase subaguda temprana, los primeros 3 meses, la fase subaguda tardía, de los 4 a 6 meses, y la fase crónica a partir de los 6 meses (revisado en Bernardo-Castro *et al.*, 2020; revisado en Bernhardt *et al.*, 2017; revisado en Lo, 2008). Sin embargo, delimitar los procesos a fases específicas sería ignorar que la recuperación funcional es un proceso continuo no lineal (revisado en Grefkes & Fink, 2020).

Aunque no se comprende completamente la interacción entre las diversas vías de señalización y los procesos involucrados en esta transición, se sabe que, en un principio, se promueve el daño en el tejido cerebral. Sin embargo, estas mismas vías deletéreas son las que permiten la activación de mecanismos de reparación y regeneración neuronal. Como resultado, el parénquima cerebral transita desde un estado de daño a uno de reparación (revisado en George & Steinberg, 2015).

## Apoptosis

Una de las vías de muerte celular que predomina en el área de penumbra es la apoptosis, un tipo de muerte programada, dependiente de energía que desencadena una cascada de proteasas (Caspasas) que se encargan de degradar componentes celulares como el DNA, el citoesqueleto y proteínas nucleares a fin de preparar a las células que están muriendo para que sean fagocitadas y de esa forma estresar lo menos posible a las células vecinas (revisado en Singh *et al.*, 2019).

La activación de la apoptosis está regulada por diferentes estímulos, los cuales pueden originarse ya sea desde el interior de la célula o desde su entorno extracelular (revisado en Green & Llambi, 2015). Existen dos vías generales de apoptosis: la vía intrínseca, mediada por la mitocondria, donde el daño mitocondrial libera el Citocromo c al citoplasma, que posteriormente estimula la Caspasa-3 llevando a apoptosis; y la vía extrínseca, desencadenada por los receptores de muerte localizados en la superficie celular, la cual está mediada por las Caspasas 8 y 3 (revisado en Erekat, 2022; revisado en Uzdensky, 2019).

Además de las vías intrínseca y extrínseca, existe otra vía apoptótica, la cual está mediada únicamente por la proteína supresora de tumores P53. En su activación intervienen factores como el estrés oxidativo, y el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular elevado, entre otros. Una vez activa P53, se transloca al núcleo donde se une a sitios específicos de DNA induciendo la expresión de genes que codifican para proteínas pro-apoptóticas (revisado en Datta *et al.*, 2020). Entre estas se encuentran la Proteína X asociada a Bcl-2 (BAX), la Proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato (NOXA), la Proteína inductora de apoptosis 1 regulada por P53 (p53AIP1), y el modulador de apoptosis regulado al alza por P53 (PUMA), las cuales actúan directamente en la mitocondria induciendo muerte celular, de tal forma que la activación de P53 lleva a la vía intrínseca (revisado en Morrison *et al.*, 2003; revisado en Qin *et al.*, 2022).

Entre las vías de señalización río arriba de P53 que se activan como resultado de la isquemia se encuentra la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y Notch (revisado en Datta *et al.*, 2020). De modo que diferentes vías y estímulos inician y regulan simultáneamente la apoptosis en la penumbra (revisado en Uzdensky, 2019).

## Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

Las vías de MAPKs son cascadas de señalización intracelular que se expresan ubicuamente y que se encuentran conservadas evolutivamente en eucariontes (revisado en Pimienta & Pascual, 2007). Éstas se encargan de procesar diversos estímulos, tanto extracelulares como intracelulares, incluyendo factores de crecimiento, citocinas, hormonas, y varios estresores (revisado en Kim & Choi, 2010). Al procesar estos estímulos, las MAPKs generan una señalización espaciotemporal específica que lleva a la expresión de genes o a la interacción con diferentes proteínas blanco, por lo que juegan un papel crítico en procesos celulares como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la migración, la respuesta al estrés, la sobrevivencia y la apoptosis (Bandyopadhyay *et al.*, 2010; revisado en Whitmarsh, 2007). Para llevar a cabo sus funciones, las MAPKs fosforilan sus propios residuos duales de serina y treonina (autofosforilación), o los de sus sustratos, para activarlos o desactivarlos (revisado en Peti & Page, 2013).

En mamíferos se conocen 14 miembros de las MAPKs que se subdividen a su vez en 7 subgrupos (revisado en Kholodenko & Birtwistle, 2009). Los tres subgrupos mejor caracterizados son la cascada de cinasa regulada extracelularmente (ERK1/2), la cascada de Cinasa amino terminal C-Jun (JNK2/3), y la cascada de Cinasa P38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). Estos subgrupos se distinguen por su activación, la cual ocurre en módulos de fosforilaciones consecutivas, es decir, cada módulo se compone de tres cinasas, MAP3K que activa a una MAP2K, que finalmente activa una MAPK (revisado en Soares-Silva *et al.*, 2016). Asimismo, estas vías están reguladas por proteínas de andamiaje y adaptadoras, modificando su localización subcelular así como su actividad cinasa (revisado en Obsilova *et al.*, 2021).

ERK1/2 se encarga del proceso de señalización estimulada por factores de crecimiento celular, hormonas y estímulos proinflamatorios, mientras que JNK2/3 y P38 generalmente se activan tras un estímulo estresante intracelular o extracelular, así como estímulos proinflamatorios (revisado en Datta *et al.*, 2020; revisado en Soares-Silva *et al.*, 2016). Sin embargo, la activación e inactivación de estas cascadas de señalización depende del tipo celular y del contexto en el que se encuentre la célula ya que pueden desempeñar roles duales en los procesos que regulan, como la apoptosis, donde pueden promover la muerte o sobrevivencia celular (revisado en Yue & López, 2020).

Además, la pérdida del control espaciotemporal en la señalización de las MAPKs puede conducir a enfermedades como el cáncer, la neurodegeneración, la inflamación, entre otras (Bandyopadhyay *et al.*, 2010) .

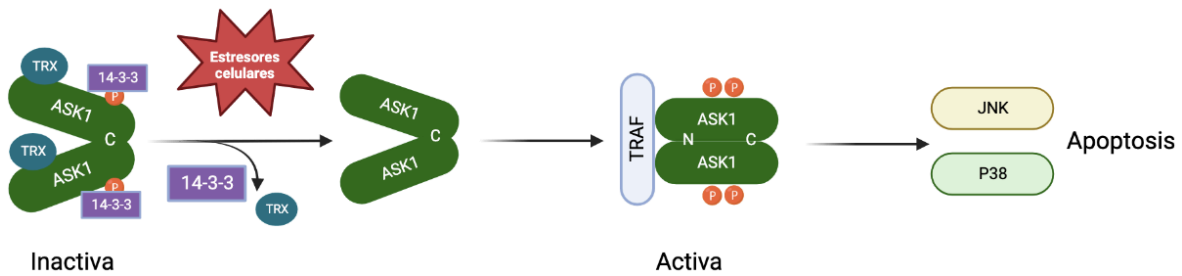
Durante el evento isquémico, las principales cascadas MAPKs que contribuyen a la apoptosis son p38 y JNK (revisado en Datta *et al.*, 2020; revisado en Qin *et al.*, 2022). Estas vías comparten varios reguladores río arriba, por lo que múltiples estímulos las activan simultáneamente (revisado en Yue & López, 2020). En presencia de estrés oxidativo y excitotoxicidad, la proteína cinasa de cinasa de cinasa activada por mitógeno 5 (MAP3K5), también conocida como Cinasa regulada por señal de apoptosis 1 (ASK1) activa ambas vías (revisado en Brys *et al.*, 2020).

### Cinasa regulada por señal de apoptosis 1 (ASK1)

#### Función

ASK1 es una cinasa que forma parte de la familia de las MAPKs, específicamente al grupo de las MAP3K. Su activación puede ser desencadenada por diversos estímulos, incluyendo las ROS, el estrés del retículo endoplásmico, el choque osmótico, el choque térmico, las señales inflamatorias mediadas por receptores, la sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , una infección patogénica, entre otros (revisado en Ogier *et al.*, 2020).

En respuesta a estos estresores, ASK1 se activa y lleva a la fosforilación de las vías MAPKs p38 y JNK, lo cual conduce a la apoptosis (Fig. 3) (Izumi *et al.*, 2005). Sin embargo, la actividad de ASK1 se regula por sus interacciones proteína-proteína (PPI) y las modificaciones post-traduccionales (PTM) de sus dominios de interacción (Hirata *et al.*, 2017; R. Zhang *et al.*, 2005). Estas características le confieren la capacidad de activarse o inactivarse de manera dependiente del contexto (Hirata *et al.*, 2017; Sobhan *et al.*, 2017). De tal forma que se ha demostrado que ASK1 no sólo interviene en la apoptosis, sino que también participa en la proliferación celular, la sobrevivencia, la diferenciación y la respuesta inflamatoria (Izumi *et al.*, 2005; Sobhan *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2005).



**Fig. 3 Mecanismo canónico de activación de ASK1.** ASK1 se encuentra inactiva cuando está interactuando con la forma reducida de tioredoxina (Trx) a través de su región N-terminal y con 14-3-3 $\zeta$  en el residuo S966, y forma un homo-oligómero a través del dominio en espiral en la región C-terminal (indicado como 'C'). La exposición de las células a varios estresores celulares, incluidas las ROS, induce la disociación de la Trx y 14-3-3 $\zeta$  de ASK1, promoviendo el reclutamiento de las proteínas TRAF. Esta interacción promueve la interacción homofílica del dominio enrollado en espiral N-terminal (indicado como 'N') de ASK1, lo que facilita la formación del complejo ASK1 activo. La activación persistente de la señalización ASK1 conduce a la inducción de la muerte celular mediante las vías JNK y P38. Creada con BioRender.

## Estructura

ASK1 es un polipéptido de 1374 aminoácidos conformado por tres principales dominios, el dominio de unión a Tiorredoxina (TBD) en el amino terminal (N-terminal) entre los residuos 46 a 277; la región reguladora (CRR) que incluye la región de unión de las proteínas del Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF), entre los residuos 269 a 658; y el dominio catalítico también conocido como el dominio de serina-treonina cinasa (CD) localizado entre los residuos 659 a 951. Además, cuenta con dos regiones de colas enrolladas (CC) tanto en la región N-terminal como en la región carboxilo terminal (C-terminal). La C-terminal contiene un motivo de unión a 14-3-3 $\zeta$ , localizado entre los residuos 963 a 970 (revisado en Agrahari *et al.*, 2022; Bunkoczi *et al.*, 2007; revisado en Obsilova *et al.*, 2021).



**Fig. 4 Segmentos estructurales de ASK1.** Los segmentos estructurales disponibles (verde), los cuales incluyen su dominio CRR, CD y la región de unión a 14-3-3 $\zeta$ , y los segmentos estructurales no disponibles (gris), que incluyen el dominio a Trx en los residuos 1-268. CRR, región reguladora; CD, dominio cinasa; CC, región de colas enrolladas. Tomada y modificada de Agrahari *et al.*, (2022).

Aunque se han identificado algunos de los dominios de ASK1, su estructura contiene varios sitios de interacción con otras proteínas que aún no se comprenden con detalle (revisado en Agrahari *et al.*, 2022). Estas PPI dan lugar a la formación de un complejo de alto peso molecular, denominado señalosoma ASK1, que oscila entre los 1500 y 2000 kDa. La proteína con la que ASK1 interactúa en el señalosoma determina y regula su función en ese momento específico, ya que induce un cambio conformacional en ASK1 que resulta en

la fosforilación o desfosforilación de residuos en dominios específicos (revisado en Rusnak & Fu, 2017; Song *et al.*, 2013).

En su estado basal o inactivo, ASK1 forma un homodímero a través de la región CC de la C-terminal. Cada molécula de ASK1 se encuentra interactuando directamente con Tioredoxina (Trx) y con la Proteína 14-3-3ζ, las cuales impiden su activación mediante la homo-oligomerización de ASK1 (Fig. 3) (revisado en Agrahari *et al.*, 2022; Bunkoczi *et al.*, 2007).

Las propiedades electrostáticas o estructurales de los dominios de interacción pueden ser regulados por diversas PTMs, como la fosforilación y la metilación (Avin *et al.*, 2017; Duan & Walther, 2015). La fosforilación en el residuo T845 del CD activa a ASK1, mientras que la fosforilación de los residuos S83, S967 y S1034 la inhibe (revisado en Brys *et al.*, 2020; Bunkoczi *et al.*, 2007). Por otro lado, la metilación de los residuos R78, R80 y R89 regula negativamente la actividad de ASK1 (revisado en Agrahari *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2012). Sin embargo, cómo es que las PPIs y PTMs regulan cooperativamente la actividad de ASK1 sigue siendo en gran parte desconocido (Hirata *et al.*, 2017).

## Interacciones

Las proteínas no suelen realizar actividades biológicas de forma aislada, por lo que entender la interacción proteína-proteína en condiciones fisiológicas y patológicas puede ayudar a comprender la etiología, la progresión, y la patogénesis de una enfermedad (revisado en Agrahari *et al.*, 2022). A continuación, mencionaré las PPI que involucran la activación de ASK1 cuando hay presencia de ROS, ya que al ser una MAPK es relevante entender el contexto en el que se activa, debido a que esto determina los eventos río abajo que desencadena.

### *Tioredoxina*

Es una proteína oxidorreductasa que se expresa de forma ubicua en todos los organismos. Su función principal consiste en mantener una homeostasis redox y proteger a las proteínas de daño oxidativo mediante la eliminación de ROS, así como de la regulación de vías de señalización sensibles a ROS (revisado en An & Kang, 2014; revisado en Mohammadi *et al.*, 2019). La Trx se encuentra directamente unida a la región N-terminal de

ASK1, específicamente entre los residuos 46 y 277. Esta interacción inhibe la activación de ASK1 al bloquear su homo-oligomerización a través de su dominio de CC en la N-terminal. Únicamente su forma reducida, mas no la oxidada en la que los dos residuos de cisteína del dominio catalítico redox forman un puente disulfuro intramolecular, interactúa con ASK1 (Kosek *et al.*, 2014). Durante el estrés oxidativo, las ROS oxidan a Trx, disociándola de ASK1, activándola mediante su homo-oligomerización de la región N-terminal, y la autofosforilación en su CD (revisado en Guo *et al.*, 2017).

### 14-3-3

Son una familia de siete isoformas ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$ , y  $\zeta$ ) de proteínas adaptadoras citosólicas diméricas, que se encargan de regular la función de múltiples proteínas que tienen un motivo fosfoserina o fosfotreonina generando cambios conformacionales que pueden activarla o inhibirla (revisado en Pennington *et al.*, 2018). Las 14-3-3 integran y regulan múltiples vías de señalización por lo que intervienen en muchas de las funciones celulares, como la progresión del ciclo celular, la iniciación de la apoptosis, expresión de genes, entre otros (revisado en Cho & Park, 2020).

14-3-3 $\zeta$  se une al residuo S967 o S966 fosforilado de ASK1, inhibiendo su actividad cinasa mediante el bloqueo del acceso al sitio activo de ASK1 (revisado en Pennington *et al.*, 2018; Petrvalska *et al.*, 2016). Cuando los niveles de ROS aumentan, la Calcineurina desfosforila el residuo S966 induciendo la disociación de 14-3-3 $\zeta$  de ASK1, que junto con la disociación de Trx llevan a la activación de ASK1 (revisado Agrahari *et al.*, 2022).

### Proteína arginina metiltransferasa 1 (PRMT1)

PRMT1 pertenece a la familia de proteínas arginina metiltransferasas (PRMTs), que catalizan la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina (SAM) al grupo guanidino de la arginina en proteínas blanco (revisado en Jarrold & Davies, 2019). Las PRMTs se clasifican en tres tipos según la naturaleza de la modificación de sus sustratos. PRMT1 es una PRMT tipo 1, por lo que cataliza la formación de dimetilarginina asimétrica (Lowe & Clarke, 2022).

La metilación asimétrica de arginina contribuye a la regulación de diversos procesos fisiológicos como la embriogénesis, la progresión del ciclo celular, la viabilidad celular, la transducción de señales, la regulación de la transcripción, el procesamiento del RNA y la

reparación del DNA a través de la modulación de las interacciones entre proteínas (Cho *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2021). PRMT1 metila los residuos R78 y R80 de ASK1, lo que suprime la disociación de Trx y el reclutamiento de TRAF2, llevando a la atenuación de la actividad de ASK1 (Cho *et al.*, 2012).

### *Tumor Necrosis Factor Receptor-associate: Proteínas del factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF)*

Es una familia de 7 proteínas (TRAF1-7). Tienen dos funciones principales, la función de Ubiquitina ligasa E3 y la función de andamiaje. La función que llevarán a cabo dependerá de la estructura de los dominios de cada TRAF. Para el caso de la función de andamiaje, la estructura del dominio TRAF determina las interacciones con proteínas río abajo de varios receptores de membrana, principalmente proteínas cinasas, como ASK1 (revisado en Park, 2018).

Una vez que el cambio conformacional en ASK1, inducido por la liberación de Trx y 14-3-3 $\zeta$  permite que se oligomerice y se active, recluta principalmente a TRAF2 y 6, las cuales se unen en la región de unión TRAF en ASK1, la cual abarca los residuos 384 a 655, facilitando su autofosforilación (Fujino *et al.*, 2007).

Se han identificado más de 90 proteínas que interactúan con ASK1, cada una capaz de regular su actividad, de tal forma que se involucra en diversos procesos biológicos más allá de la apoptosis (Federspiel *et al.*, 2016; revisado en Shiizaki *et al.*, 2013). A pesar de que se han descubierto varios mecanismos reguladores de ASK1, como los descritos anteriormente, todavía hay muchos desconocidos, por lo que se requiere investigar su regulación en contextos específicos a partir de múltiples enfoques experimentales que permitan identificar los nodos centrales de la señalización de ASK1.

### **Modelos experimentales**

La isquemia cerebral es una enfermedad altamente compleja y heterogénea que depende de múltiples factores, tales como la duración, la etiología y la gravedad de la isquemia, la ubicación del infarto, los sistemas de circulación colateral, la edad, el sexo, entre otros (revisado en Campbell *et al.*, 2019; revisado en Sommer, 2017). Por lo tanto, a nivel experimental no es posible cubrir todos los aspectos de esta enfermedad multifacética. Sin embargo, algunas características, como la oclusión del vaso sanguíneo o las condiciones de



deficiencia energética, pueden ser modeladas experimentalmente, lo que ha permitido identificar algunos de los mecanismos que subyacen a la fisiopatología de la isquemia (revisado en Holloway & Gavins, 2016; Mergenthaler & Meisel, 2012; revisado en Sommer, 2017).

A pesar de que se han estudiado los efectos de la isquemia en modelos *in vivo* e *in vitro* derivados de animales, no siempre se pueden extrapolar los resultados a los humanos debido a las diferencias interespecies en la fisiología del sistema nervioso central (SNC) (revisado en Sommer, 2017). Por lo tanto, es fundamental desarrollar modelos con validez fisiológica para lograr una mejor comprensión de la patología (revisado en Kaiser & West, 2020).

Los modelos *in vitro* son una herramienta útil para estudiar los mecanismos moleculares y bioquímicos de la isquemia ya que permiten simular las condiciones de deficiencia de energía y nutrientes que ocurren tras la oclusión (revisado en Holloway & Gavins, 2016). La privación de oxígeno y glucosa (OGD) es una estrategia comúnmente utilizada en estos modelos, que se logra sometiendo a los sistemas celulares a un cambio de gases atmosféricos utilizando una cámara de hipoxia, donde se elimina el O<sub>2</sub> y la glucosa del medio (Tasca *et al.*, 2015).

Los sistemas celulares empleados incluyen cultivos celulares y rebanadas de cerebro organotípicas (revisado en Sommer, 2017). Los cultivos celulares pueden obtenerse a partir de tejido animal o células pluripotentes humanas, mientras que las rebanadas de cerebro organotípicas pueden derivarse de tejido animal o de cerebros humanos postmortem (Mitsios *et al.*, 2007; revisado en Van Breedam & Ponsaerts, 2022). Una de las principales ventajas de estos modelos es que permiten estudiar la respuesta a la isquemia de cada tipo celular del SNC, así como las interacciones entre ellas (revisado en Holloway & Gavins, 2016).

### Células troncales embrionarias humanas

Las células troncales embrionarias humanas (hESC) son células pluripotenciales humanas (hPSC) capaces de diferenciarse a cualquier célula somática en el embrión (revisado en Vazin & Freed, 2010). Se derivan de la masa interna de los blastocistos de embriones preimplantados (revisado en Sternecker *et al.*, 2014). Su morfología se caracteriza por una alta relación núcleo-citoplasma y nucleolos prominentes, lo que sugiere una transcripción y

síntesis de proteínas activa durante la proliferación celular. Las hESC proliferan formando colonias planas con bordes celulares distintos (revisado en Semb, 2005).

Los marcadores de pluripotencia que se expresan en la superficie celular de las hESC incluyen el Antígeno embrionario específico de etapa 3 y 4 (SSEA-3 y SSEA-4), las glicoproteínas de alto peso molecular TRA-1-60 y TRA-1-81, GCTM-2 y Fosfatasa alcalina. Además, otros marcadores relacionados con el estado de pluripotencia son los factores de transcripción Oct4, Nanog y Sox2 (revisado en Collier & Rugg-Gunn, 2018; revisado en Semb, 2005; Thomson *et al.*, 1998).

Las primeras líneas hESC que se derivaron fueron las líneas H1, H13 y H14, que tenían un cariotipo masculino normal 46XY, así como las H7 y H9 que tenían un cariotipo femenino normal 46XX (Thomson *et al.*, 1998). A raíz de este acontecimiento, surgieron complicaciones bioéticas que llevaron a algunos países a crear leyes específicas para regular su uso, y en algunos casos, a prohibirlo. En países como México, Estados Unidos, Bélgica, Gran Bretaña, entre otros, se permite el uso de las hESC en la investigación, pero éste se encuentra sujeto a leyes y consideraciones éticas. En cambio, países como Alemania, Italia, Austria, Rusia, entre otros prohíben su uso (revisado en Matthews & Morali, 2020).

La investigación básica y clínica de estas células ha avanzado gracias a que su capacidad de autorrenovación indefinida hace posible que en las condiciones apropiadas de cultivo generen un amplio número de linajes celulares, lo cual facilita su uso para modelar enfermedades (revisado en Dvash *et al.*, 2006; revisado en Vazin & Freed, 2010).

En el caso de la isquemia, como se mencionó anteriormente, las hESC son utilizadas como modelos *in vitro*, ya que es posible diferenciarlas a cualquier linaje celular, incluyendo células del SNC (revisado en Van Breedam & Ponsaerts, 2022). Para lograr esto, se simulan los patrones espaciotemporales del SNC en desarrollo a lo largo de los ejes dorso-ventral, antero-posterior y medio-lateral (Takahashi *et al.*, 2007). Las principales señales en estos ejes incluyen retinoides, Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), proteínas Wnt, Proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y Sonic Hedgehog (Shh) (revisado en Itasaki, 2020).

Una técnica empleada para dirigir la diferenciación de hESC hacia linajes neuronales implica el uso de un coctel de factores de crecimiento y moléculas pequeñas que activan o inhiben las vías de señalización que dirigen la diferenciación hacia el linaje celular deseado

(Chambers *et al.*, 2009; Kriks *et al.*, 2011). Para diferenciar las hESC hacia un linaje dopaminérgico de placa de piso, es necesario imitar los patrones de activación e inhibición de las vías de señalización en cada una de las etapas de diferenciación (revisado en Wang *et al.*, 2020).

Durante la primera etapa del proceso, conocida como neuralización, se induce la diferenciación de las células pluripotenciales hacia precursores neuronales a través de una inhibición dual de las proteínas SMAD. Este bloqueo evita la fosforilación de los receptores de la vía BMP, ALK4, ALK5 y ALK7, así como los receptores de la vía del Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ALK2 y ALK3. Este proceso da como resultado un progenitor intermedio capaz de dar lugar a poblaciones neuronales específicas (Chambers *et al.*, 2009).

La siguiente etapa del proceso se denomina especificación, y en ella se busca dirigir los precursores neurales hacia el linaje dopaminérgico de la placa de piso (revisado en Wang *et al.*, 2020). Para lograr este objetivo, además de la inhibición dual de las Proteínas SMAD, se exponen los precursores a Factores morfogénicos como FGF8, Shh y Wnt. Estos factores se administran a través de moléculas pequeñas que activan la vía de Shh y Wnt, así como mediante el uso de FGF8 recombinante. Como resultado de este proceso, se produce la expresión de factores de transcripción críticos para el desarrollo de neuronas dopaminérgicas, como FOXA2 y LMX1A (Chambers *et al.*, 2009; Kriks *et al.*, 2011; López-Ornelas *et al.*, 2020).

Por último, los progenitores de la placa de piso se exponen a factores neurotróficos y de crecimiento, tales como el Factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), el Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el Dibutil cíclico AMP, la N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-l-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster (DAPT) y el Factor de crecimiento transformante  $\beta$ 3 (TGF $\beta$ 3) (Kriks *et al.*, 2011; López-Ornelas *et al.*, 2020). La administración de estos factores en conjunto promueve tanto la sobrevivencia como la diferenciación neuronal (Sibuea *et al.*, 2023). La madurez de estas neuronas se puede medir a través de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), la cual es crítica para la síntesis de dopamina. (Chambers *et al.*, 2009; Kriks *et al.*, 2011; revisado en Wang *et al.*, 2020).

Además, las hPSC son una valiosa herramienta para estudiar la función de genes mediante técnicas de edición genética, como CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated proteins). Estas células mutadas pueden ser sometidas a protocolos de diferenciación que las inducen a linajes celulares específicos, lo cual permite analizar los efectos de las mutaciones introducidas de manera dependiente del contexto (Jacobs *et al.*, 2017).

## CRISPR-Cas9

Los sistemas CRISPR-Cas, originalmente sistemas inmunitarios adaptativos en procariontes que los protegen de elementos genéticos extraños, han sido adaptados ampliamente en la investigación básica y recientemente en ensayos clínicos controlados para permitir una manipulación específica del genoma, transcriptoma y epigenoma en una variedad de organismos (revisado en Li *et al.*, 2020; revisado en Li *et al.*, 2023; revisado en Mojica & Montoliu, 2016; revisado en Xu & Li, 2020). Estos sistemas se han convertido en la tecnología de edición del genoma más ampliamente utilizada en todo el mundo debido a su diseño simple, bajo costo y alta eficiencia (revisado en Komor *et al.*, 2017).

Estos sistemas emplean moléculas de RNA cortas para inducir cortes de doble cadena (DSBs) mediante nucleasas asociadas que se unen a secuencias específicas del genoma (Ran *et al.*, 2013). Existen varios tipos de sistemas CRISPR-Cas que se diferencian por la presencia de un complejo efector multiprotéico de Clase 1 (Tipo I, III y IV) o una proteína efectora única de Clase 2 (Tipo II, V y VI) (revisado en Donohoue *et al.*, 2018). El sistema de tipo II, que utiliza la endonucleasa Cas9 de *S. pyogenes* para realizar el corte, es el más utilizado para la edición genética a nivel experimental (revisado en Makarova & Koonin, 2015).

En este sistema, una proteína endonucleasa Cas9 forma un complejo de ribonucleoproteína (RNP) con una molécula de RNA guía (gRNA). Este complejo RNP se une a una secuencia blanco de DNA mediante el apareamiento de bases Watson-Crick (revisado en Doudna & Charpentier, 2014; revisado en Ran *et al.*, 2013). Para que la proteína Cas específica que se esté utilizando se una a la secuencia blanco de DNA (protoespaciador), ésta debe contener una secuencia motivo adyacente al protoespaciador (PAM), que es una breve secuencia de DNA. Para la Cas9 de *S. pyogenes*, se requiere la PAM 5'-NGG-3' (Sentmanat *et al.*, 2018).

Para llevar a cabo la edición genética mediante CRISPR-Cas, es necesario introducir la maquinaria correspondiente en el núcleo de las células blanco. Esto se puede lograr mediante plásmidos o complejos de RNP preformados. La principal diferencia entre estos métodos radica en que, en el caso de los plásmidos, las células deben transcribir y traducir la maquinaria antes de poder realizar la edición, mientras que la introducción de complejos RNP preformados permite que la edición comience de forma inmediata (Lin *et al.*, 2022; revisado en Spencer, 2020).

La reparación de los DSBs es crucial para prevenir la inestabilidad del genoma y la muerte celular (revisado en Rees *et al.*, 2021). Los cortes pueden repararse mediante uno de los dos mecanismos principales que se encuentran la mayoría de las células y organismos: la reparación dirigida por homología (HDR), que utiliza una plantilla de reparación diseñada para introducir mutaciones precisas, permitiendo la corrección de mutaciones o la inserción de nuevas secuencias de manera específica en el sitio; o bien por la unión de extremos no homólogos (NHEJ), en la cual los extremos del DNA cortado se reparan mediante una DNA polimerasa que tiende a introducir errores durante el proceso de reparación (revisado en Ghosh & Raghavan, 2021; Nambiar *et al.*, 2019). Los errores introducidos pueden ser inserciones o deleciones (indels) de pares de bases de diversas longitudes en las secuencias de genes en el sitio de DSBs (revisado en Chang *et al.*, 2017). Estos indels pueden eventualmente causar la inactivación del gen debido a cambios en el marco de lectura, lo que resulta en la degradación del RNA mensajero (mRNA) o la producción de una proteína truncada no funcional (revisado en Li *et al.*, 2020; revisado en Rees *et al.*, 2021; revisado en Xu & Li, 2020).

El sistema CRISPR-Cas9 se ha utilizado para estudiar enfermedades, creando modelos celulares y animales más precisos de los procesos patológicos (Jacobs *et al.*, 2017; revisado en Li *et al.*, 2020; revisado en Xu & Li, 2020). En el contexto de la isquemia, esta herramienta se ha utilizado para evaluar la función de genes que se encuentran alterados en la isquemia, como los genes que codifican para las proteínas ribosómicas mitocondriales L19 y 51, las cuales son esenciales para la función de la fosforilación oxidativa (Guan *et al.*, 2020). Esto ha permitido identificar y validar nuevos blancos farmacológicos, así como estudiar los mecanismos subyacentes de la patología (revisado en Granata, 2023; Guan *et al.*, 2020).

La edición de hESC mediante CRISPR-Cas9 y su posterior diferenciación se ha consolidado como una herramienta poderosa y fisiológicamente relevante para el estudio de diversas enfermedades (Jacobs *et al.*, 2017).

## Antecedentes

### ASK1 en la isquemia

La señalización anormal de ASK1 se asocia con diversas enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamatorias, oncológicas y cerebrovasculares (revisado en Brys *et al.*, 2020; revisado en Guo *et al.*, 2017). En el caso particular de la isquemia, la activación de ASK1 conduce a la muerte celular a través de las vías MAPK JNK y P38 (revisado en Brys *et al.*, 2020; Izumi *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2013). La eliminación o disminución de su expresión en modelos KO para ASK1 o mediante RNAs pequeños de interferencia (siRNA), respectivamente, reduce tanto la muerte neuronal apoptótica como el volumen del infarto (Kim *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2015).

Además de inducir apoptosis, la activación de ASK1, durante la fase hiperaguda de la isquemia cerebral también promueve la formación del edema cerebral mediante el incremento de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en las células endoteliales (Song *et al.*, 2015).

### VEGF y ASK1 en la isquemia

Durante un evento isquémico, el VEGF contribuye a la generación del edema cerebral y a la exacerbación de la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE) al promover la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Cárdenas-Rivera *et al.*, 2019; revisado en Weis & Cheresch, 2005). Sin embargo, en etapas posteriores a la fase hiperaguda, el VEGF adquiere un papel neuroprotector al estimular la angiogénesis y promover la sobrevivencia celular (revisado en Geiseler & Morland, 2018). Esto se debe a la regulación a la alza de sus receptores, los cuales desencadenan la activación de diversas vías de señalización que modulan mecanismos que favorecen la recuperación endógena del cerebro, tales como la angiogénesis y la neuroprotección (Geiseler & Morland, 2018; revisado en Licht & Keshet, 2013; Tovar-y-Romo *et al.*, 2016).

Se ha sugerido que la angiogénesis promovida por el VEGF en el tejido isquémico está asociada a la expresión de ASK1, de tal forma que ASK1 estimula la expresión de VEGF

(Izumi *et al.*, 2005). No obstante, el mecanismo específico por el cual ASK1 lleva a cabo esta función se desconoce. Una posible vía mediadora podría ser a través del factor inducible por hipoxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ), ya que la activación de la vía MAPK P38 por ASK1 provoca la fosforilación de HIF- $1\alpha$ , promoviendo su acumulación después de la isquemia (revisado en Ke & Costa, 2006; Kwon *et al.*, 2005; Sumbayev, 2008). Además, VEGF modula la neuroprotección en el tejido isquémico a través de la activación de la vía de supervivencia PI3K/Akt (Cárdenas-Rivera *et al.*, 2019; revisado en Geiseler & Morland, 2018; Tovar-y-Romo & Tapia, 2010).

### Akt y ASK1 en la isquemia cerebral

La activación de la vía PI3K-Akt tiene un efecto neuroprotector en la lesión isquémica al inhibir las vías apoptóticas a través del bloqueo de las proteínas y procesos pro-apoptóticos (Ahn, 2014; Zhang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2019). Además de activar vías de supervivencia como mTOR y CREB (revisado en Hers *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2013). La activación farmacológica de PI3K/Akt y la sobreexpresión de proteínas que estimulan endógenamente dicha vía se utilizan para reducir la apoptosis y aumentar la viabilidad celular después de la isquemia cerebral (Cárdenas-Rivera *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2019).

Akt tiene la capacidad de regular nodos críticos de señalización que controlan múltiples objetivos y funciones celulares, como ASK1. La interacción directa entre ASK1 y Akt se produce a través del residuo de serina (S83) de ASK1. Este aminoácido es de gran importancia a nivel estructural y funcional ya que se encuentra dentro del dominio TBD de ASK1 (Kim *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005).

Es posible que la fosforilación de Akt en el residuo S83 de ASK1 solo ocurra cuando Trx se haya dissociado de ASK1. En tal caso, esta vía de supervivencia podría interferir solo una vez que ASK1 haya sido activada (Kim *et al.*, 2001). Por lo que esta interacción hace de ASK1 un blanco fisiológico de Akt, la cual regula negativamente su función apoptótica, inhibiéndola (Santabárbara-Ruiz *et al.*, 2019).

### ASK1 y la supervivencia celular tras la isquemia

Como se mencionó anteriormente, la activación de las vías MAPK JNK y P38 lleva a muerte celular. Sin embargo, la vía P38 también está involucrada en vías de diferenciación

y supervivencia (revisado en Asih *et al.*, 2020). Resultados obtenidos de diferentes estudios donde se evaluó la vía ASK1-P38 demostraron que su activación por estímulos estresantes puede llevar a la diferenciación y supervivencia de diversos tipos celulares, desde células cancerígenas, hasta células pluripotentes (Sobhan *et al.*, 2017; Takeda *et al.*, 2000).

La evidencia acumulada indica que inactivar ASK1 disminuye la apoptosis tras la isquemia cerebral (revisado en Geiseler & Morland, 2018). No obstante, la activación de la vía MAPK P38 mediada por ASK1, lleva a la supervivencia, proliferación y diferenciación de células troncales neuronales (NSCs) tras la isquemia (Song *et al.*, 2013a).

Los hallazgos mencionados anteriormente sugieren que ASK1 está involucrada en diferentes procesos desencadenados tras la isquemia, como la apoptosis, la formación del edema cerebral, la angiogénesis y la supervivencia, proliferación y diferenciación de NSCs (Izumi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2015). Esto sugiere que ASK1 puede tener funciones opuestas que dependen del contexto en que se produjo su activación. De tal forma que ASK1 puede conducir a apoptosis o vías que promueven la recuperación endógena del cerebro.

### Antecedentes del laboratorio

La actividad catalítica de ASK1 está rigurosamente regulada mediante la oligomerización y la unión de diversos cofactores, siendo Trx y 14-3-3 $\zeta$  los principales inhibidores de ASK1 (Agrahari *et al.*, 2022; Obsil *et al.*, 2020). Tras la isquemia cerebral, el aumento en la producción de ROS induce la disociación de Trx y 14-3-3 $\zeta$  de ASK1, activándola (Elsayed *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2017). Sin embargo, aún no se han reportado datos sobre la caracterización de su activación en respuesta a la isquemia.

Previamente el grupo de investigación en el que se realizó el presente trabajo, caracterizó la activación de ASK1 a lo largo de un curso temporal de 24 horas en cultivos primarios de neuronas corticales de rata sometidas a OGD. Los resultados muestran que la activación de ASK1 aumentó significativamente entre las 6 y 12 horas posteriores a la inducción de la isquemia (Apéndice, Fig. 1), seguido de una disminución gradual.

Para complementar la caracterización de ASK1, se estudiaron sus interacciones con las principales proteínas que modulan su estado inactivo y activo. Las proteínas evaluadas



fueron Trx y PRMT1 para el estado inactivo, y TRAF1 para su estado activo, de tal forma que se evaluó la regulación de ASK1 a través de sus PPI durante una recuperación de 24 horas. Se observó una disminución en la fosforilación de Trx y 14-3-3 $\zeta$  entre las 6 y 12 horas (Apéndice, Fig. 2). Estos resultados sugieren que en el curso temporal de 24 horas tras las condiciones de OGD, ASK1 no volvió a su estado conformacional inactivo. Sin embargo, después del pico de activación de ASK1, Trx vuelve a un estado reducido, lo que podría favorecer su unión a ASK1, suprimiendo así su activación (Apéndice, Fig. 3).

Además, la expresión de PRMT1 aumentó a las 6 horas (Apéndice, Fig. 2), sugiriendo que la activación de ASK1 que lleva a apoptosis se suprime en respuesta a la reducción de Trx y a la metilación por parte de PRMT1. Por su parte, TRAF1 tuvo un pico de expresión a las 24 horas (Apéndice, Fig. 2), lo que sugirió que TRAF1 podría estar promoviendo la apoptosis, a pesar de los reguladores negativos que podrían suprimir su activación. Sin embargo, se requiere profundizar en la interacción de TRAF1 y ASK1.

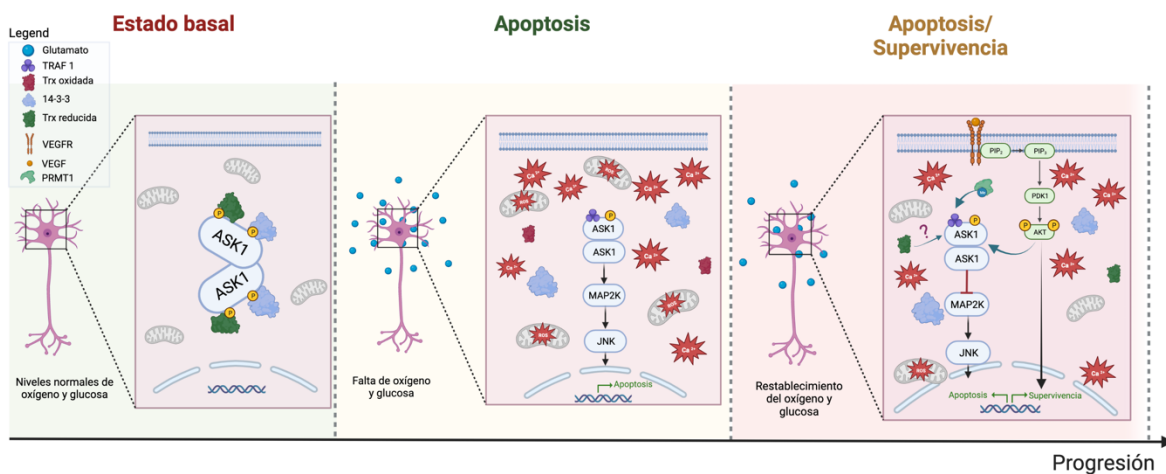
En conjunto, estos resultados demostraron que la activación de ASK1 en condiciones de isquemia es similar a la que se ha descrito en la literatura que es inducida por las ROS (revisado en Agrahari *et al.*, 2022; revisado en Obsilova *et al.*, 2021; revisado en Shiizaki *et al.*, 2013). Además, de sugerir que existen mecanismos que regulan la activación de esta vía de muerte, lo que podría indicar que ASK1 es un switch molecular que participa en vías de sobrevivencia.

Posteriormente se evaluó la relación de ASK1 con VEGF en las neuronas sometidas a OGD. Para esto se utilizaron el inhibidor de ASK1, NDQI1 y administraron VEGF pre-OGD y post-OGD. Se encontró que la apoptosis disminuyó para las células tratadas con NDQI1 y VEGF, tanto para el tratamiento pre como post OGD, lo que aumentó la viabilidad celular en todas las condiciones. El grupo al que se le administró VEGF y NDQI1 mostró una mayor actividad metabólica con respecto a los demás, indicando que bloquear ASK1 disminuyó la muerte celular, lo que podría estar promoviéndose por el efecto neuroprotector que ejerce VEGF (Apéndice, Fig. 4).

El mecanismo que subyace a la interacción de ASK1 y VEGF se desconoce. No obstante, en la literatura está reportado que, en condiciones de isquemia cerebral, VEGF actúa como un factor neuroprotector mediante la activación de la vía PI3K/Akt. Por lo que

se evaluó la activación de Akt en los cultivos sometidos a OGD. Se observó una disminución en su fosforilación entre las 2 y 6 horas posteriores al OGD, y la inhibición por wortmannina de PI3K resultó en una reducción de la viabilidad neuronal (Apéndice, Fig. 5). Estos resultados sugirieron que la activación de Akt ocurre después del inicio de la supresión de la apoptosis mediada por ASK1, lo que podría indicar que Akt también contribuye a la inactivación de ASK1 mediante su interacción con esta proteína. Sin embargo, todavía se desconoce si Akt protege contra la muerte neuronal que ocurre río abajo de ASK1 (Lu *et al.*, 2013).

En resumen, se caracterizó la activación de ASK1 en un modelo *in vitro* de neuronas corticales de rata (Fig. 5). Sin embargo, la progresión de la modulación ejercida por sus reguladores positivos y negativos durante la lesión isquémica no fue explicada completamente con el modelo previo. Por lo tanto, con base en estos resultados, decidimos establecer un modelo *in vitro* utilizando neuronas dopaminérgicas humanas derivadas de hESC para posteriormente evaluar como sus PPI regulan su función en condiciones de isquemia.



**Fig. 5 Modelo esquemático de la activación de ASK1 en la muerte neuronal por isquemia.** (Izquierda) En su estado basal o inactivo, ASK1 interactúa directamente con Trx y 14-3-3 $\zeta$ . (Centro) Tras un evento isquémico, la falta de oxígeno y glucosa promueve la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  en las neuronas y una producción excesiva de ROS. Las ROS disocian la interacción entre ASK1-Trx y 14-3-3 $\zeta$ , llevando a la autofosforilación de su CD, y el reclutamiento de otras proteínas como TRAF1. Como consecuencia, ASK1 se activa y desencadena la fosforilación de las MAPKs p38 y JNK, llevando a apoptosis. A medida que la lesión progresa, otros reguladores negativos de ASK1 se expresan, posiblemente suprimiendo su actividad apoptótica, entre ellos PRMT1, Trx reducida y Akt. PRMT1 metila a ASK1, suprimiendo su disociación de Trx y el reclutamiento de reguladores positivos. Por otro lado, Trx se reduce con el tiempo, lo que en conjunto con PRMT1 podría inactivar a ASK1. Además, Akt se activa por medio de la vía VEGFR-PI3K, aumentando la viabilidad celular. El aumento en la supervivencia neuronal podría deberse también a la inhibición de ASK1 mediante su interacción con Akt. En resumen, la respuesta apoptótica mediada por ASK1 puede suprimirse por diferentes reguladores negativos que se expresan conforme progresa la lesión. Sin embargo, se desconoce cómo es que estas proteínas inactivan a ASK1. Creada en BioRender

## Planteamiento del problema

La actividad de ASK1 está regulada por diferentes interacciones con otras proteínas de manera dependiente de contexto, por lo que entender el contexto fisiológico de su activación es fundamental para comprender su funcionamiento bajo condiciones celulares específicas, como las que ocurren para producir muerte neuronal después de un estímulo isquémico. En este sentido, resulta indispensable establecer un modelo con validez fisiológica que eventualmente permita comprender cómo las interacciones de ASK1 con proteínas reguladoras modulan su papel funcional en la fisiología de la muerte neuronal por isquemia en neuronas humanas.

## Hipótesis

ASK1 funciona como switch molecular entre las vías de supervivencia y muerte neuronal.

## Objetivo general

Establecer las condiciones para la implementación de un modelo KO de ASK1 en neuronas humanas derivadas de células troncales embrionarias mediante CRISPR-Cas9.

## Objetivos específicos

- Generar una estrategia de edición para eliminar la expresión de ASK1 en hESC utilizando el sistema CRISPR-Cas9.
- Realizar la edición de las hESC mediante CRISPR-Cas9.
- Establecer un modelo *in vitro* de neuronas dopaminérgicas humanas derivadas de células troncales embrionarias mediante un protocolo de diferenciación dopaminérgica de placa de piso.

## Diseño Experimental

Utilizamos el sistema CRISPR-Cas9 para establecer un KO del gen ASK1 en neuronas humanas derivadas de la línea hESC H9, con el fin posterior de comprender el papel funcional de ASK1 en la fisiología de la muerte neuronal por isquemia.

### Expansión de hESC

La línea hESC H9 (WA009) fue obtenida de WiCell (Madison, WI, USA). Las células se cultivaron en medio mTeSR (STEMCELL Technologies) sobre una matriz de Matrigel (Corning) diluida en medio DMEM/F12 (1:15; Gibco) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió diariamente hasta que las células alcanzaron una confluencia del ≈80%. Posteriormente, las células fueron sembradas o criopreservadas. Además, para incrementar la sobrevivencia y proliferación celular durante los primeros tres días de cultivo, se agregó un inhibidor selectivo de la cinasa asociada a Rho (ROCK), Y-27632 (10 μM; Tocris).

Característica	Línea H9
<b>Identificador y nombre de la línea celular</b>	WA009; H9
<b>Origen</b>	Humano
<b>Tipo de línea celular</b>	hESC
<b>Cariotipo</b>	46, XX

**Tabla 1** Características técnicas de la línea H9

### Criopreservación

Las células se criopreservaron en el medio de cultivo mTeSR suplementado con 10% de DMSO en crioviales de 1 ml. Los viales fueron congelados gradualmente y almacenados a -80°C durante 24 a 48 horas antes de ser transferidos a un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenamiento a largo plazo.

### CRISPR-Cas9

El proceso de edición genómica mediante el sistema CRISPR-Cas9 se realiza en varias etapas que a continuación se describirán (Fig. 6).

## Diseño de guías

Diseñamos los RNA guías para dirigir la edición génica a dos secuencias específicas en diferentes regiones del exón 1 de ASK1 (Tabla 2). Las guías se seleccionaron utilizando el programa [CRISPOR.org](http://CRISPOR.org), tomando como criterio de elección un puntaje alto en el score de especificidad en el sitio blanco, un score bajo por los posibles off-targets, y un bajo número de off-targets. Además, se verificó que las guías seleccionadas estuvieran prediseñadas y tuvieran puntajes altos por el proveedor IDT (Integrated DNA Technologies).

ID	Guías PAM	On-target score	Off-target score
185	CGCCGGACAACCGATGCCAG GGG	51	92
306	GTGATCAACGAAGCGAGCCA AGG	58	88

**Tabla 2** Especificaciones de gRNAs. Las guías contienen la secuencia blanco y en rojo se especifica la secuencia PAM correspondiente

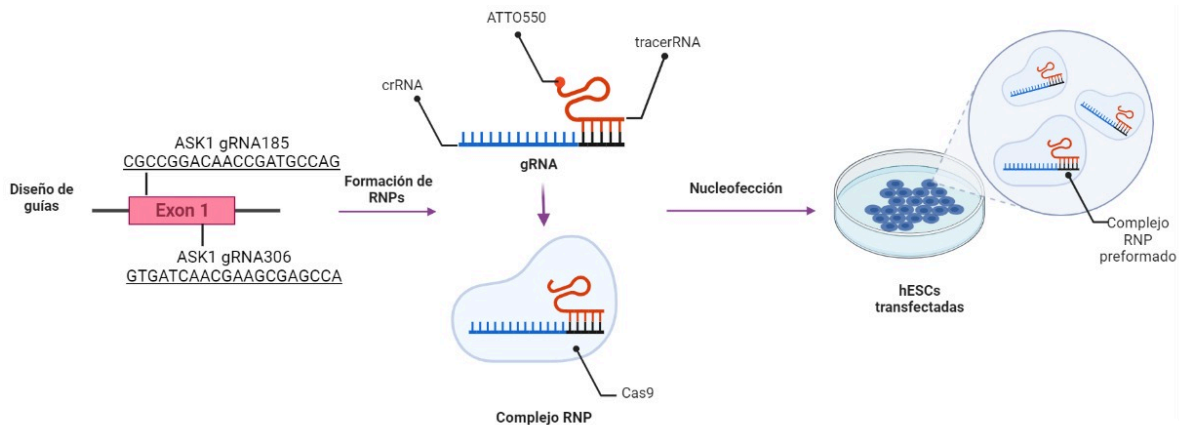
## Formación de los complejos de RNP

Para introducir el sistema CRISPR-Cas9 en las células, se decidió utilizar los complejos de ribonucleoproteína (RNP) preformados, que se formaron una hora antes de ser introducidos mediante nucleofección. Para formar los complejos RNP, inicialmente se unieron el crRNA (Integrated DNA Technologies) y el tracrRNA (Integrated DNA Technologies) para formar la gRNA. Se combinaron 1.2 µl de crRNA y 1.2 µl tracrRNA a 95°C durante 5 min para cada guía colocando el tubo en un termociclador. Después, la gRNA se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 15 a 20 min. Luego, se unieron 2.4 µM de la gRNA con 2 µM de Cas9 para formar el complejo RNP (Integrated DNA Technologies). Se repitió este proceso para ambas guías y se obtuvieron dos soluciones con los complejos correspondientes, cada una con un volumen final de 20 µl. La solución se incubó durante 20 min a temperatura ambiente, y una vez formados los complejos RNP, se mantuvieron en hielo hasta su transfección.

## Nucleofección de los complejos de RNP preformados

La transfección de los RNP preformados debe hacerse en una suspensión de células individuales, ya que la nucleofección de cúmulos celulares conduce a una eficiencia de transfección más baja y una menor reproducibilidad.

Para tener las hESC en una suspensión de células individuales, se lavó el cultivo con PBS y se incubó con la enzima disociadora de células, TrypLE Express (Gibco) a 37°C durante 7 min. Luego, se agregaron 2 ml de medio mTeSR para inactivar al TrypLe Express, y se raspó la superficie del pozo con un raspador celular para disgregar los cúmulos de células. El número de células en el cultivo se determinó mediante conteo con azul de tripano (Sigma) en la cámara de Neubauer. Se nucleofectaron entre  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^9$  células utilizando una solución de 100  $\mu$ l que contenía 40  $\mu$ l de los complejos RNP, la solución (solución y suplemento 1 en proporción 4.5:1) para nucleofectar las hESC del kit 2 de Human Stem Nucleofector (Lonza), y un enhancer a 2.4  $\mu$ M (Integrated DNA Technologies) para mejorar la eficiencia de la transfección. Para los controles, se agregó PBS libre de nucleasas en lugar de los complejos RNP preformados y el enhancer. La nucleofección se realizó utilizando el nucleofector de Lonza (programa A012). Las células transfectadas se sembraron sobre una matriz de Matrigel (Corning) y se cultivaron en medio mTeSR (STEMCELL Technologies) complementado con 10  $\mu$ M de inhibidor de ROCK (Tocris) previamente calentado a 37°C. Las células se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se observaron diariamente para evaluar cualitativamente su proliferación, y el efecto de la nucleofección.



**Fig. 6 Flujo de trabajo de edición mediante CRISPR-Cas9.** Se diseñaron dos guías para realizar un corte doble en el exón 1 de ASK1. Cada una de las guías se asoció con un tracrRNA y Cas9 individual. Los complejos RNPs preformados se nucleofectaron en las hESC WT. Creada en BioRender.

## Validación

Se llevaron a cabo ensayos de validación para medir la eficiencia de edición génica en diferentes momentos posteriores a la nucleofección (Fig. 7).

### *Fluorescencia*

Las células se examinaron 24 h después de la nucleofección mediante microscopía epifluorescente. Para marcar las células que internalizaron los complejos RNP preformados, se utilizó el reportero ATTO550 (Ex/Em=554-576nm) unido al tracerRNA (Integrated DNA Technologies), lo que permitió visualizar una marca roja en las células transfectadas. La eficiencia de transfección se calculó a partir de las imágenes para cada ronda de edición. El cálculo se realizó considerando el número de células totales, y el número de células que internalizaron el complejo.

### *Diluciones clonales*

Cuarenta y ocho horas después de la nucleofección, se disociaron las células transfectadas con TrypLE Express (Gibco). Luego, fueron diluídas a una concentración final de entre 0.3 a 0.5 células por 100  $\mu$ l de medio mTeSR complementado con 10  $\mu$ M del inhibidor de ROCK (Tocris). Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ l de células diluidas a cada pozo de una placa de 96 pozos, previamente recubierta con Matrigel (Corning). Después de seis a ocho días, las colonias individuales que crecieron fueron colectadas y expandidas.

### *Extracción de DNA y proteína*

Para la extracción del DNA genómico (gDNA), las células fueron despegadas con TryPLE Express (Gibco) y se centrifugaron durante 5 min a 500 g. El pellet se resuspendió en PBS y se repitió el proceso de centrifugación dos veces más. Se utilizaron entre 300 a 1000  $\mu$ l de buffer de digestión (100 mM de NaCl, 50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, Proteinasa K 2 mg/ml). Las células se incubaron en el buffer de digestión a 60° C durante 3 h.

Posteriormente, se tomó una muestra de 300  $\mu$ l y se agregaron 150  $\mu$ l de una solución 6M de NaCl. La mezcla se agitó por 30 s y se centrifugó a 13 000 rpm durante 12 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo al que se le añadieron 300  $\mu$ l de etanol frío al 100 %. Después de agitar el tubo, se centrifugó a 13 000 rpm durante 9 min, y se decantó el sobrenadante. El pellet se dejó secar durante aproximadamente 6 min.

Una vez obtenido el gDNA, se solubilizó utilizando Tris 10 mM y se incubó durante 1 h a 65°C. Después de este tiempo, el tubo se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min. La concentración y pureza del DNA se cuantificó mediante NanoDrop.

### PCR de punto final

#### On-target

Para evaluar la delección inducida mediante CRISPR-Cas9 a nivel del gDNA, se utilizó PCR de punto final, tomando el tamaño del amplicón como criterio para diferenciar entre células editadas y no editadas. Para ello, se diluyó el gDNA aislado a una concentración de 20 a 25 ng/ $\mu$ l y se utilizaron ~2  $\mu$ l para llevar a cabo la amplificación del sitio blanco, empleando los siguientes primers (Instituto de Fisiología Celular) (Tabla 3).

	Secuencia 5'-3'	Amplicón
<b>Fw</b>	<b>GGACGAGGGCATCACTTTC</b>	417 pb WT
<b>Rv</b>	<b>TCCAGCACGGTGGTTTCTC</b>	305 pb Editado

**Tabla 3 Primers on-target** Se especifican las secuencias usadas, así como el tamaño del amplicón WT y amplicón con la edición. Ambos primers se encuentran delimitando el área de edición.

#### Off-target

Para corroborar la presencia de los principales off-targets para cada guía, se realizó una PCR de punto final para los dos sitios con mayor puntaje (Off-target score > 0.1, según CRISPOR) para la guía 185 y los dos sitios con mayor puntaje para la guía 306. En la tabla siguiente se detallan los primers utilizados para cada uno de estos sitios (Tabla 4).

Guía	Blanco	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
185	Intergenic:RP5-1051H14.2-RP5-933E2.1	ACACCATGTTGTTCCCTTAGGAGGA	TCTGCAGGCTTAAGAAAGGTCA
185	Exon:SF3A1	ACAGTTGTCTCCGCAGTACCC	GGCACCACGTTGATTCTGGG
306	Intergenic:PLCB1-AL031655.1	AACTGATGTTCCCGTGGCTT	ACATGGAGGAAAACCTAATGTAGA
306	Intron:USP33	AGCCCACACAGTCATTTCTG	AGCCCACACAGTCATTTCTG

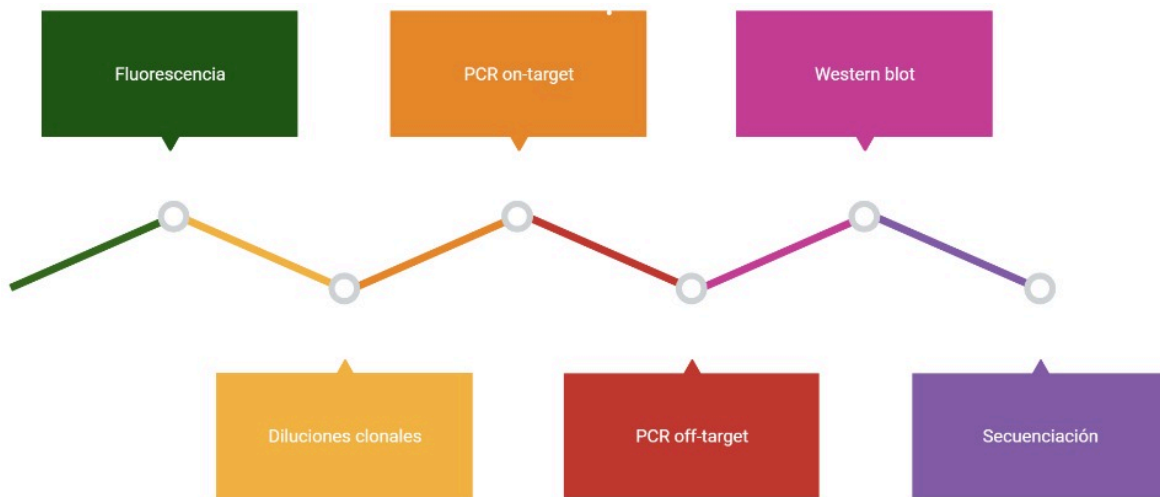
**Tabla 4 Primers off-target para cada una de las guías.** El orden en el que se presentan es descendente con respecto al off-target score.

#### Western blot

Para evaluar la expresión de la proteína, se realizó un Western blot en las células editadas. Para esto, las células se lisaron con el buffer de ensayo de Radioinmunoprecipitación (RIPA) (TBS1X, 1% Triton X-100, 1% S.D.S, 0.5% deoxicolato



de sodio) suplementado con el coctel inhibidor de proteasa (Roche) y PMSF (Roche). La concentración de cada muestra se cuantificó mediante el kit de ensayo de proteína DC (BIORAD). Se realizó una electroforesis de los lisados, seguida de un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo contra ASK1 (1:2000; Cell Signaling), y el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano picante anti-conejo (1:5000; Jackson HRP anti-rabbit).



**Fig. 7 Flujo de trabajo de validaciones de edición.** Se ejemplifica el orden en el que se realizaron cada una de las validaciones. Creada con BioRender.

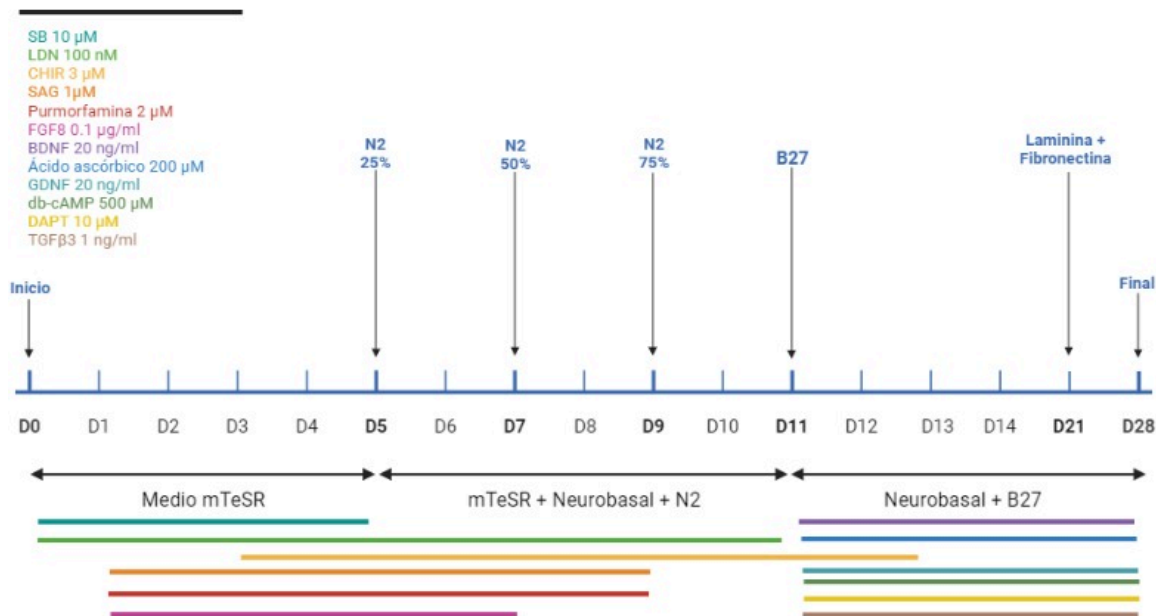
## Inmunocitoquímica

Las células se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 25 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS antes de procesarlas para el marcaje por inmunofluorescencia. Para la permeabilización, se utilizó una solución de lavado compuesta por 0.2% de Triton X-100 en PBS por 15 min en agitación lenta, seguido del bloqueo con 10% de suero normal de cabra y 0.1% de albúmina de suero bovino (BSA) durante 2 h. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Nanog (1:1000, PeproTech) para reconocer el factor de transcripción Nanog, anti-Tuj1(1:3000, Covance) para reconocer la proteína  $\beta$ -tubulina III (propia del citoesqueleto de neuronas inmaduras), anti-FOXA2 (1:500, Millipore) para identificar el factor de transcripción FOXA2, anti-TH (1:1000, Pel-Freez) para reconocer la enzima tirosina hidroxilasa presente en neuronas dopaminérgicas y anti-GFAP (1:200, Sigma) como marcador de la proteína ácida fibrilar glial propia de astrocitos. Estos se incubaron por un periodo de 24 a 72 h a 4°C. Posteriormente, se realizaron lavados con la solución de lavado y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados Alexa488 o Alexa546. Por último, se marcaron los núcleos con DAPI (1:10000) o Hoechst (1:1000) durante 5 min. Las

células fijadas en plástico se observaron con microscopio de epifluorescencia, mientras que las células fijadas en vidrio se montaron para ser observadas en el microscopio confocal. El número de células positivas al marcador se determinó mediante la cuantificación del número de núcleos positivos a DAPI o Hoechst, y el número de células que expresaban el marcador de interés.

### Diferenciación de hESC a neuronas dopaminérgicas

Las células hESC WT y las células ASK1<sup>-/-</sup> se diferenciaron a neuronas dopaminérgicas por 28 días siguiendo el protocolo de diferenciación dopaminérgica de placa de piso (López-Ornelas *et al.*, 2020) (Fig. 8). Se usaron moléculas pequeñas para inhibir dualmente los receptores de BMP y TGF- $\beta$  a partir de LDN193189 100 nM (Stemgent) y SB431542 10  $\mu$ M (Tocris), respectivamente. La vía canónica de Wnt se estimuló mediante la inhibición de la cinasa GSK-3 $\beta$ , con 3  $\mu$ M CHIR99021 (Stemgent). La señalización de Shh se estimuló con 1  $\mu$ M SAG (Sigma) y 2  $\mu$ M purmorfamina (Stemgent). Se añadió FGF-8 humano recombinante a 100 ng/ml (Peprotech) hasta el día 7. En el día 14, las células se cultivaron en medio Neurobasal con suplemento B27. La diferenciación neuronal y la sobrevivencia fueron promovidas por 20 ng/ml de BDNF (Peprotech), 2  $\mu$ M de ácido ascórbico (Sigma), 20 ng/ml de GDNF (Peprotech), 1 ng/ml de TGF- $\beta$ 3 (Peprotech), 5  $\mu$ M de dibutilil cAMP (Santa Cruz) y el inhibidor de Notch, DAPT a 10  $\mu$ M (Sigma) en el medio de cultivo. Al día 21, las células se disociaron usando TrypLE Express (Life Technologies) y se sembraron en placas tratadas con poli-L-ornitina, Fibronectina y Laminina. La diferenciación se detuvo al día 28.



**Fig. 8 Línea de tiempo del protocolo de diferenciación dopaminérgica de placa de piso.** Se indica la línea del tiempo con los días específicos donde se administra cada una de las moléculas pequeñas o factores tróficos (con su concentración) y el medio en el que debe hacerse. SB431542 (SB); LDN193189 (LDN); CHIR99021 (CHIR). Las flechas verticales indican el día de inicio y final del experimento, así como el día en que se cambia el medio y la matriz adherente. D5, D7 y D9 se utiliza medio mTeSR suplementado con N2 con 25, 50 y 75% de medio neurobasal, respectivamente. Al D11 se cambia a medio neurobasal con B27. Al D21 se cambia la matriz adherente de Matrigel a Laminina+Fibronectina. Creado con BioRender.

### Inducción de privación de glucosa y oxígeno (OGD)

Los cultivos de neuronas WT y ASK1<sup>-/-</sup> se sometieron a OGD. El OGD se indujo mediante el cambio de medio Neurobasal a medio DMEM sin glucosa (Gibco), después las neuronas se incubaron en una cámara de hipoxia humidificada durante 4 h a 37°C y 100% N<sub>2</sub>. Tras el periodo de OGD, se retiró el medio sin glucosa y se agregó medio neurobasal completo.

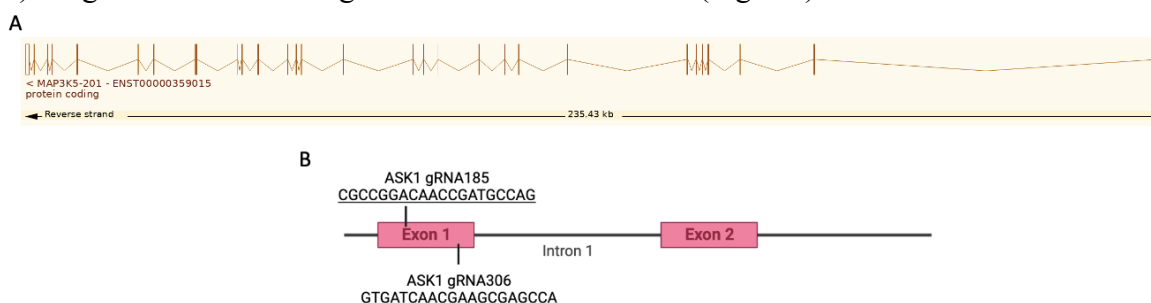
### Viabilidad celular a partir de actividad metabólica:

La actividad metabólica de los cultivos de neuronas WT en condiciones de normoxia (oxígeno y glucosa normales) y sometidas a OGD se midió a partir del ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). A cada cultivo se le agregaron 10  $\mu$ l de MTT por cada 100  $\mu$ l de medio. Se dejó incubar por 3 h a 37°C. Posteriormente se solubilizó el reactivo con isopropanol ácido. Finalmente se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 570nm.

## Resultados

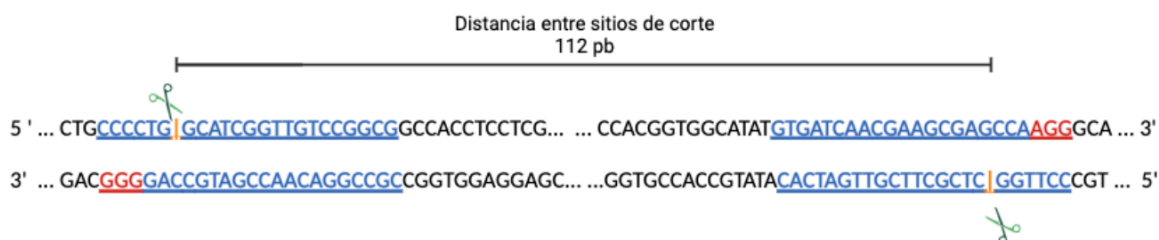
### Edición genética en hESC con el sistema CRISPR-Cas9

El gen de ASK1 tiene tres transcritos, de los cuales dos codifican para proteínas de 1374 aminoácidos (aa) y 1483 aa, respectivamente; mientras que el tercero no codifica para proteína. El transcrito que codifica la proteína de 1374 aa se compone de 30 exones (Fig. 9A), mientras que el que codifica la proteína de 1483 aa contiene 31 exones. Aunque el transcrito canónico de ASK1 es el que codifica para la proteína de 1374 aa, decidimos realizar la edición en una secuencia compartida por ambos transcritos de tal forma que los dos se editen, por lo que para generar el KO de ASK1 en las hESC diseñamos dos gRNAs (Tabla 2) dirigidas a diferentes regiones del exón 1 de ASK1 (Fig. 9B).



**Fig. 9 Estructura genómica de ASK1.** A) Esquema de exones e intrones del transcrito que codifica para la proteína de 1374 aa tomado de ensembl.org; B) Esquema de estrategia de eliminación dual para el exón 1 de ASK1, se indican las secuencias blanco (5'-3') y la cadena específica donde se encuentran.

La distancia entre los sitios de corte de las guías es de 112 pares de base (pb) (Fig. 10), distancia suficiente para evitar el impedimento estérico cuando la Cas9 está simultáneamente reclutada para ambos objetivos (Binda *et al.*, 2020; Nishimasu *et al.*, 2014), además de que los sitios de corte están en cadenas opuestas.



**Fig. 10 Diagrama de la distancia entre sitios de corte.** Las secuencias blanco de cada una de las gRNA se muestran en color azul donde la secuencia PAM correspondiente se ha marcado en rojo, además, se muestran los sitios de corte tres pb río arriba de la secuencia PAM, los cuales se han marcado con una línea amarilla.

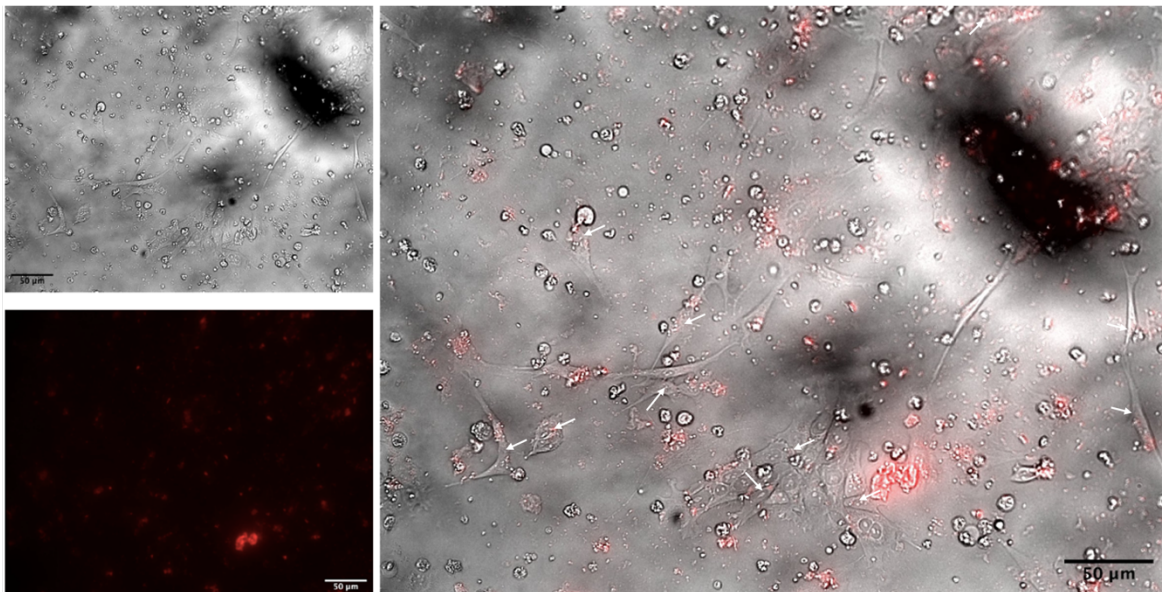
Utilizando el programa Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), evaluamos las consecuencias de la delección de la secuencia del exón 1 de ASK1. El programa predijo que la mutación que planteamos no alteraría el marco de lectura, pero podría generar cambios en la secuencia de aminoácidos y en el sitio de empalme, lo que resultaría en una proteína ASK1

truncada significativamente, ya que se perderían la mayoría de sus dominios conocidos (Tabla 5).

Residuos	Detalle estructural	Detalles	Resultado
83	TBD	Residuo pSer PPI: Trx, AKT	Perdido
680-938	CD	Actividad cinasa	Podría perderse
966	Motivo 14-3-3	Residuo pSer	Podría perderse

**Tabla 5** Detalles de la proteína truncada a nivel de residuos que podrían generarse tras la edición

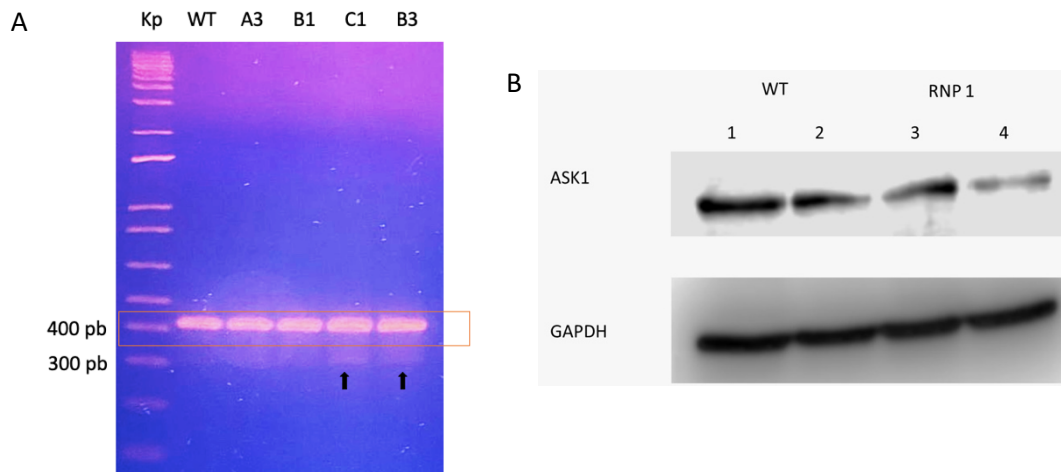
Nucleofectamos los complejos RNP preformados correspondientes a cada guía y evaluamos la internalización de estos en las células de 24 a 72 horas después de la nucleofección. Para visualizar la internalización de los complejos, utilizamos como marcador al ATTO550, el cual estaba unido al tracrRNA del complejo RNP preformado. Observamos que las hESC que internalizan los complejos RNP muestran la marca fluorescente roja (Fig. 11). La eficiencia de transfección en esta primera ronda de edición fue de ~30%.



**Fig. 11** Internalización de los complejos RNP preformados 30 h después de nucleofección en células hESC. A) Micrografía de campo claro de las hESC transfectadas; B) Micrografía de la expresión de ATTO550 (Ex/Em=554-576nm) en las hESC transfectadas; C) Sobrelape de campo claro con fluorescencia de ATTO550 indicando las células que internalizaron los complejos RNP preformados. Barra de escala 50μm, se utilizó el microscopio de epifluorescencia OLYMPUS IX71, con el objetivo 20x. La edición de la imagen se realizó en FIJI.

En un periodo de dos a tres días después de la nucleofección, las hESC editadas fueron aisladas clonalmente mediante diluciones seriadas en placas de 96 pozos. Las clonas se expandieron para extraer el gDNA.

El gDNA de cada colonia aislada se utilizó para validar la edición mediante una PCR de punto final. El amplicón WT esperado es de 417 pb, mientras que para las colonias editadas se espera un amplicón de 305 pb cuando ambas Cas9 cortan en las regiones deseadas. Los resultados de la PCR muestran que, de las cuatro colonias obtenidas, dos muestran delecciones heterocigotas, mientras que las otras dos no (Fig. 12A).

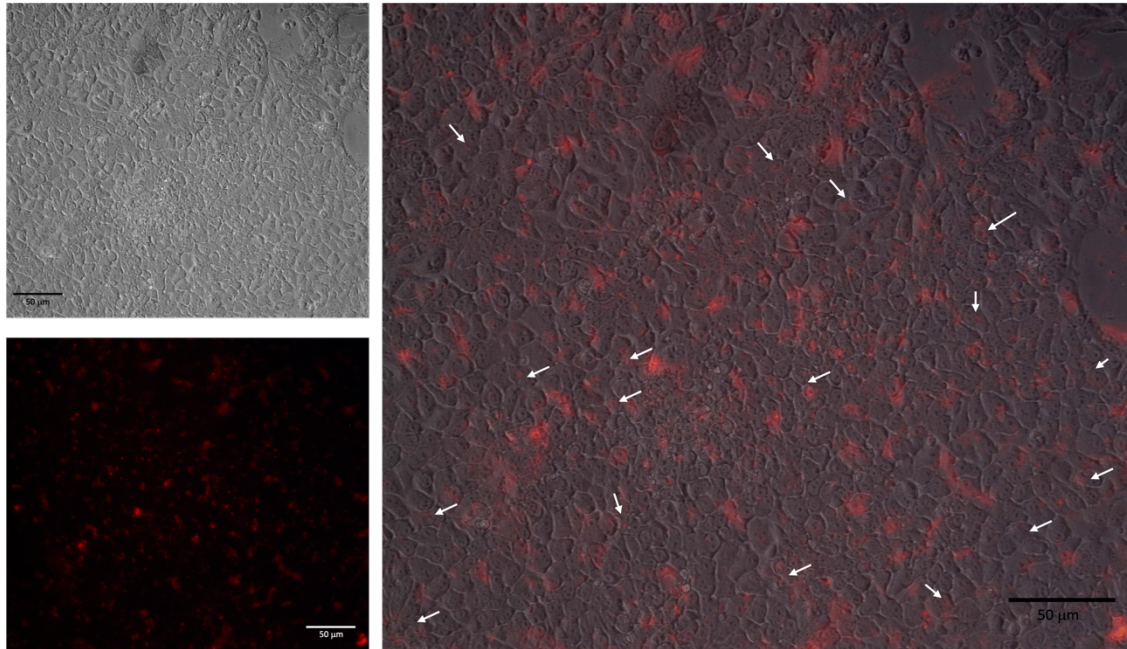


**Fig. 12 Amplificación PCR de la región blanco en las mutantes aisladas tras la primera ronda de edición**

A) Gel de agarosa del producto de la amplificación para la secuencia blanco. El primer carril corresponde a la escalera de DNA de 1kb. El segundo carril corresponde a una colonia WT, mientras que en los 4 carriles siguientes se encuentran las colonias aisladas clonalmente (A3, B1, C1 y B3). El amplicón esperado tras la delección es de 305 pb, y el amplicón WT es de 417 pb. Las flechas señalan el amplicón editado, y el rectángulo naranja indica el amplicón WT; B) Análisis de expresión de ASK1 mediante Western blot en una colonia heterogénea (presentó células editadas y WT). Los primeros dos carriles corresponden a una colonia de células WT y los último dos carriles a una colonia de células editadas. Los carriles 1 y 3 tienen la misma cantidad de proteína, mientras que los carriles 2 y 4 tienen la mitad de la concentración de la proteína cargada en los carriles 1 y 3.

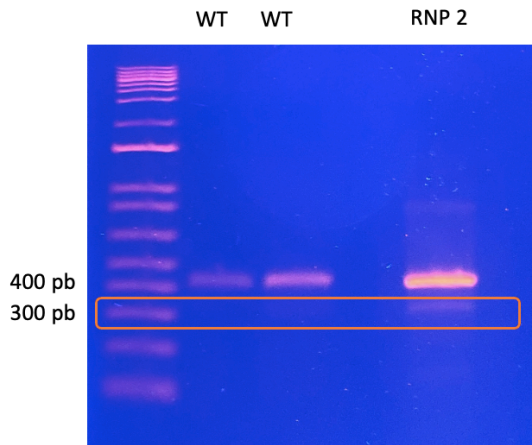
Asimismo, evaluamos la expresión de la proteína a partir de Western blot. Aunque la expresión de la proteína disminuyó tras una ronda de edición, no se eliminó completamente (Fig. 12B). Esta situación podría ser explicada a través de dos mecanismos: 1) las dos colonias con mutaciones heterocigotas pueden ser resultado de la presencia de células editadas y no editadas durante el proceso de dilución clonal, y 2) es posible que ambos complejos RNP preformados no hayan cortado en todas las células o sólo hayan cortado en uno de los dos alelos.

Por lo tanto, se llevó a cabo una segunda ronda de edición en las células que mostraron mutaciones heterocigotas. Esta segunda ronda de edición se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que en la primera (Fig. 13). Para esta ronda, la eficiencia de transfección fue del ~15%.



**Fig. 13 Internalización de complejos RNP preformados en células hESC re-editadas 72 h después de nucleofección.** A) Micrografía de campo claro de las hESC transfectadas por segunda vez; B) Micrografía de la expresión de ATTO550 (Ex/Em=554-576nm) en las hESC transfectadas por segunda vez; C) Sobreelape de campo claro con fluorescencia de ATTO550, indicando las células que internalizaron los complejos RNP preformados. Barra de escala: 50μm, se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon eclipse TE2000-U, con el objetivo 20x. La edición de la imagen se realizó con FIJI.

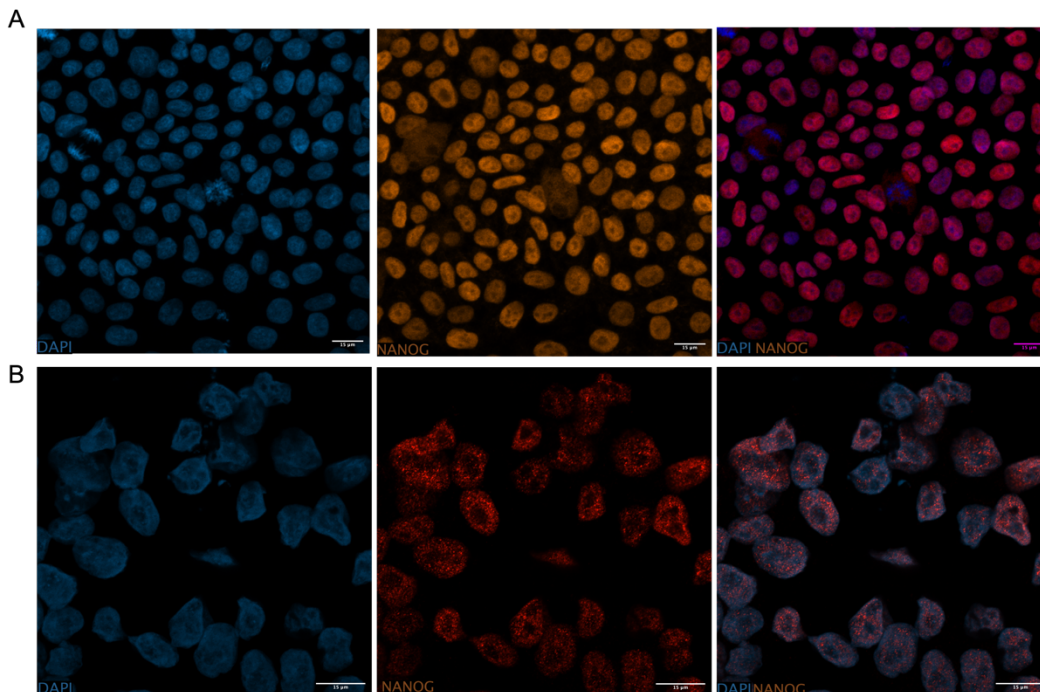
Los resultados de la validación a nivel del gDNA muestran una población heterogénea (Fig. 14) similar a la observada en la primera ronda de edición (Fig. 12). No obstante, se observa una mayor cantidad de amplicón editado. A pesar de esto, es necesario corroborar a nivel de la expresión de la proteína si este aumento de amplicón editado se refleja en la disminución de la proteína. En conjunto, estos resultados muestran una baja eficiencia de edición en nuestro modelo, indicando que dos rondas de edición no son suficientes para lograr el KO de ASK1 en las hESC. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo una tercera ronda de edición con modificaciones en el proceso de aislamiento de colonias para mejorar la eficiencia y homogeneidad de las poblaciones editadas.



**Fig. 14 Amplificación PCR de la región blanco en las mutantes aisladas tras dos rondas de edición.** Gel de agarosa del producto de la amplificación para la secuencia blanco. El primer carril corresponde a la escalera de DNA de 1kb. El segundo y tercer carril corresponden a una colonia WT, mientras que en el siguiente carril se encuentra la colonia aislada clonalmente (RNP2). El recuadro naranja resalta el amplicón editado de 305pb, no obstante, también hay presencia de un amplicón WT de 417pb.

### Pluripotencia de la línea H9 editada

Las células editadas no mostraron diferencias morfológicas con respecto a las células WT. Sin embargo, para asegurarnos de que las ediciones repetidas no afectaron el estado de pluripotencia de las células, evaluamos la expresión de Nanog, un factor de transcripción asociado con el mantenimiento del estado de pluripotencia a partir de inmunocitoquímica. La expresión de este marcador fue similar en ambas condiciones, tanto en las células WT como editadas, lo que sugiere que las hESC editadas mantienen su pluripotencia (Fig. 15).

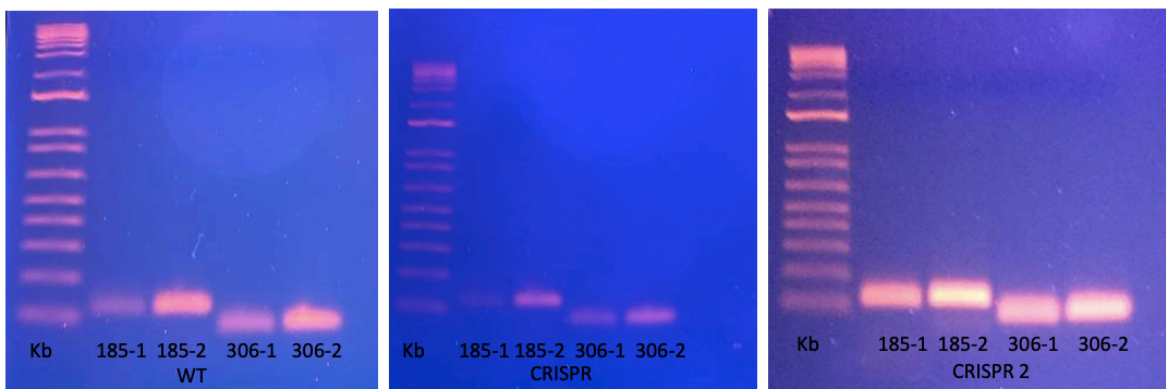


**Fig 15 El estado de pluripotencia de las células hESC editadas tras varias rondas de edición no se afectó.** A) hESC WT; B) hESC editadas con dos rondas de edición. (Izquierda) DAPI en azul para marcar núcleos. (Centro) NANOG en rojo para marcar el factor de transcripción Nanog. (Derecha) Sobrelape de NANOG con DAPI. Barra de escala 15µm, se utilizó el microscopio confocal LSM 800, con los objetivos 10x para las células WT y 20x para las células editadas. La edición de la imagen se realizó con FIJI.



## Off-targets

Una de las principales preocupaciones en cuanto a la edición del genoma, es el posible efecto off-target de las enzimas de edición, lo cual podría provocar cambios genómicos no deseados, como mutaciones y translocaciones cromosómicas (Duan *et al.*, 2014). Por lo tanto, realizamos PCR de punto final para evaluar los dos principales off-target de cada guía (Tabla 4). No detectamos ningún cambio en el tamaño de los amplicones de los off-target en las células editadas en comparación con las células WT, lo que sugiere que múltiples rondas de edición no aumentan la probabilidad de efectos off-targets, indicando una alta especificidad por parte de las guías elegidas (Fig. 16).



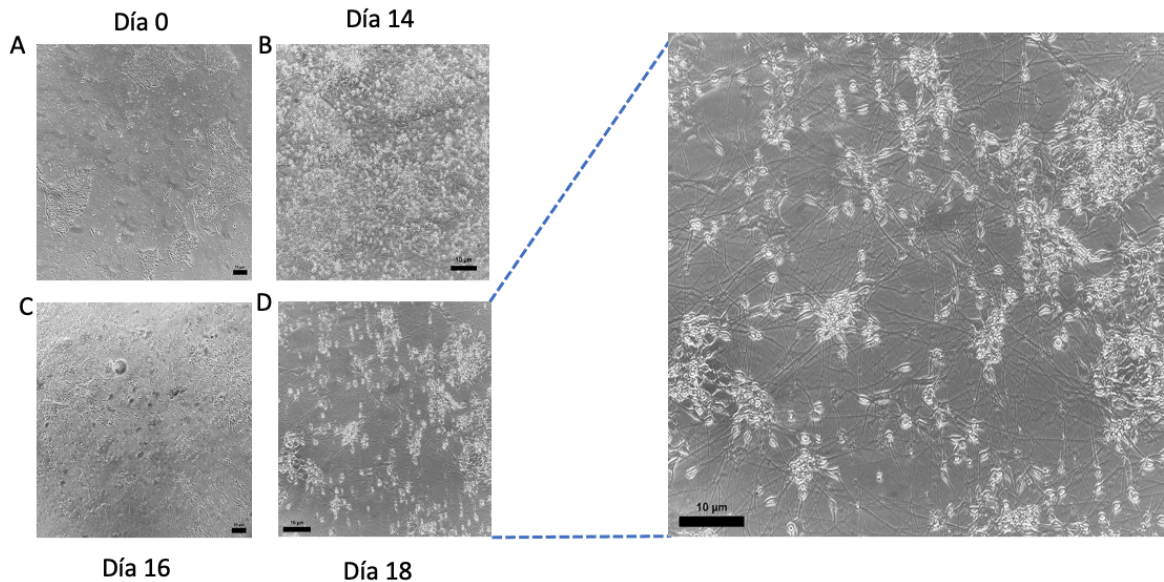
**Fig. 16 La amplificación de los off-target para cada una de las guías muestran que la edición genética no ocasionó mutaciones off-target.** Se evaluaron los off-targets de ambas guías en la misma colonia de células **A)** Colonia de hESC WT; **B)** hESC con una ronda de edición; **C)** hESC con dos rondas de edición. El primer carril corresponde a la escalera de DNA de 1kb; el dos, al off-target denominado 185-1 (120 pb); el carril tres, al off-target denominado 185-2 (125 pb); el carril cuatro, al off-target denominado 306-1 (73 pb); y el carril cinco, al off-target denominado 306-2 (75 pb).

## Diferenciación a neuronas dopaminérgicas

Para inducir la diferenciación de las hESC indiferenciadas WT a neuronas dopaminérgicas, seguimos el protocolo descrito por López-Ornelas *et al.*, 2020. Dado que uno de nuestros objetivos era evaluar el papel de ASK1 en las neuronas sometidas a condiciones similares a la isquemia, decidimos detener la diferenciación al día 28. En este punto, las células ya estaban comprometidas hacia un linaje dopaminérgico, pero seguían en proceso de maduración.

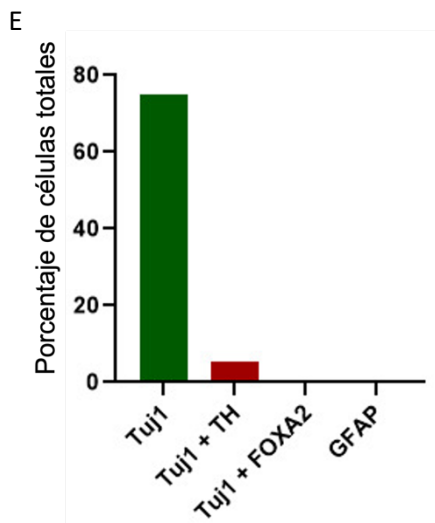
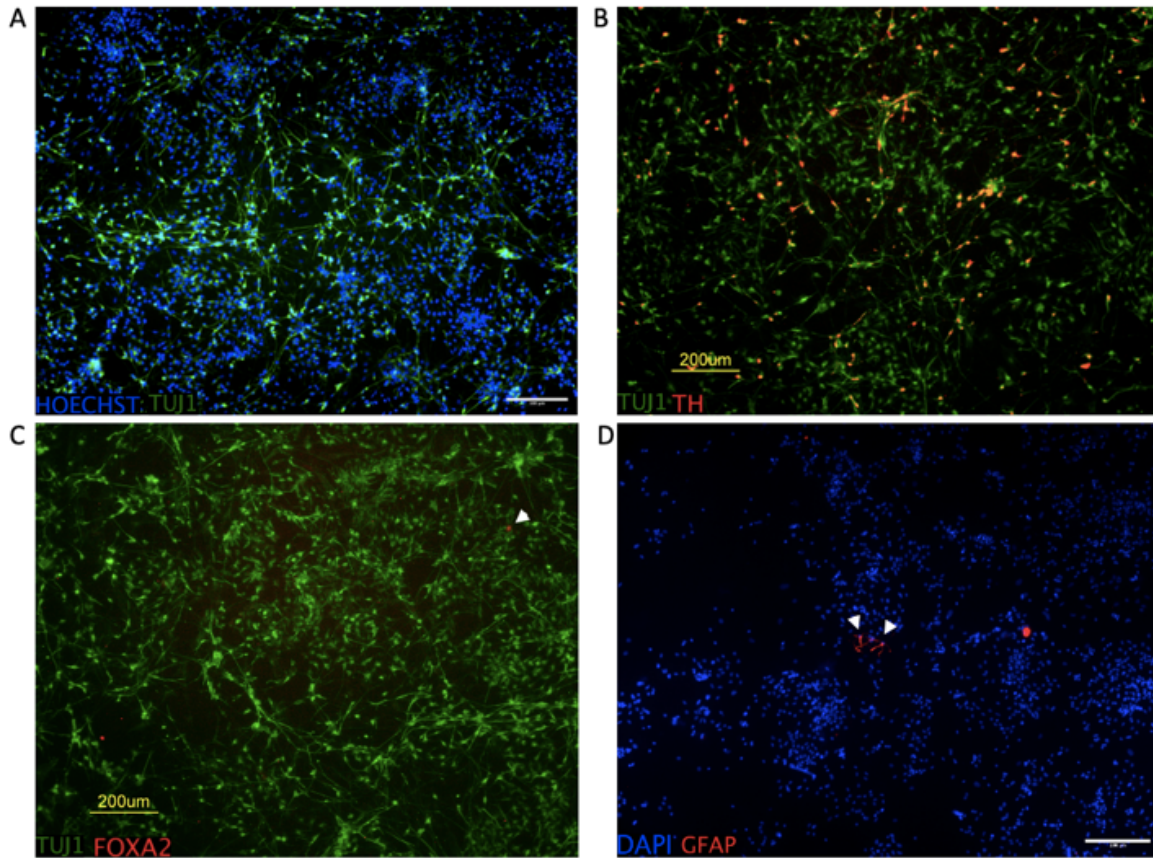
Evaluamos su morfología a lo largo de todo el protocolo de diferenciación (Fig. 17), fue en el día 18 cuando las células presentaron una morfología tipo neurona (Fig. 17D), sin embargo, en este punto las células aún no habían crecido en el medio de maduración que estaba conformado por medio Neurobasal + B27 suplementado con factores de crecimiento

y neurotróficos que promovían la diferenciación y sobrevivencia de las células (Fig. 8), por lo que decidimos proseguir con la diferenciación.



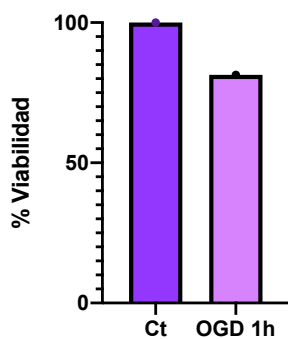
**Fig. 17 Cambios morfológicos de las hESC a lo largo del protocolo de diferenciación dopaminérgica de placa de piso.** Micrografías de campo claro de diferentes días a lo largo de la diferenciación **A)** Día 0: inicio de la diferenciación, se logran observar las colonias planas con bordes celulares distintos que forman las hESC cuando proliferan; **B)** Día 14: las células ya están inducidas a un linaje neuronal, por lo que son precursores neuronales; **C)** Día 16: Una parte de las células muestran morfología de glía radial, mientras otras ya muestran una morfología similar a neuronas; **D)** Día 18: las células se han diferenciado a neuronas dopaminérgicas, y es posible distinguir los somas y los axones. Barra de escala 10µm, se utilizó el microscopio Nikon Eclipse Ti-S, con el objetivo 20x. La edición de las imágenes se realizó en FIJI.

En el día 28 se interrumpió la diferenciación y se evaluó la expresión de TUJ1, un marcador de neuronas que indica la presencia de la proteína  $\beta$ -tubulina III en el citoesqueleto de los cuerpos neuronales y axones, y la expresión de los marcadores para neuronas dopaminérgicas, TH, el cual indica la presencia de la enzima tirosina hidroxilasa, la cual está involucrada en la síntesis de dopamina; y FOXA2, un factor de transcripción relevante para el desarrollo y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas (Fig. 18). Del total de células en el cultivo, aproximadamente el 80% fueron positivas a TUJ1 (Fig. 18A), mientras que alrededor del 5% fueron positivas a TUJ1 y TH (Fig. 18B), y aproximadamente el 0.03% fueron positivas para TUJ1 y FOXA2 (Fig. 18C). Estos porcentajes sugieren que la diferenciación no fue eficiente. Además, se evaluó la presencia de astrocitos mediante la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Fig. 18D), una proteína que se encuentra en el citoesqueleto de los astrocitos. Sin embargo, no se observó una presencia significativa de astrocitos en el día 28 del cultivo (Fig. 18E).



**Fig. 18 Caracterización de células diferenciadas al día 28** A) Micrografía de hESC diferenciadas marcadas con TUJ1 en verde y HOECHST en azul para marcar los núcleos; B y C) Micrografías de la expresión de los marcadores específicos de neuronas dopaminérgicas en rojo junto con la expresión de TUJ1 en verde, B) TH y C) FOXA2; D) Micrografía de la expresión de GFAP en rojo y DAPI en azul para marcar los núcleos; E) Cuantificación de co-expresión para cada marcador n=1. Barra de escala en los paneles A y D 100µm, se utilizo el microscopio confocal LSM 800, con el objetivo 10x. Barra de escala en los paneles C y D 200µm, se utilizo el microscopio de fluorescencia Nikon eclipse TE2000-U, con el objetivo 10x.

## OGD y actividad metabólica de neuronas



**Fig. 19 Viabilidad celular de neuronas dopaminérgicas sometidas a 1h de OGD y 24 h de recuperación.** La diferencia entre la actividad metabólica del grupo en condiciones de normoxia (Ct) y grupo OGD fue significativa de 19.65%. n=1.

En el día 28, las neuronas WT fueron sometidas a 1h de OGD y 24 h de recuperación. Posteriormente se evaluó su viabilidad utilizando el ensayo de MTT. Las condiciones experimentales utilizadas fueron las mismas que en el proyecto previo del laboratorio. Sin embargo, para el nuevo modelo los resultados obtenidos mostraron que sólo el 19.65% de las células murieron (Fig. 19), lo que nos llevó a concluir que la OGD de una hora es un estímulo demasiado bajo para inducir la muerte celular en las neuronas humanas. Además de que la duración de la OGD no fue suficiente para causar un porcentaje de muerte significativo, otro factor que podría haber afectado fue el medio de recuperación, ya que se utilizó el medio de maduración, el cual contiene factores de crecimiento (BDNF y GDNF) que contribuyen a la protección de las neuronas durante la recuperación. Por lo que sugerimos realizar modificaciones experimentales para obtener una diferencia significativa entre los grupos.

## Discusión

Con el fin de generar un modelo *in vitro* con validez fisiológica para el estudio del papel funcional de ASK1 en la fisiología de la muerte neuronal por isquemia, establecimos un modelo KO en hESC para ASK1 utilizando el sistema CRISPR-Cas9. La estrategia de edición se basó en utilizar dos gRNA para delimitar una secuencia específica del exón 1 de ASK1 (Fig. 9).

El sistema se introdujo a las células en forma de complejos RNP preformados. Este método de entrega de la maquinaria en forma de proteínas preformadas es más rápido ya que no requiere transcripción ni traducción intracelular, lo que permite una alta eficiencia de edición y reduce los efectos off-target, la mutagénesis insercional y las respuestas inmunitarias (Mout *et al.*, 2017; revisado en Zhang *et al.*, 2021).

El diseño de las gRNA se realizó mediante la herramienta CRISPOR.org, la cual permite encontrar gRNA en una secuencia dada (Concordet & Haeussler, 2018). Las guías elegidas fueron aquellas que presentaban un puntaje alto en el score de especificidad por la secuencia blanco, un score bajo de especificidad por posibles off-targets, y un bajo número de off-targets. Además, las dos guías elegidas coincidían con guías prediseñadas por el proveedor IDT (Tabla 2).

La distancia entre los sitios de corte de cada una de las gRNA es de 112 pb (Fig. 10). Además, cada uno de estos sitios se encuentra en la hebra opuesta a la del otro, lo que evita cualquier impedimento estérico cuando la Cas9 se recluta simultáneamente en ambos blancos. El programa Mutation Taster predijo que la mutación generaría cambios en la secuencia de aminoácidos y en el sitio de empalme, lo que resultaría en una proteína truncada, ya que se perderían la mayor parte de sus dominios funcionales (Tabla 5).

Los métodos actuales para seleccionar mutantes se basan principalmente en la selección a partir de antibióticos o en la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (Jillette *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2023). Ambas estrategias tienen ventajas y desventajas, mientras que la selección basada en antibióticos puede resultar tóxica para las células y a menudo requiere de una selección adicional, las estrategias basadas en FACS son lo suficientemente sensibles como para detectar marcadores de fluorescencia expresados en el sistema (Koch *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2023).

Los complejos RNP preformados que utilizamos para introducir la maquinaria de edición estaban compuestos por un tracrRNA acoplado al marcador fluorescente ATTO550. El objetivo de este marcaje es permitir el aislamiento de las células que han internalizado el complejo utilizando FACS, lo que asegura que las células que se expandan sean aquellas con una mayor probabilidad de presentar la mutación deseada. Sin embargo, al igual que en el aislamiento basado en resistencia a antibióticos, el aislamiento por medio de FACS generalmente requiere una clonación adicional para obtener poblaciones monoclonales (Arndell *et al.*, 2019; Koch *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2023).

Entre 30 y 72 h después de la nucleofección, evaluamos si las células habían internalizado los complejos (Fig. 11). Debido a limitaciones experimentales, no fue posible llevar a cabo la selección utilizando FACS. Por lo tanto, optamos por realizar la selección de las mutantes mediante diluciones clonales. La mutación generada no causa cambios visibles en el fenotipo de las hESC, por lo que utilizamos la PCR y la electroforesis de agarosa para identificar las células mutadas. A pesar de que no es posible conocer la longitud de indels introducidos tras la reparación, dada nuestra estrategia de corte dual, pudimos aproximar el tamaño de la secuencia blanco editada.

Para distinguir entre las colonias de células WT y las editadas, diseñamos los primers que delimitaban la secuencia blanco del exón 1 (Tabla 3). El tamaño del amplicón obtenido utilizando estos primers para la secuencia WT fue de 407 pb, mientras que en la secuencia editada, que perdió 112pb, el tamaño del amplicón fue de 305 pb. Estas diferencias en el tamaño de los amplicones nos permitieron distinguir y caracterizar las células editadas de las no editadas.

Tras la primera ronda de edición observamos que, a pesar de la expansión clonal, solo 2 de las 4 colonias aisladas mostraban una tenue banda de 305pb (Fig. 12A). En las colonias con dos bandas, observamos que las células editadas representaban un porcentaje mucho menor de la población editada. De tal forma que obtuvimos colonias policlonales, que seguían expresando ASK1 (Fig. 12B). Esta situación podría ser explicada a través de dos mecanismos: 1) las colonias con mutaciones pueden ser resultado de la presencia de células editadas y no editadas durante el proceso de dilución clonal, y 2) es posible que ambos

complejos RNP preformados no hayan cortado en todas las células o sólo hayan cortado en uno de los dos alelos.

En la literatura está reportado que la edición por CRISPR-Cas9 en células humanas suele producir modificaciones monoalélicas, lo que dificulta la selección y el aislamiento de las células que experimentan modificaciones bialélicas deseadas, ya que representan un porcentaje mucho menor de la población editada (Singh *et al.*, 2023). Por lo tanto, se recomiendan rondas complementarias de edición y aislamiento hasta obtener una mutante editada bialélicamente (Singh *et al.*, 2023; Supharattanasitthi *et al.*, 2019).

Decidimos llevar a cabo una segunda ronda de edición en las colonias que presentaron ambas bandas, tanto editada como WT. Los resultados obtenidos de esta segunda ronda de edición muestran un aumento en la cantidad de amplicón editado (Fig. 14) en comparación con la primera ronda (Fig. 12A). Sin embargo, a pesar de esta edición, la población celular seguía siendo heterogénea. Estos resultados sugieren que se deben realizar modificaciones en el proceso de aislamiento para mejorar la homogeneidad de las poblaciones editadas. Además, demuestran la baja eficiencia de edición de las hESC. Los porcentajes de eficiencia de edición reportados van del 2% al 10% (Bohaciakova *et al.*, 2017; Mali *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Por lo que se requieren realizar hasta cinco rondas de edición para obtener clonas homocigotas (Bohaciakova *et al.*, 2017)

Los efectos off-target son una preocupación importante con el sistema CRISPR/Cas9, por lo que elegimos los primeros 2 off-target para una guía, y los 2 primeros para la otra. Sin embargo, los efectos off-target estaban teóricamente limitados debido al riguroso diseño de las gRNA y la estrategia utilizada para introducir la maquinaria. A pesar de esto, comprobamos mediante PCR que los 4 sitios posibles de off-target estuvieran presentes. Una de las preocupaciones que surgieron al someter las células a múltiples rondas de edición fue el aumento de la probabilidad de cortar algún off-target. Sin embargo, los resultados muestran que no hubo cambios en el tamaño del amplicón de los 4 sitios analizados a lo largo de las rondas de edición (Fig. 16). Estos resultados sugieren que el sistema CRISPR-Cas9 utilizado es relativamente específico y efectivo para la generación de la línea H9-ASK1<sup>-/-</sup>.

Asimismo, corroboramos que las hESC editadas mantuvieron el estado de pluripotencia tras varias rondas de edición. Por lo que, evaluamos la expresión del marcador

de pluripotencia Nanog y observamos que la expresión de Nanog en las células editadas es similar que en las clonas WT, indicando que el estado de pluripotencia se mantiene (Fig. 15), lo que sugiere que su capacidad para diferenciarse a cualquier linaje celular no se debería afectar.

Para establecer el modelo KO para ASK1 en neuronas humanas, implementamos en el laboratorio un protocolo de diferenciación de las hESC WT a neuronas dopaminérgicas de placa de piso. Se han reportado varios protocolos para generar neuronas a partir de hPSC utilizando diversos métodos. Sin embargo, ha resultado difícil establecer métodos fiables para generar neuronas derivadas de hPSC que presenten características electrofisiológicas maduras (revisado en Wang *et al.*, 2020). Uno de los enfoques más empleados consiste en inducir la diferenciación neuronal a través de la inhibición dual de las proteínas SMAD (Gunhanlar *et al.*, 2018). Esta inhibición favorece la diferenciación hacia el linaje neuronal, el cual puede ser direccionado hacia un linaje dopaminérgico de la placa del piso mediante la aplicación secuencial de moléculas de patrón definido que imitan el desarrollo *in vivo* del mesencéfalo (Chambers *et al.*, 2009; Kriks *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2011; Perrier *et al.*, 2004).

Como se mencionó anteriormente, la alta demanda energética por parte de las neuronas las hace más vulnerables a un daño isquémico independientemente de su linaje neuronal, y dado que la expresión de ASK1 es ubicua, decidimos utilizar el protocolo de diferenciación a neuronas dopaminérgicas de placa de piso utilizado en López-Ornelas *et al.*, 2020 (Fig. 8).

Las neuronas derivadas de hESC mediante este protocolo pueden mantenerse por varias semanas con el medio de maduración. Sin embargo, para el proyecto, decidimos detener la diferenciación en el día 28, ya que en este punto la mayoría de las células mostraban una morfología similar a la de las neuronas (Fig.17). Para corroborar el tipo celular presente en el cultivo, evaluamos mediante inmunocitoquímica la expresión de los marcadores neuronales dopaminérgicos Tuj1, TH y FOXA2 (Fig. 18).

En el día 28, sometimos a las neuronas WT diferenciadas a una OGD de 1 hora. Sin embargo, los resultados de la actividad metabólica indicaron que este estímulo estresante no fue suficiente para inducir un porcentaje significativo de muerte celular en las neuronas



humanas (Fig. 19). Esto nos llevó a considerar que la sobrevivencia celular estaba siendo promovida por los factores neurotróficos GDNF y BDNF presentes en el medio de maduración.

Por lo tanto, sugerimos realizar modificaciones experimentales, tales como incrementar la duración de la OGD y reemplazar el medio de maduración por Neurobasal + B27 24 horas antes de la OGD, y durante la recuperación. Creemos que estas modificaciones pueden proporcionar un entorno más adecuado para evaluar los efectos de la muerte celular en las neuronas y permitirnos estudiar el papel de ASK1 en estas condiciones.

Los datos previos del laboratorio sugieren que después de la isquemia, los reguladores positivos de ASK1 están al alza durante su pico de activación, mientras que los reguladores negativos se encuentran a la baja. A medida que la lesión progresa, la expresión de los reguladores negativos aumenta, lo que sugiere una búsqueda de la homeostasis a través de un microambiente más favorable que promueva mecanismos de recuperación endógena.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, así como el hecho de que ASK1 es una proteína ampliamente expresada y conservada evolutivamente, el modelo KO de ASK1 en neuronas derivadas de hESC nos brindará la oportunidad de investigar los mecanismos moleculares subyacentes a la transición de ASK1 desde su estado hiperactivo durante la isquemia hasta su estado normal.

## Perspectivas

Los resultados de la segunda ronda de edición muestran que se requieren modificaciones en el proceso de aislamiento y selección de clonas. Por lo tanto, planeamos realizar una tercera ronda de edición con el objetivo de aumentar la población de células editadas y aumentar la probabilidad de encontrar una clona homocigota mediante el incremento en la cantidad de diluciones clonales. Además, se llevarán a cabo las validaciones del tamaño de amplicón y expresión de la proteína, así como controles para detectar los efectos off-targets y verificar el estado de pluripotencia. Posteriormente, purificaremos el amplicón editado de una clona homocigota, y se enviará para su secuenciación con el fin de identificar los indels introducidos.

Además, realizaremos modificaciones en las condiciones experimentales del OGD. Inicialmente, aumentaremos la duración del OGD de 1 hora a 2 y 4 horas. También cambiaremos el medio de maduración por Neurobasal + B27 24 horas antes del OGD, y durante la recuperación. Esperamos que estas modificaciones pueden crear un entorno más propicio para evaluar los efectos de la delección de ASK1 en la muerte celular en las neuronas.

Basándonos en que la delección del gen que codifica para ASK1 en ratones no genera alteraciones aparentes en el desarrollo de los animales (Tobiume *et al.*, 2001), y considerando nuestros resultados de inmunocitoquímica en las células editadas, anticipamos que la diferenciación de las células H9-ASK1<sup>-/-</sup> será similar a la de las células WT. Por lo que utilizaremos las mismas condiciones experimentales empleadas con las WT para evaluar su viabilidad celular tras ser expuesta a OGD. Posteriormente, evaluaremos la viabilidad neuronal mediante citometría de flujo a partir del kit de ensayo de Apoptosis/Necrosis ab176749 (Abcam) que permite distinguir entre células vivas, apoptóticas y necróticas, esperando ver un mayor porcentaje de neuronas H9 ASK1<sup>-/-</sup> vivas en comparación con las WT. Estos resultados validarían el modelo establecido.

La caracterización de la activación de ASK1 y la generación de este modelo nos permitirá explorar si ASK1 funciona como un switch molecular en respuesta a la isquemia a través de sus PPI. Para profundizar en su regulación a nivel de sus PPI, llevaremos a cabo estudios de pérdida y ganancia de función mediante mutantes para ASK1 en residuos específicos de los principales sitios de interacción que modulan su actividad. Utilizaremos plásmidos que codifican a ASK1 con mutaciones puntuales en los en los residuos S83, T848 y S966. Estas mutantes se realizaron por el grupo de investigación del Dr. Torres Quiroz en el Instituto de Fisiología Celular.

Las mutantes para ASK1 presentarán mutaciones puntuales en los residuos S83, T848 y S966 de ASK1 para simular la fosforilación del residuo mediante la sustitución de la serina o de la treonina por un ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E), mientras que para simular la falta de fosforilación se sustituirán por una alanina (A). Estas mutaciones, una con ganancia y otra con pérdida de la función de ASK1, respectivamente. Las mutaciones realizadas fueron las siguientes: S83A, S83D, T848A, T848E, S966A y S966D. Las mutantes S83D y S966D simulan la fosforilación en los residuos que regulan negativamente la función

de ASK1, mientras que las mutantes S83A y S966A simulan las formas no fosforiladas, indicando la activación de ASK1. En el caso de la mutante T848, la mutación T848E lleva al estado activo de ASK1 mientras que la T848A lo lleva a su estado inactivo.

La estructura de una proteína determina su función, por lo que comprender el mecanismo molecular y las interacciones de ASK1 con sus principales reguladores como TRX, 14-3-3 $\zeta$ , TRAF1, TRAF2 y PRMT1 podría ayudar a entender la regulación de ASK1 y cómo afecta la interacción entre las vías de muerte celular y supervivencia desencadenadas por la isquemia, ya que la actividad catalítica de ASK1 no es el único evento de señalización intracelular que tiene lugar en esta patología.

## Conclusión

- La estrategia de edición diseñada, tanto el corte dual, como la introducción de la maquinaria en forma de complejos RNP preformados a la célula muestran una alta especificidad por la secuencia blanco, ya que no se detectaron cortes en los principales off-targets de las gRNA.
- Dada la baja eficiencia de edición reportada para las hSEC, el número de rondas de edición no fue suficiente para obtener clones homocigotas, y debemos seguir editando.
- Al día 28 de diferenciación, las células diferenciadas son en su mayoría neuronas.
- Para obtener un porcentaje significativo de muerte celular en la población neuronal y evaluar los efectos de la eliminación de ASK1 en las neuronas derivadas de hESC, se recomienda aumentar la duración del OGD y reemplazar el medio de maduración por Neurobasal + B27 24 horas antes del OGD y durante la recuperación.

## Referencias

- Agrahari, A. K., Dikshit, M., & Asthana, S. (2022). Crystallographic mining of ASK1 regulators to unravel the intricate PPI interfaces for the discovery of small molecule. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *20*, 3734–3754. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.07.008>
- Ahn, J.-Y. (2014). Neuroprotection Signaling of Nuclear Akt in Neuronal Cells. *Experimental Neurobiology*, *23*(3), 200–206. <https://doi.org/10.5607/en.2014.23.3.200>
- Alloubani, A., Saleh, A., & Abdelhafiz, I. (2018). Hypertension and diabetes mellitus as a predictive risk factors for stroke. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, *12*(4), 577–584. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.03.009>
- An, N., & Kang, Y. (2014). Thioredoxin and Hematologic Malignancies. En *Advances in Cancer Research* (Vol. 122, pp. 245–279). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420117-0.00007-4>
- Aoki, I., Ebisu, T., Tanaka, C., Katsuta, K., Fujikawa, A., Umeda, M., Fukunaga, M., Takegami, T., Shapiro, E. M., & Naruse, S. (2003). Detection of the anoxic depolarization of focal ischemia using manganese-enhanced MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, *50*(1), 7–12. <https://doi.org/10.1002/mrm.10528>
- Arndell, T., Sharma, N., Langridge, P., Baumann, U., Watson-Haigh, N. S., & Whitford, R. (2019). GRNA validation for wheat genome editing with the CRISPR-Cas9 system. *BMC Biotechnology*, *19*(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0565-z>
- Asih, P. R., Prikas, E., Stefanoska, K., Tan, A. R. P., Ahel, H. I., & Ittner, A. (2020). Functions of p38 MAP Kinases in the Central Nervous System. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *13*, 570586. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.570586>
- Avin, A., Levy, M., Porat, Z., & Abramson, J. (2017). Quantitative analysis of protein-protein interactions and post-translational modifications in rare immune populations. *Nature Communications*, *8*(1), 1524. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01808-6>
- Bandyopadhyay, S., Chiang, C., Srivastava, J., Gersten, M., White, S., Bell, R., Kurschner, C., Martin, C. H., Smoot, M., Sahasrabudhe, S., Barber, D. L., Chanda, S. K., & Ideker, T. (2010). A human MAP kinase interactome. *Nature Methods*, *7*(10), 801–805. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1506>
- Bernardo-Castro, S., Sousa, J. A., Brás, A., Cecília, C., Rodrigues, B., Almendra, L., Machado, C., Santo, G., Silva, F., Ferreira, L., Santana, I., & Sargento-Freitas, J. (2020). Pathophysiology of Blood–Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. *Frontiers in Neurology*, *11*, 594672. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.594672>
- Bernhardt, J., Hayward, K. S., Kwakkel, G., Ward, N. S., Wolf, S. L., Borschmann, K., Krakauer, J. W., Boyd, L. A., Carmichael, S. T., Corbett, D., & Cramer, S. C. (2017). Agreed Definitions and a Shared Vision for New Standards in Stroke Recovery Research: The Stroke Recovery and Rehabilitation Roundtable Taskforce. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, *31*(9), 793–799. <https://doi.org/10.1177/1545968317732668>
- Binda, C. S., Klaver, B., Berkhout, B., & Das, A. T. (2020). CRISPR-Cas9 Dual-gRNA Attack Causes Mutation, Excision and Inversion of the HIV-1 Proviral DNA. *Viruses*, *12*(3), 330. <https://doi.org/10.3390/v12030330>
- Bohaciakova, D., Renzova, T., Fedorova, V., Barak, M., Kunova Bosakova, M., Hampl, A., & Cajanek, L. (2017). An Efficient Method for Generation of Knockout Human Embryonic

- Stem Cells Using CRISPR/Cas9 System. *Stem Cells and Development*, 26(21), 1521–1527. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0058>
- Brys, R., Gibson, K., Poljak, T., Van Der Plas, S., & Amantini, D. (2020). Discovery and development of ASK1 inhibitors. En *Progress in Medicinal Chemistry* (Vol. 59, pp. 101–179). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2020.02.001>
- Bunkoczi, G., Salah, E., Filippakopoulos, P., Fedorov, O., Müller, S., Sobott, F., Parker, S. A., Zhang, H., Min, W., Turk, B. E., & Knapp, S. (2007). Structural and Functional Characterization of the Human Protein Kinase ASK1. *Structure*, 15(10), 1215–1226. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.08.011>
- Campbell, B. C. V., De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., & Donnan, G. A. (2019). Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 70. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
- Cárdenas-Rivera, A., Campero-Romero, A. N., Heras-Romero, Y., Penagos-Puig, A., Rincón-Heredia, R., & Tovar-y-Romo, L. B. (2019). Early Post-stroke Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Hinders the Receptor 1-Dependent Neuroprotection Afforded by the Endogenous Ligand. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 270. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00270>
- Cassidy, J. M., & Cramer, S. C. (2017). Spontaneous and Therapeutic-Induced Mechanisms of Functional Recovery After Stroke. *Translational Stroke Research*, 8(1), 33–46. <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0467-5>
- Cekanaviciute, E., Fathali, N., Doyle, K. P., Williams, A. M., Han, J., & Buckwalter, M. S. (2014). Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice: Astrocytic TGFβ Reduces Neuroinflammation. *Glia*, 62(8), 1227–1240. <https://doi.org/10.1002/glia.22675>
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology*, 27(3), 275–280. <https://doi.org/10.1038/nbt.1529>
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(8), 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- Chen, M., Qu, X., Zhang, Z., Wu, H., Qin, X., Li, F., Liu, Z., Tian, L., Miao, J., & Shu, W. (2016). Cross-talk between Arg methylation and Ser phosphorylation modulates apoptosis signal-regulating kinase 1 activation in endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 27(8), 1358–1366. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-10-0738>
- Cho, E., & Park, J.-Y. (2020). Emerging roles of 14-3-3γ in the brain disorder. *BMB Reports*, 53(10), 500–511. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.10.158>
- Cho, J.-H., Lee, M.-K., Yoon, K. W., Lee, J., Cho, S.-G., & Choi, E.-J. (2012). Arginine methylation-dependent regulation of ASK1 signaling by PRMT1. *Cell Death & Differentiation*, 19(5), 859–870. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.168>
- Choreño-Parra, J. A., Carnalla-Cortés, M., & Guadarrama-Ortíz, P. (2019). Enfermedad vascular cerebral isquémica: Revisión extensa de la bibliografía para el médico de primer contacto. *Medicina Interna de México*, 35(1), 61–79.
- Collier, A. J., & Rugg-Gunn, P. J. (2018). Identifying Human Naïve Pluripotent Stem Cells – Evaluating State-Specific Reporter Lines and Cell-Surface Markers. *BioEssays*, 40(5), 1700239. <https://doi.org/10.1002/bies.201700239>

- Concordet, J.-P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>
- Datta, A., Sarmah, D., Mounica, L., Kaur, H., Kesharwani, R., Verma, G., Veeresh, P., Kotian, V., Kalia, K., Borah, A., Wang, X., Dave, K. R., Yavagal, D. R., & Bhattacharya, P. (2020). Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Translational Stroke Research*, *11*(6), 1185–1202. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00806-z>
- Donohoue, P. D., Barrangou, R., & May, A. P. (2018). Advances in Industrial Biotechnology Using CRISPR-Cas Systems. *Trends in Biotechnology*, *36*(2), 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.07.007>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Duan, G., & Walther, D. (2015). The Roles of Post-translational Modifications in the Context of Protein Interaction Networks. *PLOS Computational Biology*, *11*(2), e1004049. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004049>
- Dvash, T., Ben-Yosef, D., & Eiges, R. (2006). Human Embryonic Stem Cells as a Powerful Tool for Studying Human Embryogenesis. *Pediatric Research*, *60*(2), 111–117. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000228349.24676.17>
- Elsayed, W. M., Abdel-Gawad, E.-H. A., Mesallam, D. I. A., & El-Serafy, T. S. (2020). The relationship between oxidative stress and acute ischemic stroke severity and functional outcome. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, *56*(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s41983-020-00206-y>
- Erekat, N. S. (2022). Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clinical Anatomy*, *35*(1), 65–78. <https://doi.org/10.1002/ca.23792>
- Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K., & Ichijo, H. (2007). Thioredoxin and TRAF Family Proteins Regulate Reactive Oxygen Species-Dependent Activation of ASK1 through Reciprocal Modulation of the N-Terminal Homophilic Interaction of ASK1. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(23), 8152–8163. <https://doi.org/10.1128/MCB.00227-07>
- Geiseler, S., & Morland, C. (2018). The Janus Face of VEGF in Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5), 1362. <https://doi.org/10.3390/ijms19051362>
- George, P. M., & Steinberg, G. K. (2015). Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron*, *87*(2), 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.041>
- Ghosh, D., & Raghavan, S. C. (2021). Nonhomologous end joining: New accessory factors fine tune the machinery. *Trends in Genetics*, *37*(6), 582–599. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.03.001>
- Granata, A. (2023). Functional genomics in stroke: Current and future applications of iPSCs and gene editing to dissect the function of risk variants. *BMC Cardiovascular Disorders*, *23*(1), 223. <https://doi.org/10.1186/s12872-023-03227-6>
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(12), a006080. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
- Grefkes, C., & Fink, G. R. (2020). Recovery from stroke: Current concepts and future perspectives. *Neurological Research and Practice*, *2*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s42466-020-00060-6>

- Guan, X., Zhang, H., Qin, H., Chen, C., Hu, Z., Tan, J., & Zeng, L. (2020). CRISPR/Cas9-mediated whole genomic wide knockout screening identifies mitochondrial ribosomal proteins involving in oxygen-glucose deprivation/reperfusion resistance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(16), 9313–9322. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15580>
- Gunhanlar, N., Shpak, G., van der Kroeg, M., Gouty-Colomer, L. A., Munshi, S. T., Lendemeijer, B., Ghazvini, M., Dupont, C., Hoogendijk, W. J. G., Gribnau, J., de Vrij, F. M. S., & Kushner, S. A. (2018). A simplified protocol for differentiation of electrophysiologically mature neuronal networks from human induced pluripotent stem cells. *Molecular Psychiatry*, 23(5), 1336–1344. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.56>
- Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Harada, C., & Harada, T. (2017). ASK1 in neurodegeneration. *Advances in Biological Regulation*, 66, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.08.003>
- Harris, J. J., Jolivet, R., & Attwell, D. (2012). Synaptic Energy Use and Supply. *Neuron*, 75(5), 762–777. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.019>
- Hers, I., Vincent, E. E., & Tavaré, J. M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling*, 23(10), 1515–1527. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>
- Hirata, Y., Katagiri, K., Nagaoka, K., Morishita, T., Kudoh, Y., Hatta, T., Naguro, I., Kano, K., Udagawa, T., Natsume, T., Aoki, J., Inada, T., Noguchi, T., Ichijo, H., & Matsuzawa, A. (2017). TRIM48 Promotes ASK1 Activation and Cell Death through Ubiquitination-Dependent Degradation of the ASK1-Negative Regulator PRMT1. *Cell Reports*, 21(9), 2447–2457. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.007>
- Holloway, P. M., & Gavins, F. N. E. (2016). Modeling Ischemic Stroke In Vitro: Status Quo and Future Perspectives. *Stroke*, 47(2), 561–569. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.011932>
- IHME. (2016). *GBD Compare Data Visualization*. Institute for Health Metrics and Evaluation. Verhoeven
- INEGI. (2021). *CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO DURANTE ENERO A AGOSTO DE 2020*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020\\_Pnles.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf)
- Itasaki, N. (2020). Vertebrate Embryo: Neural Patterning. En John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *ELS* (1a ed., pp. 1–8). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000737.pub4>
- Izumi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Yoshiyama, M., Omura, T., Shiota, M., Matsuzawa, A., Yukimura, T., Murohara, T., Takeya, M., Ichijo, H., Yoshikawa, J., & Iwao, H. (2005). Important Role of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in Ischemia-Induced Angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(9), 1877–1883. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000174801.76234.bd>
- Jacobs, E. Z., Warriar, S., Volders, P.-J., D'haene, E., Van Lombergen, E., Vantomme, L., Van der Jeught, M., Heindryckx, B., Menten, B., & Vergult, S. (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing in naïve human embryonic stem cells. *Scientific Reports*, 7(1), 16650.
- Jarrold, J., & Davies, C. C. (2019). PRMTs and Arginine Methylation: Cancer's Best-Kept Secret? *Trends in Molecular Medicine*, 25(11), 993–1009. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.05.007>
- Jiao, H., Wang, Z., Liu, Y., Wang, P., & Xue, Y. (2011). Specific Role of Tight Junction Proteins Claudin-5, Occludin, and ZO-1 of the Blood–Brain Barrier in a Focal Cerebral Ischemic



- Insult. *Journal of Molecular Neuroscience*, 44(2), 130–139. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9496-4>
- Jillette, N., Du, M., Zhu, J. J., Cardoz, P., & Cheng, A. W. (2019). Split selectable markers. *Nature Communications*, 10(1), 4968. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12891-2>
- Kaiser, E., & West, F. (2020). Large animal ischemic stroke models: Replicating human stroke pathophysiology. *Neural Regeneration Research*, 15(8), 1377. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.274324>
- Ke, Q., & Costa, M. (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology*, 70(5), 1469–1480. <https://doi.org/10.1124/mol.106.027029>
- Kholodenko, B. N., & Birtwistle, M. R. (2009). Four-dimensional dynamics of MAPK information-processing systems. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 1(1), 28–44. <https://doi.org/10.1002/wsbm.16>
- Kim, A. H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T. F., & Chao, M. V. (2001). Akt Phosphorylates and Negatively Regulates Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(3), 893–901. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.3.893-901.2001>
- Kim, E. K., & Choi, E.-J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1802(4), 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>
- Kim, H.-W., Cho, K.-J., Lee, S. K., & Kim, G. W. (2011). Apoptosis signal-regulating kinase 1 (Ask1) targeted small interfering RNA on ischemic neuronal cell death. *Brain Research*, 1412, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.07.018>
- Koch, B., Nijmeijer, B., Kueblbeck, M., Cai, Y., Walther, N., & Ellenberg, J. (2018). Generation and validation of homozygous fluorescent knock-in cells using CRISPR–Cas9 genome editing. *Nature Protocols*, 13(6), 1465–1487. <https://doi.org/10.1038/nprot.2018.042>
- Komor, A. C., Badran, A. H., & Liu, D. R. (2017). CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell*, 169(3), 559. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.005>
- Kosek, D., Kylarova, S., Psenakova, K., Rezabkova, L., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., & Obsil, T. (2014). Biophysical and Structural Characterization of the Thioredoxin-binding Domain of Protein Kinase ASK1 and Its Interaction with Reduced Thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 289(35), 24463–24474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.583807>
- Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., Yang, L., Beal, M. F., Surmeier, D. J., Kordower, J. H., Tabar, V., & Studer, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 480(7378), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10648>
- Kwon, S. J., Song, J. J., & Lee, Y. J. (2005). Signal Pathway of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Phosphorylation and its Interaction with von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein During Ischemia in MiaPaCa-2 Pancreatic Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 11(21), 7607–7613. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0981>
- L, F., V., Nguyen, G., & Cercy, K.,. (2018). Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016. *New England Journal of Medicine*, 379(25), 2429–2437. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804492>

- Lee, Reggie H. C., Lee, Michelle H. H., Wu, Celeste Y. C., Couto e Silva, A., Possoit, H., Hsieh, T.-H., Minagar, A., & Lin, H. (2018). Cerebral ischemia and neuroregeneration. *Neural Regeneration Research*, 13(3), 373. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.228711>
- Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: Mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>
- Li, T., Yang, Y., Qi, H., Cui, W., Zhang, L., Fu, X., He, X., Liu, M., Li, P., & Yu, T. (2023). CRISPR/Cas9 therapeutics: Progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 36. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>
- Licht, T., & Keshet, E. (2013). Delineating multiple functions of VEGF-A in the adult brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(10), 1727–1737. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1280-x>
- Lin, Y., Wagner, E., & Lächelt, U. (2022). Non-viral delivery of the CRISPR/Cas system: DNA versus RNA versus RNP. *Biomaterials Science*, 10(5), 1166–1192. <https://doi.org/10.1039/D1BM01658J>
- Lo, E. H. (2008). A new penumbra: Transitioning from injury into repair after stroke. *Nature Medicine*, 14(5), 497–500. <https://doi.org/10.1038/nm1735>
- López-Ornelas, A., Escobedo-Avila, I., Ramírez-García, G., Lara-Rodarte, R., Meléndez-Ramírez, C., Urrieta-Chávez, B., Barrios-García, T., Cáceres-Chávez, V. A., Flores-Ponce, X., Carmona, F., Reynoso, C. A., Aguilar, C., Kerik, N. E., Rocha, L., Verdugo-Díaz, L., Treviño, V., Bargas, J., Ramos-Mejía, V., Fernández-Ruiz, J., ... Velasco, I. (2020). Human embryonic stem cells-derived dopaminergic neurons transplanted in parkinsonian monkeys recover dopamine levels and motor behavior. *bioRxiv*, 2020.07.08.192591. <https://doi.org/10.1101/2020.07.08.192591>
- Lowe, T. L., & Clarke, S. G. (2022). Human protein arginine methyltransferases (PRMTs) can be optimally active under nonphysiological conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 298(9), 102290. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102290>
- Lu, Y.-Y., Li, Z.-Z., Jiang, D.-S., Wang, L., Zhang, Y., Chen, K., Zhang, X.-F., Liu, Y., Fan, G.-C., Chen, Y., Yang, Q., Zhou, Y., Zhang, X.-D., Liu, D.-P., & Li, H. (2013). TRAF1 is a critical regulator of cerebral ischaemia–reperfusion injury and neuronal death. *Nature Communications*, 4(1), 2852. <https://doi.org/10.1038/ncomms3852>
- Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. In M. Lundgren, E. Charpentier, & P. C. Fineran (Eds.), *CRISPR* (Vol. 1311, pp. 47–75). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_4)
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Matthews, K. R., & Morali, D. (2020). National human embryo and embryoid research policies: A survey of 22 top research-intensive countries. *Regenerative Medicine*, 15(7), 1905–1917. <https://doi.org/10.2217/rme-2019-0138>
- Mergenthaler, P., & Meisel, A. (2012). Do stroke models model stroke? *Disease Models & Mechanisms*, 5(6), 718–725. <https://doi.org/10.1242/dmm.010033>

- Mohammadi, F., Soltani, A., Ghahremanloo, A., Javid, H., & Hashemy, S. I. (2019). The thioredoxin system and cancer therapy: A review. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *84*(5), 925–935. <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03912-4>
- Mojica, F. J. M., & Montoliu, L. (2016). On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends in Microbiology*, *24*(10), 811–820. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.005>
- Morrison, R. S., Kinoshita, Y., Johnson, M. D., Guo, W., & Garden, G. A. (2003). P53-Dependent Cell Death Signaling in Neurons. *Neurochemical Research*, *28*(1), 15–27. <https://doi.org/10.1023/A:1021687810103>
- Mout, R., Ray, M., Yesilbag Tonga, G., Lee, Y.-W., Tay, T., Sasaki, K., & Rotello, V. M. (2017). Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. *ACS Nano*, *11*(3), 2452–2458. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b07600>
- Nambiar, T. S., Billon, P., Diedenhofen, G., Hayward, S. B., Taglialatela, A., Cai, K., Huang, J.-W., Leuzzi, G., Cuella-Martin, R., Palacios, A., Gupta, A., Egli, D., & Ciccia, A. (2019). Stimulation of CRISPR-mediated homology-directed repair by an engineered RAD18 variant. *Nature Communications*, *10*(1), 3395. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11105-z>
- Nguyen, H. N., Byers, B., Cord, B., Shcheglovitov, A., Byrne, J., Gujar, P., Kee, K., Schüle, B., Dolmetsch, R. E., Langston, W., Palmer, T. D., & Pera, R. R. (2011). LRRK2 Mutant iPSC-Derived DA Neurons Demonstrate Increased Susceptibility to Oxidative Stress. *Cell Stem Cell*, *8*(3), 267–280. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.013>
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014). Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, *156*(5), 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Obsil, T., Psenakova, K., Hexnerova, R., Srb, P., Obsilova, V., & Veverka, V. (2020). Structural Characterization of the Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) Domain Responsible for Thioredoxin Binding and its Complex. *The FASEB Journal*, *34*(S1), 1–1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.03959>
- Obsilova, V., Honzejkova, K., & Obsil, T. (2021). Structural Insights Support Targeting ASK1 Kinase for Therapeutic Interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 13395. <https://doi.org/10.3390/ijms222413395>
- Ogier, J. M., Nayagam, B. A., & Lockhart, P. J. (2020). ASK1 inhibition: A therapeutic strategy with multi-system benefits. *Journal of Molecular Medicine*, *98*(3), 335–348. <https://doi.org/obsil>
- Oriques Martins, S. C., Sacks, C., Hacke, W., Brainin, M., de Assis Figueiredo, F., Marques Pontes-Neto, O., Lavados Germain, P. M., Marinho, M. F., Hoppe Wiegering, A., Vaca McGhie, D., Cruz-Flores, S., Ameriso, S. F., Camargo Villareal, W. M., Durán, J. C., Fogolin Passos, J. E., Gomes Nogueira, R., Freitas de Carvalho, J. J., Sampaio Silva, G., Cabral Moro, C. H., ... Feigin, V. L. (2019). Priorities to reduce the burden of stroke in Latin American countries. *The Lancet Neurology*, *18*(7), 674–683. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30068-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30068-7)
- Park, H. H. (2018). Structure of TRAF Family: Current Understanding of Receptor Recognition. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1999. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01999>
- Pennington, K., Chan, T., Torres, M., & Andersen, J. (2018). The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: Emerging mechanisms of regulation and context-dependent

- protein–protein interactions. *Oncogene*, 37(42), 5587–5604.  
<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0348-3>
- Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N. L., & Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(34), 12543–12548.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0404700101>
- Peti, W., & Page, R. (2013). Molecular basis of MAP kinase regulation: Molecular Basis of MAP Kinase Regulation. *Protein Science*, 22(12), 1698–1710. <https://doi.org/10.1002/pro.2374>
- Petrvalská, O., Kosek, D., Kukacka, Z., Tosner, Z., Man, P., Vecer, J., Herman, P., Obsilová, V., & Obsil, T. (2016). Structural Insight into the 14-3-3 Protein-dependent Inhibition of Protein Kinase ASK1 (Apoptosis Signal-regulating kinase 1). *Journal of Biological Chemistry*, 291(39), 20753–20765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.724310>
- Pimienta, G., & Pascual, J. (2007). Canonical and Alternative MAPK Signaling. *Cell Cycle*, 6(21), 2628–2632. <https://doi.org/10.4161/cc.6.21.4930>
- Qin, C., Yang, S., Chu, Y.-H., Zhang, H., Pang, X.-W., Chen, L., Zhou, L.-Q., Chen, M., Tian, D.-S., & Wang, W. (2022). Signaling pathways involved in ischemic stroke: Molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 215. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01064-1>
- Radu, R. A., Terecoasă, E. O., Băjenaru, O. A., & Tiu, C. (2017). Etiologic classification of ischemic stroke: Where do we stand? *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 159, 93–106. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2017.05.019>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rees, H. A., Minella, A. C., Burnett, C. A., Komor, A. C., & Gaudelli, N. M. (2021). CRISPR-derived genome editing therapies: Progress from bench to bedside. *Molecular Therapy*, 29(11), 3125–3139. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.027>
- Rusnak, L., & Fu, H. (2017). Regulation of ASK1 signaling by scaffold and adaptor proteins. *Advances in Biological Regulation*, 66, 23–30.
- Saini, V., Guada, L., & Yavagal, D. R. (2021). Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. *Neurology*, 97(20 Supplement 2), S6–S16. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000012781>
- Santabárbara-Ruiz, P., Esteban-Collado, J., Pérez, L., Viola, G., Abril, J. F., Milán, M., Corominas, M., & Serras, F. (2019). Ask1 and Akt act synergistically to promote ROS-dependent regeneration in *Drosophila*. *PLOS Genetics*, 15(1), e1007926. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007926>
- Secretaría de Salud. (2022). *En 2021, ictus o enfermedad vascular cerebral ocasionó más de 37 mil decesos en México*. <https://www.gob.mx/salud/prensa/531-en2021-ictus-o-enfermedad-vascular-cerebral-ocasiono-mas-de-37-mil-decesos-en-mexico?idiom=es>
- Semb, H. (2005). Human embryonic stem cells: Origin, properties and applications. *APMIS*, 113(11–12), 743–750. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm\\_312.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm_312.x)
- Sentmanat, M. F., Peters, S. T., Florian, C. P., Connelly, J. P., & Pruett-Miller, S. M. (2018). A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. *Scientific Reports*, 8(1), 888. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8>

- Shiizaki, S., Naguro, I., & Ichijo, H. (2013). Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Advances in Biological Regulation*, 53(1), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2012.09.006>
- Sibuea, S., Ho, J. K., Pouton, C. W., & Haynes, J. M. (2023). TGFβ3, dibutyryl cAMP and a notch inhibitor modulate phenotype late in stem cell-derived dopaminergic neuron maturation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1111705. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1111705>
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: The balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175–193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- Singh, S., Banerjee, A., Vanden Broeck, A., & Klinge, S. (2023). Rapid clonal identification of biallelic CRISPR/Cas9 knock-ins using SNEAK PEEC. *Scientific Reports*, 13(1), 1719. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28732-8>
- Soares-Silva, M., Diniz, F. F., Gomes, G. N., & Bahia, D. (2016). The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00183>
- Sobhan, P. K., Zhai, Q., Green, L. C., Hansford, L. M., & Funa, K. (2017). ASK1 regulates the survival of neuroblastoma cells by interacting with TLX and stabilizing HIF-1α. *Cellular Signalling*, 30, 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.11.018>
- Sodaei, F., & Shahmaei, V. (2020). Identification of penumbra in acute ischemic stroke using multimodal MR imaging analysis: A case report study. *Radiology Case Reports*, 15(10), 2041–2046. <https://doi.org/10.1016/j.radcr.2020.07.066>
- Sommer, C. J. (2017). Ischemic stroke: Experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 245–261. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1667-0>
- Song, J., Cheon, S. Y., Lee, W. T., Park, K. A., & Lee, J. E. (2015). The effect of ASK1 on vascular permeability and edema formation in cerebral ischemia. *Brain Research*, 1595, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.024>
- Song, J., Cho, K. J., Cheon, S. Y., Kim, S.-H., Park, K. A., Lee, W. T., & Lee, J. E. (2013a). Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is linked to neural stem cell differentiation after ischemic brain injury. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(12), e69–e69. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.134>
- Song, J., Cho, K. J., Cheon, S. Y., Kim, S.-H., Park, K. A., Lee, W. T., & Lee, J. E. (2013b). Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is linked to neural stem cell differentiation after ischemic brain injury. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(12), e69–e69. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.134>
- Spencer, N. (2020). *The CRISPR basics handbook*.
- Sternecker, J. L., Reinhardt, P., & Schöler, H. R. (2014). Investigating human disease using stem cell models. *Nature Reviews Genetics*, 15(9), 625–639. <https://doi.org/10.1038/nrg3764>
- Sumbayev, V. V. (2008). LPS-induced Toll-like receptor 4 signalling triggers cross-talk of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and HIF-1α protein. *FEBS Letters*, 582(2), 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.12.024>
- Supharattanasitthi, W., Carlsson, E., Sharif, U., & Paraoan, L. (2019). CRISPR/Cas9-mediated one step bi-allelic change of genomic DNA in iPSCs and human RPE cells in vitro with dual antibiotic selection. *Scientific Reports*, 9(1), 174. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36740-2>

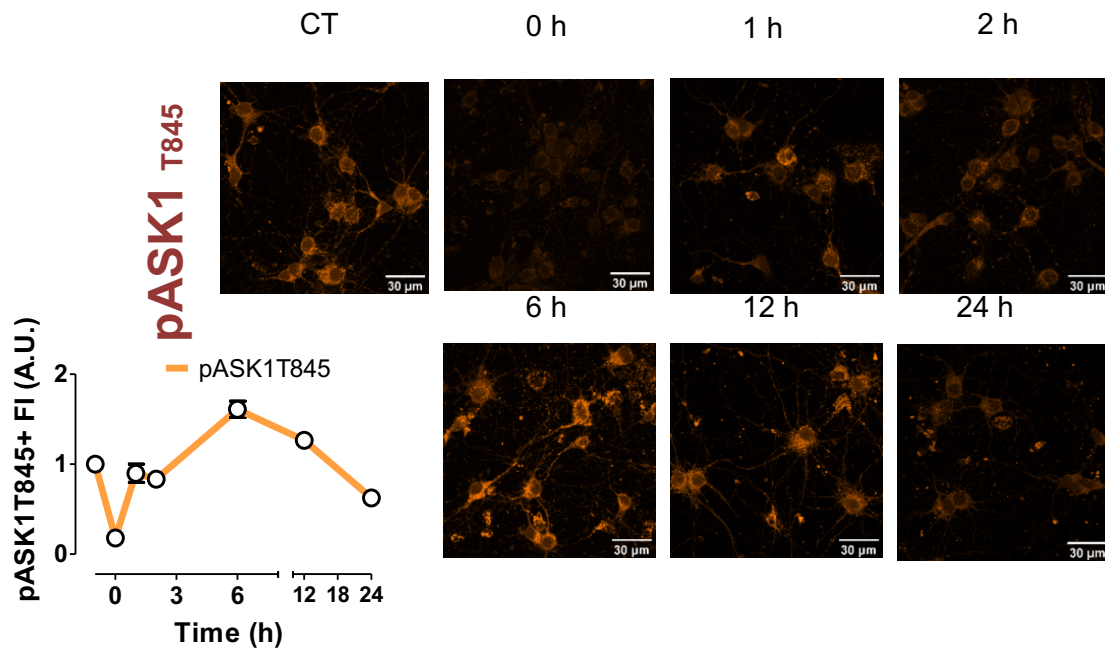
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, *131*(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takeda, K., Hatai, T., Hamazaki, T. S., Nishitoh, H., Saitoh, M., & Ichijo, H. (2000). Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) Induces Neuronal Differentiation and Survival of PC12 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(13), 9805–9813. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9805>
- Tasca, C. I., Dal-Cim, T., & Cimarosti, H. (2015). In Vitro Oxygen-Glucose Deprivation to Study Ischemic Cell Death. En L. Lossi & A. Merighi (Eds.), *Neuronal Cell Death* (Vol. 1254, pp. 197–210). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2152-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2152-2_15)
- The GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators. (2018). Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016. *New England Journal of Medicine*, *379*(25), 2429–2437. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804492>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tiedt, S., Buchan, A. M., Dichgans, M., Lizasoain, I., Moro, M. A., & Lo, E. H. (2022). The neurovascular unit and systemic biology in stroke—Implications for translation and treatment. *Nature Reviews Neurology*, *18*(10), 597–612. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00703-z>
- Tovar-y-Romo, L. B., Penagos-Puig, A., & Ramírez-Jarquín, J. O. (2016). Endogenous recovery after brain damage: Molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *Journal of Neurochemistry*, *136*(1), 13–27. <https://doi.org/10.1111/jnc.13362>
- Tovar-y-Romo, L. B., & Tapia, R. (2010). VEGF protects spinal motor neurons against chronic excitotoxic degeneration in vivo by activation of PI3-K pathway and inhibition of p38MAPK: VEGF signaling for motor neuron survival. *Journal of Neurochemistry*, *115*(5), 1090–1101. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06766.x>
- Tymianski, M. (2011). Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. *Nature Neuroscience*, *14*(11), 1369–1373. <https://doi.org/10.1038/nn.2951>
- Uzdensky, A. B. (2019). Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: Expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis*, *24*(9–10), 687–702. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01556-6>
- Van Breedam, E., & Ponsaerts, P. (2022). Promising Strategies for the Development of Advanced In Vitro Models with High Predictive Power in Ischaemic Stroke Research. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(13), 7140. <https://doi.org/10.3390/ijms23137140>
- Vazin, T., & Freed, W. J. (2010). Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review. *Restorative Neurology and Neuroscience*, *28*(4), 589–603. <https://doi.org/10.3233/RNN-2010-0543>
- Ventura-Antunes, aLissa, & Herculano-Houzel, S. (2022). Energy supply per neuron is constrained by capillary density in the mouse brain. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *16*, 760887. <https://doi.org/10.3389/fnint.2022.760887>
- Verhoeven, J. I., Allach, Y., Vaartjes, I. C. H., Klijn, C. J. M., & de Leeuw, F.-E. (2021). Ambient air pollution and the risk of ischaemic and haemorrhagic stroke. *The Lancet Planetary Health*, *5*(8), e542–e552. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00145-5](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00145-5)

- Wang, M., Ling, K.-H., Tan, J., & Lu, C.-B. (2020). Development and Differentiation of Midbrain Dopaminergic Neuron: From Bench to Bedside. *Cells*, *9*(6), 1489. <https://doi.org/10.3390/cells9061489>
- Watts, M. E., Pocock, R., & Claudianos, C. (2018). Brain Energy and Oxygen Metabolism: Emerging Role in Normal Function and Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 216. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00216>
- Weis, S. M., & Cheresch, D. A. (2005). Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*, *437*(7058), 497–504. <https://doi.org/10.1038/nature03987>
- Whitmarsh, A. J. (2007). Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1773*(8), 1285–1298. <https://doi.org/peti>
- Xu, Y., & Li, Z. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *18*, 2401–2415. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.031>
- Yan, Z., Wu, H., Liu, H., Zhao, G., Zhang, H., Zhuang, W., Liu, F., Zheng, Y., Liu, B., Zhang, L., & Gao, C. (2021). The protein arginine methyltransferase PRMT1 promotes TBK1 activation through asymmetric arginine methylation. *Cell Reports*, *36*(12), 109731. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109731>
- Yang, L., Guell, M., Byrne, S., Yang, J. L., De Los Angeles, A., Mali, P., Aach, J., Kim-Kiselak, C., Briggs, A. W., Rios, X., Huang, P.-Y., Daley, G., & Church, G. (2013). Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Research*, *41*(19), 9049–9061. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt555>
- Yue, J., & López, J. M. (2020). Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 2346. <https://doi.org/10.3390/ijms21072346>
- Zhang, R., Luo, D., Miao, R., Bai, L., Ge, Q., Sessa, W. C., & Min, W. (2005). Hsp90–Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene*, *24*(24), 3954–3963. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208548>
- Zhang, S., Shen, J., Li, D., & Cheng, Y. (2021). Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics*, *11*(2), 614–648. <https://doi.org/10.7150/thno.47007>
- Zhang, W., Wu, Y., Chen, H., Yu, D., Zhao, J., & Chen, J. (2021). Neuroprotective effects of SOX5 against ischemic stroke by regulating VEGF/PI3K/AKT pathway. *Gene*, *767*, 145148. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145148>
- Zhang, Z., Wang, Q., Zhao, X., Shao, L., Liu, G., Zheng, X., Xie, L., Zhang, Y., Sun, C., & Xu, R. (2020). YTHDC1 mitigates ischemic stroke by promoting Akt phosphorylation through destabilizing PTEN mRNA. *Cell Death & Disease*, *11*(11), 977. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03186-2>
- Zheng, T., Shi, Y., Zhang, J., Peng, J., Zhang, X., Chen, K., Chen, Y., & Liu, L. (2019). MiR-130a exerts neuroprotective effects against ischemic stroke through PTEN/PI3K/AKT pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *117*, 109117. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109117>

## Apéndice

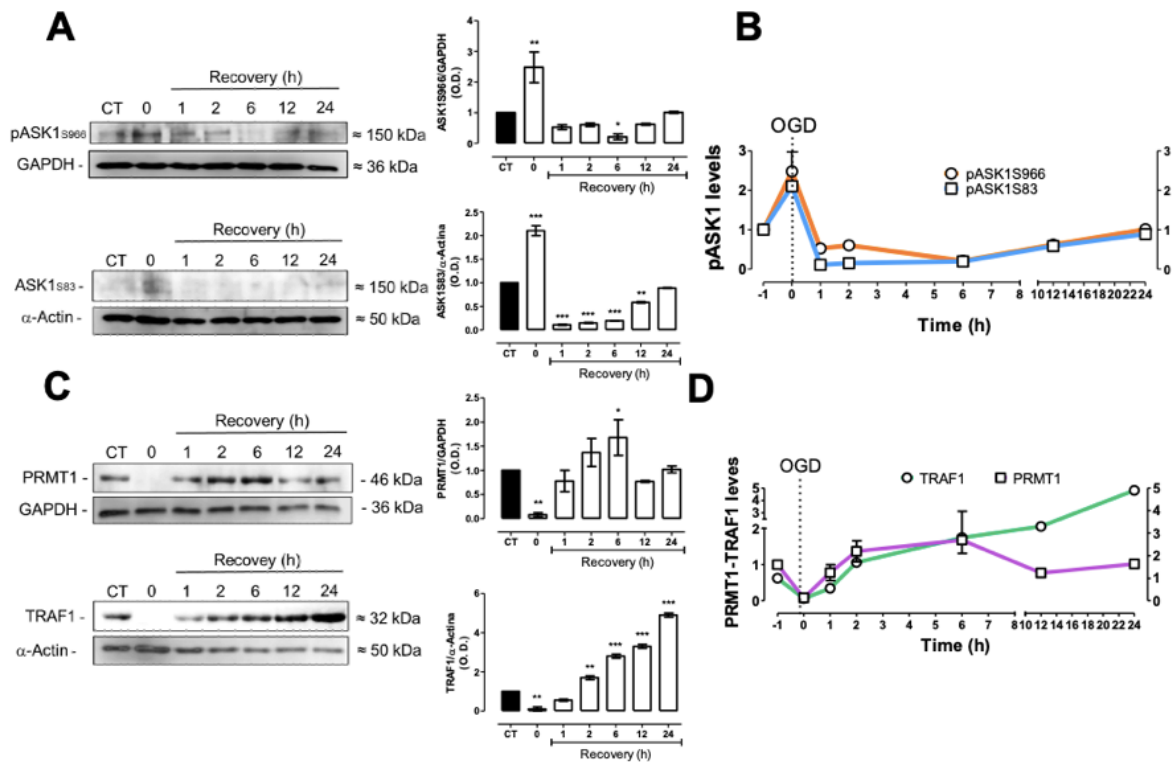
### Caracterización de la activación de ASK1

Previamente nuestro grupo de investigación, específicamente, el Dr. Ricardo Santana caracterizó la activación de ASK1 a lo largo de un curso temporal de 24 horas en cultivos primarios de neuronas corticales de rata sometidas a OGD.

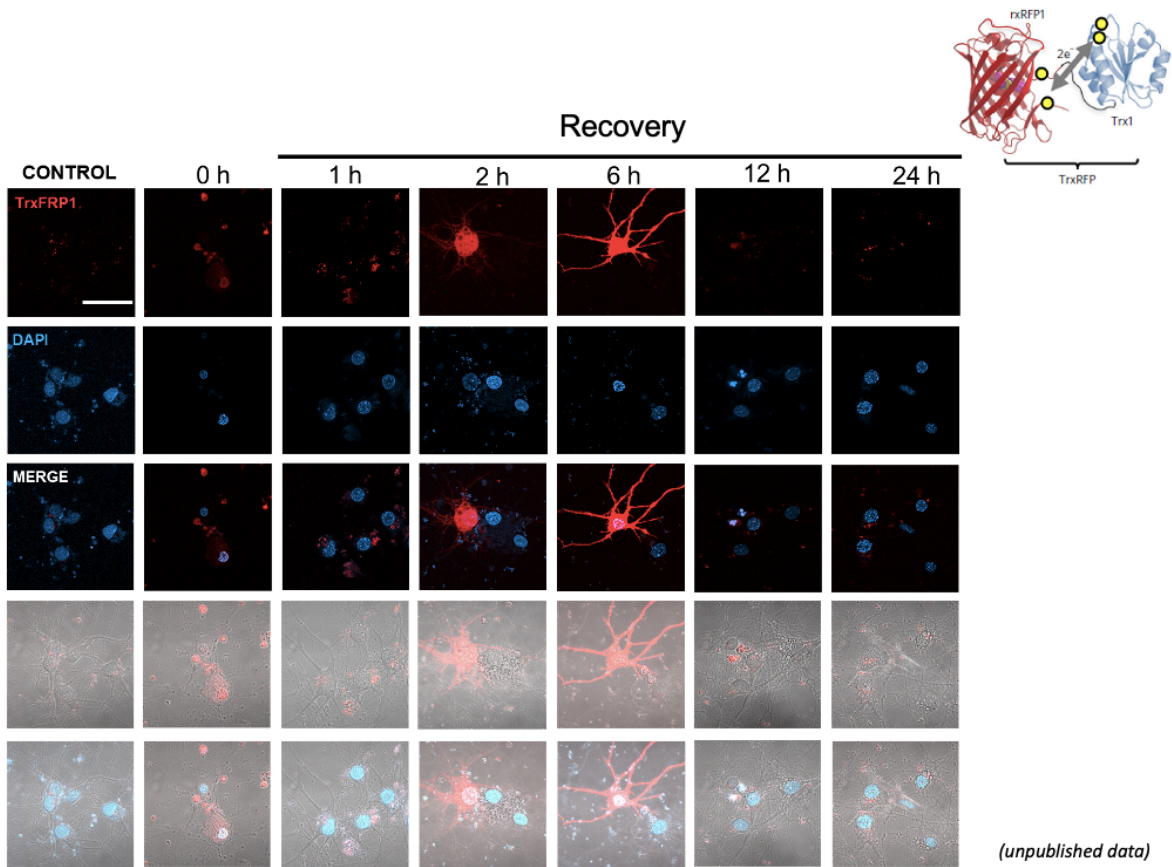


**Apéndice Fig 1. Activación de ASK1.** Para medir su activación, utilizaron la fosforilación del residuo T845. Observamos que la activación de ASK1 aumentó significativamente entre las 6 y 12 horas posteriores a la isquemia, seguido de una disminución gradual.

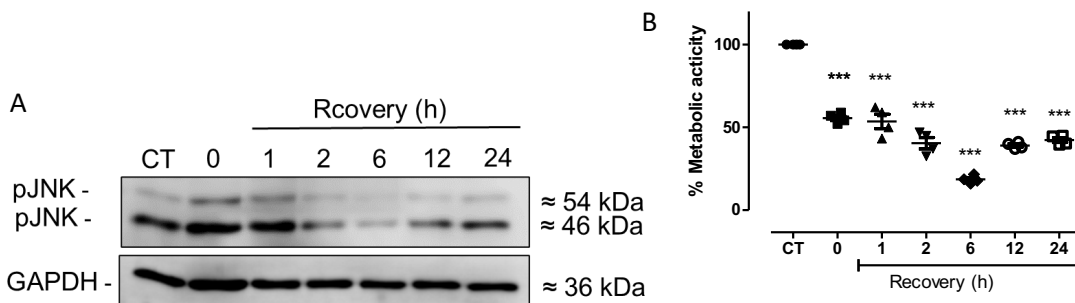




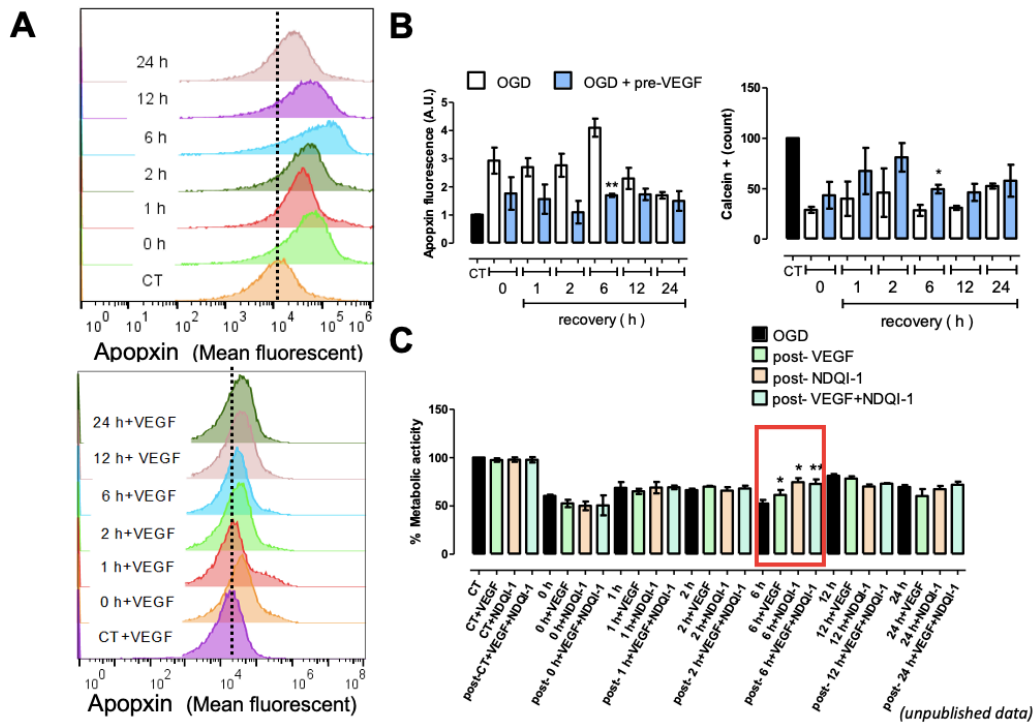
**Apéndice Fig 2 Reguladores de ASK1 tras OGD.** A) y B) Fosforilación de los residuos S83 y S966, que corresponden a la interacción con Trx y 14-3-3 $\zeta$ , respectivamente. Observaron una disminución en su fosforilación entre las 6 y 12 horas, con un ligero aumento hasta las 24 horas, pero sin volver a su estado basal C) y D) La expresión de PRMT1 aumentó a las 6 horas. Es posible que sea en este momento cuando comienza la supresión de la apoptosis mediada por ASK1, ya que PRMT1 metila los residuos de arginina 78 y 80 de ASK1, regulando negativamente su señalización al promover la disociación entre su activador TRAF2 y ASK1, y favorecer la interacción entre ASK1 y Trx. Teniendo en cuenta estos resultados, junto con los obtenidos del biosensor, es posible que la metilación de ASK1 ocurra antes que la reducción de Trx, lo que facilitaría su unión. TRAF1 tuvo su pico de expresión a las 24 horas. Estos hallazgos sugieren que TRAF1, como reportaron Lu y colaboradores (2013), podría estar promoviendo la apoptosis, sugiriendo que la supresión de la apoptosis mediada por ASK1 no es total, sin embargo, se requiere profundizar en la interacción entre TRAF1 y ASK1.



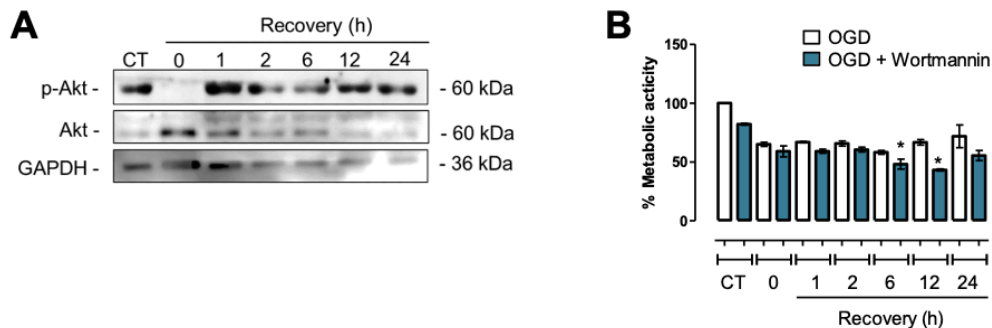
**Apéndice Fig 3 Oxidación de Trx en tiempo real.** Para evaluar la disociación de Trx, utilizaron un biosensor que emitía una señal fluorescente roja cuando Trx se oxidaba. Los resultados obtenidos indican que, a partir de las 6 horas, momento en que se detectó la activación por la fosforilación del residuo T845, se produjo una mayor oxidación de Trx. Estos hallazgos confirmaron que la oxidación de Trx se produce después de un estímulo isquémico, lo que promueve su disociación de ASK1. Sin embargo, después del pico de activación de ASK1, Trx vuelve a un estado reducido, lo que podría favorecer su unión a ASK1, suprimiendo así su activación.



**Apéndice Fig 4 Blancos río debajo de ASK1** A) Expresión de JNK B) actividad metabólica. Para verificar que la activación de ASK1 induce apoptosis, llevaron a cabo diversas pruebas de actividad metabólica y evaluaron la vía de señalización JNK. Los resultados obtenidos corroboraron que la activación de ASK1 en el modelo *in vitro* de isquemia provoca apoptosis a través de las vías JNK.



**Apéndice Fig 5 Relación de ASK1 con VEGF en neuronas sometidas a OGD** Se utilizó el inhibidor de ASK1, NDQI1 y se administró VEGF pre-OGD y post-OGD. Encontramos que la apoptosis disminuyó para las células tratadas con NDQI1 y VEGF, tanto para el tratamiento pre y post OGD, lo que aumentaba la viabilidad celular en todas las condiciones. El grupo en el que se administró VEGF y NDQI1 mostró una mayor actividad metabólica con respecto a los demás. Lo que indica que bloquear ASK1 disminuye la muerte celular, y que esto puede estar promoviéndose por el efecto neuroprotector que ejerce VEGF.



**Apéndice Fig 6 Activación de Akt tras OGD** Se evaluó la activación de Akt. Se observó una disminución en su fosforilación entre las 2 y 6 horas posteriores al OGD, y su inhibición por wortmannina resultó en una reducción de la viabilidad neuronal. Estos resultados sugieren que la activación de Akt ocurre después del inicio de la supresión de la apoptosis mediada por ASK1, lo que podría indicar que Akt también contribuye a la inactivación de ASK1 mediante su interacción con esta proteína.