



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN CON TRATAMIENTOS  
COMBINADOS DE CITOCINAS DE LA FAMILIA DEL TGF-  $\beta$   
EN LA NEUROGÉNESIS Y ASTROGÉNESIS DE CÉLULAS  
TRONCALES NEURALES”**

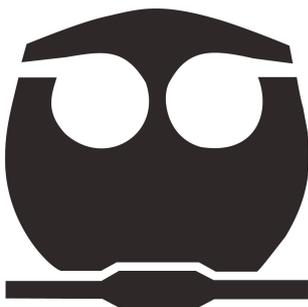
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

PRESENTA:

**DIANA KARINA ALATRISTE GONZÁLEZ**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE**      **Dra. Marisol López López**  
**VOCAL**            **Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova**  
**SECRETARIO**    **Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez**  
**1er SUPLENTE**   **Dr. Vanessa Rebeca Maya Ampudia**  
**2° SUPLENTE**    **Dra. Marina Macias Silva**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA: DR. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ**

**SUPERVISOR TÉCNICO : QFB GRISELDA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ**

**SUSTENTANTE : DIANA KARINA ALATRISTE GONZÁLEZ**

**A mis papás por su amor y apoyo incondicional**

**A mi hermana por ser mi eterna compañera**

**A Clemen por ser mi felicidad.**

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular, División de Neurociencias, laboratorio AL-101 de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Iván Velasco Velázquez.

El trabajo fue realizado con el apoyo parcial de la Red Temática de Desarrollo de Fármacos y Métodos Diagnósticos (FARMED), el proyecto PAPIIT IN224210 y el proyecto CONACYT 131281.

Agradezco también el apoyo brindado por la Fundación Alberto y Dolores Andrade durante todos estos años. Su apoyo y su confianza en mí siempre fueron un gran aliciente.

Gracias también al jurado que llevó a cabo la revisión del presente trabajo y que estuvo conformado por:

Dra. Marisol López López

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Dr. Iván Velasco Velázquez

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>2</b>
<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
2.1 Desarrollo del sistema nervioso central .....	5
2.1.1 Especificación del telencéfalo .....	8
2.1.2 Neurogénesis y gliogénesis en la corteza cerebral .....	10
2.2 Células troncales .....	12
2.2.1 Células troncales neurales .....	14
2.3 Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ ) .....	16
2.3.1 TGF- $\beta$ 1 .....	18
2.3.2 Activina A.....	21
2.3.3 Proteína Morfogénica ósea isoforma 4.....	22
2.4 Histamina .....	24
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	28
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>APÉNDICE I. SOLUCIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>APÉNDICE II. ANTICUERPOS .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>bFGF</b>	Factor de Crecimiento Fibroblástico básico
<b>BMPs</b>	Proteínas morfogénicas óseas
<b>BMP4</b>	Proteína morfogénica ósea isoforma 4
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CTN</b>	Células troncales neurales
<b>E</b>	Día embrionario
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>Fn</b>	Fibronectina
<b>GAPDH</b>	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GFAP</b>	Proteína acídica fibrilar glial
<b>HA</b>	Histamina
<b>MAP2</b>	Proteína asociada a microtúbulos 2
<b>P</b>	Día post natal
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés 'Polymerase Chain Reaction')
<b>PLO</b>	Poli-L-ornitina
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>Shh</b>	Sonic hedgehog
<b>Smad</b>	Proteína, (del inglés) 'Similar to Mathers against decapentaplegic'
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>NGS</b>	Suero normal de cabra pre-inmune (del inglés 'normal goat serum')
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$ isoforma 1
<b>Tuj1</b>	Anticuerpo que reconoce a la $\beta$ -tubulina III

## 1. RESUMEN

Las células troncales se definen como células no diferenciadas con una alta capacidad de autorrenovación que pueden dar origen a uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo. Las células troncales neurales (CTN) son un subtipo de células presentes en el sistema nervioso que además de autorrenovarse, dan origen a los 3 principales tipos celulares que componen este sistema: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Múltiples vías de señalización se han implicado en la regulación, la proliferación y diferenciación de las CTN. Durante el desarrollo cerebral se ha reportado la expresión de varios miembros de la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), sugiriendo que podrían tener algún papel en las CTN aisladas en el desarrollo. La superfamilia del TGF- $\beta$  incluye a Activina A, BMP4 y TGF- $\beta$ 1. Con la finalidad de estudiar el papel que ejercen estas citocinas durante la diferenciación de CTN, realizamos cultivos de células precursoras de la corteza cerebral de embriones de rata de 14 días. La adición de Activina A o TGF- $\beta$ 1 inducen la diferenciación neuronal, mientras que BMP4 promueve la diferenciación astrocítica. Para determinar si existe un efecto sinérgico o antagónico entre dichas proteínas, realizamos tratamientos combinados con estas citocinas. Estudios inmunocitoquímicos realizados para detectar los marcadores de diferenciación astrogial o neuronal (proteína ácida fibrilar glial y  $\beta$ -tubulina III, respectivamente) mostraron, que ninguno de los tratamientos combinados presentan un efecto sinérgico en la diferenciación neuronal y glial, y que, por el contrario, el efecto visto al adicionar estas citocinas de manera individual, se veía disminuido. Estos datos fueron confirmados por la cuantificación de transcritos por retrotranscripción.

Finalmente el análisis del patrón de fosforilación de las Smads, mediante Western blot, en los siguientes tratamientos: TGF- $\beta$ 1+histamina, activina A+TGF- $\beta$ 1+histamina, activina A+BMP4, BMP4+ TGF- $\beta$ 1 y activina A+BMP4+ TGF- $\beta$ 1+histamina, corroboró que la ausencia de respuesta evidente es debida a una disminución considerable en la fosforilación de dichas proteínas, que suprime casi por completo su activación, y que

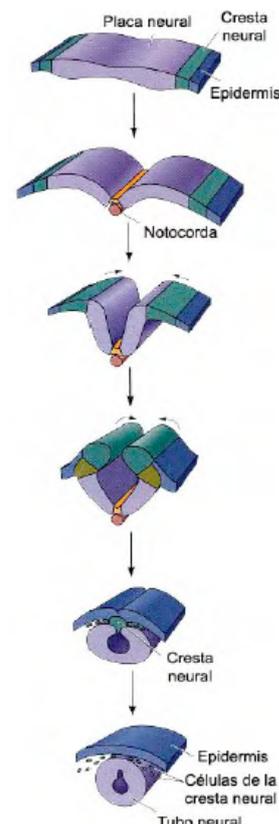
correlaciona con la similitud en la diferenciación entre la condición control y estos tratamientos.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Desarrollo del sistema nervioso central

Durante la tercera semana del desarrollo embrionario en el humano, se lleva a cabo el proceso de gastrulación, que su vez, da inicio al proceso de embriogénesis, y en el cual se establecen las tres capas germinativas: ectodermo, mesodermo y endodermo [Moore, 1991]. Justo al final de esta fase se establece la notocorda, eje primario del cuerpo de los vertebrados, que opera como inductor primario (centro señalizador) del embrión primitivo [Moore, 1991; Moore y Persaud 2009]. A medida que se desarrolla, la notocorda induce al ectodermo embrionario suprayacente a engrosarse y formar una capa elongada de células epiteliales, la placa neural. El ectodermo de la placa neural, conocido como neuroectodermo es el que da origen al Sistema Nervioso Central (SNC) [Moore y Persaud 2009]. Posteriormente, la placa neural invagina por su línea media, elevando los bordes laterales y dando origen a los pliegues neurales y a la placa del piso. De la fusión de las puntas dorsales de los pliegues neurales se forma el tubo neural, a partir del cual se desarrollan todo el cerebro y la médula espinal (Fig.1). Este proceso también es conocido como neurulación. El remanente de ectodermo que rodea a la placa neural constituye la epidermis [Moore y Persaud 2009; Smith y Schoenwolf, 1997; Sadler, 2005].

**Figura 1. Proceso de neurulación.** Esquematización de la invaginación de la placa neural y la unión de los pliegues neurales producidos por inducción de la notocorda. Estos procesos derivan en la formación del tubo neural, la cresta neural y la epidermis. Las células de la cresta neural luego se dispersan dejando al tubo neural separado de la epidermis (modificada de Gilbert, 2003).

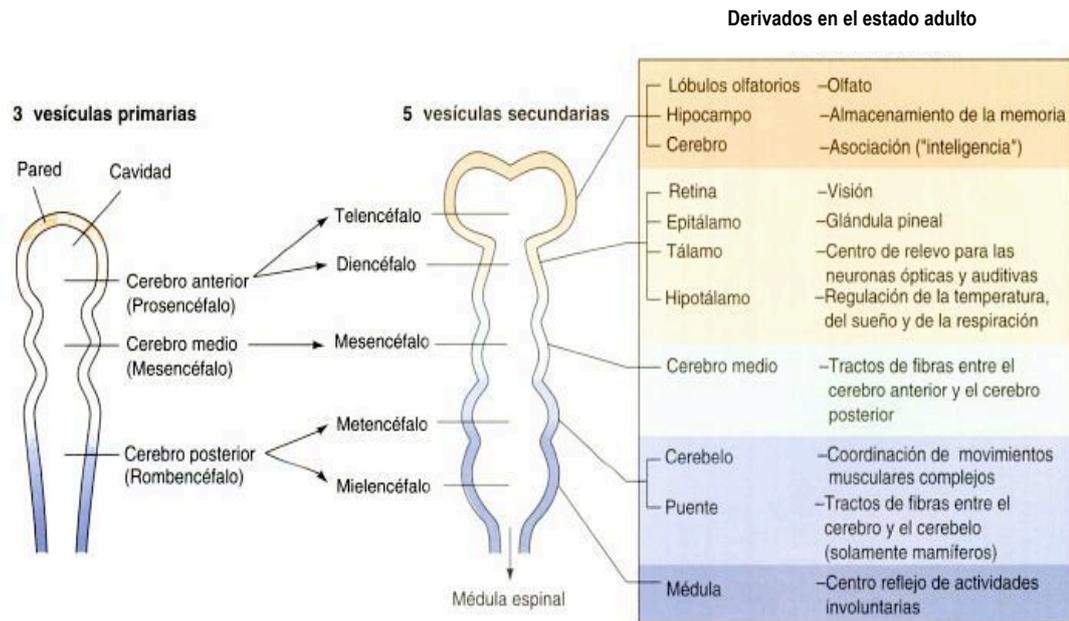


La diferenciación del tubo neural en las distintas regiones que forman parte del SNC se produce simultáneamente de 3 modos diferentes:

- A nivel anatómico, el tubo neural y su cavidad sobresalen y se estrechan formando las cámaras del cerebro y de la médula espinal.
- A nivel tisular, las poblaciones celulares dentro de la pared del tubo neural se reorganizan para formar las diferentes regiones funcionales del cerebro y de la médula espinal.
- A nivel celular, las células neuroepiteliales se diferencian a numerosos tipos de células nerviosas (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) [Gilbert, 2003].

Es así como pueden distinguirse dos ejes neurales primarios:

- **Eje anteroposterior:** en etapas tempranas del desarrollo, durante la gastrulación y la inducción neural, comienza el establecimiento del patrón anteroposterior del sistema nervioso central. Esta regionalización se da incluso antes de que se haya formado la porción posterior [Gilbert, 2003]. En el embrión vertebrado, la mayor parte del tubo neural da lugar a la médula espinal, mientras que el extremo rostral (anterior) se agranda para formar las tres vesículas cerebrales primarias: el prosencéfalo (o cerebro anterior), el mesencéfalo (o cerebro medio) y el rombencéfalo (o cerebro posterior) [Sanes, et al., 2006]. Cuando la porción posterior del tubo neural se ha cerrado, las vesículas primarias se subdividen y forman las vesículas secundarias; el prosencéfalo se divide parcialmente en telencéfalo (porción anterior) y diencefalo (porción caudal), el mesencéfalo no se divide y el rombencéfalo se divide parcialmente en metencéfalo y mielencéfalo (Fig. 2). Todas estas regiones a su vez, producen regiones encefálicas adicionales en el adulto [Gilbert, 2003].



**Figura 2.** Desarrollo temprano del cerebro humano. Las tres vesículas primarias (prosencéfalo y rombencéfalo) son subdivididas a medida que el desarrollo continúa. A la derecha se muestra una lista de las estructuras específicas derivadas de cada región del tubo neural en el embrión. (Figura tomada de Gilbert, 2003)

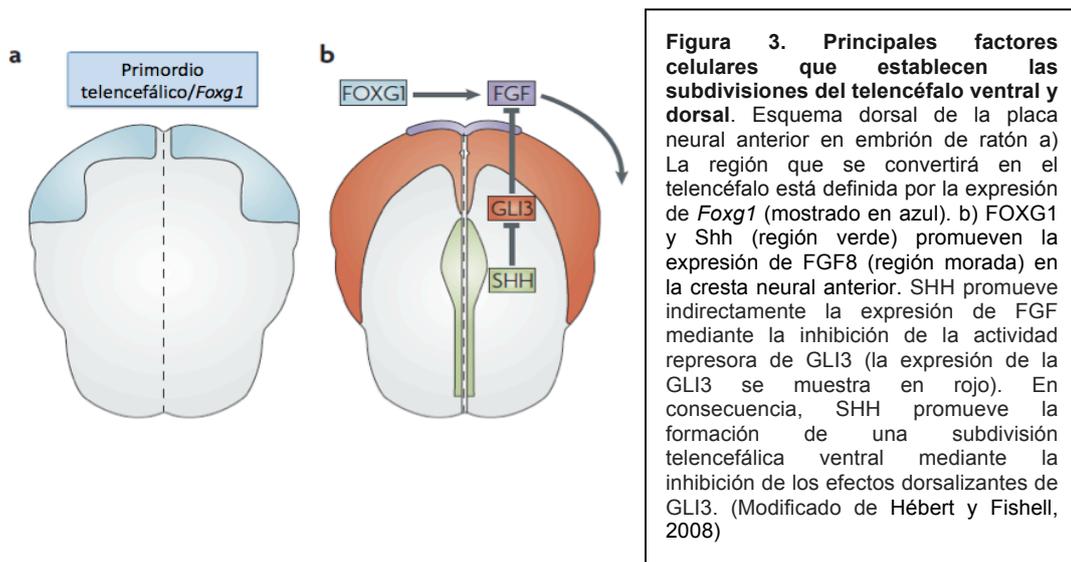
- Eje dorso-ventral:** la polaridad dorsoventral del tubo neural es inducida por señales que vienen de sus ambientes inmediatos. El patrón ventral es impuesto por la notocorda, mientras que el patrón dorsal es inducido por la epidermis. La especificación del eje dorsoventral es iniciada por 2 factores parácrinos principales. El primero es la proteína Sonic hedgehog (Shh) originada desde la notocorda. El segundo grupo de factores son las proteínas morfogénicas óseas o BMPs originadas en el ectodermo dorsal. Shh induce a la formación de la estructura denominada placa del piso del tubo neural. Shh señala la región ventral del tubo neural, mientras que las BMPs marcan la región dorsal. Ambos morfógenos estimulan además la proliferación celular [Gilbert, 2003].

### 2.1.1 Especificación del telencéfalo

Como ya se mencionó, la placa neural en su extremo anterior, da lugar al prosencéfalo (o cerebro anterior), que posteriormente se subdivide en el telencéfalo y el diencefalo. [Hébert y Fishell, 2008]

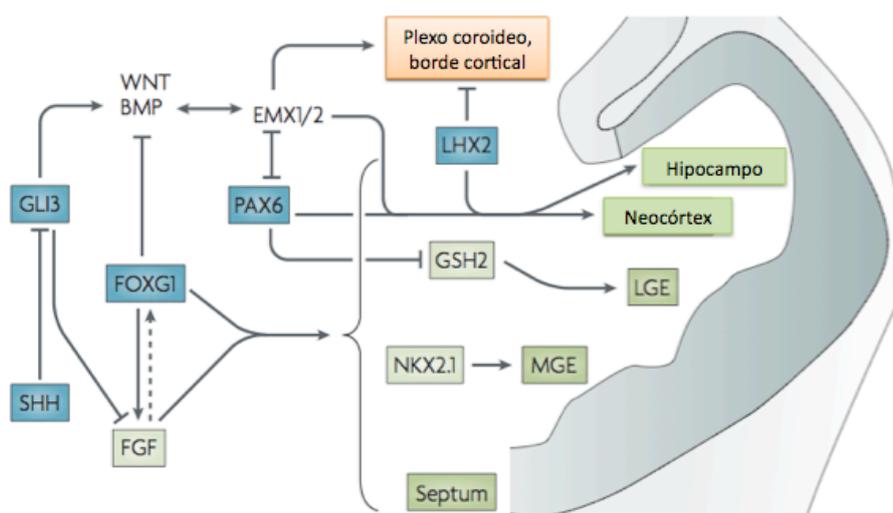
Existen por lo menos 3 pasos principales en la formación del prosencéfalo: 1) las células ectodérmicas deben adquirir identidad neural, 2) el tejido neural rostral debe adoptar carácter anterior y 3) los patrones regionales deben llevarse a cabo dentro de la placa neural rostral. [Wilson y Houart, 2004]

El establecimiento del primordio telencefálico comienza con la expresión del factor de transcripción *Foxg1* (del inglés *forkhead box G1*). Este factor es expresado por las células de la placa anterior temprana que están destinadas a formar el telencéfalo, y regula el desarrollo del telencéfalo (hemisferios cerebrales) y la especificación regional en el cerebro anterior, incluidos el telencéfalo basal y la retina (Fig. 3). Al constituirse los límites entre el cerebro anterior y el cerebro medio, aparecen dos centros organizadores: la cresta neural anterior (ANR), ubicada en el polo anterior del cerebro, y el istmo, localizado entre el cerebro medio y el posterior. El factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) es la señal molecular clave en ambas localizaciones e induce la expresión subsecuente de genes que regulan la diferenciación [Hébert y Fishell, 2008; Sadler y Langman, 2009].



Posteriormente, la subdivisión inicial que define lo que más tarde se convertirá en el telencéfalo dorsal y ventral, se regula en parte por los efectos dorsalizantes de la expresión *Gli3* y la influencia ventralizante de la expresión de *Shh*. SHH ventraliza al telencéfalo al antagonizar los efectos dorsalizantes de GLI3. Al reprimir *Gli3*, SHH, junto con FOXG1 activan la expresión de FGF8; éste, a su vez puede promover la expresión de *Foxg1*. Las señales de FOXG1 y FGF son necesarias para formar todas las regiones del telencéfalo, a excepción de la región dorsomedial [Hébert y Fishell, 2008].

De igual manera, algunos factores de transcripción localizados río abajo, tales como GSH2 y NKX2.1, participan en la formación de las respectivas subdivisiones específicas (Fig 3). Por su parte, en el telencéfalo dorsal, la expresión de proteínas BMPs y WNTs (del inglés Wingless/Int), promovida por GLI3 es necesaria para la expresión de los genes EMX. Los productos de estos genes, junto con PAX6 y LHX2, dividen posteriormente al telencéfalo dorsal (Fig 4.) [Hébert y Fishell, 2008]. Por un lado, PAX6 es expresado a lo largo del primordio telencefálico y junto con GSH2, definen el límite entre el palio y el subpalio. Estructuralmente este límite se da en la interfase entre el primordio cortical ventral y la porción más dorsal del subpalio, denominada eminencia ganglionar lateral o LGE [Yun, et al., 2001; Hébert y Fishell, 2008] (ver siguiente subtema).



**Figura 4. Principales vías genéticas que interactúan para formar y regionalizar el telencéfalo.** Los factores que actúan de manera temprana para establecer amplias regiones telencefálicas se muestran en azul. FGF podría promover y retroalimentar la expresión de FOXG1 (línea punteada). La señalización de FOXG1, así como la de FGF son necesarias para formar todas las regiones del telencéfalo (mostradas en verde), excepto la región dorsomedial (mostrada en naranja). (Modificado de Hébert y Fishell, 2008)

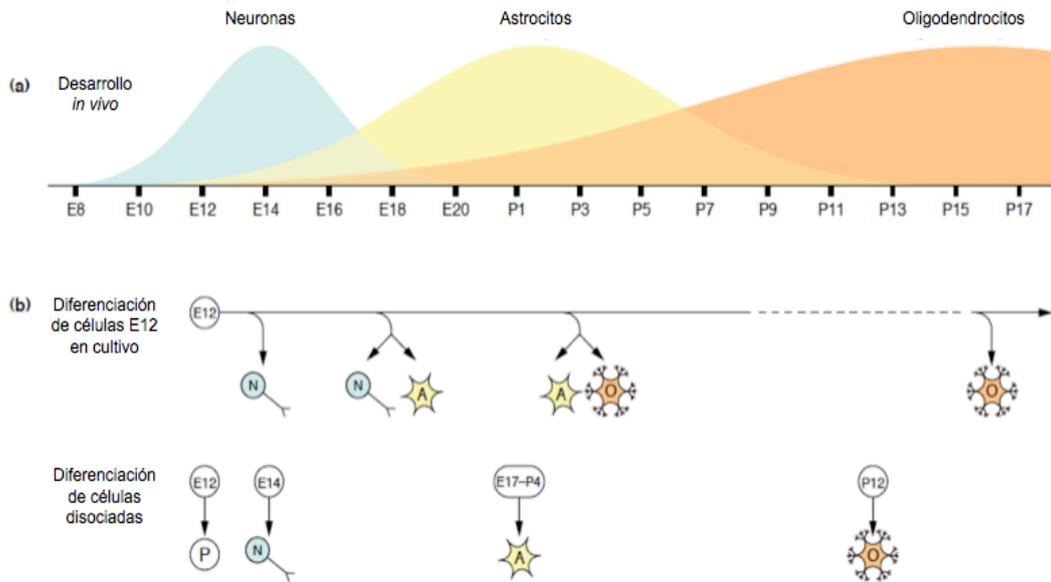
Por otro lado, LHX2, un factor de transcripción de tipo homeodominio LIM, es expresado en el primordio cortical y actúa como un gen clásico de selección para especificar un destino cortical en las células [Hébert y Fishell, 2008].

### **2.1.2 Neurogénesis y gliogénesis en la corteza cerebral**

El telencéfalo se subdivide en 4 grandes áreas que generan diferentes tipos celulares y que dan lugar a distintas estructuras funcionales adultas. El telencéfalo dorsal embrionario genera principalmente neuronas glutamatérgicas y puede ser dividido, a su vez, en 2 regiones principales: una región anterior y lateral que da lugar a la corteza cerebral, y una región posterior y medial que deriva en el hipocampo, el borde cortical y el plexo coroideo. El telencéfalo ventral, por su parte, también puede dividirse en 2 regiones: un dominio interno que se conoce como la eminencia ganglionar medial (MGE), y dos regiones posterior y lateral que se designan como la eminencia ganglionar lateral (LGE) y la eminencia ganglionar caudal (CGE) (Fig. 4). [Sadler y Langman, 2009; Rubenstein, et.al, 2009]

La corteza cerebral en desarrollo es una de las regiones del cerebro mejor estudiadas *in vivo*. Se forma a partir de CTN multipotentes que se dividen inicialmente en la zona ventricular (ZV) y posteriormente en la zona subventricular (ZSV). El epitelio cerebrocortical está constituido por CTN que se dividen de forma asincrónica y que producen neuroblastos que migran radialmente a la placa cortical, donde se diferencian en 6 capas distintas de neuronas [Velasco y Mayani, 2011].

La generación de todos los 3 tipos celulares en la corteza ocurre en fases distintas pero superpuestas. Las neuronas son generadas primero; una vez que la mayoría de éstas se han diferenciado y emigrado a sus destinos finales, una segunda ola de diferenciación se produce: la fase astrogliar. Finalmente, la diferenciación a oligodendrocitos se lleva a cabo una vez que la mayoría de las neuronas corticales han migrado a sus posiciones correctas, se han rodeado por células gliales de soporte y han formado conexiones sinápticas apropiadas (Fig.5). [Sauvageot y Stiles, 2002; Ross et al., 2002].



**Figura 5. Las células progenitoras corticales siguen una secuencia intrínseca de desarrollo tanto *in vivo* como *in vitro*.** (a) En ratas, la neurogénesis alcanza su máximo en el E14, las astrocitogénesis en el día postnatal 2 y la oligodendrogénesis en el día postnatal 14. (b) Los cultivos *in vitro* imitan el patrón de diferenciación observado *in vivo*, lo que sugiere que estas células están preparadas intrínsecamente para un destino determinado en un período del desarrollo determinado. Células disectadas en diferentes periodos del desarrollo diferencian a una progenie que refleja la actividad que ocurre en el momento de la disección. A: astrocito; N: neurona; O: oligodendrocito; P: célula progenitora; E+número: día embrionario correspondiente a dicho número; P+número: día postnatal correspondiente a dicho número) (Modificado de Sauvageot y Stiles, 2002)

Las fases iniciales del desarrollo cortical involucran la rápida proliferación de células progenitoras corticales a través de divisiones simétricas. Aproximaciones realizadas hace 10 años demostraron que la proliferación, especificación, y diferenciación de estas células son controladas, en gran medida, por factores de transcripción pertenecientes a la familia bHLH (por sus siglas en inglés *basic helix-loop-helix*) [Ross et al., 2002]. De esta manera, se ha visto que los progenitores corticales son mantenidos en un estado de proliferación gracias a la acción de factores bHLH de las familias Id (inhibidor de diferenciación) y Hes (por sus siglas en inglés Hairy/enhancer of slit). La transición de este estado proliferativo a la neurogénesis, implica un aumento coordinado en la actividad de los factores Mash1, Neurogenina 1 (Ngn1) y Neurogenina 2 (Ngn2), así como una disminución en la actividad de los factores Id y Hes. Curiosamente ambas Neurogeninas son expresadas en el telencéfalo dorsal, en donde se generan

las neuronas glutamatérgicas, mientras que Mash1 se expresa predominantemente en el telencéfalo ventral, el cual da origen a neuronas GABAérgicas y colinérgicas, haciendo alusión a la posibilidad de que diferentes genes proneurales están involucrados en la especificación de diferentes subtipos neuronales [Ross et al., 2002].

A medida que avanza el desarrollo, la inhibición de los factores proneurales bHLH en progenitores corticales, promueve la formación de los astrocitos [Ross et al., 2002]. Dicha astrogénesis también se ve promovida por la activación de la vía de Notch, por un lado, y la acción de las BMPs por otro. La vía de Notch actúa inhibiendo la actividad de genes proneurales, promoviendo así la entrada a la vía de diferenciación glial; por su parte las BMPs inducen la expresión de factores Id y Hes que a su vez conducen a la reducción de la activación de Ngn1 y Mash1 [Sauvageot y Stiles, 2002; Ross et al., 2002; Morrison, 2001].

## **2.2 Células troncales**

Dependiendo de las características celulares tales como la proliferación y la diferenciación, se han adoptado diferentes nombres para referirse a las células precursoras de algún linaje en particular. De manera general, *célula troncal* es el nombre que se le da a las células no diferenciadas con una alta capacidad de autorrenovación, que pueden dar origen a uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo [Baizabal, et al., 2003]. Este tipo de células se sitúan al inicio del linaje de un tejido determinado. En la mayoría de los casos, entre las células troncales y su progenie completamente diferenciada, existe una población intermedia de células progenitoras comprometidas, con una capacidad proliferativa limitada y un restringido potencial de diferenciación.

Durante la última década, la investigación con células troncales ha tenido avances significativos debido a importantes descubrimientos tanto a nivel embrionario como en el adulto. Debido a la falta de marcadores definitivos, estas células se identifican principalmente en base a 3 propiedades funcionales. En primer lugar, tienen la capacidad de auto

replicarse en repetidas ocasiones a través de divisiones celulares simétricas, en donde ambas células hijas continúan siendo idénticas a la célula troncal que les dio origen. De manera alternativa, en las divisiones celulares asimétricas, solo una de las células hijas es idéntica a la célula madre [Martin, 2009]. En segundo lugar, las células troncales no especializadas pueden dar origen, a células troncales especializadas a través de divisiones asimétricas, en donde una de las células hijas se somete a compromiso del linaje y diferenciación, bajo la influencia de señales fuera y dentro de la célula (factores celulares intrínsecos y extrínsecos). Y, en tercer lugar, aunque ésta no es una característica definitoria, son capaces junto con su progenie, de reconstituir funcionalmente un determinado tejido tras transplantarse *in vivo* [Martin, 2009].

Asimismo, de acuerdo a su potencial de desarrollo, las células troncales pueden dividirse en diferentes categorías:

- **Totipotentes:** se pueden encontrar en las primeras etapas del desarrollo embrionario. El término se refiere al cigoto unicelular, que es la única célula capaz de dar origen a todos los tipos celulares presentes en el embrión, así como a los tejidos extraembrionarios (trofoblasto).
- **Pluripotentes:** pueden diferenciarse en células de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), pero no en linaje trofodérmico. Las células pluripotentes mejor caracterizadas son las células troncales embrionarias.
- **Multipotente:** aisladas de nichos específicos en varios tejidos y órganos en desarrollo y adultos; pueden dar origen a los diversos tipos celulares que pertenecen a un linaje específico.
- **Unipotente:** únicamente pueden generar un tipo celular específico y tienen un potencial de proliferación limitado. [Appasani, 2010; Baizabal, et al., 2003; Martin, 2009].

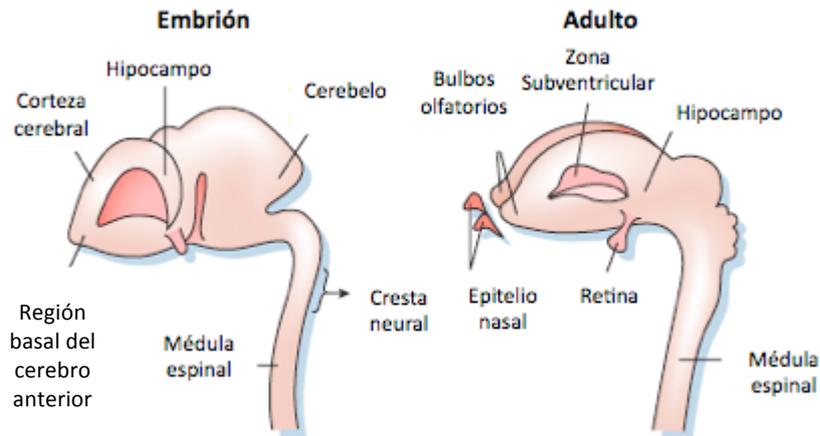
En mamíferos se han identificado tres tipos de células troncales pluripotentes: las células troncales embrionarias, derivadas de la masa celular interna del blastocisto, las células germinales embrionarias, obtenidas

de embriones post-implantados y las células de carcinoma embrionario aisladas de tumores gonadales. Todas dan origen a diversos órganos y tejidos [Kim y de Vellis, 2009].

Recientemente ha habido un gran desarrollo en la generación de una nueva clase de células troncales pluripotentes: las células pluripotentes inducidas o iPSCs (por sus siglas en inglés *Induced Pluripotent Stem Cells*), obtenidas de células somáticas adultas, como los fibroblastos de la piel, por introducción de 4 factores de reprogramación: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, conocidos por contribuir a la proliferación celular y al mantenimiento de la pluripotencia [Takahashi y Yamanaka, 2006; Chin, et al., 2009].

### **2.2.1 Células troncales neurales**

Una característica intrínseca del sistema nervioso central es su enorme diversidad celular, en particular por los diferentes tipos de neuronas presentes en el cerebro y la médula espinal. En el cerebro adulto existe una producción continua de neurotransmisores y receptores específicos, generados por neuronas especializadas. Las células troncales neurales (CTN) son las progenitoras de todos estos tipos celulares especializados presentes en el SNC; se caracterizan por su capacidad de dar lugar a más células troncales por división simétrica (autorrenovación), así como a los progenitores más maduros de todos los linajes neurales por división asimétrica (multipotencialidad). De esta manera, dan origen a los 3 principales tipos celulares que componen este sistema: neuronas, astrocitos, oligodendrocitos [Baizabal, et al., 2003; Gangemi R., et al. 2004; Temple, 2001].



**Figura 6. Localización de las células troncales neurales (CTNs).** Principales zonas del sistema nervioso embrionario y adulto de donde han sido aislados las CTN. (Modificado de Temple, 2001)

Estas células aparecen durante la formación de la placa neural y posiblemente constituyen el tipo celular predominante en el neuroectodermo en desarrollo. Como ya se mencionó previamente, a medida que avanza el desarrollo, se forma el tubo neural y las CTN se vuelven progresivamente menos abundantes y emergen progenitores celulares más restringidos [Baizabal, et al., 2003]. Igualmente, han sido descritas en una variedad de áreas del sistema nervioso en desarrollo, así como en la zona subventricular (SVZ) y el hipocampo del cerebro adulto, lo que nos indica su ubicuidad (Fig. 6) [Temple, 2001].

Las células troncales, además de tener especificación posicional, también tienen 'información temporal' que refleja los cambios de los progenitores dependiendo del estadio del desarrollo en que se encuentren [Temple, 2001]. Es así que los diferentes tipos de células neuronales surgen en un orden temporal preciso que es característico de una región y especie en particular. De manera general, las neuronas del SNC y SNP se originan antes que glía.

Uno de los marcadores más usados para identificar a la CTN *in vivo* e *in vitro* es la proteína Nestina. Esta proteína de filamentos intermedios tipo VI, se expresa exclusivamente en las células progenitoras neurales no comprometidas; después de que dichas células diferencian, su expresión se

sustituye normalmente por la expresión de marcadores específicos neuronales o gliales [Veselska, et al, 2006].

Las CTN, al igual que las células troncales embrionarias (CTE), pueden ser mantenidas en cultivo. Sin embargo, las CTE pueden mantenerse por períodos prolongados, mientras que las CTN únicamente por períodos restringidos de tiempo. Existen 2 formas para mantener a las CTN *in vitro*: 1) en neuroesferas, que son agregados flotantes de células neurales y 2) en monocapa, con la adición de proteínas de la matriz extracelular tales como la fibronectina o la laminina, que promueven la adherencia de las células a la placa de cultivo. En ambos casos, las CTN proliferan en respuesta a la aplicación de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento fibroblástico básico o bFGF (del inglés *basic fibroblast growth factor*) o el factor de crecimiento epidérmico o EGF (del inglés *epidermal growth factor*). La diferenciación se logra normalmente al retirar los factores de crecimiento; de esta manera las células comienzan a expresar proteínas características de los fenotipos neuronales, astrocíticos o oligodendrocíticos. [Velasco y Mayani, 2011].

Tras el descubrimiento de células troncales neurales en el embrión, se dio origen a un nuevo capítulo en la neurociencia [Temple, 2001]. Por ello, en los últimos años ha surgido gran interés en el estudio de sus características biológicas, así como en explorar la posibilidad de usarlas como herramientas potenciales para encontrar alternativas terapéuticas para las enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, antes de proceder a la realización de ensayos clínicos es necesario entender los mecanismo por los cuales las CTN generan los tipos neuronales requeridos para el tratamiento de dichos padecimientos, y de esa manera poder desarrollar protocolos terapéuticos eficientes.

### **2.3 Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

Múltiples factores de crecimiento se han implicado en la regulación de las CTN y la proliferación de células progenitoras. La superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), está constituida por una gran

cantidad de factores de crecimiento extracelulares que desempeñan funciones pleiotrópicas en el crecimiento de muchos órganos y sistemas [Falk, et al., 2008; Chang, et al., 2002].

Estas citocinas, expresadas en complejos patrones temporales y tejido-específicos, controlan un conjunto diverso de procesos celulares, incluyendo la proliferación, reconocimiento, diferenciación, apoptosis y la especificación del destino celular durante el desarrollo, tanto en embriogénesis como en tejidos adultos, en especies que van desde la mosca y el gusano hasta los mamíferos [Gomes, et al., 2005; Shi y Massagué, 2003]. La respuesta inducida o reprimida depende del tipo celular y el contexto en el que la señal es recibida.

En la actualidad, la superfamilia TGF- $\beta$  comprende alrededor de 100 proteínas distintas, incluyendo 30 de origen mamífero. [Gomes, et al., 2005]. De acuerdo a la similitud de secuencias y las vías específicas de señalización que activan, esta familia de citocinas se divide en 2 subfamilias:

- la subfamilia TGF- $\beta$ /Activina/Nodal y
- la subfamilia BMPs/ GDF (factor de crecimiento y diferenciación) /MIS (sustancia inhibitoria Muelleriana) [Shi y Massagué, 2003].

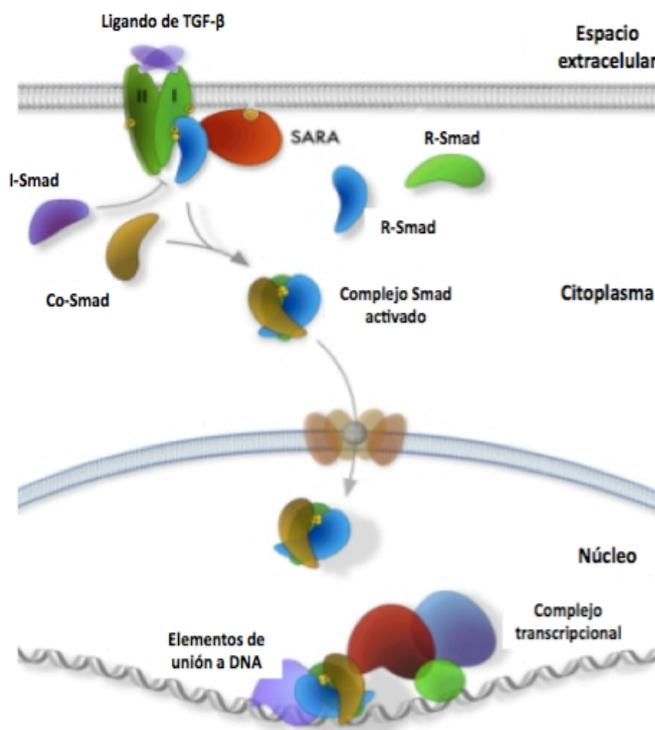
De manera general, cada ligando de la familia TGF- $\beta$  se une a los pares específicos de receptores con actividad de serina/treonina cinasas, que pertenecen a grupos conocidos como los receptores tipo I y tipo II. Ambos receptores son expresados en la superficie de casi todos los tipos celulares mamíferos. La unión del ligando actúa como un factor de ensamblaje y favorece la formación de un complejo dimérico entre ambos receptores, lo que permite que el receptor de tipo II fosforile el dominio cinasa del receptor tipo I, mismo que posteriormente propaga la señal mediante la fosforilación de las proteínas Smad (por sus siglas en inglés *similar to mothers against decapentaplegic*) (Fig.7) [Golestaneh y Mishra, 2005; Massagué, 2000; Shi y Massagué, 2003].

En vertebrados existen ocho proteínas Smad distintas, que constituyen tres clases funcionales: las Smad reguladas por receptor o R-Smads, el mediador común o Co-Smad y las Smad inhibitorias o I-Smads. Las R-Smads

(Smad1, 2, 3, 5 y 8) son fosforiladas y activadas directamente por el receptor de tipo I, para posteriormente formar un complejo heterotrimérico de dos R-Smad y una Co-Smad denominada Smad4. Los complejos Smad activados son translocados al núcleo y junto con otros cofactores nucleares participan en la transcripción de genes blanco específicos (Fig.7) [Shi y Massagué, 2003].

A su vez, las R-Smads se subdividen, dependiendo del ligando que las active; las Smads 2 y 3 son fosforiladas por los receptores de TGF- $\beta$  y Activinas, mientras que las Smads 1, 5, y 8 son activadas por receptores de BMPs [Gomes, et al., 2005].

En contraste, las I-Smads, Smad6 y Smad7, regulan negativamente la señalización de TGF- $\beta$  de 3 maneras distintas: asociándose a los receptores activados de tipo I, previniendo la unión y activación de las R-Smads, compitiendo por la unión a Smad4 o por funciones represoras de los genes blanco putativos antes de la señal inducida por la activación transcripcional [Shi y Massagué, 2003; Böttner, et al., 2000].



**Figura 7. Diagrama esquemático que muestra la señalización de TGF- $\beta$  de la membrana celular al núcleo.** Las flechas indican el flujo de la señal. Un ligando de la vía se une y activa al receptor de tipo II, que a su vez activa y forma un complejo con el receptor de tipo I. Esto promueve la fosforilación de las R-Smads que posteriormente forman un complejo heterotrimérico con Smad4. Este complejo se acumula en el núcleo para asociarse con diversas proteínas de unión a DNA y de este modo modular la actividad de promotores específicos. El reconocimiento de las R-Smads por los receptores puede ser facilitado por proteínas auxiliares; una de ellas es SARA (del inglés 'Smad anchor for receptor activation'), la cual es una proteína de membrana que inmoviliza de manera particular a las Smad 2 y 3 cerca de la superficie celular y las presenta al receptor tipo I activado. (Modificado de Garamszegi, et al., 2010)

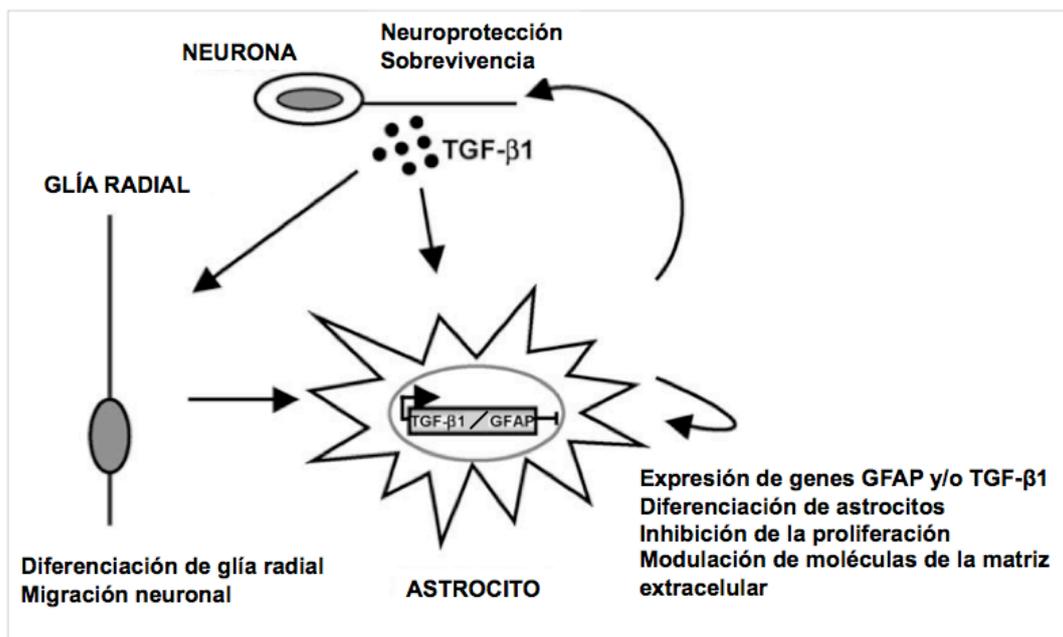
La familia de TGF- $\beta$ s está representada en mamíferos por un pequeño grupo de citocinas multifuncionales, constituido por tres isoformas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 que son consideradas moléculas reguladoras independientes.

Dentro del sistema nervioso central adulto, estas citocinas son producidas tanto por células gliales como por neuronas, sin embargo, TGF- $\beta$ 2 y  $\beta$ 3 se expresan de manera ubicua (inclusive dentro del SNP), mientras que la expresión de TGF- $\beta$ 1 se limita a las meninges y al plexo coroideo. Todas están involucradas en funciones celulares y tisulares esenciales, incluyendo el control del ciclo celular, la regulación del desarrollo temprano, así como la diferenciación y sobrevivencia de las células neuronales [Gomes, et al., 2005].

De manera particular, TGF- $\beta$ 1 desempeña un papel central en la reparación tisular, ya que se sobreexpresa drásticamente en el SNC inmediatamente después de lesión o neurodegeneración, e induce la expresión de muchos otros genes de respuesta a lesión, al ser secretada predominantemente por células microgliales activadas. En los últimos años sin embargo, ha emergido como un regulador crucial en la fisiología del sistema nervioso. La distribución de TGF- $\beta$ 1 y sus receptores en el sistema nervioso en desarrollo *in vivo*, fue consistente con la idea de que podría estar involucrado en el desarrollo del cerebro. Esta idea se apoyó fuertemente con la generación del ratón *knockout* para TGF- $\beta$ 1, el cual se caracteriza por presentar un grave deterioro en el desarrollo cortical, con un aumento en el número de neuronas apoptóticas, una expresión disminuida de la proteína de matriz extracelular laminina, y microgliosis generalizada [Kandasamy, et al., 2011; Gomes, et al., 2005]. Asimismo, en cultivos de células troncales neurales, TGF- $\beta$ 1 tiene la capacidad de promover la diferenciación neuronal al promover la salida del ciclo celular de estas células [Misumi, et al., 2008].

Además, diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han determinado las funciones biológicas de TGF- $\beta$ 1 dentro del SNC. Así, se ha demostrado que TGF- $\beta$ 1 modifica la migración celular en la corteza cerebral en desarrollo de manera dependiente de la concentración, y en acción conjunta con otros factores tróficos como GDNF, regula la sobrevivencia de neuronas

embrionarias, neonatales y adultas [Echeverry, et al., 2009]. Además, bloquea la proliferación microglial y astrocítica, la inducción de radicales libres [Suzumura, et al., 1993] y promueve la extensión de neuritas [Abe K., et al., 1996] (Fig. 8). Por otro lado se ha visto que esta citocina se expresa en células de la zona proliferativa y que sus receptores son expresados por neuronas y glía radial migratoria, lo que sugiere que este factor de crecimiento desempeña un papel en la migración neuronal. Otros estudios enfocados principalmente en las etapas finales de la neurogénesis adulta describen que TGF- $\beta$ 1 facilita la diferenciación neuronal y promueve la sobrevivencia de dichas células [Kandasamy, et al., 2011]. Finalmente, muchos de los efectos de TGF- $\beta$ 1 en la astroglia son antiinflamatorios e inmunosupresores, como la inhibición de TNF- $\alpha$  inducida por el interferón  $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  [Echeverry, et al., 2009].



**Figura 8. Papel de TGF- $\beta$ 1 como mediador de las interacciones de los astrocitos en el cerebro adulto.** Las neuronas aumentan la producción y liberación de TGF- $\beta$ 1, que a su vez protege a las neuronas vecinas contra la muerte excitotóxica. Adicionalmente el TGF- $\beta$ 1 secretado por las neuronas modula la migración neuronal a lo largo de las fibras de la glía radial y podría estar implicado en la diferenciación de la misma. Por otro lado, además de promover la sobrevivencia neuronal, TGF- $\beta$ 1 modula varios eventos en los astrocitos tales como: la inducción de la expresión del gen GFAP y la consecuente diferenciación en estas células, la inhibición de la proliferación y la secreción de proteínas de la matriz extracelular. Esta red resume el rol de TGF- $\beta$ 1 en la biología de los astrocitos y sugiere que esta citocina puede desempeñar una función clave como mediador de las interacciones neurona-glía durante el desarrollo del SNC. (Modificado de Gomes, et al., 2005)

### 2.3.2 Activina A

Las activinas, como se mencionó anteriormente, son miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ . Se ha encontrado que poseen varias actividades en diferentes sistemas biológicos, por ejemplo: en la diferenciación eritroide, la sobrevivencia de células nerviosas, la inducción del mesodermo embrionarios en *Xenopus laevis*, la promoción del crecimiento del hueso y la inducción de somatostatina [Mathews, 1994]. Subsecuentemente se describió que las activinas regulan una amplia variedad de eventos celulares, incluidos la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis.

Estas citocinas están estructuralmente relacionadas con las inhibinas, ya que ambas comparten subunidades  $\beta$  en común;  $\beta A$  y  $\beta B$  son las más frecuentes. Las proteínas biológicamente activas de activina consisten de homo o heterodímeros de dos subunidades  $\beta$ , unidas por un puente disulfuro, y dependiendo de la combinación de subunidades, existen 3 isoformas: activina A ( $\beta A/\beta A$ ), activina B ( $\beta B/\beta B$ ) o activina AB ( $\beta A/\beta B$ ). Las inhibinas en cambio, son heterodímeros de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  puede dimerizar ya sea con  $\beta A$  o  $\beta B$  y formar la inhibina A ( $\alpha\beta A$ ) o B ( $\alpha\beta B$ ), respectivamente [Chen, et al., 2002].

Las activinas fueron descubiertas en la década de los '80 como proteínas gonadales que estimulaban la liberación de la hormona folículo estimulante o FSH (por sus siglas en inglés *follicle-stimulating hormone*), y fueron consideradas como hormonas reproductivas. Sin embargo, en los últimos 5 años, una serie de avances importantes se han hecho para aclarar la comprensión de las bases estructurales de las activinas en la señalización y regulación, así como sus funciones biológicas en células troncales, en el desarrollo embrionario y en los organismos adultos [Xia y Schneyer, 2009].

En especial, activina A es conocida por regular la proliferación y diferenciación neural durante la embriogénesis [Abdipranoto-Cowley, et al., 2009]. Varios estudios han mostrado que podría desempeñar un papel neuroprotector, ya que la expresión de esta citocina se incrementa en el hipocampo de roedores en modelos de isquemia cerebral transitoria e hipoxia, así como posterior a la neurodegeneración ocasionada por el tratamiento con ácido kaínico [Abdipranoto-Cowley, et al., 2009; Mukerji, et

al., 2007]. Asimismo, estudios *in vitro* han sugerido que la activina A estimula la formación de nuevos astrocitos [Sato, et al., 2000].

A pesar de los hallazgos anteriores, el papel de activina A durante el desarrollo del sistema nervioso no está bien definido. Por un lado, se ha visto que activina A inhibe la diferenciación neuronal inducida por ácido retinoico en células pluripotenciales murinas de carcinoma embrionario y en células de neuroblastoma [Hashimoto, et al., 1990]. Por otro lado, en una línea celular de neuroblastoma humano (SK-N-SH), el tratamiento con activina A exógena causó crecimiento de neuritas y un aumento en la expresión de marcadores neurales, lo que sugiere que, a pesar de que esta citocina ha sido considerada como un regulador negativo de diferenciación neuronal en algunas líneas celulares, podría regular positivamente este proceso en otras [Suzuki, et al., 2010].

Aunado a esto se encuentra el hecho de que los ratones *knockout* de activina A no presentan alteraciones aparentes en el SNC. Estos ratones se desarrollan a término, carecen de bigotes e incisivos inferiores, tienen defectos en el paladar y mueren después de 24 horas de haber nacido [Matzuk, et al., 1995]. Sin embargo, el ARNm de activina A es expresado en la corteza cerebral y en el estriado de embriones de roedores de 16-20 días gestacionales. Además, ActRII, uno de los dos subtipos del receptor de tipo II, también se expresa ampliamente en tejidos neuronales, encontrándose en cerebro y médula espinal, del E13 al E20, mientras que el RNAm de ActRIIB, el otro subtipo del receptor de tipo II, se expresa en etapas más tempranas del desarrollo (E9 al E11) en el tubo neural y médula espinal, sugiriendo que esta citocina podría estar involucrada en la regulación del desarrollo del SNC [Roberts et al., 1991].

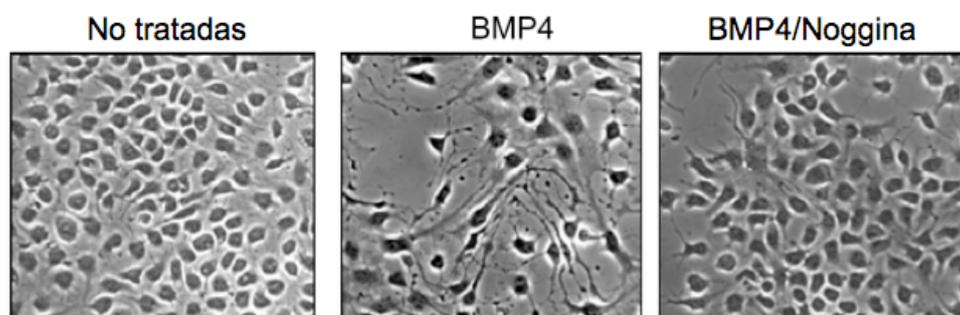
### **2.3.3 Proteína morfogénica ósea isoforma 4**

La familia de BMPs es el subgrupo más grande de la superfamilia del TGF- $\beta$ . A pesar de que fueron descubiertas originalmente en hueso y su nombre hace hincapié a su importancia en el desarrollo esquelético, las

BMPs controlan muchos pasos clave en la formación y diferenciación del sistema nervioso vertebrado. Estas proteínas actúan en diferentes etapas del desarrollo neural y adulto, en diferentes regiones del SNC, regulando la proliferación, diferenciación y destino celular [Liu y Niswander, 2005].

En general, las proteínas BMPs potencian la neurogénesis o gliogénesis dependiendo de la edad de las células corticales en cultivo, de una manera paralela a la ocurrida en el desarrollo *in vivo*. De esta manera, las BMPs son neurogénicas durante las primeras etapas del desarrollo cortical, y gliogénicas durante el desarrollo postnatal temprano y tardío [Sauvageot y Stiles, 2002].

Existen más de 30 miembros de la familia BMP, aunque en mamíferos parece que hay solamente cerca de 15. BMP4 en particular, es conocida por participar en la diferenciación astrocítica de células troncales y progenitores neurales. Sin embargo, se ha observado también, que cultivos de CTN de embriones de rata en E14, sufren diferenciación neuronal cuando las células son tratadas con BMP4 y que esta diferenciación es inhibida con el tratamiento concomitante con Noggina, un antagonista de BMP4 (Fig. 9) [Moon, et al., 2009]. Esta diversidad de respuestas puede ser debida a otras señales que modulen la respuesta a BMP y/o a la activación de diferentes vías de señalización de BMP [Rajan, et al., 2003]. Por lo tanto esta citocina puede también inducir diferenciación neuronal, dependiendo del balance entre las vías de diferenciación neuronales y astrocíticas [Kim, et al., 2010].



**Figura 9. Efecto de BMP4 en la proliferación y diferenciación de CTN.** Micrografías tomadas con microscopio de contraste de fase con un aumento de 40X. Las CTN fueron cultivadas en medio N2 adicionado con bFGF (10 ng/ml) y fueron tratadas con BMP4 (20 ng/ml) por 48 hrs y/o con Noggina (150 ng/ml). (Modificado de Moon, et al., 2009).

Se ha visto además que el tratamiento con BMP4 induce eficientemente la generación de células de músculo liso o glía en cultivos de células troncales neurales, de una manera dependiente de la densidad celular [Rajan, et al., 2003]. De igual manera, en explantes de prosencéfalo de ratón cultivados con cuentas embebidas en BMP4, se reportó una disminución dramática en la proliferación y en la muerte celular [Gobeske, et al., 2009].

Finalmente, tanto el *knockout*, como la sobreexpresión constitutiva de BMP4 tienen consecuencias importantes en el desarrollo. Los ratones knockout para BMP4 no muestran diferenciación del mesodermo y mueren durante las etapas tempranas del desarrollo, indicando que este gen desempeña papeles importantes durante la embriogénesis [Aoki, et al., 2010; Chang et al., 2002]. En contraste, la sobreexpresión de esta citocina ha demostrado disminuir la proliferación celular y el número de células troncales y progenitores neurales en el giro dentado [Gobeske, et al., 2009],

## **2.4 Histamina**

Además de los efectos descritos de TGF- $\beta$ 1, activina A y BMP4 existen otras moléculas que inciden sobre la proliferación y diferenciación de las CTN. La histamina (HA) es una amina biogénica que es sintetizada en las neuronas a partir del aminoácido precursor L-histidina y que actúa como neurotransmisor (neurorregulador) en el SNC adulto. En mamíferos, la HA está involucrada en la regulación, pre y post sináptica, de diversas funciones fisiológicas como el ciclo de sueño y vigilia, la actividad motora, la regulación térmica y cardiovascular, el control de la ingestión de alimentos y agua, y la regulación endócrina [Molina-Hernandez y Velasco, 2008; Rang, 2008; Schwartz, 1991].

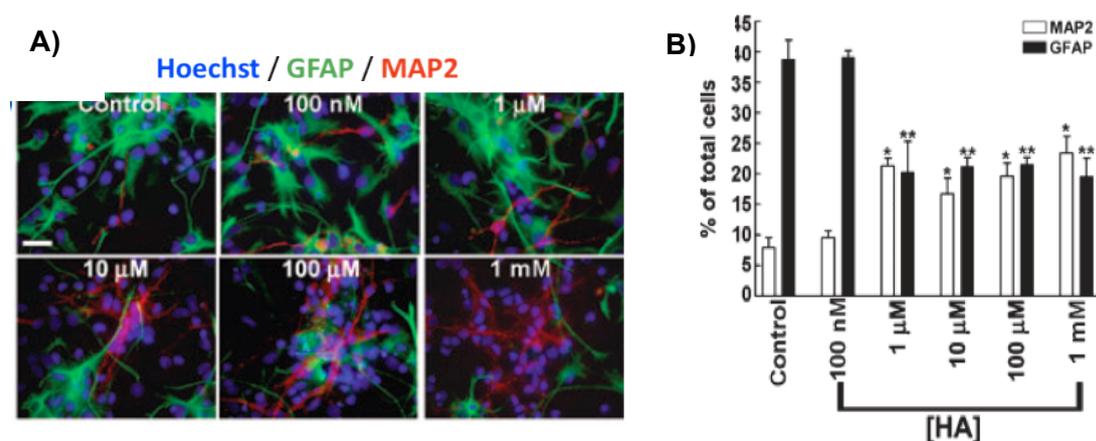
La HA actúa en el cerebro a través de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Hasta el momento se han clonado 4 receptores histaminérgicos (H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>), de los cuales 3 (H<sub>1</sub>-H<sub>3</sub>) se encuentran ampliamente distribuidos en diversas regiones del cerebro de mamíferos y activan diversas vías de señalización; por su parte, el receptor H<sub>4</sub> se ha detectado

predominantemente en tejidos periféricos (médula ósea y leucocitos) [Haas y Panula, 2003].

Durante el desarrollo, tanto de rata como de ratón, la HA se encuentra ampliamente distribuida en diversos tejidos embrionarios, principalmente durante la segunda mitad de este proceso. Asimismo, es uno de los primeros neurotransmisores en aparecer durante el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados [Nissinen y Panula, 1995].

Del mismo modo, se ha comprobado la presencia de HA en altas concentraciones (5 veces mayores a las encontradas en el cerebro adulto) en el prosencéfalo de rata, del día E14 al día E17. Se sabe por otro lado que en esta misma región del cerebro, la neurogénesis comienza al día E12, alcanza su pico al día E14, y decrece al día E17. Este traslape de eventos sugiere que la HA juega un papel en la diferenciación neuronal que ocurre en este período [Molina-Hernandez y Velasco, 2008; Vanhala et al. 1994].

Finalmente, con respecto a los efectos de esta amina sobre las CTN, recientemente se observó que en cultivos de precursores corticales de rata E14, la HA, a concentraciones de 1  $\mu$ M a 1 mM, actúa como un modulador positivo en la expansión/ proliferación de CTN a través de la activación del receptor H<sub>2</sub>R y también como un factor que promueve la diferenciación neuronal de precursores neurales, efecto debido a la activación del receptor H<sub>1</sub>R (Fig. 10) [Molina-Hernandez y Velasco, 2008].



**Figura 10. La histamina promueve la diferenciación neuronal mediante la activación de los receptores H1.**  
**A)** Micrografías representativas que muestran el marcaje para la proteína 2 asociada a microtúbulos, o MAP2 (un marcador de neuronas maduras mostrado en rojo) y la proteína ácida fibrilar glial o GFAP (marcador de astrocitos, mostrado en verde), así como la detección nuclear por Hoechst (en azul), que muestra el efecto de HA sobre el número de neuronas y células gliales. Barra de escala = 5  $\mu$ m. **(b)** Cuantificación del número total de células MAP2-positivas y GFAP-positivas por duplicado de ocho campos tomados en tres experimentos independientes. No se encontraron células que coexpresaran MAP2 y GFAP. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  EE y son expresados como el porcentaje del total de células teñidas con Hoechst. \*P < 0.05 y \*\*P < 0.001 vs. control y 100 nM HA. (Modificado de Molina-Hernandez y Velasco, 2008)

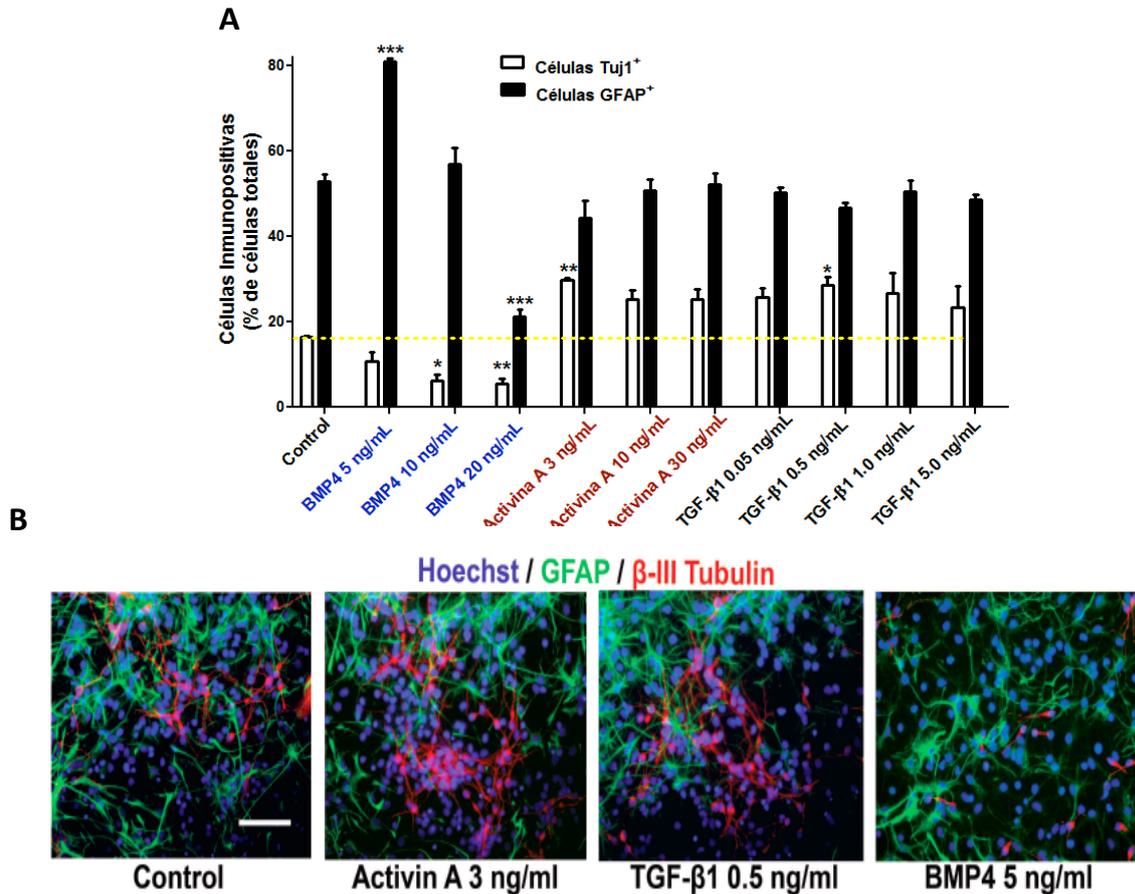
### 3. JUSTIFICACIÓN

Los miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  desempeñan un papel fundamental en la morfogénesis y la especificación de linaje celular durante el desarrollo cerebral [Golestaneh y Mishra, 2005]. Estas citocinas, así como sus respectivos receptores son expresados durante el desarrollo cerebral de la corteza de rata, con patrones de expresión que se traslapan en tiempo y espacio, y producen efectos diferentes cuando son adicionados a cultivos de CTN.

Los cultivos de CTN son herramientas experimentales muy útiles para el estudio de los mecanismos que se dan durante el desarrollo del cerebro. Las células cultivadas tienen el potencial de desarrollarse a los 3 tipos celulares presentes en el SNC (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos).

En el laboratorio se ha analizado particularmente, el efecto que tiene la adición de TGF- $\beta$ 1, activina A, BMP4 sobre la proliferación, diferenciación y muerte celular. Se ha demostrado que la adición continua (tanto en la fase de proliferación como en la fase de diferenciación) de 5 ng/ml de BMP4 a CTN en cultivo, incrementa la proporción de astrocitos y disminuye el número de neuronas, mientras que la adición de 3 ng/ml de activina A, o bien de 0.5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 produce incrementos en el número de neuronas respecto al control (60% y 43%, respectivamente), sin alterar el número de astrocitos presentes en los cultivos (Fig. 11A). Estos incrementos en el porcentaje de neuronas no fueron debidos a un incremento en la proliferación, ni a una disminución en la muerte celular [Rodríguez-Martínez et al., datos enviados para su publicación].

Algunos estudios han demostrado que activina A y TGF- $\beta$  se comportan como moléculas neurotróficas, es decir, promueven la supervivencia neuronal, en ensayos *in vitro*, aunque la contribución sinérgica de otros factores no puede ser descartada en estas condiciones de cultivo [Böttner, et al ., 2000].



**Figura 11. Efecto de activina A, TGF-β1 y BMP4 sobre la diferenciación de células progenitoras neurales.** A) Cuantificación del número total de células β-tubulina III<sup>+</sup> y GFAP<sup>+</sup> por duplicado, de 10 campos tomados aleatoriamente en tres experimentos independientes. No se encontraron células que coexpresaran ambos marcadores. Los resultados se muestran como el promedio ± EE y expresados como el porcentaje del total de células teñidas con Hoechst. Se observa una curva de concentración realizada con el objetivo de encontrar la concentración más efectiva. En base a estos resultados se eligieron las concentraciones de BMP4 5 ng/ml, activina A 3 ng/ml y TGF-β1 0.5 ng/ml como las más significativas. \* P < 0.05 vs control; \*\* P < 0.01 vs control; \*\*\* P < 0.001 vs control.

B) Micrografías representativas de los cultivos tratados con dichas concentraciones. Se muestra el marcaje para GFAP (marcador glial) y para β-tubulina III (marcador neuronal) así como la detección nuclear con Hoechst (azul) (Modificado de Rodríguez-Martínez, datos no publicados).

Debido a que los efectos de estas citocinas sobre cultivos de progenitores neurales han sido estudiados de manera individual y a que la producción de estas citocinas se traslapa durante el desarrollo, nos propusimos analizar los efectos producidos al adicionarlas en conjunto en este tipo de células, con la finalidad de determinar si dichos efectos podían potenciarse debido a una acción sinérgica, o por el contrario, disminuir. Del mismo modo, quisimos probar si activina A y TGF-β1 pueden potenciar a factores que promueven la diferenciación neuronal, como la histamina, ya que se ha demostrado que esta amina es capaz de incrementar la diferenciación neuronal de las CTN [Molina-Hernandez y Velasco, 2008].

## **4. HIPÓTESIS**

Los tratamientos combinados con activina A, TGF-  $\beta$ 1 e histamina potenciarán el efecto neurogénico individual ya conocido de estas moléculas en cultivos de células progenitoras neurales, lo que se verá reflejado en un aumento en la proporción de neuronas. La presencia de BMP4 en los tratamientos, por su parte, antagonizará el efecto neurogénico de activina A, TGF- $\beta$ 1 e Histamina sobre estas células.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar el efecto del tratamiento combinado de factores de crecimiento de la familia del TGF- $\beta$  e histamina sobre el potencial de diferenciación de células troncales neurales.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estandarizar las condiciones de amplificación de los transcritos neurales GFAP y  $\beta$ -tubulina III.
- Determinar si el tratamiento conjunto de BMP4 con factores neurogénicos de la familia del TGF- $\beta$  altera la proporción de neuronas y/o astrocitos generados en los cultivos de células troncales neurales.
- Establecer si el tratamiento conjunto de activina A y TGF- $\beta$ 1 tiene un efecto sinérgico sobre la diferenciación de células troncales neurales hacia la población neuronal.
- Determinar si activina A y TGF-  $\beta$ 1 pueden potenciar a factores que promueven la diferenciación neuronal, en particular a la Histamina.
- Analizar si los cambios obtenidos en las inmunocitoquímicas también se presentan a nivel de mensajeros.
- Analizar si los cambios obtenidos coinciden con el patrón de fosforilación de las proteínas Smads, mediante Western blot para las

formas fosforiladas de Smad2/3 y Smad1/5/8, pSmad2/3 y pSmad1/5/8 respectivamente.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### i) **Disección de corteza cerebral fetal de rata de 14 días de desarrollo embrionario.**

Los embriones se obtienen de ratas gestantes de 14 días de la cepa Wistar, proporcionadas por el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Dichas ratas son sacrificadas por decapitación para la posterior extracción de los embriones, de la siguiente manera:

- El área y los instrumentos de trabajo son desinfectados previamente con etanol al 70%.
- Se realiza una incisión en la parte baja del abdomen de la rata gestante, con la precaución necesaria de no lesionar ningún embrión, pero con la seguridad de cortar las capas de piel y músculo.
- Se localizan los cuernos uterinos, lugar donde se sitúan los embriones, y se extraen.
- Colocar los embriones en una caja petri previamente llenada con solución salina amortiguada (Solución Krebs; ver apéndice 1).
- Remover el saco vitelino de cada uno de los embriones.
- Con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ 1500) disectar la región ventral de vesículas telencefálicas (corteza cerebral) (Fig.12).
- Recolectar el tejido disectado en un tubo cónico de 15 ml (Corning 430791) con 5 ml de solución Krebs.

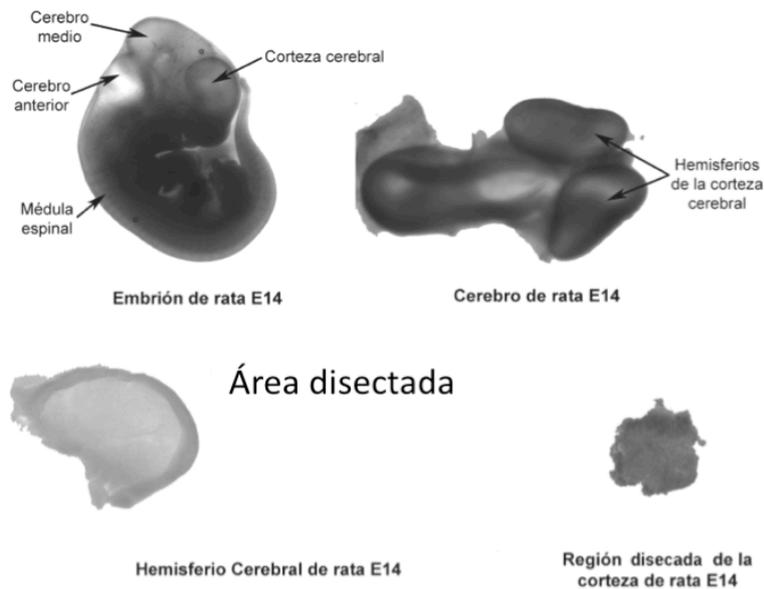


Figura 12. Esquematación de la región disectada correspondiente a la corteza cerebral

## ii) Obtención de cultivos de CTN de telencéfalo ventral de rata E14

Una vez realizada la disección de la corteza cerebral fetal:

- 1) Centrifugar los fragmentos de corteza durante 5 minutos a 1000 rpm y 4° C en una centrífuga de mesa (Thermo Forma 1L GP).
- 2) Retirar el sobrenadante cuidando no tocar el pellet.
- 3) Agregar 900 µl de solución Krebs fría y disociar mecánicamente de 6 a 8 veces con ayuda de una micropipeta de 1000 µl.
- 4) Dejar sedimentar 3 minutos. Al concluir este tiempo, recuperar el sobrenadante en un tubo cónico nuevo de 15 ml.
- 5) Agregar al sedimento 900 µl de solución Krebs y disociar nuevamente.
- 6) Dejar sedimentar 3 minutos. Recuperar el sobrenadante y colocarlo junto con el sobrenadante anterior.
- 7) Llevar a un volumen final de 5 ml con solución fisiológica de Krebs.
- 8) Centrifugar los sobrenadantes recuperados durante 5 minutos a 1000 rpm y 4° C.
- 9) Retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en medio N2 (de 2 a 5 ml dependiendo del tamaño de la pastilla) (Ver Apéndice 1).

10) Cuantificar las células en una cámara de Neubauer realizando una tinción vital con azul tripano. Realizar el conteo del número de células en 4 cuadrantes de la cuadrícula de la cámara. Para obtener el número total de células en la suspensión se realiza el siguiente cálculo:

$$\frac{(\# \text{ de células} / 4 \text{ campos}) \times 2 (\text{factor de dilución}) \times 10,000 (\text{factor del hemocitómetro})}{\text{x ml de volumen utilizado para resuspender las células}} = \# \text{ total de células en la suspensión}$$

11) Una vez contadas sembrar a una densidad  $1-1.5 \times 10^6$  en cajas Petri de 10 cm previamente tratadas con poliornitina (PLO) (15  $\mu\text{g/ml}$ ) y laminina/fibronectina (1  $\mu\text{g/ml}$ ). NOTA: Volumen total por caja de 10 cm = 6 ml.

12) Mantener las células en la incubadora a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$

13) Agregar FGF diariamente (factor mitógeno), y cambiar el medio cada 2 días.

A estos cultivos se les conoce como células en pasaje 0.

### **iii) Pasaje de cultivos primarios de CTN de telencéfalo dorsal de rata E14**

Cuando las cajas alcancen una confluencia del 85-90 % se procede a cambiarlas a otra caja. A esto se le conoce como pasaje, y se realiza con el fin de homogeneizar la población celular. Se procede de la siguiente manera:

- Con una pipeta de 5 ml y con ayuda del pipetor, subir y bajar el medio a una velocidad y fuerza constantes para despegar las células de la superficie de la caja.
- Observar la caja al microscopio para verificar que la totalidad de las células se haya despegado.
- En caso de haber muchas células pegadas, se utiliza solución 5 ml de PBS-EDTA 0.1 mM (ver Apéndice 1) y repetir el primer paso.

- La suspensión celular se recupera en un tubo de 15 ml y se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Se retira el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 1 a 5 ml de medio N2, dependiendo del tamaño del botón.
- Calcular la cantidad de células utilizando la cámara de Neubauer, como se explicó anteriormente.

Todos los experimentos fueron realizados con células en P2. El procedimiento para obtenerlas es idéntico al del párrafo anterior.

#### **iv) Tratamientos con citocinas de la familia TGF- $\beta$ e histamina**

Los tratamientos se inician el día que se pasan las células de P1 a P2. Las moléculas empleadas fueron: activina A, TGF- $\beta$ 1, BMP4, e histamina, en concentraciones de 3 ng/ml, 0.5 ng/ml, 5 ng/ml y 100  $\mu$ M respectivamente.

Como antecedente, cabe mencionar que las concentraciones utilizadas en el experimento ya habían sido estandarizadas y probadas con resultados positivos en el laboratorio, demostrándose que eran las adecuadas para observar el efecto estimulante o inhibidor de la diferenciación neuronal; durante este proceso se observó que dicho efecto era dependiente de la concentración.

Las concentraciones utilizadas se obtienen de la siguiente manera:

Experimento	Citocina	Stock (µg/ml)	Concentración final
Inmunocitoquímica (caja de cultivo de 24 pozos; 300 µl de medio/pozo)	Activina A	30	3 ng/ml
	BMP4	10	5 ng/ml
	TGF-β1	20	0.5 ng/ml
	Histamina	500 mM*	100 µM
Extracción de RNA (caja de cultivo de 6 pozos; 1 ml de medio/pozo)	Activina A	30	3 ng/ml
	BMP4	10	5 ng/ml
	TGF-β1	20	0.5 ng/ml
	Histamina	500 mM	100 µM
Inmunoprecipitación de extractos celulares (caja de cultivo de 10 cm; 4.5 ml de medio/pozo)	Activina A	30	3 ng/ml
	BMP4	10	5 ng/ml
	TGF-β1	20	0.5 ng/ml
	Histamina	500 mM	100 µM

\* Ver Apéndice 1

Para el caso de las inmunocitoquímicos y la extracción de RNA, las células pasan por dos etapas: una de proliferación, en la que se continúa el tratamiento con bFGF, y además comienzan los tratamientos con las diferentes citocinas; y una etapa de diferenciación en la que los tratamientos con las citocinas continúan y el FGF-2 es sustituido por ácido ascórbico (agente antioxidante) (Fig. 13)

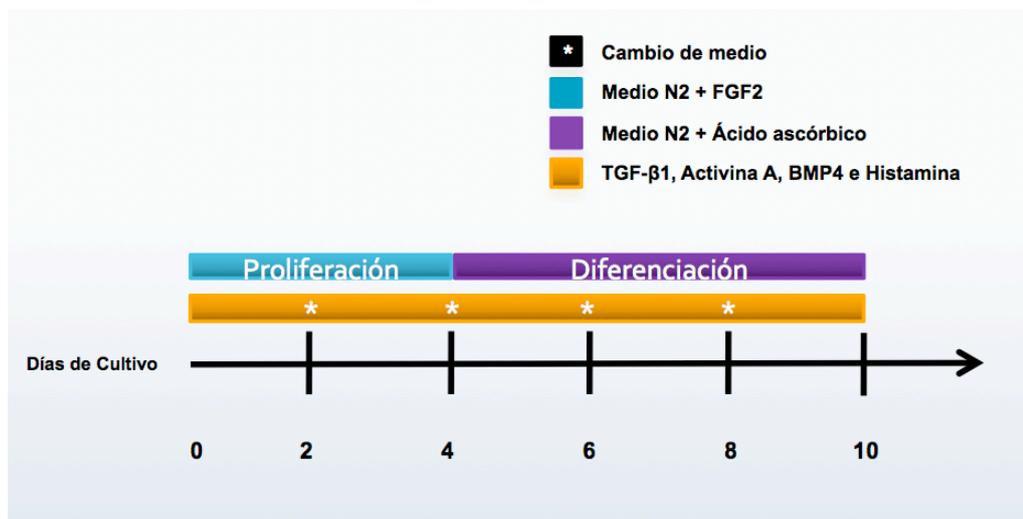


Figura 13. Esquematización de la secuencia en los tratamientos recibidos por las células

### iii) Inmunocitoquímica

En este caso, las células se siembran en cajas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 15 000 células (volumen total de 300 a 500 µl por pozo). Una vez que finaliza la etapa de diferenciación, se procede de la siguiente manera:

1. Retirar el medio N2.
2. Lavar 2 veces con PBS (Ver apéndice 1).
3. Fijar las células con PFA al 4% (Ver apéndice 1). NOTA: A partir de este paso, el procedimiento puede realizarse fuera de la campana.
4. Retirar el PFA y hacer 3 lavados en agitación de 5 minutos con PBS 1X + 0.1% de BSA (0.1%).
5. Aplicar la solución bloqueadora de PBS 1X + 0.3% de Tritón X-100 + 10% de suero normal de cabra o NGS (del inglés *normal goat serum*).
6. Al finalizar, hacer 3 lavados de 5 minutos en agitación con PBS 1X + 0.1% BSA.
7. Incubar toda la noche a 4°C con 20 µl del o los anticuerpos primarios (ver Apéndice 2) + 10% NGS. Cubrir con parafilm cada uno de los pozos para que el anticuerpo se distribuya uniformemente y no se evapore.
8. Recuperar los anticuerpos primarios y realizar 3 lavados de 5 minutos en agitación con PBS + 0.1% de seroalbúmina bovina o BSA (del inglés *bovine serum albumin*). NOTA: El anticuerpo primario puede reutilizarse hasta 3 veces.
9. Adicionar el o los anticuerpos secundarios + PBS + 0.1% BSA e incubar a temperatura ambiente en agitación. Cada pozo tiene un volumen final de 300 µl.
10. Recuperar los anticuerpos secundarios y realizar 3 lavados de 5 minutos en agitación con PBS + 0.1% BSA.

Cubrir las cajas con papel estroza durante cada lavado para evitar la exposición a la luz.

11. Incubar con una solución de Hoechst/PBS por 10 minutos para teñir los núcleos.

12. Realizar 3 lavados de 5 minutos en agitación con PBS. Cubrir las cajas con papel estroza durante cada lavado para evitar la exposición a la luz.

#### **iv) Extracción de ARN por el método de Trizol**

Para este procedimiento, las células P2 son sembradas en cajas de 6 pozos a una densidad de 500,000 células por pozo (volumen total de 1 ml por pozo). Al concluir la etapa de diferenciación, se procede de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1) Añadir en cada pozo 1 ml de Trizol (Invitrogen).
- 2) Con ayuda de una punta de micropipeta de 1 ml, se raspa el fondo de cada pozo con el fin de desprender las células adheridas a él.
- 3) Se recolecta el volumen en un microtubo de 1 ml.
- 4) Incubar 15 min a 30°C.
- 5) Al finalizar la incubación, agregar 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol.
- 6) Agitar en vortex por 15 segundos.
- 7) Incubar por 3 minutos a 30° C.
- 8) Centrifugar 15 minutos a 4000 rpm a 2-8 ° C.
- 9) Transferir únicamente la parte acuosa a un tubo nuevo.
- 10) Agregar 500 µl de isopropanol.
- 11) Agitar en vortex por 15 segundos.
- 12) Incubar por 10 minutos a 30° C.
- 13) Centrifugar 10 minutos a 4000 rpm a 2-8 ° C.

- 14) Retirar el sobrenadante con ayuda de 1 pipeta Pasteur.
- 15) Lavar el precipitado con 1 ml de etanol grado absoluto.
- 16) Centrifugar 5 minutos a 4000 rpm a 2-8 ° C.
- 17) Lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 75%.
- 18) Agitar en vortex por 15 segundos.
- 19) Centrifugar 5 minutos a 4000 rpm a 2-8 ° C.
- 20) Retirar el etanol y dejar secar las tubos volteados en una sanita.
- 21) Una vez seco completamente, agregar 20 µl de agua inyectable, raspando las paredes del tubo y resuspendiendo de manera vigorosa.
- 22) Incubar por 10 minutos a 60°C.
- 23) Resuspender nuevamente y tomar 3 µl para correr en un gel de agarosa al 1% para observar el ARN ribosomal 18S y 28S.
- 24) Hacer una dilución 1:60 para cuantificar en el espectrofotómetro. Leer a  $\lambda = 260 \text{ nm}$  y calcular la concentración con la siguiente fórmula.

**$\mu\text{g/ml de ARN} = A_{260\text{nm}} \times \text{FD} \times 40$**  , donde:

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

FD= Factor de dilución, que en este caso corresponde a 60

NOTA: La medida de la lectura realizada a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico. Este valor es calculado directamente por el espectrofotómetro y en el caso de RNA debe ser cercano a 2.

**v. Reacción de la Transcriptasa Reversa**

De acuerdo a la cuantificación obtenida, calcular el volumen necesario para colocar 500 ng de ARN por reacción, y proceder de la siguiente manera:

1. Poner los tubos con 500 ng de ARN<sub>total</sub> a 65° por 15 minutos. Al finalizar incubar 5 minutos en hielo.
2. Preparar una mezcla que contenga por cada tubo:

1 µl de primers aleatorios (Hexámeros aleatorios) (5 nmol/ml, 50 µM) (Roche ®)
1 µl de una mezcla de dNTPs a 10 mM cada uno (Ver anexo 1)
lo que falte de agua inyectable para 13 µl

3. Calentar por 5 minutos a 65°C.
4. Incubar en hielo 1 minuto.
5. Centrifugar brevemente.
6. Agregar por tubo preparando una mezcla de:

4 µl de 5X First-strand buffer
1 µl de Ditiotreitól (DDT)
1 µl de inhibidor de RNAsa (40 U)
1 µl de SuperScript III RT (200 U)

NOTA: La reacción tiene un volumen total de 20 µl

7. Mezclar con la pipeta suavemente.
8. Incubar a 50 °C durante 1 hora.
9. Inactivar la reacción a 70 °C durante 15 minutos. .
10. Utilizar 500 ng de cADN para la amplificación por PCR.

NOTA: El cDNA fue cuantificado en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

## vi. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

1. A cada uno de los tubos agregar la siguiente mezcla :

5 µl de buffer PCR 10 X
1.5 µl de una solución de MgCl <sub>2</sub> 50 mM
1 µl de una mezcla de dNTPs a 10 mM cada uno
1 µl de primer para amplificar 5'→3' (tomado del stock de 20 pmol)
1 µl de primer para amplificar 3'→5' (tomado del stock de 20 pmol)
0.4 µl de Taq polimerasa de ADN (5 U/µl)
lo que falte para 50 µl de agua ultrapura (inyectable)

2. Mezclar suavemente y centrifugar de 2 a 5 segundos.

3. Las condiciones de los ciclos se ajustaron de la siguiente forma:

ETAPAS	Temperatura y Tiempo		
	Tuj1	GFAP	GAPDH
<b>Desnaturalización</b>	95° C durante 15 minutos	95° C durante 15 minutos	95° C durante 15 minutos
<b>Ciclos</b>	35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos	35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos	35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos
<b>Alineación</b>	58° C durante 1 minuto	59° C durante 1 minuto	58° C durante 1 minuto
<b>Polimerización</b>	72° C durante 1 minuto	72° C durante 1 minuto	72° C durante 1 minuto
<b>Elongación</b>	74° C durante 10 minutos	74° C durante 10 minutos	74° C durante 10 minutos

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y el tamaño de los productos de la reacción fue determinado mediante la comparación con un estándar de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (Quick –Load 100 bp DNA Ladder, BioLabs).

## vii. Inmunoprecipitación de extractos celulares

Las células en P2 son sembradas en cajas Petri de 10 cm de diámetro a una densidad de 1.5 millones de células. Una vez que alcanzan una confluencia cercana al 100 % se procede de la siguiente manera:

1. Estimular las células con TGF- $\beta$ 1, activina A, BMP4 y/o histmina (dependiendo del tratamiento en cuestión) e incubar durante 20 minutos.
2. Aspirar el medio y lavar con PBS frío 2 veces.
3. Adicionar a las células amortiguador<sup>1</sup> de lisis frío con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Mantener las muestras en hielo todo el tiempo.
4. Raspar las cajas con ayuda de un raspador celular y transferir el líquido a un microtubo (uno por cada condición).
5. Incubar 15 minutos a 4° C en agitación.
6. Centrifugar a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos en frío.
7. Transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo.
8. Cuantificar la concentración de proteína de los extractos por el método de Bradford.
9. Añadir 5  $\mu$ l del anticuerpo específico a cada tubo (Smad 2/3 o Smad 1/5/8 según sea el caso; stock 200  $\mu$ g/ml) e incubar toda la noche a 4° C en agitación.
10. Agregar de 50 a 60  $\mu$ l de proteína G-agarosa.
11. Incubar en agitación a 4° C durante 2 horas.
12. Centrifugar los tubos a 14 000 r.p.m por 10 segundos.
13. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado 3 veces con 1 ml de amortiguador TNTE 0.1% frío. Entre cada lavada centrifugar a 14 000 r.p.m. por 10 segundos y descartar el sobrenadante.
14. Después del último lavado centrifugar los tubos a 14 000 r.p.m por 10 segundos y remover el exceso de líquido con una pipeta larga, cuidando no remover la agarosa.
15. Resuspender cada muestra en 30  $\mu$ l de solución de Laemmli.
16. Hervir las muestras durante 5 minutos, dejar enfriar y guardar a -20°C o -70°C.

---

<sup>1</sup> Del inglés 'buffer'

## viii. Western Blot

17. Descongelar las muestras

18. Durante su descongelación, montar la cámara de corrida y preparar el gel de poliacrilamida al 12% de la siguiente manera:

Mezclar en un vaso de precipitados de 50 ml

### Gel de corrida

Compuesto	Cantidad por agregar (para 20 ml o 2 geles)
Acilamida al 30%	9.3 ml
Amortiguador inferior	5.6 ml
Agua destilada	5.53 ml
Persulfato de Amonio (100 mg/ml)	84 µl
TEMED al 99%	20.9 µl

Agregar a los vidrios y esperar a que polimerice. Una vez polimerizado, preparar en otro vaso de precipitados de 50 ml la siguiente mezcla:

### Gel Concentrador

Compuesto	Cantidad por agregar (para 20 ml o 2 geles)
Acilamida al 30%	1.2 ml
Amortiguador superior	800 µl
Agua destilada	3.94 ml
Persulfato de Amonio (100 mg/ml)	60 µl
TEMED al 99%	6 µl

Cuando polimerice, montar el gel en la cámara y utilizar en la parte interna solución amortiguadora de corrida (ver Apéndice 1) nuevo hasta llenarla y en la parte externa amortiguador de corrida usado (hasta 2 veces).

NOTA: el espesor del gel es de 0.75 mm (estándar, Bio-Rad 461502)

19. Cargar las muestras y un marcador de peso molecular (Bio-Rad Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards) y correr a 75 V por 30 minutos y después a 90 V por 2 horas.

#### **ix. Transferencia de Proteínas a Membranas e Inmunoblot**

1. Cortar una pieza de PVDF del tamaño del gel, sumergirla en metanol absoluto, y luego en solución amortiguadora de transferencia fría (ver Apéndice 1).
2. Colocar los papeles filtro y las esponjas en solución amortiguadora fría.
3. Desmontar la electrofóresis y colocar el gel de poliacrilamida en un poco de amortiguador de transferencia frío, para remover el exceso de SDS.
4. Montar la cámara de transferencia con el amortiguador frío y una barra magnética.
5. Montar el 'sándwich' de la siguiente manera: rejilla lado negro (-), esponja, papel filtro, membrana, papel filtro, esponja, rejilla lado blanco (+).
6. Eliminar las burbujas entre el gel y la membrana. Para ello ejercer un poco de presión con la ayuda de un tubo cónico.
7. Asegurar bien el 'sándwich' y colocarlo dentro de la cámara con la orientación adecuada.
8. Colocar la cámara en un recipiente con hielo para enfriar el amortiguador.
9. Encender el agitador y colocar los electrodos en la posición adecuada.
10. Transferir a 100 V por 2 horas.
11. Desmontar la transferencia y marcar las membranas con lápiz o marcador para identificarlas.
12. Bloquear la membrana con leche descremada al 5% en TBS-Tween (ver Apéndice 1) durante 2 horas a temperatura ambiente.

13. Al finalizar, desechar la solución de bloqueo y realizar 3 lavados con TBS-Tween. El primero de 15 minutos y los 2 restantes de 10 minutos.
14. Incubar con el anticuerpo primario (1:1000 en TBS-Tween) a 4 °C durante toda la noche.
15. Lavar 3 veces con TBS-Tween por 5 minutos.
16. Agregar el anticuerpo secundario (1:15000 en TBS-Tween) acoplado a peroxidada de rábano (HRP por sus siglas en inglés) e incubar una hora a temperatura ambiente.
17. Lavar 3 veces con TBS-Tween por 5 minutos.
18. Quitar el exceso de líquido y agregar el reactivo de revelado por quimioluminiscencia (aprox. 1 ml) por 5 minutos.

**En el cuarto oscuro:**

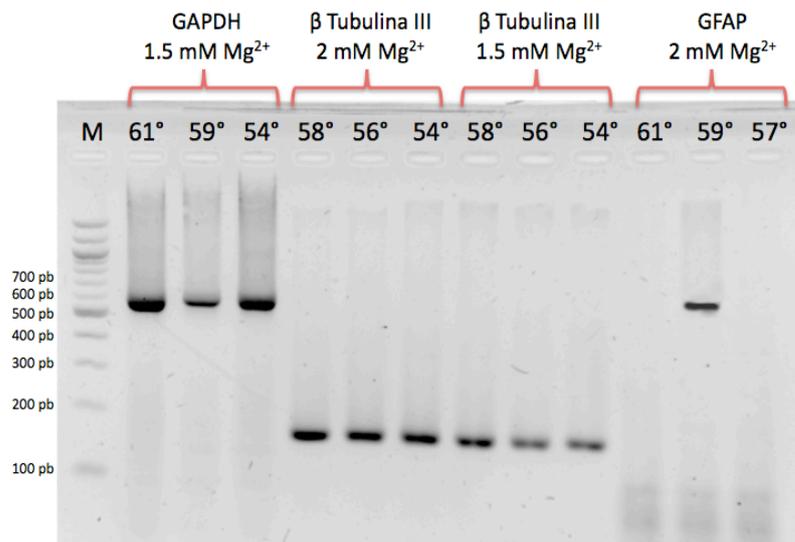
19. Colocar la membrana entre cubiertas de plástico y luego dentro del casete de revelado.
20. Revelar en placas radiográficas (BioMax Kodak) exponiendo de 1-3 minutos.
  - Revelador 30 seg
  - Agua
  - Fijador 30 seg
  - Agua

## 7. RESULTADOS

### Estandarización de las condiciones de amplificación de los transcritos neurales GFAP y $\beta$ -tubulina III

El desarrollo y estandarización de un sistema de PCR incluye optimizar toda una serie de parámetros críticos de los cuales depende este método, determinar cuáles son importantes, y así poder establecer la confiabilidad de la determinación deseada. Como se sabe, una reacción de amplificación típica incluye la secuencia blanco, la enzima ADN polimerasa, dos oligonucleótidos específicos para cada gen, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), el amortiguador de reacción y aditivos opcionales. Todos estos factores, así como la temperatura y el tiempo de cada uno de los pasos del programa de amplificación, corresponden a dichos parámetros que deben perfeccionarse para lograr un correcto funcionamiento del sistema.

En base a lo anterior, para poder determinar las condiciones adecuadas de amplificación de los transcritos neurales se optó por modificar 2 parámetros en particular: la temperatura de alineación y la concentración de iones  $Mg^{2+}$ . Por consiguiente, se extrajo RNA de corteza cerebral de rata adulta, (tejido donde se expresan abundantemente los transcritos para ambos genes), que posteriormente se retrotranscribió y se amplificó mediante una PCR de gradiente, en la que se probaron tres temperaturas de alineamiento distintas: 57, 59 y 61 °C para GFAP; 54, 56 y 58 °C para  $\beta$ -tubulina III. Estas temperaturas fueron seleccionadas en base a la  $T_m$  de los oligonucleótidos utilizados y dos concentraciones de  $Mg^{2+}$ : 1.5 o 2 mM. Se corrió un gel de agarosa para observar qué condiciones fueron más favorables para la amplificación (Fig. 14).



**Figura 14.** Electroforesis en geles de agarosa al 2% para determinar la concentración de  $Mg^{2+}$  y la temperatura de alineamiento adecuadas para la amplificación de los transcritos neurales GFAP y Tuj1. M= Marcador de peso molecular de 100 pb.

Evaluación del efecto de los tratamientos combinados de citocinas de la familia de TGF- $\beta$  e histamina sobre la diferenciación de precursores neurales.

Una vez optimizadas las condiciones de amplificación de los transcritos neurales se procedió a evaluar el efecto que ejercen los distintos tratamientos combinados de TGF- $\beta$ 1, activina A, BMP4 y/o histamina sobre la diferenciación de precursores neurales.

Se analizaron 12 condiciones en total, en las cuales, además del grupo control, que no recibió tratamiento alguno, se realizaron todas las combinaciones posibles con las 4 moléculas elegidas. Con el fin de facilitar el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, se procedió a dividir los tratamientos en dos grupos: aquellos que incluían citocinas con tendencia a inducir diferenciación neuronal: TGF- $\beta$ 1, activina A, e histamina y aquellos con tendencia a inducir diferenciación glial, es decir, todos los que contenían BMP4. En ambos casos se añadieron los resultados obtenidos con las condiciones individuales (tomados de Rodríguez-Martínez, datos no publicados) a fin de contrastar las diferencias entre éstos, y los conseguidos con los tratamientos combinados.

En primer lugar, se analizó la identidad celular mediante ensayos inmunocitoquímicos en donde se evaluó la expresión del marcador neuronal  $\beta$ -tubulina III (Tuj1) y del marcador de astrocitos GFAP. Las figuras 15 y 16 muestran las imágenes y gráficas representativas de los resultados obtenidos en 3 experimentos independientes. Se incluyen también las fotos de los

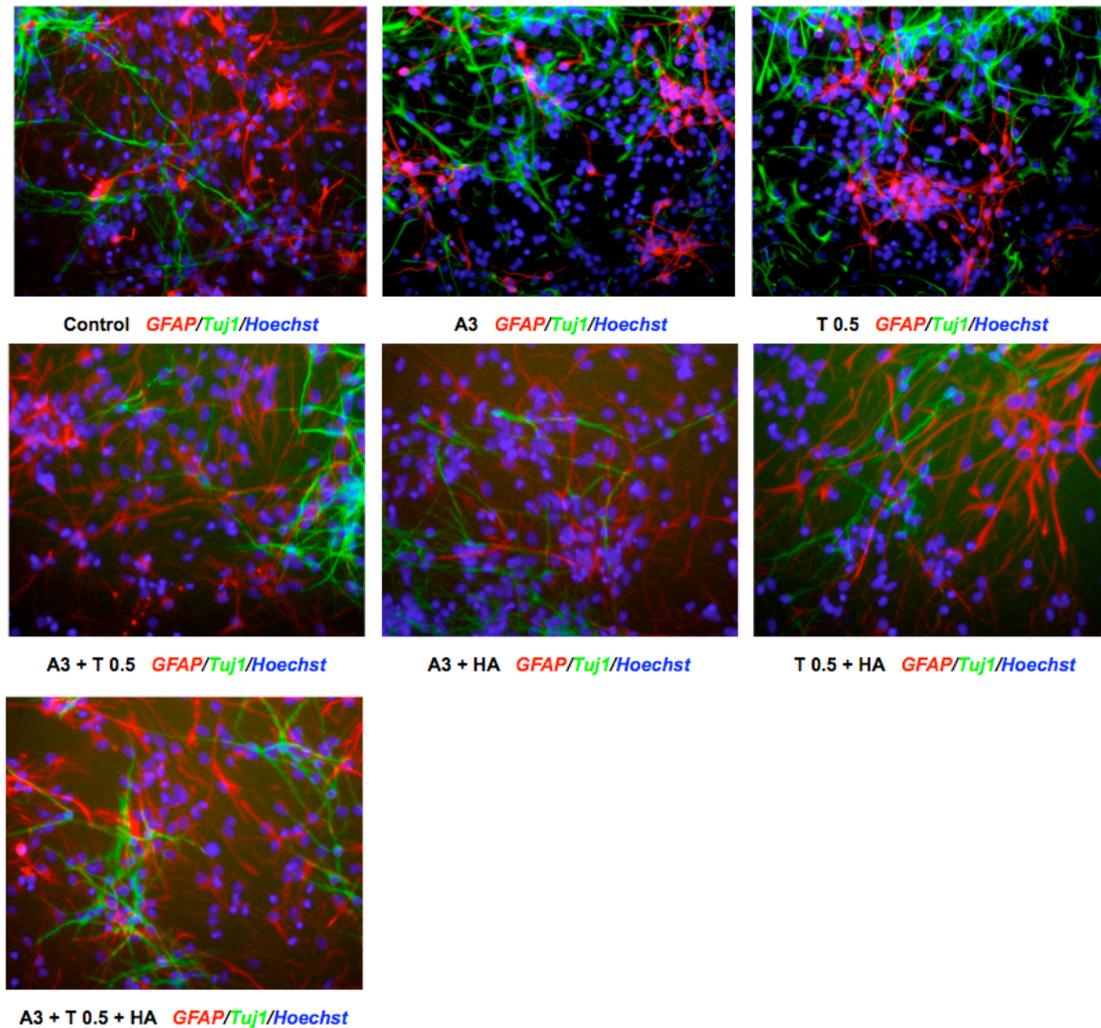
tratamientos individuales a fin de comparar visualmente éstos, con los tratamientos combinados.

Inicialmente resaltan dos cuestiones: la primera es, que de manera general se observa un porcentaje de células GFAP<sup>+</sup> mayor al de las células Tuj1<sup>+</sup>, es decir, que la diferenciación astrocítica prevalece en estos cultivos celulares; y, la segunda es que el incremento en la diferenciación neuronal visto en los tratamientos con TGF-  $\beta$ 1 y activina A solos, así como en la diferenciación astrocítica, en el caso del tratamiento con BMP4, se antagoniza cuando se adicionan estas citocinas en conjunto con cualquier otra molécula. Este decremento en el número total de neuronas y/o astrocitos llamó nuestra atención por lo que se decidió cuantificar la totalidad de núcleos del grupo control y de los grupos con tratamientos combinados, compararlos con el número de núcleos de las condiciones individuales y así descartar que esta disminución se debiera a una posible muerte celular. El análisis estadístico no arrojó diferencias en el número de núcleos de ninguna condición (Figs. 15C y 16C), por lo que se descartó que los tratamientos combinados estuviesen provocando un aumento en la muerte celular de las células progenitoras.

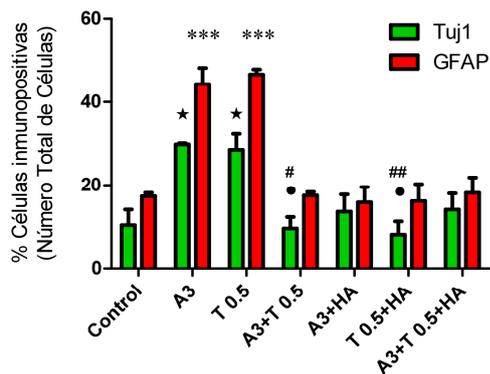
De manera mas detallada, analizando únicamente aquellas condiciones que incluían combinaciones de citocinas, destaca el incremento en el número de células Tuj1<sup>+</sup> observado en los tratamientos dobles que incluían a activina A e histamina, aunque los datos no presentaron significancia estadística entre sí, ni con la condición control. La adición de activina A en tratamientos dobles parece entonces conservar y potenciar ligeramente el efecto neurogénico ya conocido pero no con la eficacia esperada.

Si bien es cierto que los efectos individuales se abaten cuando se utilizan las citocinas en combinación, este abatimiento es más notorio en los tratamientos con BMP4, donde se observa la adición de TGF-  $\beta$ 1, activina A e histamina antagonizan fuertemente el efecto gliogénico de BMP4 (Fig. 16B)

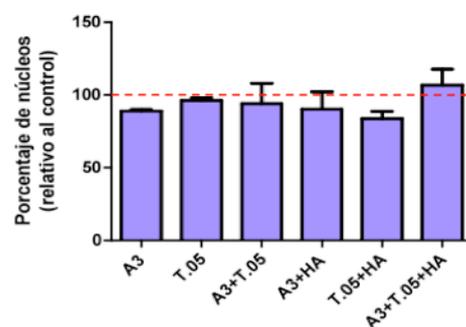
### A) TRATAMIENTOS COMBINADOS SIN BMP4



B)



C)

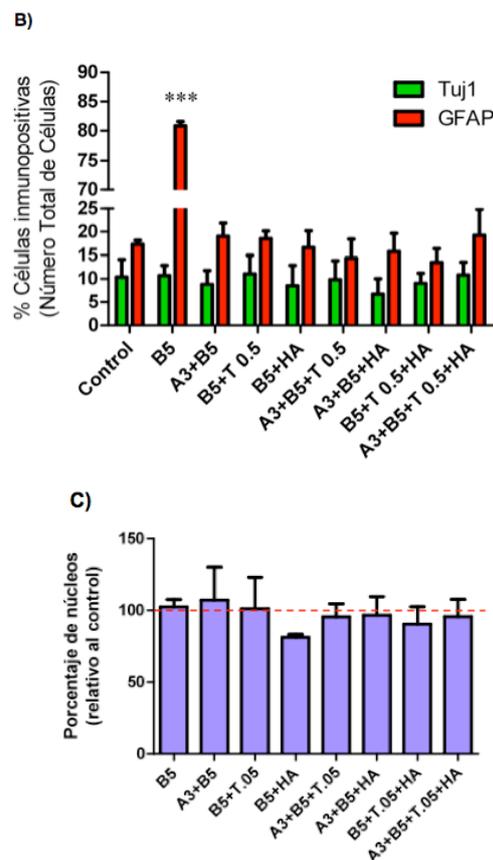
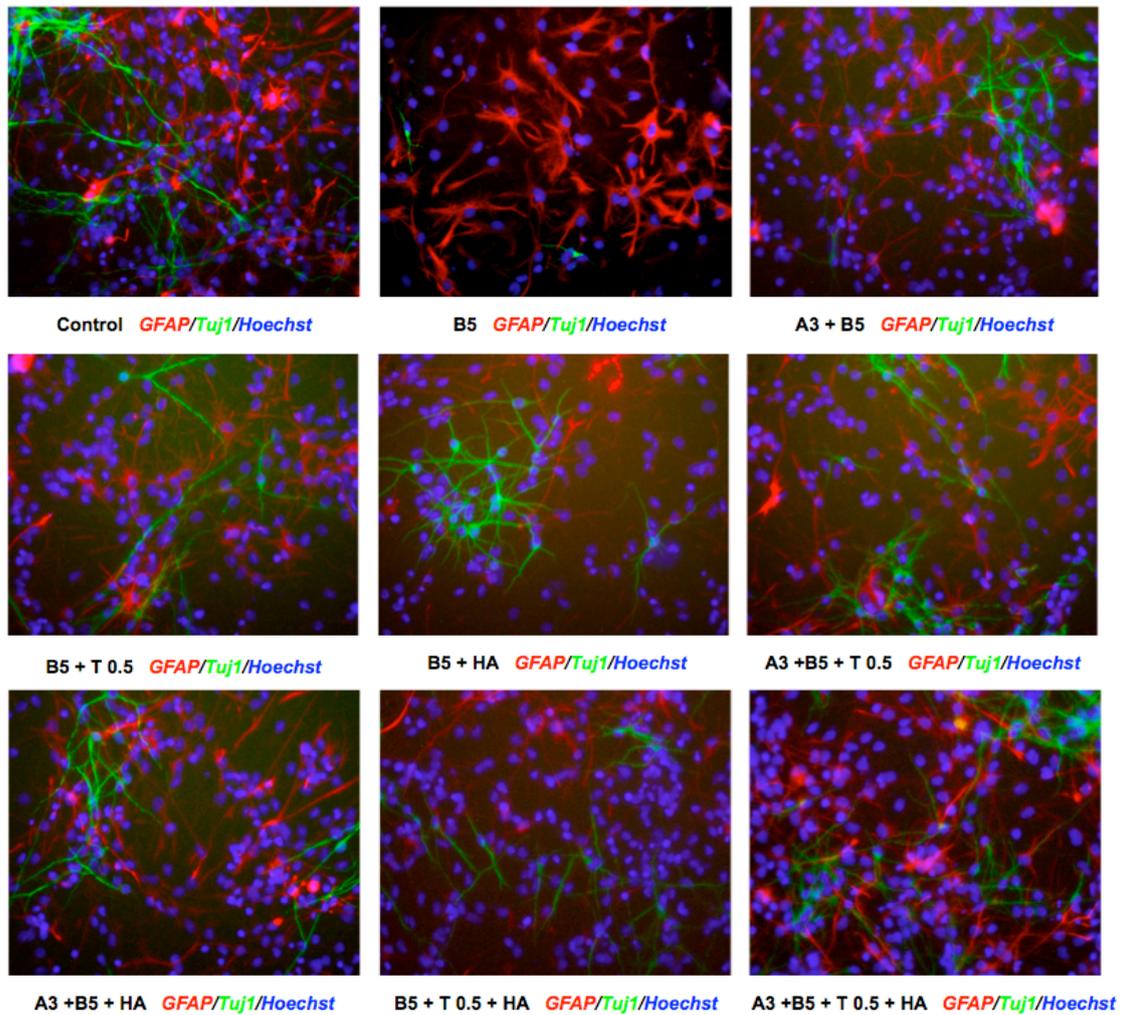


**Figura 15. Análisis de la diferenciación de CTN estimuladas con distintas combinaciones de citocinas e histamina: tratamientos sin BMP4** (A) Micrografías representativas que muestran la tinción de inmunofluorescencia para el marcador neuronal  $\beta$ -tubulina III (Tuj1), y para el marcador específico de glía, proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Las imágenes muestran la colocalización de los 2 marcadores con Hoechst (marcador de núcleos).

(B) Cuantificación del número total de células  $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup> y GFAP<sup>+</sup> de los tratamientos sin BMP4 por duplicado, de 10 campos tomados aleatoriamente en tres experimentos independientes. No se encontraron células que coexpresaran ambos marcadores. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  EE y expresados como el porcentaje del total de células teñidas con Hoechst. (C) Cuantificación del porcentaje total de núcleos, todos ellos relativos a la condición control. No se observan diferencias significativas. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una vía y se realizaron múltiples comparaciones entre los grupos tratados y el grupo control utilizando la prueba post-hoc de Dunnett. Los datos y las micrografías de los tratamientos con activina A, y TGF- $\beta$ 1 solos, fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados bajo las mismas condiciones por Rodríguez-Martínez (datos enviados para su publicación).

★ P < 0.05 vs. control; \*\*\* P < 0.001 vs. todos los tratamientos incluido el grupo control; # P < 0.05 vs. A3; ## P < 0.01 vs. A3; • P < 0.05 vs. T.5. A3: activina A 3 ng/ml; B5: BMP4 5 ng/ml; HA: Histamina 100  $\mu$ M; T.5: TGF- $\beta$ 1 0.5 ng/ml.

## A) TRATAMIENTOS COMBINADOS CON BMP4



**Figura 16. Análisis de la diferenciación de CTN estimuladas con distintas combinaciones de citocinas e histamina: tratamientos con BMP4.** (A) Micrografías representativas que muestran la tinción de inmunofluorescencia para el marcador neuronal  $\beta$ -tubulina III (Tuj1), y para el marcador específico de glía, proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Las imágenes muestran la colocalización de los 2 marcadores con Hoechst (marcador de núcleos).

(B) Cuantificación del número total de células  $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup> y GFAP<sup>+</sup> de los tratamientos con BMP4 por duplicado, de 10 campos tomados aleatoriamente en tres experimentos independientes. No se encontraron células que coexpresaran ambos marcadores. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  EE y expresados como el porcentaje del total de células teñidas con Hoechst. (C) Cuantificación del porcentaje total de núcleos, todos ellos relativos a la condición control. No se observan diferencias significativas.

Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una vía y se realizaron múltiples comparaciones entre los grupos tratados y el grupo control utilizando la prueba post-hoc de Dunnett. Los datos y las micrografías de los tratamientos con activina A, TGF- $\beta$ 1 y BMP4 solos, fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados bajo las mismas condiciones por Rodríguez-Martínez (datos enviados para su publicación).

\*\*\* P < 0.001 vs. todos los tratamientos incluido el grupo control

A3: activina A 3 ng/ml; B5: BMP4 5 ng/ml; HA: Histamina 100  $\mu$ M; T.5: TGF- $\beta$ 1 0.5 ng/ml.

## Evaluación de la expresión de los transcritos neurales en cultivos de progenitores neurales

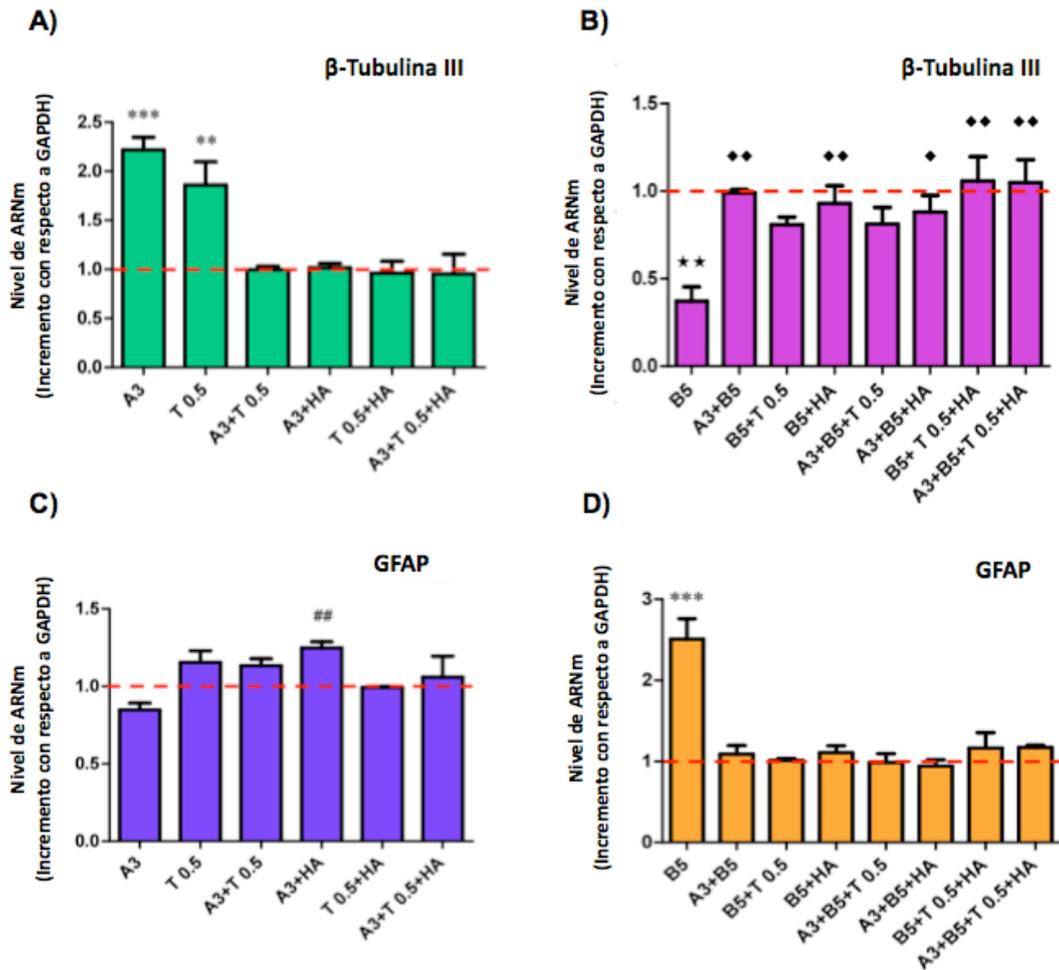
Para confirmar lo observado en los ensayos inmunocitoquímicos se analizó la expresión del ARNm en los cultivos de progenitores neurales de corteza cerebral. Al finalizar la fase de diferenciación, en cada una de las condiciones experimentales se realizó extracción de ARN, reacciones de RT-PCR y amplificación de  $\beta$ -tubulina III y GFAP. Cada banda observada en el gel de agarosa al 2% fue analizada por densitometría y normalizada con respecto a la expresión de GAPDH. Los resultados se refieren al nivel de expresión en condiciones control. Al igual que en el caso de los ensayos inmunocitoquímicos, los datos fueron organizados en dos grupos.

Con respecto a la expresión de  $\beta$ -tubulina III, nuevamente se observó un aumento significativo en los tratamientos individuales con TGF- $\beta$ 1 y activina A, que se contrarrestó con la inclusión de una o varias moléculas extras (Fig. 17A). Es así, que no se distinguen diferencias entre los tratamientos y la condición control. En cambio, en los tratamientos con BMP4, la adición de TGF- $\beta$ 1, activina A o histamina tiende a disminuir significativamente la expresión del transcrito neuronal  $\beta$ -tubulina III, restaurándola, en la mayoría de los casos a niveles similares o ligeramente superiores al control, sin tener ninguna significancia estadística con éste.

Por otro lado, la expresión del transcrito GFAP en los tratamientos combinados con citocinas neurogénicas no mostró diferencias significativas con respecto al control. La única diferencia se observó entre el tratamiento con activina A y el tratamiento con activina A + histamina (Fig. 17C). Sin embargo, nuevamente se observó una atenuación en el aumento significativo del ARNm para GFAP, inducido por BMP4, cuando este se adicionó junto con otra citocina, que, aunque no alcanza niveles inferiores a la expresión mostrada en el grupo control, sugiere que el estímulo con varias citocinas bloquea parcialmente la señalización de BMP (Fig. 17C y 17D).

Lo anterior, aunado a el número de neuronas, sugiere que la adición de 2, 3 y 4 compuestos de manera simultánea podría estar ocasionando una saturación del sistema a nivel de receptores, pues se sabe que en el caso particular de las activinas y BMP4, éstas pueden unirse tanto al receptor tipo

II (ActR-II) y tipo I (ActR-I) de activina [Böttner, et al., 2000], y considerando además que existe una producción endógena de RNAm tanto de TGF- $\beta$ 1 [Vogel, et al., 2009], como de activina A y BMP4 [Sun, et al., 2011] por parte de estas células.



**Figura 17. Análisis de expresión génica de  $\beta$ -tubulina III y GFAP por RT-PCR.** 500 ng de ARN total fueron sometidos a transcripción inversa. El cDNA obtenido se amplificó durante 30 ciclos y se utilizaron primers específicos para cada marcador. La expresión de la transcripción de los genes para  $\beta$ -tubulina III y GFAP, se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. El gen constitutivo GAPDH fue utilizado como control de carga.

Niveles de ARNm de los marcadores de diferenciación expresado en las células tratadas con citocinas de la familia TGF- $\beta$ : Tuj1 (A) y (B), y GFAP (C) y (D). La densidad óptica de cada una de las bandas se cuantificó utilizando el software ImageJ y se normalizó con respecto al valor promedio del control. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una vía y se realizaron múltiples comparaciones entre los grupos tratados y el grupo control utilizando la prueba post-hoc de Dunnett. Los datos de los tratamientos con activina A, TGF- $\beta$ 1 y BMP4 solos, fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados bajo las mismas condiciones por Rodríguez-Martínez (datos enviados para su publicación).

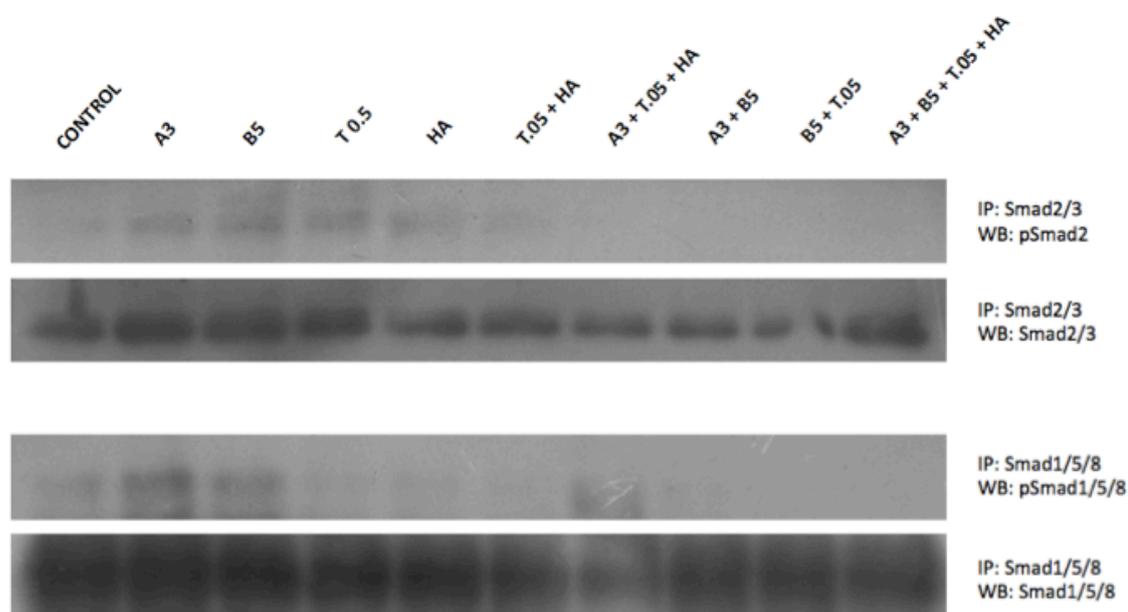
★ P < 0.01 vs. control; \*\* P < 0.01 vs. todos los tratamientos incluido el grupo control; \*\*\* P < 0.001 vs. todos los tratamientos incluido el grupo control; # P < 0.05 vs. A3; ## P < 0.01 vs. A3; ◆ P < 0.05 vs. B5; ◆◆ P < 0.01 vs. B5

A3: Activina A 3 ng/ml; B5: BMP4 5 ng/ml; HA: Histamina 100  $\mu$ M; T.5: TGF- $\beta$ 1 0.5 ng/ml.

## Evaluación del efecto de los tratamientos combinados de citocinas de la familia de TGF- $\beta$ e histamina sobre el patrón de fosforilación de las Smads

Con base en lo anterior, decidimos analizar el patrón de fosforilación de los proteínas Smads, efectores en la vía de señalización de TGF- $\beta$ , en aquellas condiciones más representativas. De esta manera, si el sistema se encontrara desensibilizado, esta fosforilación disminuiría o simplemente no se presentaría.

La Figura 18 muestra el patrón de fosforilación obtenido en un ensayo de Western blot. Como se observa, la adición de simultánea de citocinas bloquea la fosforilación de la Smad2 y la Smad1/5/8, lo que se traduce en la ausencia de banda correspondiente a la forma fosforilada de la(s) proteína(s). Tal parece que efectivamente ocurre una saturación a nivel de receptores, los cuales ante la adición de estas concentraciones de citocinas, dejan de responder a la estimulación.



**Figura 18. Análisis del patrón de fosforilación de proteínas Smad con algunos tratamientos combinatorios.** Las células fueron estimuladas por 20 minutos con las citocinas correspondientes. Posteriormente se extrajo la proteína total y se inmunoprecipitó tanto Smad2/3, como Smad1/5/8 en cada condición. Las formas no fosforiladas de cada proteínas, es decir Smad 2/3 y Smad 1/5/8 fueron utilizadas como control de carga. Imagen representativa de 1 experimento.

A3: Activina A 3 ng/ml; B5: BMP4 5 ng/ml; HA: Histamina 100  $\mu$ M; T.5: TGF- $\beta$ 1 0.5 ng/ml.

La fosforilación de la Smad2 es perceptible en el caso de los tratamientos individuales, incluyendo aquel con BMP4, mientras que es nula en el resto de los tratamientos analizados, lo que coincide con la disminución generalizada del nivel de diferenciación neuronal observada en los ensayos inmunocitoquímicos.

Con respecto a la activación de las Smads1/5/8 se observa algo similar, pues la activación de estas proteínas disminuye considerablemente, casi desapareciendo en aquellos tratamientos dobles o triples. En ambos casos, las formas no fosforiladas de cada proteína fueron utilizadas como control de carga.

## 8. DISCUSIÓN

### Estandarización de las condiciones de amplificación de los transcritos neurales

El propósito principal de estandarizar un ensayo es que brinde constantemente el mismo resultado para una muestra dada, a fin de que cuando se repita varias veces, y sea realizado por diversos analistas, en diferentes laboratorios, sea reproducible y confiable. Siempre que se sintetizan nuevos primers, deben de estandarizarse, para determinar las condiciones adecuadas de amplificación [Karp, 2009].

De manera particular, la temperatura y el tiempo de alineamiento del programa de amplificación, son los dos parámetros que comúnmente se optimizan en una reacción de PCR. Los tiempos y temperaturas del resto de las etapas usualmente no varían significativamente [Barbeyrac, et al., 1996].

Por otro lado, los iones  $Mg^{2+}$  tienden a formar complejos con los dNTPs, los oligonucleótidos y el DNA templado (o molde), por lo que se debe seleccionar la concentración óptima de  $MgCl_2$  en cada experimento. Muy pocos iones resultan en un bajo rendimiento del producto de la PCR, mientras que un número elevado aumentan el rendimiento de productos no específicos y promueven su incorporación fallida. Debido a esto se decidió manipular la temperatura de alineación y la concentración de  $MgCl_2$ .

De acuerdo con el gel obtenido se determinó que las mejores condiciones para realizar la amplificación del gen de GFAP son una temperatura de alineación de  $59^{\circ}C$  y a una concentración de  $Mg^{2+}$  igual a 2 mM. Mientras que para el gen de  $\beta$ -tubulina III, todas las condiciones probadas pueden considerarse aptas para realizar la amplificación debido a que la banda observada en el gel de agarosa al 2% es similar en todos los casos.

## Evaluación del efecto de los tratamientos combinados de citocinas de la familia de TGF- $\beta$ e Histamina sobre la diferenciación de precursores neurales.

Los cultivos *in vitro* de células precursoras neurales son herramientas útiles para el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo cerebral, así como para la generación de fuentes renovables en la terapia celular para enfermedades neurodegenerativas [Chang, et al., 2004]. Su estudio ha indicado que diversos grupos celulares llevan a cabo procesos mitóticos y, que posteriormente sufren diferenciación neuronal y glial. Distintos factores de crecimiento y sus vías de señalización son esenciales para estos procesos. Sin embargo, aun no se conoce con certeza qué combinaciones están involucradas en la proliferación y diferenciación de estas células. Una manera de estudiar estos procesos es tratar estos cultivos con diversos factores de crecimiento que nos permitan evaluar la respuesta celular ante diversas manipulaciones de su entorno. Un punto muy importante a considerar es el hecho de que *in vivo* existe un programa celular intrínseco que regula las propiedades de los precursores neurales, y que *in vitro*, es necesario considerar una gran variedad de aspectos para poder mantener estos cultivos de manera eficiente, y sobre todo permitir que los precursores mantengan sus propiedades y capacidad de diferenciación como lo hacen en su ambiente natural.

En este trabajo se evaluó si la adición de 3 citocinas de la vía de TGF- $\beta$  e histamina en conjunto, podían actuar sinérgicamente y aumentar los efectos vistos con anterioridad, cuando son adicionadas individualmente.

Nuestros resultados muestran que no existe efecto sinérgico alguno sobre la diferenciación cuando se tratan los cultivos de precursores neurales con TGF- $\beta$ 1, Activina A, y/o Histamina en conjunto. Lo que sí es evidente es que la señal gliogénica predominó sobre la neurogénica en las condiciones control, hecho que llamó nuestra atención. En aquellos tratamientos en los que se utilizaron moléculas con efecto neurogénico, el porcentaje de células positivas para GFAP también fue mayor. Al respecto, se ha reportado que las propiedades de los precursores neurales embrionarios se ven alteradas durante su desarrollo *in vitro*. Chang, et al. mostraron que mientras más largo

sea el periodo de expansión de estos cultivos, más bajo es su índice de proliferación, y que además, la continua proliferación y pasajes de células progenitoras corticales, cambia el potencial neurogénico a potencial astrogénico [Chang, et al., 2004a]. Todos los experimentos realizados en este trabajo fueron realizados con células de pasaje 2. Siguiendo la lógica anterior, es de esperarse que su potencial de diferenciación se vea reducido o con una tendencia hacia el linaje glial y por tanto que estas condiciones se acerquen más a estadios tardíos de diferenciación.

De igual forma, se ha visto también, que las células precursoras neurales aisladas de corteza de rata al día E14, mantenidas en condiciones similares a las utilizadas por nosotros, secretan abundantemente al factor inhibidor de la leucemia (LIF, por sus siglas en inglés) así como a sus receptores, y que dicha citocina además de ser responsable de la sobrevivencia de estas células, promovía su diferenciación a astrocitos. [Chang, et al., 2004b]. Este hallazgo sugiere que además del tiempo de expansión de los cultivos celulares, LIF podría estar involucrado en la predominancia de astrocitos vista en nuestros cultivos, atenuando el efecto de las concentraciones exógenas adicionadas en los experimentos realizados, y el de las citocinas de la vía de TGF- $\beta$  producidas endógenamente por estas células. Este efecto de LIF sobre la diferenciación ya había sido previamente observado en cultivos de progenitores neurales corticales en los cuales LIF indujo la diferenciación astrocítica [Rodríguez-Rivera, et al., 2009].

Por otro lado, se pensó que la disminución general en el número de células diferenciadas podría deberse a una muerte celular, sin embargo la cuantificación de núcleos de todos los tratamientos en 3 experimentos independientes no arrojó diferencias significativas, por lo que se descarta esta posibilidad. Existen reportes previos que señalan que las células troncales de rata invariablemente detienen su crecimiento y comienzan a diferenciarse después de varios pasajes [Sun, et al., 2011]. Aunado a esto se ha atribuido que la producción autócrina de BMPs induce un estado de latencia en dichas células [Sun, et al., 2011]. Esto, más la concentración de BMP4 adicional en los tratamientos, podría explicar en parte la disminución en la diferenciación celular de nuestros experimentos.

## Evaluación de la expresión de los transcritos neurales en cultivos de progenitores neurales

Lo observado en esta parte de la metodología coincide mayoritariamente con lo visto en los ensayos inmunocitoquímicos siendo más evidente que los efectos gliogénicos de BMP4 son neutralizados con TGF- $\beta$ 1, Activina A e Histamina. Asimismo, la ausencia de un efecto sinérgico nos llevó a pensar, en primer lugar en un posible efecto antagónico.

Se ha descrito que las vías de señalización de TGF- $\beta$  y BMP presentan actividades antagonistas durante el desarrollo de varios tejidos. Recientemente se demostró que ambas vías tienen efectos antagónicos en la proliferación y diferenciación *in vivo* de condrocitos. Se observó que TGF- $\beta$  fue capaz de potenciar la señalización de BMP, pero BMP (vía BMP2) redujo significativamente los niveles de la señalización de TGF- $\beta$  [Keller, et al., 2011]. Sin embargo, justo durante la realización de este trabajo, se reportó además, que las vías de BMP y TGF- $\beta$ /Activina compiten antagónicamente en el direccionamiento del destino celular en células troncales neurales, encontrándose que en ausencia de la señalización de estas 2 señales, la vía de BMP estimula la diferenciación glial, y por el contrario, cuando se daba el estímulo con Activina A o TGF- $\beta$ 1, había una disminución en el número de astrocitos. [Rodríguez-Martínez, datos no publicados]. Esto explicaría en parte, por qué la expresión de ambos transcritos se mantiene constante, y sin diferencias significativas, con respecto al control en los tratamientos dobles TGF- $\beta$ 1 + BMP4 y Activina A + BMP4. En el caso de los tratamientos triples que incluyen una combinación de estas citocinas, puede observarse algo similar, lo que nos llevó a pensar en una posible acción redundante entre las vías de Activina A y la de TGF- $\beta$ 1. Un estudio demostró con anterioridad, que la remoción del gen para el receptor TGF- $\beta$  tipo II (*Tgfr2*) en prosencéfalo, no afectaba la expresión de pSmad2/3, lo que apunta a la existencia de mecanismos de señalización redundantes [Falk, et al., 2008]. Activina A, podría formar parte de redundancia, al compensar el efecto inhibido de TGF- $\beta$ , evitando un dominio total de BMP4 sobre la diferenciación celular.

Aunado a esto, existen algunos modelos de la señalización de TGF- $\beta$  en donde se ha observado que la estimulación puede dar lugar a respuestas

transitorias o sostenidas, dependiendo de los parámetros seleccionados en el experimento. Una respuesta transitoria puede ser ocasionada por una regulación negativa mediada por las I-Smads o por el agotamiento del ligando. Esta misma regulación negativa puede dar origen también a respuestas oscilatorias. La adición de varias citocinas al mismo tiempo, en cantidades superiores a las fisiológicas, origina la activación simultánea de varias vías, lo que a su vez puede provocar una sobreexpresión de I-Smads (Smad6 para la subfamilia de BMP y Smad7 para la subfamilia de TGF- $\beta$ ) [Cellière, et al., 2011]. Smad6, cuando es expresada en niveles muy altos, puede unirse también a los receptores de la subfamilia de TGF- $\beta$ , bloqueando así la señal. De esta manera, las I-Smads podrían estar implicadas también en la disminución de la diferenciación de progenitores neurales tratados con 2, 3, y 4 citocinas en conjunto. Su participación en nuestros experimentos, se podría determinar mediante su marcaje con anticuerpos específicos anti-Smad6 o anti-Smad7, o a través de su silenciamiento con ARN pequeños o sRNA (del inglés 'small ribonucleic acid'), que interfieran con la traducción de los ARNm para Smad6 o Smad7.

El siguiente paso fue determinar que estaba ocurriendo con la señalización de histamina. El efecto positivo de esta amina sobre la diferenciación neuronal se ha atribuido principalmente a la activación del receptor histaminérgico H<sub>1</sub>, que regula la entrada de calcio a las células y provoca un incremento en las concentraciones intracelulares de dicho ión [Molina-Hernandez, et al., datos no publicados ]. La concentración extracelular de calcio es modulada por un receptor acoplado a proteínas G denominado receptor sensor de calcio, el cual, ante cualquier cambio mínimo, promueve la secreción de la hormona paratiroidea, ampliamente conocida por su acción sobre el metabolismo del calcio.

Recientemente se comprobó que el funcionamiento correcto del receptor sensor de calcio (CaR) requiere una atenuación en la señalización de TGF- $\beta$ , y que la activación del mismo regulaba negativamente la fosforilación de las Smad [Organista-Juárez, et al., datos no publicados]. Esto indica que la activación de la vía de TGF- $\beta$  promovida con los tratamientos, impide el correcto funcionamiento del CaR, privando a la histamina de una

fuentes suficientes de calcio, necesaria para que ejerza su función sobre la diferenciación de precursores neurales.

Por último, un punto muy importante a considerar es que la extracción de RNA, y su posterior retrotranscripción y amplificación, fueron realizadas en el punto final de la diferenciación. Resultaría interesante una posterior evaluación de los niveles de expresión de transcritos neurales en etapas más tempranas de la diferenciación, es decir cuando se retira el factor mitogénico y se da el cambio en la señal para que comience la diferenciación. Esto nos podría dar una idea aproximada de lo que ocurre realmente *in vivo* al inicio de la diferenciación.

#### Evaluación del efecto de los tratamientos combinados de citocinas de la familia de TGF- $\beta$ e Histamina sobre el patrón de fosforilación de las Smads

La prevalencia del efecto disminuido sobre la diferenciación neuronal y astrocítica en todos los tratamientos combinados, nos llevó a pensar que además de una acción antagónica, hubiese una posible saturación del sistema, es decir, que al estar agregando concentraciones exógenas de citocinas, en combinaciones saturantes para los receptores, los receptores se desensibilicen funcionalmente, perdiendo así su capacidad de respuesta hacia un estímulo determinado.

Lo anterior viene del conocimiento de que en el caso particular de las BMPs, las constantes de disociación o  $K_D$  (constante cinética que permite calcular la fracción de receptores ocupados después de la unión del ligando) se encuentran alrededor de 1 nM [Umulis, et al., 2009]. Así, se sugiere que las concentraciones fisiológicas de BMPs (1-30 nM) [Umulis, et al., 2009] podrían estar saturando los receptores y que el efecto de la adición exógena de esta citocina no podría ser valorado adecuadamente. Esto nos hizo pensar que una situación similar pudiera estar ocurriendo con TGF- $\beta$ 1, Activina A, ya que pertenecen a la misma superfamilia y comparten una vía de señalización, aunque no se descarta que lo también ocurra en el caso de la histamina.

El ensayo de Western blot demostró que la adición simultánea de citocinas evitó la activación de las proteínas Smads, es decir que, aunque se

dio un estímulo, no ocurrió una activación a nivel de receptores y por ende no hay fosforilación de las mismas. De esta manera se explica que la diferenciación celular en los tratamientos combinados, tanto neuronal como glial, no tenga diferencias significativas con el tratamiento control. Se realizó densitometría para confirmar esta observación y se obtuvo un incremento de las tratamientos individuales con respecto al control, que no se observó con los tratamientos combinados (datos no mostrados). Sería interesante probar si lo mismo ocurre al disminuir las concentraciones utilizadas en este trabajo, es decir, evitando utilizar las concentraciones saturantes de cada una de estas citocinas.

Finalmente, algo que llamó nuestra atención fue el aumento en la fosforilación de las Smads, comparada con el control, observada en los tratamientos con histamina. Se sabe que la histamina señala a través de receptores acoplados a proteínas G y que utiliza al diacilglicerol (DAG), al AMP cíclico (AMPc) o a la vía de la MAP cinasas, como segundos mensajeros, dependiendo del tipo de receptor al que se una [Haas y Panula, 2003]. No se ha reportado con anterioridad que esta molécula participe en la activación de las Smads. Se podría pensar entonces en una activación indirecta por parte de la histamina sobre estas proteínas, resultando mayor en el caso de Smad2. Sería conveniente entonces, incrementar el número de ensayos para así confirmar esta observación y analizar posteriormente como es que se está ocasionando esta activación indirecta.

## **9. CONCLUSIONES**

Los tratamientos combinados con activina A, TGF- $\beta$ 1 e histamina no tuvieron un efecto sinérgico sobre la diferenciación de células progenitoras neurales. La señal gliogénica de BMP4 es antagonizada por Activina A, TGF- $\beta$ 1 e Histamina. La ausencia de sinergia entre las citocinas podría deberse en parte a una saturación en los receptores, confirmada inicialmente por una disminución en la activación de la Smad2, en el caso de Activina A y TGF- $\beta$ 1, y de Smad1/5/8, en el caso de BMP4.

## APÉNDICE I. SOLUCIONES

### DISECCIÓN DE CORTEZA CEREBRAL FETAL DE RATA DE 14 DÍAS DE DESARROLLO EMBRIONARIO.

- Solución de Krebs 10X (500 ml)

NaCl	35.35 g
KCl	1.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.83 g
NaHCO <sub>3</sub>	10.7 g
Glucosa	12.87 g
Rojo de fenol	75 mg

- Solución de Krebs 1X (500 ml)

Krebs 10X	50 ml
Albúmina	1.5 g
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O al 3.8%	4 ml

### OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS TRONCALES NEURALES DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA E14

- Medio N2 (1L)

Medio F12/DMEM	12 g
Glucosa	1.55 g
Glutamina	0.073 g
Bicarbonato de sodio	1,69 g
Insulina	0.025 g (disuelta en 1 ml de NaOH 10 mM)
Apo-transferrina	0.1 g
Putrescina 1 M	100 µl (100 µM)
Selenito de sodio 300 µM	60 µl (30 nM)
Progesterona 300 µM	66.6 µl (20 nM)

Ajustar pH a 7.2± 0.02.

Filtrar en membrana de 0.22 µm y agregar 10 ml de antibiótico Penicilina – Estreptomina 100X (Concentración final al 1%)

## PASAJE DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS TRONCALES NEURALES DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA E14

- PBS- EDTA

PBS 1X	1L
EDTA (0.5 mM, pH 8)	20 ml (2mM)

## TRATAMIENTOS CON CITOCINAS DE LA FAMILIA TGF-B

- Ácido Ascórbico 1000X (200 mM)
- Histamina (500 mM)

Pesar 91.6 mg de hidrocloreuro de histamina (  $C_5H_9N_3 \cdot 2 HCl$  , Sigma H 7250) y disolver en 1 ml de agua inyectable.

La concentración utilizada en paralos experimentos es de 25 mM por lo que se toman 50  $\mu$ l de la solución 500 mM y se añaden 950  $\mu$ l de agua destilada.

## INMUNOCITOQUÍMICA

- PFA al 4% (20 ml)
  1. Tomar 15 ml de agua bidestilada
  2. Calentar en el horno de microondas por 15 segundos
  3. Agregar 0.8 g de PFA y mezclar en agitación
  4. Agregar 2 ml de PBS 10X
  5. Agregar 16  $\mu$ l de NaOH al 42%
  6. Añadir 3 ml de agua bidestilada para completar los 20 ml de volumen total
  7. Dejar enfriar a temperatura ambiente
  8. Filtrar en campana con membrana de 0.22  $\mu$ m

- Solución Salina Amortiguadora con Fosfatos (PBS) 10X (1L)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	27.07 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4 g

Esterilizar en autoclave

- PBS-BSA

PBS 1X	100 ml
BSA	100 mg

- Solución Bloqueadora (10 ml)

PBS 1X	9 ml
SNC	1 ml
Tritón X-100	30 µl

## RT-PCR

Para la preparación de la mezcla de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) se utilizan los siguientes reactivos (Roche):

dATP	10 µl
dGTP	10 µl
dCTP	10 µl
dTTP	10 µl
Agua estéril	60 µl

## PCR

- Oligonucleótidos (Primers)

Nombre	Sentido (5' → 3')	Antisentido (5' → 3')	Tamaño del producto (bp)
GAPDH	ATCACCATCTTCCAGGAGCG	CCTGCTTCACCACCTTCTTG	573
Tuj1	TCAGCGATGAGCACGGCATA	CACTCTTTCCGCACGACATC	199
GFAP	CTCAATGCTGGCTTCAAGGAGA	GACGCAGCGTCTGTGAGGTC	564

Sintetizados por (SIGMA ®)

## INMUNOPRECIPITACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

- Amortiguador de Lisis 10 ml

Tris-HCl 100 mM, pH 7	2.5 ml (25 mM)
IGEPAL (NP-40) 100%	100 $\mu$ l (1%)
NaCl 0.3 M	3.33 ml (100 mM)
Mezcla de inhibidor de proteasas (Roche)	1 pastilla completa
SDS 10%	100 $\mu$ l (0.1%)
Tritón X-100 100%	10 $\mu$ l (0.1%)
NaF 1 M	250 $\mu$ l (25 mM)
NaPPi 100 mM	100 $\mu$ l (1 mM)
NaVO <sub>4</sub> 100 mM	100 $\mu$ l (1 mM)

- Solución de Laemmli (4 ml)

Tris pH 6.8, 0.5 M	1 ml (100 mM)
Glicerol	800 $\mu$ l (20%)
SDS 10 %	1.6 ml (2%)
Azul de bromofenol al 2%	200 $\mu$ l (0.05%)
DTT	400 $\mu$ l (100 mM)

- TNTE 0.1% (100 ml)

Tris 0.5 M pH 7.4	10 ml
NaCl 1 M	15 ml
Tritón X-100	100 $\mu$ l
EDTA 0.5 M	200 $\mu$ l
Agua destilada	74.7 ml

Guardar a 4 °C

- Proteína G-Agarosa

1. Tomar 2 ml del stock de proteína G-sefarosa (GIBCO) y llevarlo a 10 ml con TNTE 0.1% en un tubo Falcon de 15 ml.
2. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces
3. Lavar la resina 3 veces, centrifugando a 1000 r.p.m. por 20 segundos, descartando el sobrenadante entre cada centrifugación.
4. Resuspender en 1:5 con TNTE 0.1%.
5. Guardar a 4 °C.

NOTA: siempre resuspender antes de usar.

## TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS E INMUNOBLOT

- Acrilamida 30% (30 ml)

Acrilamida	9 g
Bis N,N-Metilen-bis-acrilamida	0.24 g

Preparar con agua destilada. Filtrar con filtro de 0.45  $\mu$ m y guardar en frasco color ámbar a 4 °C.

- Amortiguador inferior (30 ml)

Tris 1.5 M	5.44 g (1.5 M)
SDS	1.2 ml al 10% (0.4%)

Ajustar pH a  $8.8 \pm 0.02$

- Persulfato de amonio (PSA) al 10%

100 mg/ml

- Amortiguador superior (30 ml)

Tris	1.8 g (1.5 M)
SDS	1.2 ml al 10% (0.4%)

Ajustar pH a  $6.8 \pm 0.02$

- Amortiguador de corrida 1X (1 L)

Glicina	14.4 g
Tris	3 g
SDS al 10%	10 ml (0.1%)

- Amortiguador de transferencia (1 L)

Glicina	2.93 g (39 mM)
Tris	5.82 g (48 mM)
SDS	3.7 g (0.37%)
Agua	c.b.p. 800 ml
Metanol	200 ml

- TBS-TWEEN 20 1X (1L) pH 7.5

Tris	6.054 g (50 mM)
NaCl	8.76 g (150 mM)
Tween 20	1 ml (0.1%)

## APÉNDICE II. ANTICUERPOS

### INMUNOCITOQUÍMICA

- Anticuerpos primarios:

Anticuerpo policlonal de conejo anti-GFAP  
(DAKO)

Anticuerpo policlonal de ratón anti- $\beta$ -tubulina III  
(Covance, Berkeley, CA)

- Anticuerpos secundarios:

Alexa Fluor 568 anti-IgG de ratón hecho en cabra (Invitrogen  
Molecular Probes, Eugene, OR)

Alexa Fluor 488 anti-IgG de conejo hecho en cabra (Invitrogen  
Molecular Probes, Eugene, OR)

NOTA: los anticuerpos fueron utilizados en una dilución 1:1000

### INMUNOPRECIPITACIÓN

Anticuerpo policlonal de cabra anti-Smad2/3 (E-20) (Santa Cruz  
Biotechnology, Inc.)

Anticuerpo policlonal de conejo anti-Smad1/5/8 (N-18)-R (Santa Cruz  
Biotechnology, Inc.)

NOTA: los anticuerpos fueron utilizados en una dilución 1:100

## TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS E INMUNOBLOT

- Anticuerpos primarios:

Anticuerpo policlonal de conejo Phospho-Smad1 (Ser463/465)/ Smad5 (Ser463/465)/ Smad8 (Ser426/428) (Cell Signaling Technology)

Anticuerpo polyclonal de conejo Phospho-Smad2 (Ser465/467) (Cell Signaling Technology)

NOTA: los anticuerpos fueron utilizados en una dilución 1:100

- Anticuerpos secundarios

Anti-IgG-HRP de conejo hecho en cabra sc-2030 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

Anti-IgG-HRP de cabra hecho en burro sc-2033 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

NOTA: los anticuerpos fueron utilizados en una dilución 1:10000

## REFERENCIAS

ABDIPRANOTO-COWLEY, A., PARK J.S., CROUCHER D., *et al.* (2009), Activin A is essential for neurogenesis following neurodegeneration. *Stem Cells*. 27: 1330-46.

ABE K., CHU P.J., ISHIHARA A., SAITO H. (1996), Transforming growth factor-beta 1 promotes re-elongation of injured axons of cultured rat hippocampal neurons, *Brain Research*, 723 (1-2): 206-209.

APPASANI KRISHNARAO, (2010), *Stem Cells & Regenerative Medicine: From Molecular Embryology to Tissue Engineering*, Editorial Springer, EUA, pp. 452.

BAIZABAL J.M., FURLAN-MAGARIL M., SANTA-OLALLA J., *et al.* (2003), Neural stem cells in development and regenerative medicine, *Archives of Medical Research*, 34: 572-588.

BARBEYRAC B., BÉBEAR C., TAYLOR D. (1996), PCR: Preparation of DNA from clinical specimens en: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Vol II. *Diagnostic Procedures*, Editorial Academic Press, Inc., EUA, pp. 61-65.

BÖTTNER M., KRIEGLSTEIN K., UNSICKER K. (2000), The transforming growth factor- $\beta$ s: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions, *Journal of Neurochemistry*, 75: 2227-2240.

CARLSON B. M. (2009), *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*, Editorial Elsevier, España, pp. 106-108 y Capítulo 11.

CELLIÈRE G., FENGOS G., HERVÉ M., IBER D. (2011), The plasticity of TGF- $\beta$  signaling, *BMC Systems Biology*, 5:184.

CHANG H., BROWN C., MATZUK M., (2002), Genetic Analysis of the Mammalian Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily, *Endocrine Reviews* 23: 787–823.

CHANG M. Y., PARK C. H., LEE S. Y., *et al.* (2004a), Properties of cortical precursor cells cultured long term are similar to those of precursor at later developmental stages, *Developmental Brain Research*, 153: 89-96.

CHANG M.Y., PARK C.H., SON H., *et al.* (2004b), Developmental stage-dependent self-regulation of embryonic cortical precursor cell survival and differentiation by leukemia inhibitory factor, *Cell Death and Differentiation*, 11: 985–996.

CHEN, Y.G., LUI H.M., LIN S.L., *et al.* (2002) Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin, *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 227: 75-87.

CHIN, M., MASON M., XIE, W., et al., (2009), Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signature, *Cell Stem Cell* 5, 111–123

ECHEVERRY S., SHI X., HAW A., et al. (2009), Transforming growth factor- $\beta$ 1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects, *Molecular Pain*, 5:16

FALK S., WURDAK H., ITTNER L., et al. (2008), Brain Area-Specific of TGF- $\beta$  Signaling on Wnt-Dependent Neural Stem Cell Expansion, *Cell Stem Cell* 2: 472–483.

GANGEMI R., PERERA M., CORTE G. (2004), Regulatory genes controlling cell fate choice in embryonic and adult neural stem cells, *Journal of Neurochemistry*, 89: 286–306.

GARAMSZEGI N., GARAMSZEGI S.P., SAMAVARCHI-TEHRANI P., et al. (2010), Extracellular matrix-induced transforming growth factor-beta receptor signaling dynamics, *Oncogene*. 29, 2368-80.

GILBERT S. (2003), *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Inc. EUA, pp.391-425.

GOBESKE K., DAS S., BONAGUIDI A., et al. (2009), BMP Signaling Mediates Effects of Exercise on Hippocampal Neurogenesis and Cognition in Mice, *PLoS ONE* 4: e7506.

GOLESTANEH N., MISHRA B. (2005), TGF- $\beta$ , Neuronal Stem Cells and Glioblastoma, *Oncogene* ,24: 5722–5730

GOMES F.C.A., DE OLIVEIRA V., ROMÃO L., (2005), Emerging roles for TGF- $\beta$ 1 in nervous system development, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23: 413-424

HAAS H., PANULA P. (2003), The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system, *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 121-130.

HASHIMOTO, M., KONDO, S., SAKURAI, T., et al. (1990), Activin/EDF as an inhibitor of neural differentiation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173: 193–200.

KANDASAMY M., REILMANN R., WINKLER J., et al. (2011), Transforming Growth Factor-Beta Signaling in the Neural Stem Cell Niche: A Therapeutic Target for Huntington's Disease, *Neurology Research International*, 2011: Article ID 124256.

KARP G. (2009), *Cell and molecular biology: concepts and experiments*, 6a edición, Editorial John Wiley and Sons, EUA, pp. 752-753.

KELLER B., YANG T., CHEN Y., et al. (2011), Interaction of TGF and BMP Signaling Pathways during Chondrogenesis, *PLoS ONE* 6: e16421.

KIM S., de VELLIS J., (2009), Stem Cell-Based Cell Therapy in Neurological Diseases: A Review, *Journal of Neuroscience Research*, 87: 2183–2200.

KIM, M. Y., KADUWAL, S., YANG, D. H., et al. (2010), Bone morphogenetic protein stimulates attachment of neurospheres and astrogenesis of neural stem cells in neurospheres via phosphatidylinositol 3 kinase-mediated upregulation of N-cadherin, *Neuroscience* 170: 8–15.

LIU A., NISWANDER L. A. (2005), Bone morphogenetic protein signaling and vertebrate nervous system development, *Nature Reviews Neuroscience*, 6: 945-954.

MARTIN U., (2009), *Engineering of Stem Cells*, Editorial Springer, EUA, pp. 2

MAKWANA M., JONES L., CUTHILL D., et al., (2007), Endogenous Transforming Growth Factor- $\beta$  1 Suppresses Inflammation and Promotes Survival in Adult CNS, *The Journal of Neuroscience*, 27: 11201–11213.

MASSAGUÉ J. (2000), How cells read TGF- $\beta$  signals, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1: 169-178.

MATHEWS L. (1994), Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family, *Endocrine Reviews*, 15: 310-325.

MATZUK, M.M., KUMAR, T.R., BRADLEY, A. (1995), Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature*, 374: 356-60.

MISHRA L., DERYNK R., MISHRA B. (2005), Transforming growth factor –  $\beta$  signaling in stem cells and cancer, *Science*, 310: 68-71.

MISUMI S., KIM T.S, JUNG C.G, et al., (2008), Enhanced neurogenesis from neural progenitor cells with G1/S-phase cell cycle arrest is mediated by transforming growth factor  $\beta$ 1, *European Journal of Neuroscience*, Vol. 28, pp. 1049–1059.

MOLINA-HERNANDEZ A., VELASCO I. (2008), Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors, *Journal of Neurochemistry*, 106: 706-717.

MOLINE-HERNÁNDEZ A., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ G., ESCOBEDO I., et al. Histamine increases neuronal clonogenicity and induces the expression of deep cortical layer markers after differentiation of neural precursors. Datos enviados para su publicación.

MOON B. S., YOON J. Y., KIM M. Y. (2009), Bone morphogenetic protein 4 stimulates neuronal differentiation of neuronal stem cells through the ERK pathway, *Experimental and Molecular Medicine*, 41: 166-125.

MOORE K. (1991), *Elementos de Embriología Humana*, Nueva Editorial Interamericana (Mc Graw-Hill), México, pp 16-22.

- MOORE K., PERSAUD T.V.N (2009), *Embriología Clínica*, Editorial Elsevier, España, pp. 59-64.
- MORRISON S. (2001), Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells, *Current Opinion in Cell Biology*, 13: 666–672.
- MUKERJI S., KATSMAN E. A., WILBER C., et al. (2007), Activin is a neuronal survival factor that is rapidly increased after transient cerebral ischemia and hypoxia in mice, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27: 1161-1172.
- NISSINEN M. J., PANULA P. (1995), Developmental patterns of histamine-like immunoreactivity in the mouse, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 43: 211-227.
- ORGANISTA-JUÁREZ D. Y., VICENTE-FERMÍN O., SOSA-GARROCHO M., et al. Calcium sensing receptor regulates TGF- $\beta$  signaling pathway, Datos no publicados.
- RAJAN P., PANCHISION D. M., NEWELL L. F., et.al. (2003), BMPs signal alternately through a SMAD or FRAP–STAT pathway to regulate fate choice in CNS stem cells, *The Journal of Cell Biology*, 161: 911–921.
- RANG H.P., DALE M.M., RITTER J.M., et al., (2004), *Farmacología*, 5° edición, Editorial Elsevier, España, pp. 215-217.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ G., MOLINA-HERNÁNDEZ A., VELASCO I. Activin A promotes neuronal differentiation of cerebrocortical neural stem/progenitor cells. Datos enviados para su publicación.
- RODRÍGUEZ-RIVERA N., MOLINA-HERNÁNDEZ A., SÁNCHEZ-CRUZ E., et al., (2009), Activated Notch1 is a stronger astrocytic stimulus than leukemia inhibitory factor for rat neural stem cells, *International Journal of Developmental Biology*, 53: 947-953.
- ROBERTS, V.J., SAWCHENKO, P.E., VALE, W. (1991), Expression of inhibin/activin subunit messenger ribonucleic acids during rat embryogenesis. *Endocrinology*, 128: 3122-3129.
- ROSS S. E., GREENBERG M.E., STILES C.D. (2003), Basic helix-loop-helix factors in cortical development, *Neuron*, 39, 13-25.
- RUBENSTEIN J.L.R., SHIMAMURA K., MARTINEZ S., et al. (1998), Regionalization of the prosencephalic neural plate, *Annual Review of Neuroscience*, 21: 445-477.
- SADLER T.W. (2005), Embryology of the neural tube development, *American Journal of Medical Genetics Part C, Seminars in Medical Genetics*, 135: 2-8.
- SADLER T.W., LANGMAN J. (2007), *Medical Embryology: with clinical orientation*, Editorial Media Panamericana, pp. 315-317.

SANES D., REH T., HARRIS W., (2006), Development of the nervous system, 2<sup>a</sup> edición, Elsevier Academic Press, Capítulo 1.

SAUVAGEOT C. M., STILES C. D. (2002), Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis, *Current Opinion in Neurobiology*, 12: 244–249.

SATOH M., SUGINO H., YOSHIDA T. (2000), Activin promotes astrocytic differentiation of a multipotent neural stem cell line and an astrocytic progenitor cell line from murine central nervous system, *Neuroscience Letters*, 284: 143-146.

SCHWARTZ J.C., ARRANG J.M., GARBARG M. et.al. (1991), Histaminergic transmission in the mammalian brain, *Physiology Reviews*, 71: 1–51.

SHI Y., MASSAGUÉ J. (2003), Mechanisms of TGF- $\beta$  Signaling from Cell Membrane to the Nucleus, *Cell*, 113: 685–700.

SMITH J.L., SCHOENWOLF G.C. (1997), Neurulation: Coming to a closure, *Trends in Neuroscience*, 10: 510-517.

SUN Y., HU J., ZHOU L., et al., (2011), Interplay between FGF2 and BMP controls the self-renewal, dormancy and differentiation of rat neural stem cells, *Journal of Cell Science* 124: 1867-1877.

SUZUKI K., KOBAYASHI T., FUNATSU O., et al. (2010), Activin A induces neuronal differentiation and survival via ALK4 in a SMAD-independent manner in a subpopulation of human neuroblastomas, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394: 639–645.

SUZUMURA A., SAWADA M., YAMAMOTO H., et al. (1993), Transforming growth factor- $\beta$  suppresses activation and proliferation of microglia in vitro, *Journal of Immunology*, 151: 2150-2158.

TAKAHASHI K., YAMANAKA S. (2006), Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126: 663-676.

TEMPLE S., (2001), The development of neural stem cells, *Nature*, 414: 112-117.

UMULIS D., O'CONNOR M., BLAIR S. (2009), The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling, *Development* 136: 3715-3728.

VANHALA A., YAMATODANI A., PANULA P. (1994) Distribution of histamine-, 5-hydroxytryptamine-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and nerve fibers in developing rat brain, *Journal of Comparative Neurology*, 347: 101–114.

VELASCO I., MAYANI H. (2011), Topics in Animal and Plant Development: From Cell Differentiation to Morphogenesis, pp. 163-180.

VELASCO I., VELASCO-VELÁZQUEZ M.A., SALAZAR P., et al., (2003), Influence of serum-free medium on the expression of glutamate transporters and the susceptibility to glutamate toxicity in cultured cortical neurons, *Journal of Neuroscience Research*, 71: 811-818.

VOGEL T., AHRENS S., BÜTNNER N., et al. (2009), Transforming growth factor  $\beta$  promotes neuronal cell fate of mouse cortical and hippocampal *in vitro* and *in vivo*: identification of Nedd9 as an essential signaling component, *Cerebral Cortex*, 20: 661-671.

VESELSKA R., KUGLIK P., CEJPEK P., et al. (2006), Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme, *BMC Cancer*, 6:32.

WILSON S.W., HOUART C. (2004), Early steps in the development of the forebrain, *Developmental Cell*, 6: 167–181.

XIA Y., SCHNEYE A.L. (2009), The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function, *Journal of Endocrinology* 202: 1–12.

YUN K., POTTER S., RUBENSTEIN J. (2001), *Gsh2* and *Pax6* play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon, *Development* 128: 193-205.