

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



*Transfección de neuroesferas con el
plásmido c-mycER^{TAM} para aumentar su
proliferación in vitro: Estudio piloto.*

TRABAJO FIN DE GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Sara Ruiz Díaz

DIRECTOR/A: Sara García Gil-Perotín

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, Septiembre 2015



RESUMEN

Las células madre neurales adultas (NSCs), se han propuesto como candidatas para su uso en terapia celular en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. Cuando las NSCs se crecen *in vitro* forman unos agregados no adherentes denominados neuroesferas. Estos agregados son capaces de diferenciarse a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos cuando se eliminan los factores de crecimiento del medio de cultivo y es en esta capacidad de diferenciación en la que se basa su efecto terapéutico. A partir de biopsias cerebrales que nuestro grupo en colaboración con un Servicio de Neurocirugía del hospital Vall d'Hebron (Barcelona), ha realizado a pacientes, se ha conseguido obtener neuroesferas, pero no un número significativo debido a su baja capacidad de proliferación y por tanto, por su expansión limitada.

En este estudio se modificaron las NSCs de ratón mediante la tecnología del c-mycER^{TAM}. Este transgén genera una proteína de fusión que estimularía la proliferación celular (de manera c- myc dependiente) en presencia de 4-hidroxi-tamoxifeno (droga sintética), favoreciendo la rápida expansión en cultivo de estas células. Esto ha sido demostrado en células NSCs embrionarias, línea CHO y fibroblastos, pero no en NSCs adultas. Nuestro trabajo muestra un aumento de la proliferación celular a las dosis utilizadas, sin cambios en la auto-renovación, que aumentaron en pases subsiguientes, lo que supondría un avance en la preparación de NSCs de un mismo paciente para un posible tratamiento en el futuro.

Palabras clave: terapia celular, SNC, transfección, tamoxifeno, c-myc, NSC adultas, p53, cultivo.

ABSTRACT

Adult neural stem cells (NSCs) have been proposed as candidates for use in cell therapy to treat degenerative diseases of the central nervous system. When the NSCs are grown in vitro form cell aggregates or clones called neurospheres. These aggregates are capable of differentiating into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes upon removing growth factors from the culture medium. This capability of differentiation is the base of their therapeutic effect. Our group, in cooperation with the Neurosurgery department from the Vall d'Hebron hospital, collected brain biopsies, from patients, and although we were able to obtain neurospheres, we could not reach a significant number of cells, due to its low proliferative capacity and, therefore their limited expansion.

In this study, NSCs were modified by the technology of c-mycER^{TAM}. This transgene produces a fusion protein that stimulates cell proliferation (in a c-myc dependent manner) in the presence of 4-hydroxy-tamoxifen (synthetic drug), facilitating the rapid expansion in culture of these cells. This has been demonstrated in embryonic NSCs cells, CHO and fibroblasts, but not in adult NSCs. Our work shows an increase in cell proliferation at the doses used, which increased in subsequent passes, with no change in the self-renewal. Our results imply a step forward in the optimization of NSCs expansion, which would be useful in the case of a possible future treatment.

Key words: cell therapy, SNC, transfection, tamoxifen, c-myc, adult NSC, p53, culture.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi tutor de la UPV, José Salvador Vicente Antón, por su gran ayuda tanto a nivel burocrático como a nivel académico y personal. Muchas gracias.

También quisiera agradecer a Sara, mi tutora en el instituto Cavanilles, la oportunidad de poder realizar allí este proyecto y a toda la gente del laboratorio que de una u otra manera me han apoyado y me han dado ánimos para seguir adelante. En especial me gustaría dar las gracias a Marian, cuya ayuda ha sido tan importante para mí.

En segundo lugar quisiera dar las gracias a mi familia, amigos y a Juan, que han hecho que estos meses tan duros hayan sido más llevaderos. Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	<u>Neurogénesis y neuroregeneración.</u>	1
1.2.	<u>Terapia celular en enfermedades del SNC</u>	4
1.3.	<u>Tecnología ER^{TAM}. Aplicación para el aumento de la expresión de c-Myc y potencial terapéutico</u>	5
II.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	7
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1.	<u>Obtención de neuroesferas de ratón transfectadas con el plásmido episomal PCEP4-cmycER^{TAM}</u>	8
3.1.1.	Establecimiento del cultivo primario de neuroesferas.....	8
3.1.2.	Mantenimiento y expansión.....	9
3.1.3.	Modificación genética y crecimiento celular.....	10
3.1.4.	Expresión del plásmido. Purificación, PCR y electroforesis.....	10
3.1.5.	Sensibilidad de las células al 4-hidroxi-tamoxifeno.....	10
3.2.	<u>Amplificación por inducción de la expresión de c-myc mediada por la adición de 4-hidroxi-tamoxifeno. Estudio de expresión</u>	11
3.2.1.	Ensayo de proliferación.....	11
3.2.2.	Selección de células transfectadas mediante higromicina.....	12
3.3.	<u>Estudio fenotípico de las células transfectadas. Capacidad de diferenciación</u>	13
3.4.	<u>Análisis estadístico</u>	13
IV.	RESULTADOS	14
4.1.	<u>Obtención de neuroesferas de ratón transfectadas con el plásmido episomal PCEP4-cmycER^{TAM}</u>	14
4.1.1.	Expresión del plásmido. RT-PCR.....	14
4.1.2.	Sensibilidad de las células al 4-hidroxi-tamoxifeno.....	15
4.2.	<u>Amplificación por inducción de la expresión de c-myc mediada por la adición de 4-hidroxi-tamoxifeno. Estudio de expresión</u>	16
4.2.1.	Proliferación.....	18
4.2.2.	Auto-renovación.....	21
4.2.3.	Selección de células transfectadas mediante higromicina.....	22
4.3.	<u>Estudio fenotípico de las células transfectadas. Capacidad de diferenciación</u>	24
V.	DISCUSIÓN	25
VI.	CONCLUSIÓN	28
VII.	BIBLIOGRAFÍA	29

LISTADO DE ABREVIATURAS

SNC	Sistema nervioso central
NSC	Células madre neurales
NF	Neuroesferas
4-OHT	4-Hidroxitamoxifeno
EGF	Factor de crecimientos epidérmico
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
SVZ	Zona subventricular
PBS	Tampón fosfato salino
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
Rcf	Fuerza de centrifugación relativa
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico
BSA	Albúmina de suero bovino
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
cDNA	DNA complementario
TBE	Tampón formado por Tris, Borato y EDTA
FBS	Suero Fetal Bovino
PDL	Poly-D-lysina
DIV	Días <i>in vitro</i>
qPCR	PCR cuantitativa
ABS	Absorbancias
CT	Control

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo.

Tabla 2. Media de las ABS con respecto a cada condición de células sin electroporar.

Tabla 3. Media de las ABS con respecto a cada condición de células electroporadas.

Tabla 4. Media de las absorbancias para los dos ensayos por separado y en conjunto.

Tabla 5. Media de las áreas para los dos ensayos por separado y en conjunto.

Tabla 6. Valores de áreas/nº NF para cada ensayo a DIV 7 y para el conjunto de ambos ensayos.

Tabla 7. Media del nº de NF, de los dos ensayos por separado y juntos, de las células electroporadas con y sin 4-OHT a DIV 7.

Tabla 8. Áreas de las diferentes condiciones de las células seleccionadas con higromicina a DIV7.

Tabla 9. Media del número de NF tratadas con higromicina a DIV 7 para diferentes condiciones.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la SVZ de ratón adulto con el bulbo olfatorio (OB) a la izquierda y el cerebelo en la derecha (CB). En el centro el neocortex (NC), el ventrículo lateral (LV, azul) y el corpus callosum (CC). Las neuronas inmaduras se alinean en cadenas (líneas rojas) y se desplazan hacia el OB (Buylla y verdugo, 2002).

Figura 2. NF en cultivo.

Figura 3. Representación esquemática del cultivo de neuroesferas *in vitro* (Gil-Perotín et al., 2013).

Figura 4. Construcción de c-mycER^{TAM} (Littlewood et al., 1995)

Figura 5. Estructura molecular del 4-OHT a la izquierda y del tamoxifeno a la derecha (Datashet de sigma-aldrich).

Figura 6. Esquema de los cebadores empleados en la PCR

Figura 7. Gel de electroforesis que demuestra la presencia del plásmido en la célula. La primera calle se corresponde con el marcador de pesos moleculares (MP), la segunda con el control negativo (CT), la tercera con los cebadores 2 y 8 (C1) y la cuarta con los cebadores 4 y 10 (C2).

Figura 8. Ensayo XTT que muestra la sensibilidad de las células no electroporadas a la presencia de 4-OHT en el medio a diferentes concentraciones. El asterisco indica que ese valor es estadísticamente significativo.

Figura 9. Ensayo XTT que muestra la sensibilidad de las células electroporadas a la presencia de 4-OHT en el medio a diferentes concentraciones.

Figura 10. Selección de imágenes, del primer ensayo, de las NF en diferentes DIV y de las diferentes concentraciones.

Figura 11. Selección de imágenes, del segundo ensayo, de las NF en diferentes DIV y de las diferentes concentraciones.

Figura 12. ABS del primer y segundo ensayo medido en ensayo XTT para las condiciones control electroporado y electroporado +100nM 4-OHT y de ambos ensayos en conjunto.

Figura 13. Valores de las áreas de los dos ensayos por separado y en conjunto.

Figura 14. Valores de áreas/nº NF para cada ensayo a DIV 7 y para el conjunto de ambos ensayos

Figura 15. Número de NF, en los dos ensayos por separado y juntos, de las células control electroporadas vs células tratadas con 4-OHT a DIV 7.

Figura 16. Área de control electroporado vs electroporado +100nM de 4-OHT en las células tratadas con higromicina y área/nº NF.

Figura 17. Nº de NF del control electroporado vs electroporado + 100nM 4-OHT.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Neurogénesis y neuroregeneración.

La neurogénesis fue descrita por primera vez en 1962 por Joseph Altman (Altman, J., 1962). Se trata de un proceso que incluye la división celular, migración y diferenciación de células madre neurales (NSCs), células multipotenciales capaces de dividirse y diferenciarse a los diversos tipos celulares neurales, incluidas neuronas. La neurogénesis, no solo ocurre en el desarrollo embrionario de mamíferos, también se ha visto que ocurre en la edad adulta, incluida la especie humana (Eriksson *et al.*, 1998). Pero en el cerebro adulto de mamífero, en concreto en ratón, está restringida a dos zonas: el giro dentado del hipocampo (Gage, 2000; Kempermann and Gage, 2000) y la zona subventricular (SVZ) como se puede observar en la figura1 (Doetsch *et al.*, 1997; Doetsch *et al.*, 1999). La neurogénesis espontánea en el humano adulto es muy baja y se considera que es prácticamente inexistente en la SVZ adulta, a diferencia de lo que ocurre en el ratón (Spalding *et al.*, 2013).

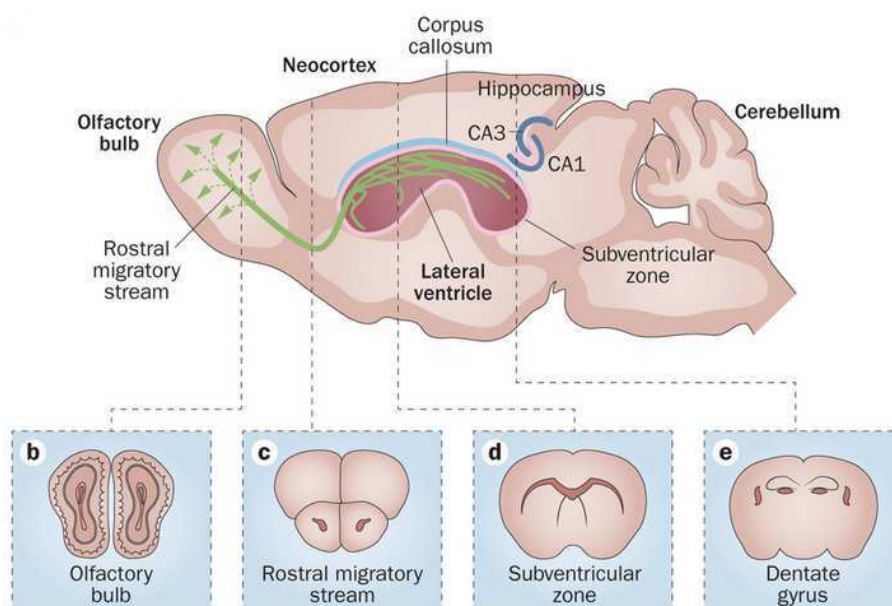


Figura 1. Esquema del cerebro de ratón adulto donde aparece la SVZ (línea rosa), el bulbo olfatorio (OB) a la izquierda y el cerebelo en la derecha. En el centro el neocórtex, el ventrículo lateral y el corpus callosum. Las neuronas inmaduras se alinean en cadenas (líneas verdes) y se desplazan hacia el OB (Ziegler *et al.*, 2014).

La neuroregeneración es el proceso de recuperación del número de células y/o de las conexiones neuronales perdidas tras daño. Requiere que se cumplan una serie de complejos procesos. En primer lugar la neurona dañada debe ser capaz de sobrevivir y el axón

dañado debe ser capaz de extenderse y volver a establecer las conexiones con las neuronas vecinas. Una vez este contacto se ha restablecido el axón debe remielinizarse y se deben formar sinapsis funcionales (Horner y Gage, 2000). Para conseguir este objetivo se han desarrollado numerosas estrategias entre las que está la terapia celular (Horner y Gage, 2000).

Puesto que el objetivo final de los tratamientos regenerativos para las enfermedades neurodegenerativas es el de reparar los tejidos neuronales dañados (Nam *et al.*, 2015), las NSC han sido propuestas como una fuente de precursores neuronales para su uso en trasplantes en varias enfermedades del SNC, como es el caso de la esclerosis múltiple donde ejercen una acción neuroprotectora (Pluchino *et al.*, 2003).

Las NSCs se consideran una población de células quiescentes, indiferenciadas con capacidad de ser activadas por agentes ambientales o por estímulos epigenéticos. Además son células altamente plásticas. Esta plasticidad les permite migrar y diferenciarse en las células que conforman los tejidos neurales de interés. (Bez *et al.*, 2003). Estas células son capaces de diferenciarse a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos e integrarse en los circuitos neuronales del hospedador reemplazando a las neuronas dañadas (Hongwei *et al.*, 2010).

Sin embargo la población endógena de células madre neurales es de tan escasa proporción que su activación en caso de lesión no se deriva en ningún cambio clínico o mejoría objetivable. Por tanto, primero se hace necesario aislar y expandir de forma eficaz las NSC in vitro (Nam *et al.*, 2015). A este respecto, la expansión in vitro de las NSCs humanas con el objetivo de adquirir la cantidad necesaria para su trasplante es un proceso necesario pero a la vez complejo debido a que las células adultas poseen una capacidad proliferativa y de auto-renovación muy limitada (resultados no publicados Vidal-Jorge *et al.*, 2015). Cuando las NSC se expanden in vitro forman unos agregados en suspensión (no adherentes) denominados neuroesferas (Reynolds y Weiss, 1992). Las neuroesferas están compuestas por una mezcla heterogénea de NSC, células progenitoras neuronales (NPC) y glía y neuronas post-mitóticas (Jensen y Parmar, 2006). Las NSC que se encuentran formando las neuroesferas son capaces de diferenciarse a células maduras (neuronas, oligodendrocitos, astrocitos) cuando se eliminan los factores de crecimiento del medio de cultivo (Reynolds y Weiss, 1996).

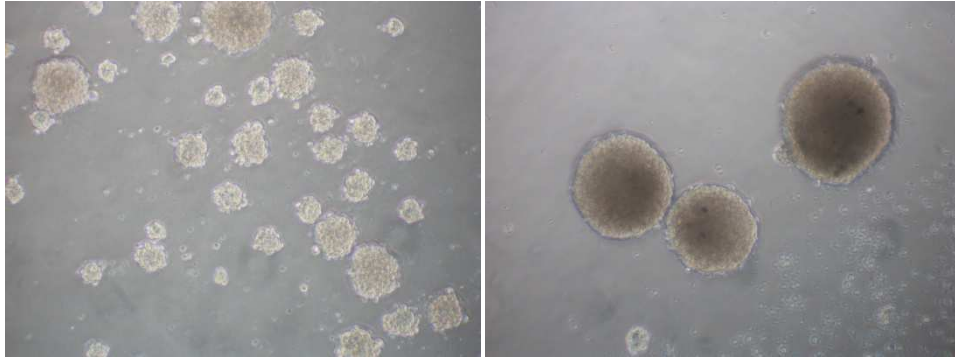


Figura 2. NF en cultivo (propias).

El cultivo de neuroesferas (Figura 3) está considerado un importante modelo *in vitro* para estudiar los procesos de desarrollo neuronales, ya que de esta manera se puede evaluar la proliferación¹, potencial de diferenciación celular y la capacidad de auto-renovación² (Jensen y Parmar, 2006). Al tratarse de cultivos en suspensión permiten además la expansión *in vitro* a gran escala para la búsqueda de fármacos y terapia celular (Sun *et al.*, 2011).

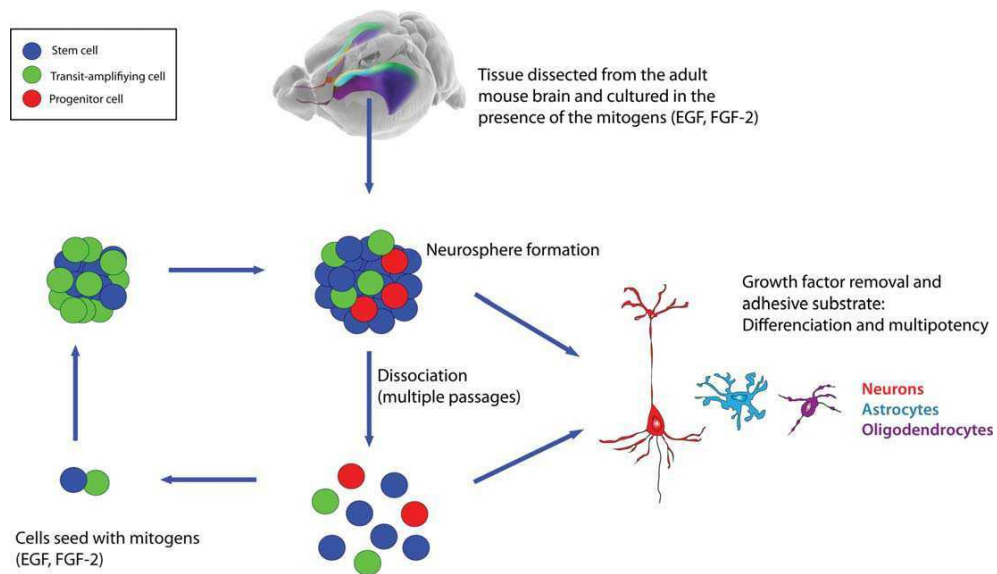


Figura 3. Representación esquemática del cultivo de neuroesferas *in vitro* (Revisado en Gil-Perotín *et al.*, 2014).

¹ La **autorrenovación** es la capacidad de una célula para generar un clon. En el caso de las NF se define como la capacidad que presenta una NSC para generar subclones de NF. Esta característica es un indicador del mantenimiento de la condición de célula madre (revisado en Gil-Perotín *et al.*, 2014).

² La **proliferación** se define como la capacidad mitótica o de división de manera que un incremento en el tamaño de la NF se correlaciona con una mayor proliferación (Silvestroff *et al.*, 2013).

Sin embargo, el cultivo de neuroesferas también presenta una serie de desventajas. (Revisado en Gil-Perotín *et al.*, 2014).

La estructura tridimensional de las NF no permite una organización espacial tal y como se encontraría en los nichos originales y, además, no todas las NF están formadas únicamente por células madre neuronales. (Louis *et al.*, 2008). Sin embargo hay que tener presente que este método permite el estudio de las NSC *in vitro*, por tanto es posible que tengan capacidad de diferenciación *in vitro* pero que *in vivo* no se comporten de la misma forma. (Jensen y Parmar, 2006)

1.2. Terapia celular en enfermedades del SNC.

Las enfermedades que afectan al SNC son causa de discapacidad a largo plazo debido a que las neuronas no son capaces de regenerar las conexiones axonales y dendríticas perdidas tras un daño. Por tanto, la lesión en el SNC produce no sólo una ruptura de las comunicaciones entre las neuronas sanas, sino también una cascada de eventos que desencadenan una degeneración y muerte neuronal (Horner y Gage, 2000). La incapacidad de regeneración de las neuronas del SNC se atribuye no sólo a una incapacidad de las neuronas para responder a un daño sino también a la presencia de factores de señalización que son inhibidores del crecimiento axonal. (Chuckowree *et al.*, 2004)

Las enfermedades cerebrovasculares, neurodegenerativas y/o neuroinflamatorias que afectan al SNC (ictus, Alzheimer, Parkinson o esclerosis múltiple, entre otras) aunque difieren en su etiopatogenia, comparten una serie de mecanismos que dan lugar a una alteración en las funciones neuronales y finalmente, a la muerte celular que ocurre de forma lenta y progresiva (Carletti *et al.*, 2011; Ginberg *et al.*, 2012). Entre esos mecanismos se encuentra la activación crónica del sistema inmune (principalmente de la microglía, macrófagos residentes del SNC), que empeora la situación por liberación de citoquinas proinflamatorias y aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Entre estos procesos lesivos del SNC, La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad autoinmune en la que los linfocitos T específicos para los antígenos de mielina desencadenan una reacción inflamatoria en el SNC que finalmente da lugar a una desmielinización y secundariamente un daño axonal (Gold *et al.*, 2006). Su tratamiento es fundamentalmente frenador de la enfermedad, pero una vez se ha establecido un daño neuronal permanente, no existe tratamiento restaurador de la función. En el terreno de la investigación con animales hay algunos resultados prometedores. Por ejemplo la inyección de neuroesferas (intratecal o intravenosa) en un ratón con EAE (encefalomielitis experimental autoinmune), modelo animal de esclerosis múltiple, mostró que las células derivadas de los precursores neurales estaban

localizadas próximas a los axones desmielinizados o en proceso de remielinización activa. Debido a que los oligodendrocitos son capaces de llevar a cabo los procesos de remielinización se piensa que los precursores neurales podrían haberse diferenciado *in situ* a células formadoras de mielina, aunque también se observó diferenciación a astrocitos. Lo que se pudo confirmar es la reducción visible de las cicatrices de la glía, características de esta enfermedad. También se vio que la mejor vía de administración era la intravenosa, evitando así otras vías de administración más invasivas (Pluchino *et al.*, 2003).

También se ha visto que en ciertas patologías como el Alzheimer, el trasplante de NSC produce efectos beneficiosos incrementando los niveles de BDNF (factor neurotrópico derivado de cerebro) aumentando así la densidad sináptica y produciendo una mejora de la enfermedad sin llegar a demostrarse la diferenciación de las NSCs a astrocitos, oligodendrocitos o neuronas (Blurton-Jones *et al.*, 2009). En el caso del ictus tras la inyección intravenosa de NSCs 24 h después de una isquemia cerebral se ha observado una recuperación neurológica en ratas. Las NSCs son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica lesionada tras la isquemia y por tanto, de anidar en el parénquima. Allí se diferencian tanto a astrocitos como a neuronas (Cheng *et al.*, 2015).

1.3. Tecnología ER^{TAM}. Aplicación para aumento de la expresión de c-Myc y potencial terapéutico.

La tecnología ER^{TAM} se basa en fusionar el receptor de estrógenos murino modificado a un gen para que regule su expresión. La modificación del receptor (mediante mutagénesis dirigida, mutación que hace que la proteína que se obtiene contenga en la posición 525 una sustitución de Gly por Arg, Figura 4) determina que este receptor solo se active en presencia del esteroide sintético Tamoxifeno, siendo insensible a los estrógenos de síntesis propia (Littlewood *et al.*, 1995).

Dado que la producción endógena de NSC es muy reducida y una vez se consiguen cultivos de NF a partir de muestras preoperatorias humanas adultas, su expansión es muy limitada (no publicado Vidal-Jorge *et al.*, 2015) y con el objetivo de aumentar la proliferación celular de las NSC en cultivo, se ha empleado la tecnología c-mycER^{TAM} (Stevanato *et al.*, 2009). La tecnología c-mycER^{TAM} se basa en la obtención de una proteína de fusión que se consigue mediante la unión del gen c-myc (oncogen) al ER^{TAM} (Littlewood *et al.*, 1995).

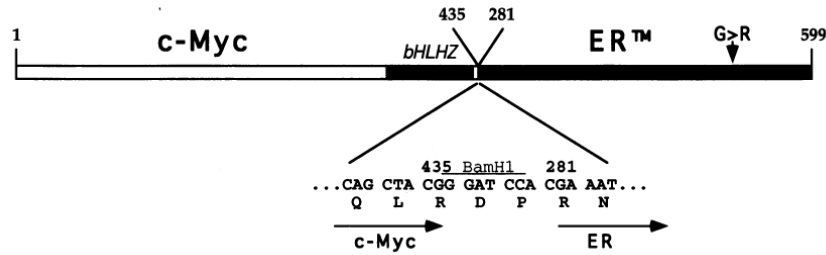


Figura 4. Construcción de *c-mycER^{TAM}* (Littlewood *et al.*, 1995).

El *C-MYC* es un oncogen de la familia de genes *MYC* que juega un papel fundamental en los procesos de proliferación celular. Cuando se activa, en presencia de factores de crecimiento, da lugar a un factor de transcripción, *c-myc*, que regula la expresión de otros genes con aumento de la duplicación celular, y por ello una alteración de su expresión está asociada con la aparición de tumores (Dunn y Cowling, 2015).

Una de las principales ventajas de la utilización de este plásmido es que su expresión, relativamente rápida y reversible, está altamente controlada por la presencia en el medio del 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) (figura 4) y además se añade en concentraciones que distan de ser letales para la célula ya que están por debajo de $1\mu\text{M}$. Además se ha comprobado que con este plásmido se generan líneas de NSC genéticamente estables, sin modificaciones en su fenotipo que las hagan susceptibles de generar tumores (Pollock *et al.*, 2006). El 4-OHT se trata de un metabolito derivado del antiestrógeno tamoxifeno, molécula que ejerce su acción compitiendo con los estrógenos por su receptor (Mahfoudi *et al.*, 1995).

Cuando el 4-Hidroxitamoxifeno se añade al medio de cultivo, se une al receptor murino modificando provocando la dimerización de la proteína de fusión y permitiendo que adquiera su conformación activa, traslocándose al núcleo donde el *c-myc* ejerce su función como factor de transcripción (Ming *et al.*, 1999; Stevanato *et al.*, 2009).

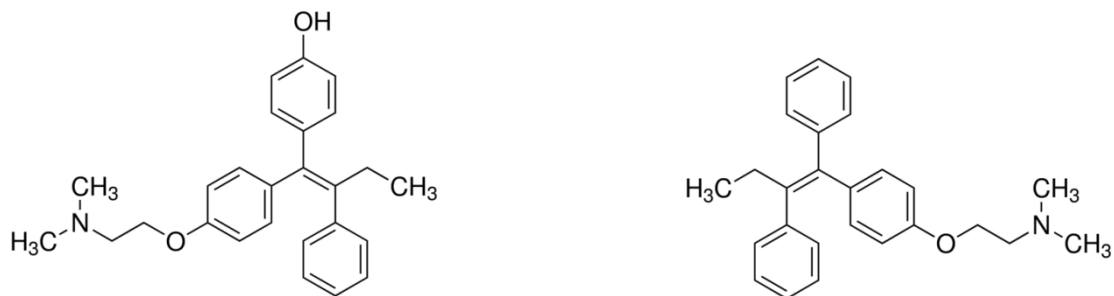


Figura 5. Estructura molecular del 4-OHT a la izquierda y del tamoxifeno a la derecha (Datasheet de sigma-aldrich).

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Obtener un mejor rendimiento de las biopsias cerebrales de pacientes humanos adultos, mediante la modificación genética de las NSCs humanas por transfección no viral con el gen modificado c-myc-ER^{TAM}, que permita establecer un modelo estable y reproducible para el estudio y tratamiento de diferentes patologías del SNC.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención de neuroesferas de ratón transfectadas con el plásmido episomal PCEP4-c-mycER^{TAM}

3.1.1. Establecimiento del cultivo primario de neuroesferas.

Se emplearon tres ratones de la cepa C57, black (B6), de 4 semanas de edad, machos. Los ratones se anestesiaron y se eutanasiaron por dislocación cervical. Los cerebros se extrajeron y se mantuvieron en tampón fosfato salino (PBS) (Gibco, Waltham, MA, Estados Unidos) frío (4°C). Primero con unas pinzas se separó el cráneo del cerebro y una vez obtenido el cerebro se depositó en una placa de silicona con PBS frío donde se diseccionó para obtener la SVZ.

Una vez se obtuvo la SVZ se pasó a una placa con Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco). Ambas placas se mantuvieron en hielo. La SVZ se troceó en campana de flujo laminar en la sala de cultivos empleando un escarpelo estéril. Para disgregar el tejido enzimáticamente se empleó una solución de papaína (14 mg de papaína) (Worthington Lakewood, NJ, Estados Unidos); 2,7 mg de L-cisteína (Sigma, St.Louis, MO, Estados Unidos); 2,7 mg de Ácido etildiaminotetraacético (EDTA) (Sigma) y 15 mL de Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) (Gibco) que se añadió 30 minutos antes de usar la solución. Pasado este tiempo se procedió a centrifugar 5 minutos a una fuerza de centrifugación relativa (rcf) de 600. El sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en 1mL de medio de cultivo control al que se le añadió heparina, albúmina de suero bovino (BSA) (sigma) y factores de crecimiento epidérmico (EGF) y fibroblástico (FGF) (Sigma) dando lugar así al medio de cultivo completo (Tabla1).

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo.

COMPONENTES (Medio completo)	VOLÚMENES	CASA COMERCIAL
DMEM-F12	41,5 mL	Gibco
GLUCOSA	1 mL	Panreac, Barcelona, España
NaHCO₃	0,75 mL	Gibco
HEPES	0,25 mL	Sigma
L-GLUTAMINA	0,5 mL	Gibco
HORMONE-MIX	5 mL	(Preparado)
ANTIBIÓTICO/ANTIMICÓTICO	1 mL	Gibco
BSA	200 mg	Sigma
HEPARINA	0,1 mL	Sigma
FGF	20 µL	Sigma
EGF	10 µL	Invitrogen, Walthman, MA, Estados Unidos

Posteriormente se aspiró el sobrenadante y se disgregó mecánicamente el tejido usando una pipeta Pasteur de vidrio con la punta previamente estrechada a la llama. A continuación la suspensión celular se filtró a través de un cell strainer de 70nm (Falcon, Corning, NY, Estados Unidos) para eliminar restos de mielina, se añadieron nuevamente 5mL medio control y se centrifugó durante 10 min a 600 rcf. El sedimento se resuspendió en 3 mL de medio completo (Tabla 1) y se sembró en una placa de 6 pocillos. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C con una atmósfera de CO₂ del 5%

3.1.2. Mantenimiento y expansión

Aproximadamente a los 6-7 días tras el cultivo primario, las neuroesferas alcanzan un tamaño adecuado para el pase. El tamaño de las neuroesferas es crítico a la hora de expandir un cultivo de NSCs. Si el tamaño es demasiado grande los nutrientes no llegarán a las células del centro de la esfera y éstas morirán, disminuyendo el número de células viables. Por otro lado, si las esferas son demasiado pequeñas conseguiremos mantener el cultivo, pero no expandirlo. Para el subcultivo las neuroesferas se recolectaron y se centrifugaron durante 5 min a 600 rcf.

Se eliminó el sobrenadante y las neuroesferas se disgregaron enzimáticamente, utilizando acutasa (Sigma) (5 min a 37°C), asociada a disgregación mecánica con la pipeta.

Las células viables se contaron en una cámara Neubauer usando azul tripán (Sigma) al 0,1 % en suero salino para identificar las células muertas (que son las que captan el azul), y se sembraron en medio completo a una densidad de expansión apropiada (75.000 células/ml).

3.1.3. Modificación genética y crecimiento celular

3.1.3.1. Plásmido

Se obtuvo el plásmido de DNA (KPNI-cmycERTAM-HindIII; GeneScript, EEUU) que contiene la secuencia cmyc-ER^{TAM} y se clonó en el vector pCEP4 (Invitrogen), vector episomal, que contiene el gen de resistencia a la higromicina B. Se realizó la comprobación de las secuencias de ADN mediante secuenciación Sanger de manera automática en el servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia.

3.1.3.2. Transfección

El DNA plasmídico se transfectó en las células madre neuronales de ratón adulto por electroporación usando el kit de transfección Nucleofector Kit Mouse Neural Stem Cells (mNSC) (Lonza, Walkersville, MD, Estados Unidos). Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: 20.000 cells, 2 µg de DNA y 100 µl de Mouse Neural Stem Cells nucleofection solution. Pasadas las 48h post-transfección se añadieron las diferentes dosis de 4-OHT (50nM, 100nM y 250nM en función del ensayo) y factores de crecimiento. Cada dos días, ¾ partes del medio se reemplazaron por medio nuevo, suplementado con la dosis correspondiente de 4-OHT. A los 7 días post-transfección las células se pasaron y sembraron a la misma densidad de clonaje.

3.1.4. Expresión del plásmido. Purificación, PCR y Electroforesis

3.1.4.1. Aislamiento de RNA

Para comprobar que las células habían incorporado el plásmido se realizó una PCR empleando la transcriptasa reversa (RT-PCR) del RNA extraído de las neuroesferas control (CT) electroporadas. Para la extracción del RNA se empleó el kit RNeasy Micro Kit (50) (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez extraído el RNA se midió su concentración empleando el espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, Estados Unidos).

3.1.4.2. RT-PCR. Síntesis de cDNA (DNA complementario) y PCR

El paso de RNA a cDNA se llevó a cabo empleando el kit Superscript II RT (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez se obtuvo el cDNA se empleó como molde para la PCR empleando los cebadores 2-8 y 4-10 (Figura 6) con una $T_m = 64^\circ\text{C}$ y realizando 35 ciclos.



Figura 6. Esquema de los cebadores empleados en la PCR.

3.1.4.3. Electroforesis

El análisis electroforético del cDNA se llevó a cabo en gel de agarosa 1%. Se preparó añadiendo 50mL de un tampón formado por Tris, Borato y EDTA (TBE) 0,5x, 500mg de agarosa y 5 μ l de bromuro de etidio. La mezcla se depositó en el molde con el peine durante 45 minutos. Pasado este tiempo se colocó el gel en una cubeta que contenía TBE 1x y se aplicaron 110 mV durante 45 minutos.

3.1.5. Sensibilidad de las células al 4-OHT

Se evaluó la toxicidad del 4-OHT a diferentes dosis (50nM, 100nM, 250nM) tal y como se describe en el siguiente apartado (3.2.2)

3.2. Amplificación por inducción de la expresión de c-myc mediada por la adición de 4 -hidroxi-tamoxifeno. Estudio de expresión.

3.2.1. Ensayo de proliferación

Se evaluaron y los efectos del 4- OHT a una concentración de 100nM durante 7 días *in vitro* (DIV) en células transfectadas con el plásmido.

La proliferación celular se evaluó mediante:

- 1) Estudio de la proliferación celular mediante el ensayo colorimétrico XTT (cell proliferation kit II (XTT), Roche Applied Science, Penzberg, Upper Bavaria, Alemania). Este ensayo consiste en la adición de sal de tetrazolio (XTT) a los cultivos celulares. La sal de tetrazolio XTT, es convertida a una sal formazán por la actividad succinato-tetrazolio reductasa, la cual es activa sólo en células viables, por tanto, a mayor color, más células viables. Las células se sembraron a una concentración de 15.000 cells/mL en una placa de 96 pocillos y tras 7 DIV se realizó el ensayo XTT, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.
- 2) Cuantificación del número y tamaño de las neuroesferas por condición a diferentes DIV. Se ha utilizado un microscopio de campo claro invertido para capturar 5 campos a una magnificación de 10X los días 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de cultivo a DIV1, DIV2, DIV3, DIV5, DIV6 y DIV7. Se han analizado DIV1 y DIV7.

Las imágenes obtenidas se exportaron al programa de análisis de imágenes ImageJ 1.47v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EEUU) y el número de células en cada imagen se calculó con el Pluggin Cell Counter (Kurt De Vos, <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>). El tamaño de las neuroesferas se analizó utilizando el mismo programa. Se calibró empleando la cámara Neubauer como referencia puesto que sus dimensiones son conocidas. Se trazó una línea recta sobre uno de los cuadrantes que componen la cámara y se obtuvo la distancia en píxeles con la herramienta *Analyze* y *Set Scale*. Una vez calibrado se analizaron las áreas de las NF trazando una línea alrededor de cada NF, con la opción de forma poligonal.

3.2.2. Selección de células transfectadas mediante higromicina

Debido a que el plásmido presentaba resistencia a la higromicina, se hicieron ensayos de selección con este antibiótico, en sucesivos pases, de las células transfectadas. Brevemente, a partir de las placas con las células transfectadas se hizo un pase. Pasadas 24 horas se añadió el 4-hidroxi-tamoxifeno y la higromicina. Cada 48 h se cambió la mitad del medio y se añadió la mitad reponiendo el tamoxifeno y la higromicina. 24h después del primer pase se añadió 4- OHT y 100 µg/mL de higromicina.

3.3. Estudio fenotípico de las células. Capacidad de diferenciación.

Para la diferenciación de las células madre neuronales se empleó una *chamber-slide* (portaobjetos con pocillos) que previamente fue tratada con Poly-D-lysina (PDL) (Sigma) y laminina (Sigma). Se añadieron 300 µl de PDL a una concentración de 1mg/mL en cada pocillo de cada *chamber-slide* y se dejó el incubador 24h. Pasado este tiempo se eliminó la PDL haciendo un lavado con H₂O estéril, se dejó secar la *chamber-slide*, se cubrió con laminina (1:100) en PBS y se dejó durante dos horas en el incubador evitando que se secan. A continuación se quitó la laminina y se dejó con DMEM-F12 en campana hasta el momento de sembrar las células. Para sembrar las células, en primer lugar se recogieron las euroesferas, y se procesaron tal y como queda explicado en el apartado 3.1.2

A continuación se añadió 800µl de medio control y se contó el número de células para sembrar 100.000 células/cm². Puesto que los pocillos de la *chamber-slide* tienen una superficie de 0,7cm² se debería sembrar 70.000 células/pocillo de chamber-slide. El medio de diferenciación que se añadió al sembrar las células en la chamber-slide estaba compuesto por medio control + 1,5% de suero fetal bovino (FBS) inactivo (Sigma) y suplementado con 10 ng/mL de FGF y heparina (volumen acorde con el volumen preparado). Se sembraron dos pocillos por condición, conteniendo cada uno de ellos 100 µl de la suspensión celular y 200 µl del medio de diferenciación. Pasados tres días el medio de diferenciación se eliminó, evitando que se secan los pocillos, y se añadió medio control + 1,5% de FBS inactivado (con calor).

3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con la herramienta PruebaT del Excel (Microsoft, Excel 2007) para calcular el p-valor. También se analizó la desviación estándar y el error estándar de la media. Posteriormente se comprobaron los cálculos con el software GraphPad Prism versión 6.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California USA, www.graphpad.com)

IV. RESULTADOS

4.1. Obtención de neuroesferas de ratón transfectadas con el plásmido episomal PCEP4- c-mycER^{TAM}

4.1.1. RT-PCR

Mediante la visualización del gel se pudo comprobar la expresión del plásmido en las células analizadas (figura 7). La expresión del plásmido está ocurriendo, sin embargo se desconoce si se está produciendo la dimerización y la traslocación al núcleo de c-myc

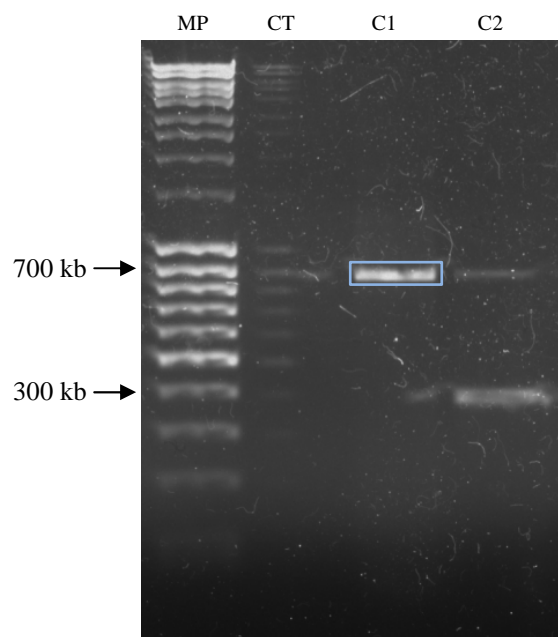


Figura 7. Gel de electroforesis que demuestra la presencia del plásmido en la célula. La primera calle se corresponde con el marcador de pesos moleculares (MP), la segunda con el control negativo (CT), la tercera con los cebadores 2 y 8 (C1) y la cuarta con los cebadores 4 y 10 (C2).

4.1.2. Toxicidad de las células debida a 4-OHT.

Se comprobó, mediante ensayo XTT (Tabla 2) (Figura 8), el efecto del 4-OHT a diferentes dosis (50nM, 100nM y 250 nM) en células no transfectadas para determinar si el 4-OHT por si mismo era capaz de afectar significativamente al número de células.

Tabla 2. Media de las ABS con respecto a cada condición de células sin electroporar.

MUESTRA	MEDIA ABS ₄₉₀
CT	0,4559 ± 0,0102
CT+50nM 4-OHT	0,5643 ± 0,0127
CT+100nM 4-OHT	0,4690 ± 0,0187
CT+250nM 4-OHT	0,5212 ± 0,0292

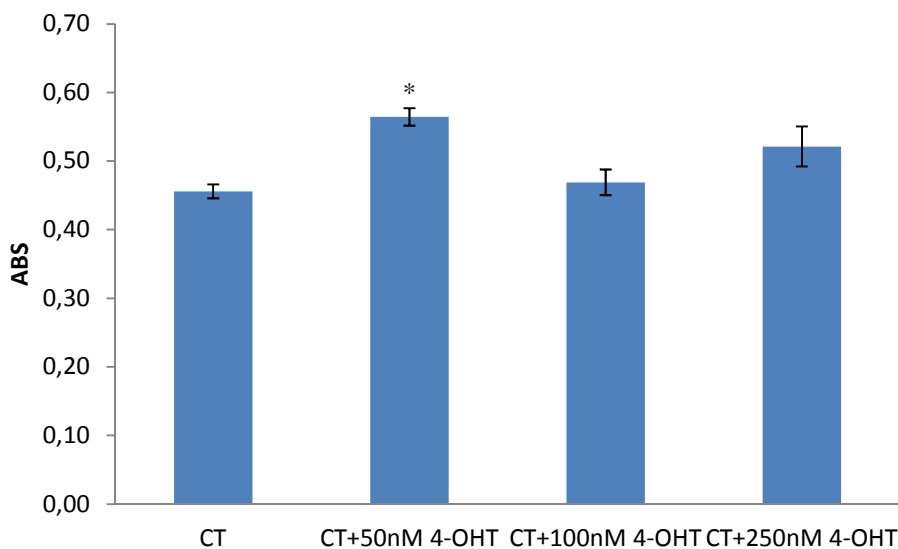


Figura 8. Ensayo XTT que muestra la sensibilidad de las células no electroporadas a la presencia de 4- OHT en el medio a diferentes concentraciones. El asterisco indica que ese valor es estadísticamente significativo.

Tomando como referencia el control sin 4-OHT, se vio que había un aumento significativo de la proliferación (p-valor= 0,0015) al poner 4-OHT en las células sin electroporar en el caso de la dosis de 50nM. Sin embargo a 100nM y 250nM no se vio dicho aumento. Lo que no se observó en ningún caso es una toxicidad que conllevara una disminución del número de células.

Para ajustarse más a las condiciones reales del experimento, se decidió hacer un ensayo XTT con las células electroporadas tratadas con diferentes concentraciones de 4-OHT (50nM, 100nM y 250nM) (Tabla 3) (Figura 9). Se observó una tendencia a un mayor número

de células (viabilidad) en las dosis de 50 y 100nM, pero no se alcanzó la significación estadística. Tampoco en este caso hubo una toxicidad respecto al control.

Tabla 3. Media de las ABS con respecto a cada condición de células electroporadas.

CONDICIÓN	MEDIA ABS ₄₉₀
CT ELECTRO	0,4874 ± 0,0662
ELECTRO+50nM 4-OHT	0,5190 ± 0,0330
ELECTRO+100nM 4-OHT	0,5984 ± 0,0180
ELECTRO+250nM 4-OHT	0,4716 ± 0,0290

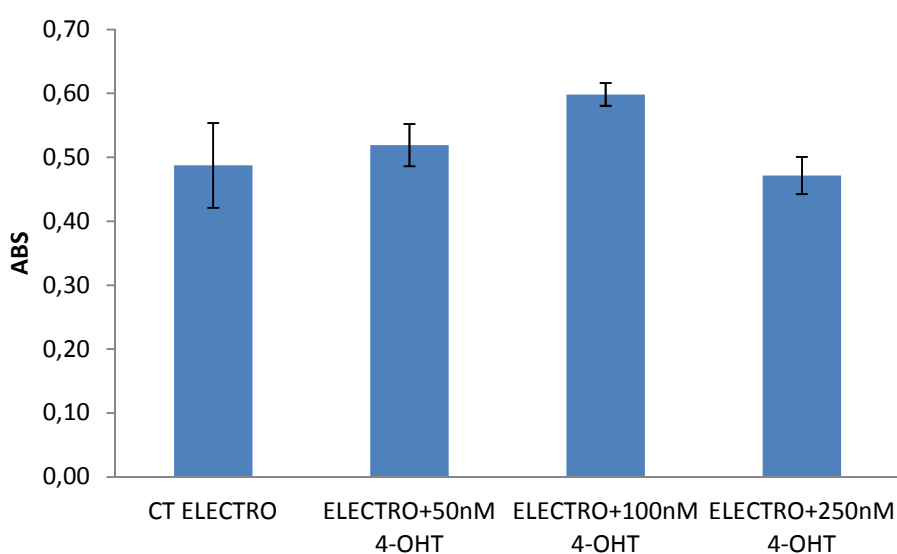


Figura 9. Ensayo XTT que muestra la sensibilidad de las células electroporadas a la presencia de 4-OHT en el medio a diferentes concentraciones.

En base a estos resultados, de ausencia de toxicidad, en la literatura existente, y observando un efecto a 50-100 nM en las muestras electroporadas (aunque no significativo), se decidió utilizar la concentración 100 nM en los ensayos subsiguientes.

4.2. Amplificación por inducción de la expresión de c-myc mediada por la adición de 4-hidroxitamoxifeno. Estudio de expresión.

Se realizaron dos ensayos para determinar la proliferación celular de las células transfectadas con el plásmido así como su capacidad de auto-renovación. La proliferación se determinó mediante ensayos XTT y midiendo el área de las neuroesferas (directamente proporcional al

número de células) mientras que para medir la capacidad de auto-renovación se contabilizó el nº de neuroesferas.

El crecimiento en los DIV 1, 2, 3, 4, 7 de todas las condiciones quedó registrado mediante fotografías siendo las más representativas las recogidas en las figuras 10 y 11.

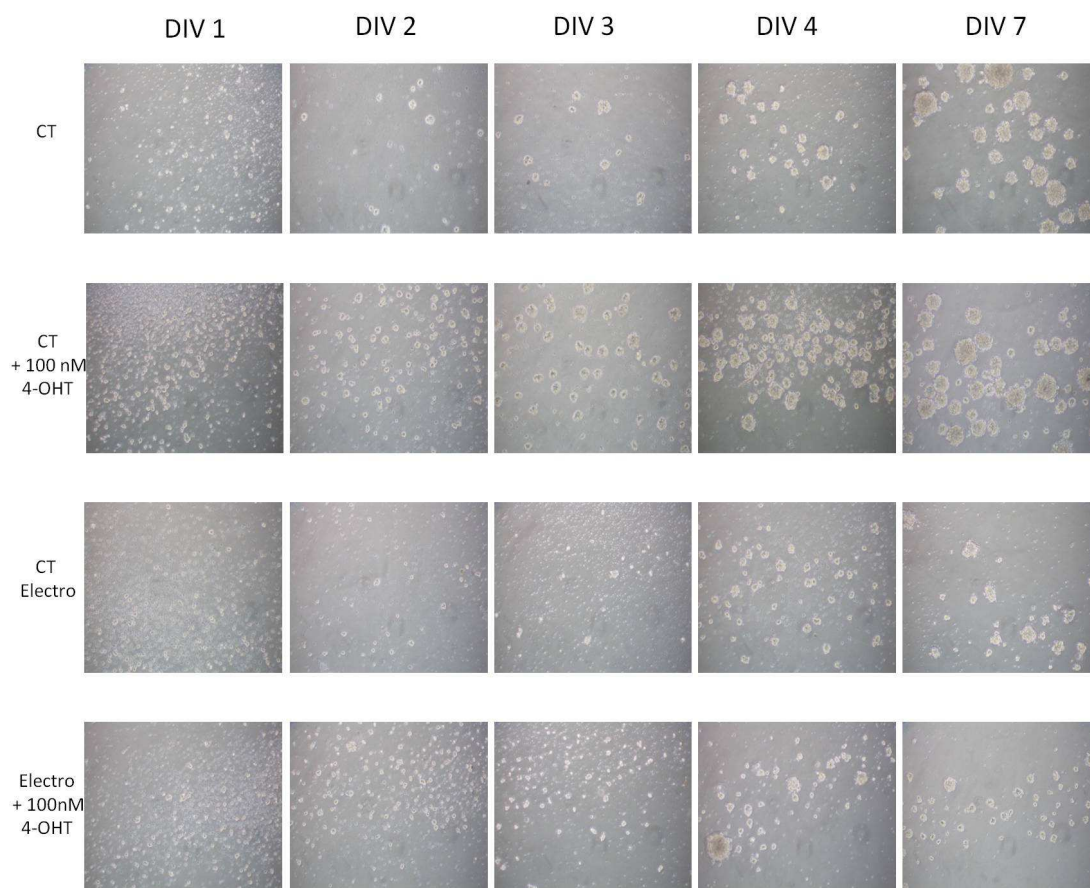


Figura 10. Selección de imágenes, del primer ensayo, de las NF en diferentes DIV y de las diferentes concentraciones.

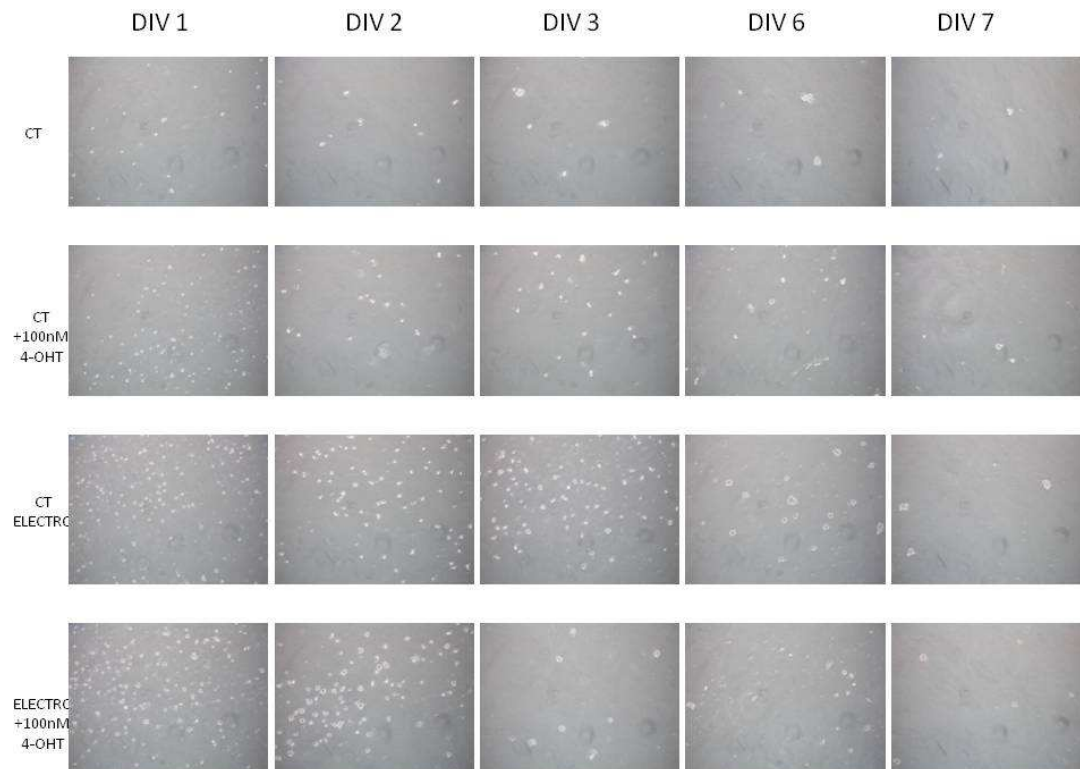


Figura 11. Selección de imágenes, del segundo ensayo, de las NF en diferentes DIV y de las diferentes concentraciones.

4.2.1. Proliferación

La proliferación celular se evaluó con dos ensayos consecutivos e independientes, mediante XTT (Tabla 4) (Figura 12) y midiendo el área de las neuroesferas (Tabla 5) (Figura 13) a DIV 7 de controles electroporados sin 4-OHT comparando con células electroporadas a las que se añadió 4-OHT a días alternos a dosis de 100 nM.

Tabla 4. Media de las absorbancias para los dos ensayos por separado y en conjunto.

CONDICIÓN	MEDIA ABS PRIMER ENSAYO	MEDIA ABS SEGUNDO ENSAYO	MEDIA ABS AMBOS ENSAYOS
CT ELECTRO	0,3560 ± 0,0260	0,3393 ± 0,0269	0,3480 ± 0,0245
ELECTRO+100nM 4-OHT	0,3590 ± 0,0545	0,3233 ± 0,0211	0,3410 ± 0,0394

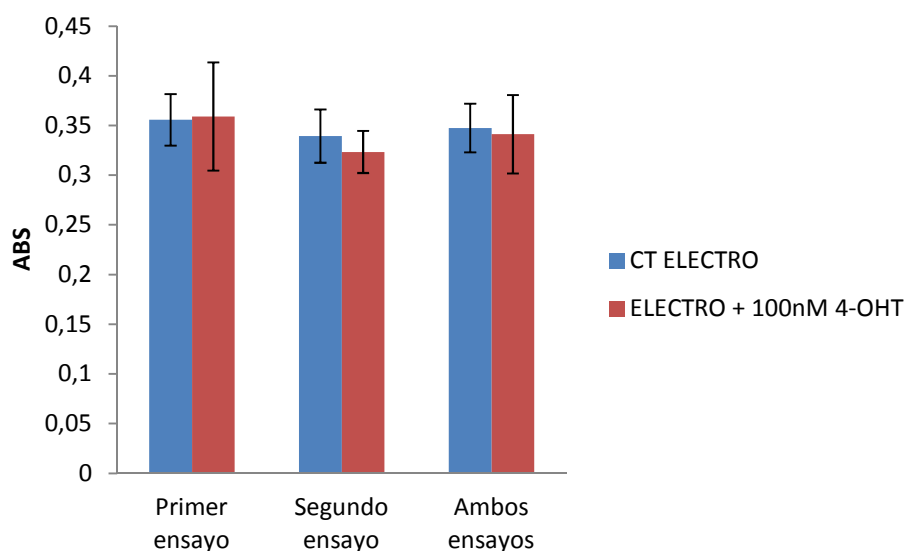


Figura 12. ABS del primer y segundo ensayo medido en ensayo XTT para las condiciones control electroporado y electroporado +100nM 4-OHT y de ambos ensayos en conjunto.

En ambos ensayos, no hubo diferencias significativas en cuanto a la viabilidad mediante XTT a la dosis estudiada (p-valor=0,819)

A continuación, se quiso comprobar si las neuroesferas eran más grandes (mayor área) lo que de forma indirecta suponía un aumento de la proliferación, para tener en cuenta únicamente las neuroesferas y no las células individuales que podrían artefactar el resultado. Se midió el área de todas las neuroesferas a día DIV 7 (sumatorio en μm^2) con el programa ImageJ y se ajustó el valor al número de neuroesferas total para obtener el valor medio de área por neuroesfera. (Tabla 5) (Figura 13).

Tabla 5. Media de las áreas para los dos ensayos por separado y en conjunto.

CONDICIONES	MEDIA DE LAS ÁREAS (μm^2) DEL PRIMER ENSAYO	MEDIA DE LAS ÁREAS (μm^2) DEL SEGUNDO ENSAYO	MEDIA DE LAS ÁREAS (μm^2) DE AMBOS ENSAYOS
CT ELECTRO	252,41 ± 24,80	358,06 ± 56,02	305,24 ± 31,21
ELECTRO+100nM 4-OHT	340,42 ± 21,10	365,88 ± 59,46	353,15 ± 30,55

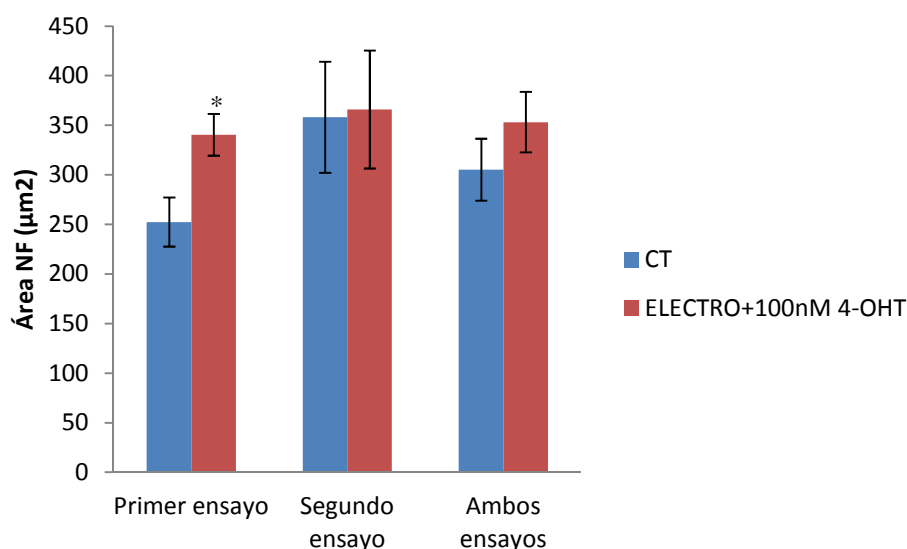


Figura 13. Valores de las áreas de los dos ensayos por separado y en conjunto.

En el primer ensayo, el área total de neuroesferas resultó significativamente mayor en el caso electroporado con 4-OHT (p-valor=0,009). En el segundo ensayo, también se observó un aumento del área total de neuroesferas a favor de las NSCs tratadas (que no resultó significativo p-valor = 0,922) así como un aumento del área media de neuroesferas. La media de ambos ensayos muestra una tendencia a mayor área en células electroporadas tratadas con 4-OHT (p-valor =0,269).

Al ajustar por n° de neuroesferas, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6) (Figura 14). Si se analizan ambos ensayos en conjunto los resultados son similares a cuando se analizan por separado puesto que, aunque se observa una tendencia hacia un mayor nivel de proliferación en el caso de la condición electroporada +100nM 4-OHT este resultado no es significativo ya que se obtiene un p-valor de 0,381.

Tabla 6. Valores de áreas/n° NF para cada ensayo a DIV 7 y para el conjunto de ambos ensayos.

CONDICIÓN	MEDIA DEL ÁREA/Nº	MEDIA DEL ÁREA/Nº	MEDIA DEL ÁREA/Nº
	NF EN EL PRIMER ENSAYO	NF EN EL SEGUNDO ENSAYO	NF EN AMBOS ENSAYOS
CT ELECTRO	20,33 ± 3,027	144,22 ± 55,88	78,85 ± 30,55
ELECTRO+100nM 4-OHT	18,55 ± 2,83	223,66 ± 67,53	121,11 ± 37,95

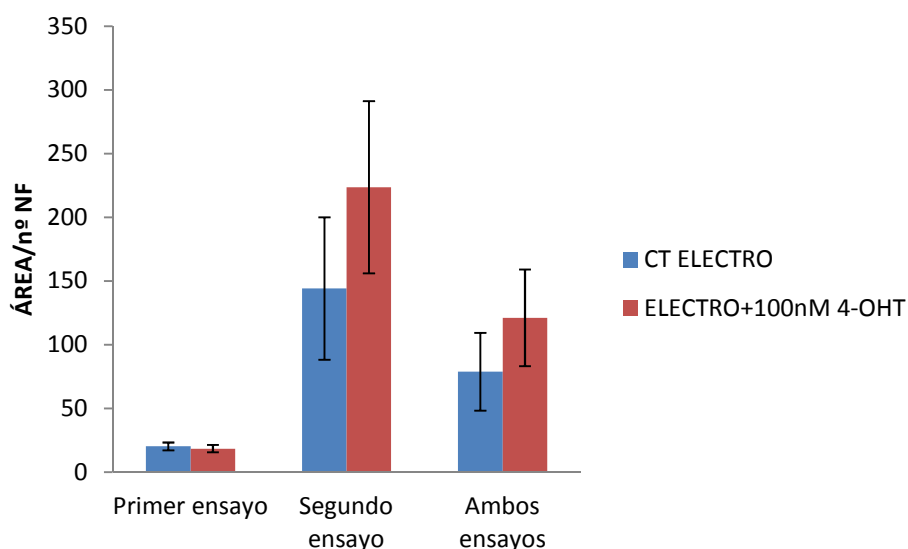


Figura 14. Valores de áreas/nº NF para cada ensayo a DIV 7 y para el conjunto de ambos ensayos

4.2.2. Auto-renovación

Se contabilizó el número de neuroesferas generadas a partir de un mismo número de células sembradas, células electroporadas control y tras adición de 100nM 4-OHT (Tabla 7) (Figura 15). Se realizaron tres réplicas por cada condición. En este caso se obtuvieron resultados dispares entre experimentos.

El número de neuroesferas en el primer ensayo fue mayor en los pocillos tratados que en los controles, aunque no fue una diferencia significativa tras realizar estadística. Por el contrario, en el 2º ensayo el control tuvo más neuroesferas (aunque la diferencia fue mínima p-valor= 0,187) que las células tratadas, y llamó la atención el número escaso de neuroesferas formadas. La media de ambos ensayos mostraba una tendencia a formar más neuroesferas por parte de las células electroporadas + 4-OHT (p-valor=0,319).

Tabla 7. Media del nº de NF, de los dos ensayos por separado y juntos, de las células electroporadas con y sin 4-OHT a DIV 7.

CONDICIÓN	MEDIA DEL Nº DE NF DEL PRIMER ENSAYO	MEDIA DEL Nº DE NF	
		DEL SEGUNDO ENSAYO	MEDIA DEL Nº DE NF DE AMBOS ENSAYOS.
CT ELECTRO	16,13 ± 2,77	4,80 ± 1,20	10,47 ± 1,81
ELECTRO+100nM 4-OHT	24,53 ± 4,10	3,01 ± 0,52	13,80 ± 2,84

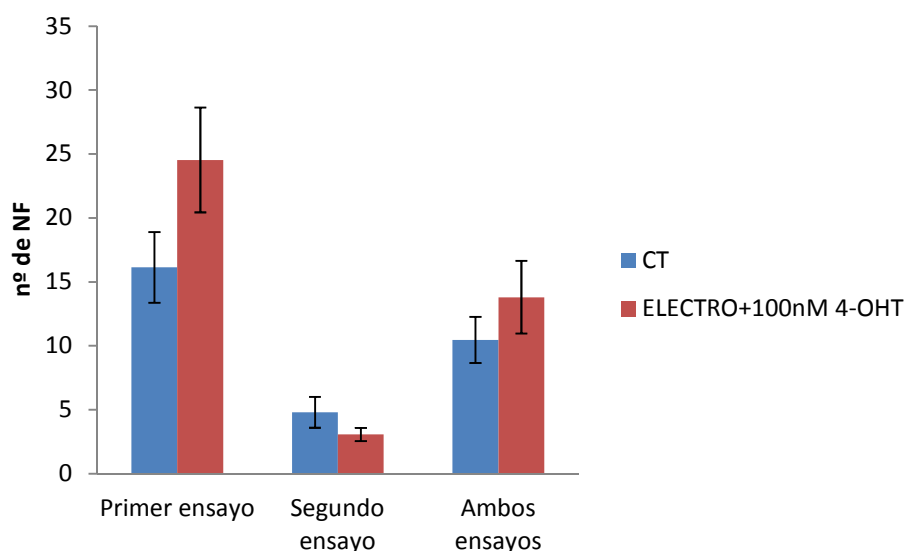


Figura 15. Número de NF, en los dos ensayos por separado y juntos, de las células control electroporadas vs células tratadas con 4-OHT a DIV 7.

4.2.3. Selección de células transfectadas mediante Higromicina

Los experimentos precedentes se realizaron sobre células electroporadas no seleccionadas, es decir, que no se utilizó el gen de resistencia incorporado al plásmido pCEP4 para seleccionar las células transfectadas. Esto fue debido a que no se quiso introducir el factor de toxicidad asociado a la higromicina en un primer momento. Sin embargo, en los pases posteriores al cultivo primario (primer pase del segundo ensayo), sí que se añadió la higromicina al medio para que los resultados obtenidos fueran solo adscribibles a las células electroporadas.

La proliferación, (Tabla 8) (Figura 16) medida como área total de neuroesferas mostró un aumento significativo de las áreas de las células electroporadas con 100 nM respecto a células electroporadas sin 4-OHT (p -valor=0,0086). El factor de confusión de células no transfectadas que pudiesen proliferar fue eliminado. El área media de neuroesferas no variaba en ambas condiciones.

Respecto a la auto-renovación, (Tabla 9) (Figura 17) el aumento del número de neuroesferas fue significativo en las muestras electroporadas con 100 nm de 4-OHT (p -valor=0,024).

Tabla 8. Áreas de las diferentes condiciones de las células seleccionadas con higromicina a DIV 7.

CONDICIÓN	ÁREA (μm)	Área /nº NF
CT ELECTRO	175,82 \pm 76,64	175,82 \pm 32,62
ELECTRO + 100nM 4-OHT	460,15 \pm 62,38	115,04 \pm 24,06

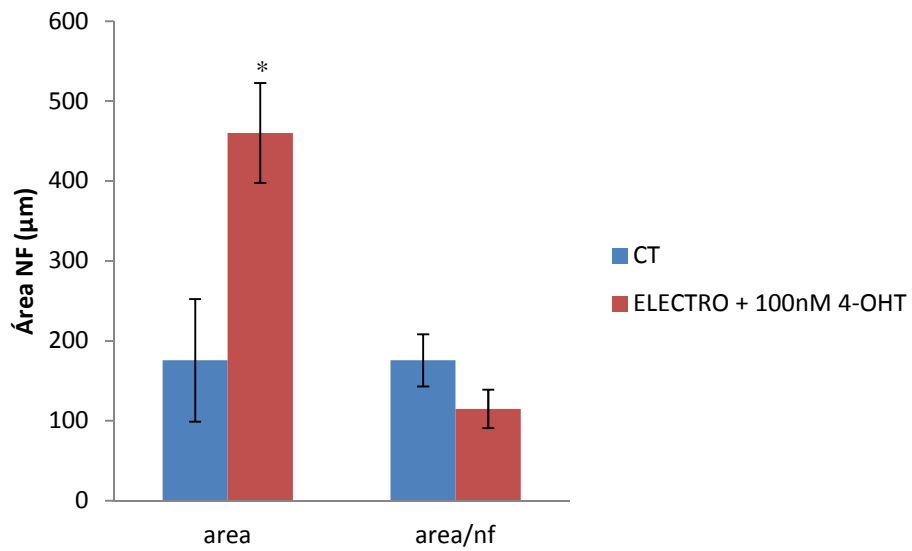


Figura 16. Área de control electroporado vs electroporado +100nM de 4-OHT en las células tratadas con higromicina y área/nº NF.

Tabla 9. Media del número de NF tratadas con higromicina a DIV 7 para diferentes condiciones.

CONDICIÓN	MEDIA DEL Nº DE NF
CT ELECTRO	1,00 ± 0,38
ELECTRO+100nM 4-OHT	4,00 ± 1,00

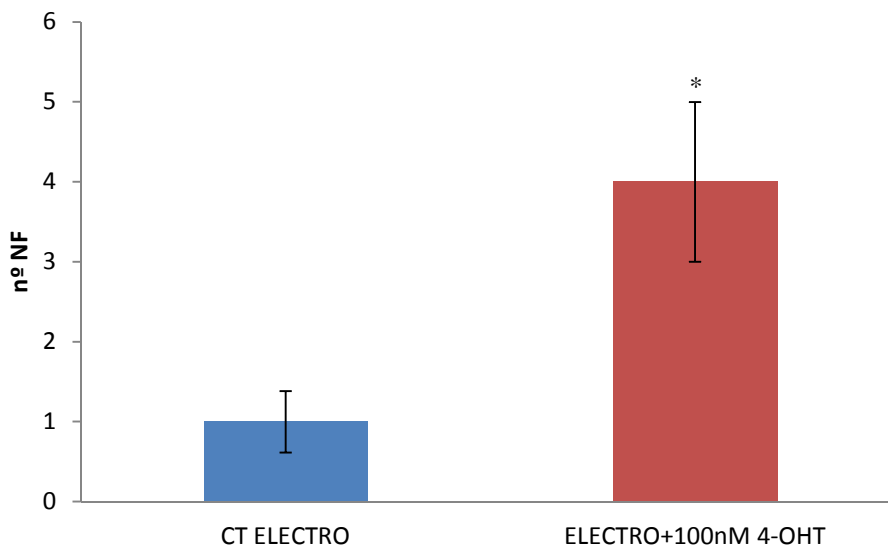


Figura 17. Nº de NF del control electroporado vs electroporado + 100nM 4-OHT.

4.3. Estudio fenotípico de las células transfectadas. Capacidad de diferenciación.

En 1mL de suspensión celular se contaron 135.000 células para la condición control + 100nM de 4-OHT, 15.000 células para la condición de células electroporadas + 100 nM de 4- OHT, 0 células para el control de electroporación y 20.000 células para el control A pesar de contar 0 células en el caso del control de electroporación, se podía ver en la cámara la existencia de células y por ello también se sembraron en la chamber-slide.

Sin embargo esta baja densidad de siembra no permitió finalizar el estudio de caracterización mediante técnicas inmunohistoquímicas específica

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigó la capacidad del 4-OHT para inducir la expresión del c-mycER^{TAM} y comprobar cómo afectaba a la capacidad de auto-renovación y de proliferación en la células madre neuronales que se encontraban *in vitro* en forma de NF.

En primer lugar, se comprobó mediante una RT-PCR la expresión correcta del plásmido en la célula. Se determinó que la expresión del plásmido tenía lugar. Cuando el 4-hidroxi-tamoxifeno se añade al medio de cultivo, se une al receptor murino modificado provocando la dimerización de la proteína de fusión y permitiendo que adquiriera su conformación activa, traslocándose al núcleo donde el c-myc ejerce su función como factor de transcripción (Ming *et al.*, 1999; Stevanato *et al.*, 2009). Sin embargo, en este estudio, no se investigó si se produjo la dimerización y la traslocación al núcleo que sería responsable de la acción de c-myc sobre la proliferación, lo que sería recomendable como control interno del buen funcionamiento de la construcción. Esto sería posible realizarlo mediante inmunocitoquímica con anticuerpo anti-c-myc antes y después de la adición de 4-OHT comprobando un aumento de la expresión de c-myc en el núcleo en el segundo caso. Otra alternativa habría sido el uso de la PCR cuantitativa (qPCR), aislando el núcleo y empleando cebadores específicos para el c-myc (Cohen *et al.*, 2009).

En cuanto al efecto que puede tener el 4-OHT en las células, se ha comprobado que el 4-OHT no es tóxico si no se superan concentraciones de 1 μ M (Chang *et al.*, 1999) y además se ha conseguido establecer líneas de células madre neurales clonales embrionarias empleando esta tecnología (Pollock *et al.*, 2006). Para comprobar la sensibilidad de las células al 4-OHT se realizó una curva de dosis con células sin electroporar y empleando distintas dosis de fármaco (50nM, 100nM y 250nM). Se observó que se producía un aumento del número de la capacidad de la auto-renovación y/o supervivencia para la dosis de 50nM pero este aumento no se observó para las dosis de 100nM y de 250nM. En todo caso, no se observó efecto tóxico secundario al

4-OHT. Se realizó otro ensayo con las mismas dosis de 4-OHT pero con las células electroporadas y se observó de nuevo un aumento de la auto-renovación, en este caso a dosis de 100 nM. Por este motivo y por referencias bibliográficas (Pollock *et al.*, 2006; Stevanato *et al.*, 2009) el resto de ensayos se realizaron a una concentración de 100nM.

En cada uno de los ensayos posteriores de auto-renovación y proliferación tras activación de c-myc, se realizó un análisis de la capacidad de auto-renovación contando el nº de NF y un análisis de la proliferación celular mediante ensayo XTT y medida del área de las NF.

En ninguno de los dos ensayos de auto-renovación se obtuvieron resultados significativos. Se observó un aumento del nº de NF en la condición tratada con 4-OHT en el primer ensayo mientras que en el segundo el aumento se observó en la condición control electroporado. Cuando se analizaron ambos ensayos en conjunto se observó un mayor nº de NF en la condición electroporado + 100nM 4-OHT, pero estos resultados no se pudieron considerar estadísticamente significativos.

En el caso de los ensayos de proliferación, en el XTT se observaron niveles de proliferación similares en ambas condiciones siendo estos resultados no significativos para ambos ensayos.

La proliferación medida como aumento de área permitió observar en el primer ensayo un aumento significativo del tamaño de las NF para la condición tratada con 4-OHT mientras que en el segundo ensayo este aumento apenas se observó y no se trató de un resultado significativo. Cuando las áreas de las NF de ambos ensayos se analizaron en conjunto los resultados obtenidos fueron similares a cuando se analizaron por separado. Se vio un aumento no significativo del nivel de proliferación en el caso de la condición electroporada +100nM 4-OHT.

En estos casos, tanto la medida de la auto-renovación como de la proliferación, hay que destacar la existencia de una tendencia a aumentar el número de células y la auto-renovación. Aquí no se puede excluir que se deba al efecto del 4-OHT que también mostró en las NSCs controles un aumento de la auto-renovación. En cuanto a la proliferación, existe un factor de confusión que se trata de las NSCs que, aunque electroporadas, no han incorporado el plásmido. Estas células podrían dividirse más rápidamente, por no sufrir los potenciales efectos deletéreos de la expresión plasmídica en su supervivencia. En este supuesto, se infraestimarían las diferencias existentes entre controles electroporados sin tratar y tratados, de forma más evidente cuanto menor fuese la eficiencia de la transfección.

Para evitar esto, y con el objetivo de comprobar si estas células podrían establecer una línea celular se seleccionaron con higromicina, lo que eliminaba las células no electroporadas que podían tener una ventaja proliferativa. Esta medida mejoró los resultados obteniéndose un aumento significativo tanto del nivel de auto-renovación de las células tratadas con 4-OHT como del nivel de proliferación, pero disminuyó la viabilidad de los cultivos ya que las NSCs adultas son células muy delicadas y poco resistentes a cambios en el medio.

Los resultados son alentadores pero parece que el efecto en las NSCs adultas de esta tecnología dista de parecerse al que posee en otros tipos celulares: células CHO, NSC

embrionarias, fibroblastos... Por ello se planteó que puede ocurrir en las NSCs adultas que no ocurra en los otros tipos celulares mencionados.

Habría que tener en cuenta la posible inactivación del gen *c-myc* por la propia maquinaria supresora de oncogenes de la célula y debería investigarse, en la dirección opuesta, el efecto sobre otros factores de transcripción o genes de control del ciclo celular. Por ejemplo, el gen supresor de tumores *p53*, se ha visto que está íntimamente relacionado con la expresión de *c-myc*, y la sobreexpresión de *c-myc* induce un aumento de expresión de *p53*, lo que ocasiona la muerte por apoptosis de la célula. A su vez, *p53* inhibiendo la expresión del oncogen *c-myc* a niveles post-transcripcionales (Sachdeva *et al.*, 2009). *p53* se sigue expresando en la SVZ adulta, de forma específica en las células madre y progenitores neurales. Mediante una RT-PCR cuantitativa de *p53* y otros genes del ciclo celular se podría identificar cambios de expresión en dichos genes y por tanto indicaría que podría estar ejerciendo una acción reguladora sobre el *c-myc*, que en condiciones normales tendrían una finalidad protectora frente a tumores.

Aunque se ha demostrado en otros tipos celulares que la tecnología *c-mycER^{TAM}* no afecta al fenotipo celular ni al potencial de diferenciación, se quiso determinar dicha capacidad de diferenciación de las NF electroporadas tras haber sido tratadas con 4-OHT, pero desafortunadamente no se pudo continuar con el proceso puesto que la densidad celular que se obtuvo no fue la adecuada. Debería realizarse en próximos ensayos el potencial de diferenciación mediante ensayos inmunocitoquímicos con anticuerpos específicos de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

VI. CONCLUSIÓN

Se observa una tendencia hacia el aumento de la proliferación de las células transfectadas con el plásmido y tratadas con el 4-OHT a una concentración de 100nM, sin embargo, se requieren más ensayos con el fin de estudiar el perfil de expresión de genes del ciclo celular, el potencial fenotípico de células tratadas y la estabilidad genética de esas células.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ALTMAN, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals?. *Science.*, 135(3509): 1127-1128.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCIA-VERDUGO, J.M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.*, 22(3): 629-34.
- BEZ, A.; CORSINI, E.; CURTI, D.; BIGGIOGERA, M.; COLOMBO, A.; NICOSIA, R.F.; PAGANO, S.F.; PARATI, E.A. (2003). Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res.*, 993(1-2): 18-29.
- BLURTON-JONES, M.; KITAZAWA, M.; MARTINEZ-CORIA, H.; CASTELLO, N.A.; MÜLLER, F.J.; LORING, J.F.; YAMASAKI, T.R.; POON, W.W.; GREEN, K.N.; LAFERLA, F.M. (2009). Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(32): 13594-13599.
- CARLETTI, B.; PIEMONTE, F.; ROSSI, F. (2011). Neuroprotection: the emerging concept of restorative neural stem cell biology for the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr Neuropharmacol.*, 9(2): 313-317.
- CHANG M.F.; CAN, S.; YONG, X.H. (1999). Deregulated c-myc expression in quiescent CHO cells induces target gene transcription and subsequent apoptotic phenotype. *Cell Research.*, 9: 305-314.
- CHENG, Y.; ZHANG, J.; DENG, L.; JOHNSON, N.R.; YU, X.; ZHANG, N.; LOU, T.; ZHANG, Y.; WEI, X.; CHEN, Z.; HE, S.; LI, X.; XIAO, J. (2015). Intravenously delivered neural stem cells migrate into ischemic brain, differentiate and improve functional recovery after transient ischemic stroke in adult rats. *Int J Clin Exp Pathol.*, 8(3):2928-293.
- CHUCKOWREE, J.A.; DICKSON, T.C.; VICKERS, J.C. (2004). Intrinsic regenerative ability of mature CNS neurons. *Neuroscientist.*, 10(4):280-285.
- DOETSCH, F.; GARCÍA-VERDUGO, J.M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. (1997). Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *The Journal of Neuroscience.*, 17(13): 5046-5061.
- DOETSCH, F.; CAILLÉ, I.; Lim, D.A.; GARCÍA-VERDUGO, J.M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.*, 97(6): 703-716.
- DUNN, S.; COWLING, V.H. (2015). Myc and mRNA capping. *Biochim Biophys Acta.*, 1849(5): 501-505.

- ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJÖRK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.*, 4(11): 1313-1317. GAGE, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science.*, 287(5457): 1433-1438.
- GIL-PEROTÍN, S.; DURAN-MORENO, M.; CEBRIÁN-SILLA, A.; RAMÍREZ, M.; GARCÍA-BELDA, P.; GARCÍA-VERDUGO, J.M. (2013). Adult Neural Stem Cells From the Subventricular Zone: A Review of the Neurosphere Assay. *The Anatomical Record.*, 296: 1435-1452.
- GINCSBERG, G.; ARIEN-ZAKAY, H.; LAZAROVICI, P.; LELKES, P.I. (2012). Neural stem cells: therapeutic potential for neurodegenerative diseases. *Br Med Bull.*, 104: 7-19.
- GOLD, R.; LININGTON, C.; LASSMANN, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.*, 129(8): 1953-1971.
- HORNER, P.J.; GAGE, F.H. (2000). Regenerating the damaged central nervous system. *Nature.*, 407(6807): 963-70.
- JENSEN, J.B.; PARMAR, M. (2006). Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol Neurobiol.*, 34(3): 153-161.
- KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. (2000). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp.*, 231: 220-235.
- LITTLEWOOD, T.D.; HANCOCK, D.C.; DANIELIAN, P.S.; PARKER, M.G.; EVAN G.I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.*, 23(10): 1686-1690.
- LOUIS, S.A.; RIETZE, R.L.; DELEYROLLE, L.; WAGEY, R.E.; THOMAS, T.E.; EAVES, A.C.; REYNOLDS, B.A. (2008). Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colonyforming cell assay. *Stem Cells.*, 26: 988-996.
- MAHFOUDI, A.; ROULET, E.; DAUVOIS, S.; PARKER, M.G.; WAHLI, W. (1995). Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to full agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(10):42.
- NAM, H.; LEE, K.H.; NAM, D.H.; J, K.M. (2015). Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status and prospect. *World J Stem Cells.*, 7(1): 126-136.

- PLUCHINO, S.; QUATTRINI, A.; BRAMBILLA, E.; GRITTI, A.; SALANI, G.; DINA, G.; GALLI, R.; DEL CARRO, U.; AMADIO, S.; BERGAMI, A.; FURLAN, R.; COMI, G.; VESCOVI, A.L.; MARTINO, G. (2003). Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature.*, 422(6933): 688-694.
- POLLOCK, K.; STROEMER, P.; PATEL, S.; STEVANATO, L.; HOPE, A.; MILJAN, E.; DONG, Z.; HODGES, H.; PRICE, J.; SINDEN, J.D. (2006). A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol.*, 199(1): 143-155.
- RAEDT, R.; VAN DYCKE, A.; WAEYTENS, A.; WYCKHUYS, T.; VONCK, K.; WADMAN, W.; BOON, P. (2009). Unconditioned adult-derived neurosphere cells mainly differentiate towards astrocytes upon transplantation in sclerotic rat hippocampus. *Epilepsy Res.*, 87(2-3): 148-59.
- REYNOLDS, B.A.; WEISS, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.*, 255(5052): 1707-1710.
- Sachdeva, M.; Zhu, S.; Wu, F.; Wu, H.; Walia, V.; Kumar, S.; Elble, R.; Watabe, K.; Mo, Y.Y. (2008). p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(9): 3207-3212.
- SILVESTROFF, L.; FRANCO, P.G.; PASQUINI, J.M. (2013). Neural and oligodendrocyte progenitor cells: transferrin effects on cell proliferation. *ASN Neuro.*, 5(1): 43-62.
- SPALDING, K.L.; BERGMANN, O.; ALKASS, K.; BERNARD, S.; SALEHPOUR, M.; HUTTNER, H.B.; BOSTRÖM, E.; WESTERLUND, I.; VIAL, C.; BUCHHOLZ, B.A.; POSSNERT, G.; MASH, D.C.; DRUID, H.;FRISÉN, J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell.*, 153(6): 1219-1227.
- STEVANATO, L.; CORTELING, R.L.; STROEMER, P.; HOPE, A.; HEWARD, J.; MILJAN, E.A.; SINDEN, J.D. (2009). c-MycERTAM transgene silencing in a genetically modified human neural stem cell line implanted into MCAo rodent brain. *BMC Neurosci.*, 10:86.
- SUN, T.; WANG, X.J.; XIE, S.S.; ZHANG, D.L.; WANG, X.P.; LI, B.Q.; MA, W.; XIN, H. (2011). A comparison of proliferative capacity and passaging potential between neural stem and progenitor cells in adherent and neurosphere cultures. *Int J Dev Neurosci.*, 29(7): 723-731.
- WEISS, S.; DUNNE, C.; HEWSON, J.; WOHL, C.; WHEATLEY, M.; PETERSON, A.C.; REYNOLDS, B.A. (1996). Multipotent CNS Stem Cells Are Present in the Adult Mammalian Spinal Cord and Ventricular Neuroaxis. *The Journal of Neuroscience.*, 16(23): 7599-7609.

- YU, H.; CAO, B.; FENG, M.; ZHOU, Q.; SUN, X.; WU, S.; JIN, S.; LIU, H.; LIANHONG, J. (2010). Combined Transplantation of Neural Stem Cells and Collagen Type I Promote Functional Recovery After Cerebral Ischemia in Rats. *The Anatomical Record.*, 293: 911-917.
- ZIEGLER, A.N.; LEVISON, S.W.; WOOD, T.L. (2015). Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. *Nat Rev Endocrinol.*, (3): 161-170.