



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y
NEUROCIENCIAS**

“Silenciamiento de Gas1 en células troncales neurales”

T E S I S

Que presenta:

Q. F. B. Guadalupe Rivera Torruco

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y
MOLECULAR**

Dr. José Victo Segovia Vila

Ciudad de México

Agosto, 2017

ÍNDICE

ÍNDICE	2
RESUMEN	4
ABSTRACT.....	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	7
1. Cáncer	7
1.1 Tumores en el Sistema Nervioso Central	9
1.2 Gliomas	9
1.3 Tratamientos	10
2. Células troncales neurales	12
2.1 Células troncales del Giro Dentado	13
3. Células troncales cancerosas	16
4. Gas1.....	18
4.1 Funciones de Gas1.....	19
4.2 Gas1 en cáncer	20
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	22
A. Planteamiento	22
B. Pregunta Científica	22
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVOS.....	24
Objetivo general	24
Objetivos particulares.....	24
METODOLOGÍA	25
1. Generación de neuroesferas a partir de cultivos primarios.	25
2. RT-PCR	25
3. Silenciamiento de Gas1.....	27
4. qRT-PCR	28
RESULTADOS	30
1. Estandarización del cultivo de neuroesferas derivadas de giro dentado	30
2. Expresión genica de marcadores de troncalidad, mGas1 y RET.....	31

3. Estandarización de la transfección de las neuroesferas derivadas de GD de ratón neonato.	32
4. Evaluación de los cambios morfológicos de las neuroesferas con el siRNA de Gas1	33
5. Evaluación de la proliferación celular	35
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
CONCLUSIÓN	40
PERSPECTIVAS	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42

RESUMEN

Gas1 es una proteína pleiotrópica, ya que dependiendo del contexto celular será la función que desempeñe. Gas1 provoca la detención del ciclo celular y su sobreexpresión promueve la apoptosis celular al modular negativamente la señalización mediada por GDNF/GFR α 1/RET. Por otra parte su rol en el desarrollo embrionario es vital, los ratones Gas1 $-/-$ no son viables, debido a que Gas1 actúa como un co-receptor de la vía de Sonic Hedgehog (Shh). Esta proteína se expresa abundantemente en etapas embrionarias y en el cerebro del ratón adulto, incluyendo los nichos neurogénicos. Uno de los nichos neurogénicos más estudiados es la zona subgranular del giro dentado (GD), en esta región se originan células troncales neurales que terminaran diferenciándose a neuronas granulares. Se ha propuesto que existe una relación entre la carcinogénesis y las células troncales neurales, ya que en el cerebro, son las únicas células que pueden proliferar y adquirir mutaciones que las lleven a originar un tumor. Diversos reportes apuntan que Gas1 actúa como una proteína supresora de tumores, su presencia previene el crecimiento exacerbado de las células mientras que su disminución en líneas cancerosas está asociado con una mayor proliferación y metástasis. Con la finalidad de observar si este efecto se reproducía en las células troncales neurales derivadas del GD, en primer lugar se encontró que estas células expresan marcadores típicos de troncalidad como son cMyc, Nanog, Sox2 y Shh pero no a RET. Posteriormente se realizó el silenciamiento de Gas1 y se evaluó la expresión génica por qRT-PCR de genes implicado en proliferación celular, de manera interesante se encontró una reducción de casi el 80% en el marcador de proliferación Ki67, acompañado de la disminución de cMyc, Nanog y Sox2. Al hacer el análisis morfológico se observó que las neuroesferas con Gas1 silenciado aumentaban de tamaño pero disminuían en cantidad, este efecto podría deberse a la coalescencia, un fenómeno que presentan las neuroesferas con lo que pueden aumentar de tamaño sin observar un incremento en la proliferación. Estos resultados sugieren que Gas1 en las neuroesferas derivadas del GD posee un papel similar al que tiene en el desarrollo embrionario, actuando como co-receptor de Shh para promover la sobrevivencia y proliferación ya que estas células expresan Shh pero no RET.

ABSTRACT

Gas1 is a pleiotropic protein that depends of the cellular context to determinate the function played. Gas1 induces cell cycle arrest and his overexpression causes apoptosis by negatively modulate the signaling pathway GDNF/GFR α 1/RET. Moreover, in developmental embryo is fundamental due to act as co-receptor for the Sonic Hedgehog (Shh) pathway. This protein is profusely expressed in embryonic stages and adult mice brain, including the neurogenic niches. The subgranular zone of the dentate gyrus is one of the most studied neurogenic niches, where remains a pool of neural stem cells that can go trough differentiation in order to become mature granular neurons. It's been proposed a close relationship between neural stem cells (NSC) and carcinogenesis, because in the brain NSC are the only cell population that can proliferate and likely acquire mutations to possibly originate a brain tumor. So many reports, proposes Gas1 as a tumor suppressor protein, the expression of this protein prevents abnormal proliferation and is downregulated in cancer cell lines, this downregulation is associated with higher proliferation rate and metastasis. With the purpose to evaluate the effect in decreasing Gas1 in neural stem cells from dentate gyrus (DG), primarily we found the expression of stemness mRNA of cMyc, Nanog, Sox2 and Shh but the absence of RET. However, the Gas1 downregulation by siRNAs shows by qRT-PCR a reduction in mRNA of genes involved in cell proliferation, there was a 80% decrease in ki67 and a slight reduction of the expression of cMyc, Nanog and Sox2. The morphologic studies revealed and interesting effect, the neurospheres with Gas1 siRNA become bigger than controls but also decrease in quantity, suggesting an effect called coalescence, this phenomenon will explain the changes in size without increasing proliferation rate. This results in the neurospheres from DG suggest Gas1 is acting more like in developing brain as a Shh co-receptor to promote proliferation and survival, because this cells express Shh but there is not RET expression.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

WHO/OMS	<i>World Health Organization/Organización Mundial de la Salud</i>
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
SNC	Sistema Nervioso Central
CTN	Células troncales neurales
CTC	Células troncales cancerosas
ZSV	Zona subventricular
GD	Giro dentado
CA3	Cuerno de Amón 3
bFGF	<i>Basic fibroblastic growth factor</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Gas1	<i>Growth-arrest-specific 1</i>
GPI	Glicofosfatidil inositol
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFRα	<i>GDNF family receptor-α</i>
Akt	<i>Protein kinase B</i>
Ret	Receptor tirosina cinasa “ <i>rearranged during transfection</i> ”
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
DCX	Doblecortina

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer es un problema de salud pública, actual y creciente, con una incidencia a nivel mundial de 14.1 millones de casos y 8.2 millones de muertes debidas a esta enfermedad. De este total, América Latina representa el 7.8% de incidencia y 7.4% de mortalidad, donde el cáncer de mama, próstata y pulmón son los de mayor ocurrencia y letalidad. (Ferlay et al., 2013)

En nuestro país durante el año 2013, se tenía que del total de defunciones en personas con menores de 20 años, 5.4% de ellas se debió a algún tumor y de estas, 86.3% se debió a tumores malignos. En el caso de los fallecimientos en la población mayor a 20 años, 13.6% se debieron a algún tumor y de estos, 93.6% a los tumores malignos. (INEGI, 2015)

Cabe destacar que el cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa con mayor incidencia entre adultos, en comparación con niños y jóvenes. Además, éste es un padecimiento que no hace distinción de razas, nivel socioeconómico o sexo. Esto tiene como consecuencia un impacto socioeconómico fuerte, debido a los costosos tratamientos y la incapacidad que genera para pacientes en estados avanzados. En nuestro país esto ocurre con frecuencia ya que muchas veces el diagnóstico es tardío.

El cáncer se define como el crecimiento incontrolado de las células, las cuales pueden invadir y diseminarse a diversos lugares del organismo. ("WHO: Cancer," 2016) Se han descrito características biológicas adquiridas ya sea genéticamente o por exposición a agentes cancerígenos que propician el desarrollo de un tumor, de forma típica muchos tipos de cáncer mantienen una señalización proliferativa, son capaces de evadir a las proteínas supresores de crecimiento, son resistentes a la muerte celular, poseen un potencial ilimitado de replicación, inducen mecanismos de invasión, colateralmente

habrá inestabilidad en el genoma así como inflamación, potenciando un microambiente tumoral. (Hanahan & Weinberg, 2011)

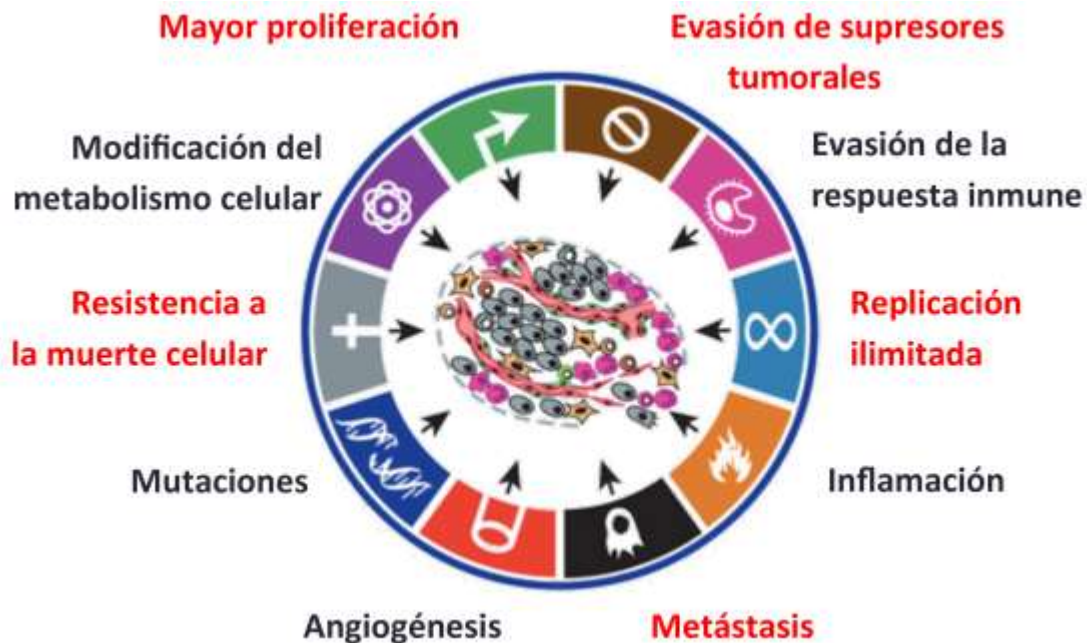


Figura 1. Características del cáncer. Adaptado de “Hallmarks of cancer: the next generation”, por Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). *Cell*, Pagina 647.

Cualquier parte del cuerpo es susceptible de verse afectada, de forma tal que existen más de 100 tipos de esta enfermedad. Si bien no hay una causa directa que origine su aparición, la OMS clasifica los agentes cancerígenos en tres grandes grupos:

- Cancerígenos físicos: radiaciones ionizantes y ultravioleta.
- Cancerígenos químicos: tabaco, alcohol, asbestos, arsénico, aflatoxinas.
- Cancerígenos biológicos: infecciones causadas por ciertos virus, bacterias o parásitos.

La exposición a estos, en combinación con factores ambientales y genéticos, así como estilos de vida poco saludables, son las causas que más se asocian al desarrollo de la enfermedad. (OMS, 2014, 2015)

Sin embargo con la excepción de los tumores cerebrales asociados con mutaciones o irradiación terapéutica, que son la minoría. Hasta la fecha se desconoce algún factor de riesgo o estilo de vida directamente asociado con el desarrollo de un tumor en el SNC

(Sistema Nervioso Central). (Kleihues, 2014)

1.1 Tumores en el Sistema Nervioso Central

A nivel mundial los tumores del SNC son el 17º tipo de cáncer mas común, con un estimado de 256 000 casos nuevos cada año. La tasa de aparición tiende a ser mayor en países desarrollados y su letalidad lo sitúa en el 12º lugar de la lista. Este tipo de cáncer tiene una mayor incidencia en niños y adultos de 45-70 años. (Stewart, 2014)

En México el cáncer de encéfalo y otras partes del SNC ocupa el segundo lugar en la tasa de mortalidad y la tercera de morbilidad hospitalaria en pacientes menores de 20 años, con una tasa de 0.66 y 5 casos de cada 100 000, respectivamente. Para adultos mayores de 20 años no se cuenta con reportes actuales sobre la incidencia, mortalidad y morbilidad de estos tumores. (INEGI, 2015)

Los tumores primarios del SNC son un grupo de neoplasias derivadas de diversos linajes celulares pertenecientes a esta estructura y pueden diseminarse a otras áreas del cerebro, pero rara vez a otros órganos del cuerpo. (Huse & Holland, 2010)

A menudo los tumores hallados en el SNC deben su origen a la invasión de células cancerosas de otra región del organismo, este tipo de tumores son llamados “metástasicos o secundarios” y suelen ser mas comunes que los primarios. (NCI, 2014)

De los tumores primarios en el SNC, los de origen glíal o “gliomas” son los mas frecuentes y agresivos, además de ser típicos en adultos de 45-60 años.. Ofrecen una baja expectativa de vida, debido a la poca efectividad en los tratamientos actuales. (Ostrom et al., 2015)

1.2 Gliomas

Los gliomas exhiben un rango amplio de entidades histológicas tales como, infiltración de células con núcleos atípicos, áreas anaplásicas o zonas con necrosis; esta

heterogeneidad provoca una respuesta pobre o nula a los tratamientos actuales. Por ejemplo, los pacientes con glioblastoma, la forma de mayor prevalencia y agresividad entre los gliomas, tienen una media de supervivencia de tan solo 15 meses. (Wen & Kesari, 2008)

La Organización Mundial de la Salud ha clasificado a los gliomas en 4 grados (I-IV), de acuerdo a una escala de malignidad. Siendo los III y IV los de peor pronóstico. Las características de cada grado son las siguientes:

Grado I: Lesiones con bajo grado de proliferación y mejor posibilidad de cura después de resección quirúrgica, por ejemplo, astrocitomas pilocíticos, gliomas angiocéntricos, neurofibromas, entre otros.

Grado II: Neoplasias con naturaleza infiltrativa y a pesar de su baja tasa de proliferación, tienden a reaparecer. Algunos tumores grado II pueden progresar a grados de mayor malignidad, como son los astrocitomas difusos u oligoastrocitomas.

Grado III: Lesiones con evidencia histológica de malignidad, incluyendo núcleos atípicos y alta actividad mitótica. Entre ellos se encuentran gran cantidad de gliomas anaplásicos.

Grado IV: Neoplasias altamente malignas, mitóticamente activas y propensas a necrosis con infiltración del tejido circundante y diseminación cráneo espinal que se asocian con una rápida evolución y con desenlace fatal. Ejemplos de neoplasias de grado IV incluyen al glioblastoma multiforme (GBM), a muchas neoplasias embrionarias y a diversos sarcomas.(Louis et al., 2007)

1.3 Tratamientos

Los gliomas de grado IV, como el GBM, representan un reto terapéutico debido a la heterogeneidad celular y la velocidad con la que se expande por el SNC, afectando gravemente la calidad de vida del paciente. La resección quirúrgica y el tratamiento post-operatorio con radioterapia son la elección estándar. Sin embargo la tasa de

sobrevivencia después de la radiación es baja.(Chao & Suh, 2006; Stupp et al., 2005)

Además de la radioterapia se recomienda tratar al paciente con quimioterapia utilizando agentes alquilantes que dañan el ADN, tales fármacos incluyen: carmustina, lomustina, vincristina y temozolamida (TMZ). La TMZ es el fármaco de elección en el tratamiento de gliomas de alto grado, la TMZ alquila a la guanina, induciendo mecanismos de apoptosis. El uso conjunto de quimioterapia y radioterapia post-operativa aumenta la esperanza de vida en aproximadamente 2 meses y medio.(Chamberlain, 2010; Stupp et al., 2005)

Uno de los grandes impedimentos para que la quimioterapia funcione en tumores cerebrales es la barrera hematoencefálica (BHE), para esto se han diseñado nanopartículas a base de lípidos, con el fin aumentar los niveles cerebrales de la TMZ, esto ha mostrado disminuir los efectos adversos en riñón y corazón.(Song, Mao, Du, & Zhu, 2016)

Los tratamientos actuales para los gliomas de alto grado, fallan debido a la resistencia que presentan, dicha resistencia se debe principalmente a mutaciones en genes involucrados en la reparación del ADN; como es el caso de la pérdida de función del gen MSH6 y la amplificación de la O⁶- metil guanina metil transferasa (MGMT). La pérdida de función en MSH6 promueve la acumulación de mutaciones, que provocan inestabilidad genómica, mientras que la enzima MGMT al promover la reparación del ADN, evita que fármacos como la TMZ sean eficaces.(Cahill et al., 2007; S. Y. Lee, 2016)

En el año 2006 se publicó por primera vez que las células troncales del GBM humano mostraban mayor resistencia a la quimioterapia. Esta subpoblación celular fue seleccionada al exhibir el marcador de troncalidad Prominina 1 (CD133). Estas células presentaron niveles altos de MGMT y BCRP1. (G. Liu et al., 2006) BCRP1 es un transportador tipo ABC que se expresa en diversos tipos de cáncer y promueve la expulsión de los fármacos antineoplásicos fuera de las células. (Kondo, Setoguchi, & Taga, 2004) A esta subpoblación celular se le conoce actualmente como células troncales cancerosas (CTC) o células iniciadoras de glioma, por su gran capacidad de autorenovación, pueden proliferar y dar origen a un tumor resiliente.(G. Liu et al., 2006)

Las CTC representan un reto en la terapia anticancerígena, su similitud con las células troncales embrionarias y adultas, nos orienta hacia el estudio de los mecanismos que regulan la reparación del ADN, la autorenovación y la proliferación en estas células.

2. Células troncales neurales

En la década de los 50s Till y McCulloch descubrieron que al reponer la médula ósea de un ratón letalmente irradiado con la de uno sano, se podía restablecer la funcionalidad de su sistema hematopoyético y con esto, evadir la muerte. Además notaron que esta recuperación era acompañada por la formación de colonias en el bazo, capaces de regenerarse al ser implantadas en otro ratón, con base estos descubrimientos, propusieron por primera vez la definición de una “Célula formadora de colonia”, después llamada “célula troncal”, una célula con la capacidad de auto-renovarse y dar origen a una progenie diferenciada. (Houghton, Morozov, Smirnova, & Wang, 2007)

Actualmente se sabe que las células troncales proceden de una subpoblación de las células troncales embrionarias, que han quedado restringidas a un linaje específico, como son las Células Troncales Neuronales (CTN), las células mesangiales del riñón, las células de las criptas en el intestino, entre otras. (Blanpain, Lowry, Geoghegan, Polak, & Fuchs, 2004; Reynolds & Weiss, 1992)

Las células troncales residen en microambientes especializados o “nichos”, que regulan su capacidad de autorenovación y diferenciación. En el desarrollo, estos nichos regulan la maduración del SNC y son modulados espaciotemporalmente, mientras que en el Sistema Nervioso adulto están restringidos a áreas específicas del cerebro. Los nichos neurogénicos descritos y más aceptados en diversas especies, incluido el humano, son la zona subventricular (ZSV) y la zona subgranular del giro dentado (GD). (Taupin, 2006)

En la ZSV, las células se generan en la parte anterior de esta región, para migrar en forma de cadenas tangenciales a lo largo de la ZSV a través de la vía rostral migratoria,

hacia el bulbo olfatorio, donde se diferenciarán en interneuronas. (Doetsch, Caille, Lim, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1999) En el GD del hipocampo, los precursores neuronales en la zona subgranular migran hacia la capa granular, donde se diferenciarán en neuronas maduras, extendiendo sus axones hasta la región CA3. (Bayer, Yackel, & Puri, 1982)

Los nichos neurogénicos emergen como una de las zonas vulnerables a sufrir transformación tumoral, debido a la abundante cantidad de factores de crecimiento y la presencia de células troncales capaces de proliferar y diferenciarse ante diversos estímulos.

2.1 Células troncales del Giro Dentado

Los primeros estudios que indicaban que la neurogénesis del hipocampo continuaba después del nacimiento se remontan a la década de los 60's, donde se observó por primera vez que ratas y conejillos de indias. (Altman & Das, 1965, 1967) Una década después Eriksson y cols., realizaron los primeros estudios en cerebro humano adulto, encontrando que al igual que en otros mamíferos la neurogénesis perduraba aún en la vida adulta. (Eriksson et al., 1998)

Actualmente se ha descrito casi por completo el proceso por el cuál una célula troncal quiescente se convierte en una neurona granular madura.

En la zona subgranular del GD residen múltiples células de fenotipo glial que coexisten con las CTN. Las CTN se clasifican en dos tipos de acuerdo a los marcadores que expresan:

- a) Células tipo I, son las más indiferenciadas, expresan el marcador glial GFAP (proteína fibrilar ácida de la glía), la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP), el transportador de glutamato (GLAST) y Sox2. (Dhaliwal & Lagace, 2011)

- b) Células tipo II, presentan una morfología horizontal con prolongaciones citoplasmáticas cortas. Son altamente proliferativas y expresan los marcadores Nestina y Sox2. Además estas se subdividen en:
- i. Células tipo 2a, que expresan al factor de transcripción Mash1/ASCL1
 - ii. Células tipo 2b, expresan Prox1 y NeuroD1, además son el tipo celular intermedio entre las CTN y los neuroblastos por lo que también pueden expresar DCX. (Lugert et al., 2010)
- c) Células tipo 3 o “Neuroblastos”, expresan al filamento intermedio DCX así como la molécula de adhesión neural PSA-NCAM. Su capacidad de proliferación reduce drásticamente así como su tasa de sobrevivencia. (J. Zhang & Jiao, 2015)
- d) Neurona inmadura, célula post-mitótica que continua expresando DCX, con la adición de la proteína neuronal nuclear NeuN y la proteína de unión a Ca²⁺, calretinina. En esta etapa las células empiezan a proyectar sus neuritas hacia la región CA3 del hipocampo. (J. Zhang & Jiao, 2015)
- e) Neurona granular, además que NeuN estas células expresan la proteína de unión a Ca²⁺ calbindina. Esta célula es completamente funcional y participa en el conocido Circuito trisináptico, el cual es importante para regular funciones de memoria y aprendizaje. (van Praag et al., 2002; J. Zhang & Jiao, 2015)

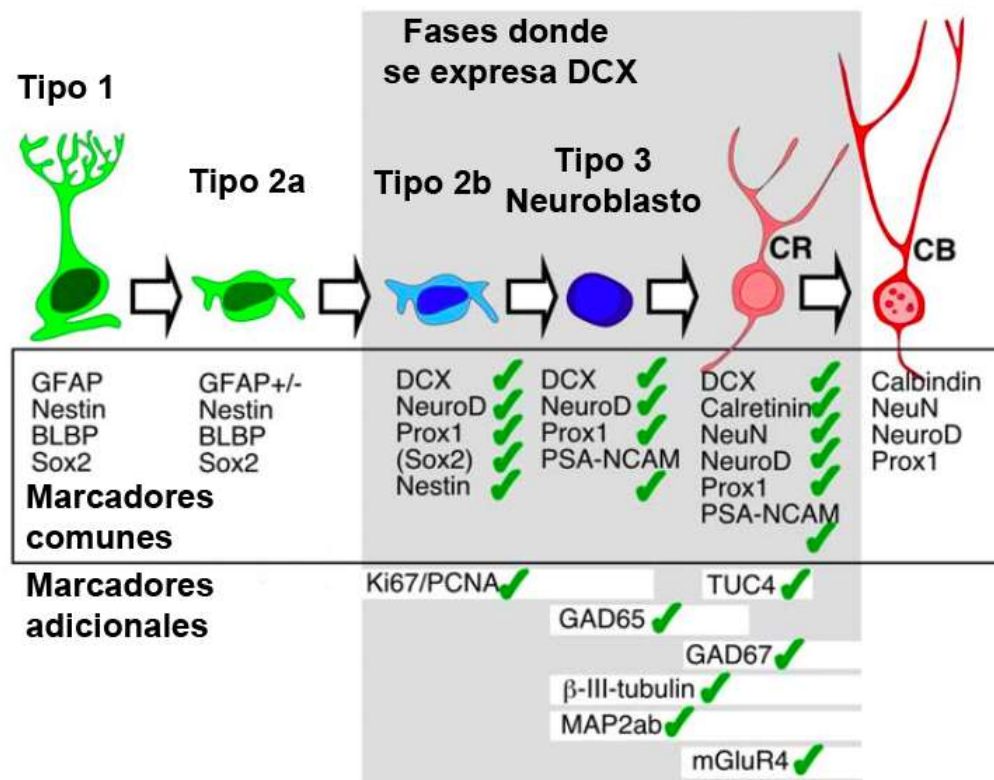


Figura 2. Marcadores de las células de la zona subgranular del giro dentado. En la imagen se esquematizan los tipos celulares así como sus marcadores específicos de uso común y algunos utilizados en menor frecuencia. Modificado de: *Knoth y cols. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. PLoS One, 5(1), e8809. doi:10.1371/journal.pone.0008809*

Actualmente existe un abanico de marcadores celulares para identificar a los tipos celulares partícipes en la neurogénesis del giro dentado, algunos de estos se encuentran por periodos más prolongados, otros se restringen a etapas específicas en la maduración de los progenitores neurales. En la figura X se resumen los más utilizados, marcadores de proliferación celular como Ki67 así como las enzimas GAD65 y GAD67 típicas en neuronas inmaduras. (Knoth et al., 2010)

3. Células troncales cancerosas

Las CTC presentan un panorama interesante, su alta resistencia a la radioterapia y quimioterapia, aunado a la capacidad de originar un tumor *de novo* las colocan como un blanco de investigación científica. (Clarke & Fuller, 2006; Natsume et al., 2011)

Las CTN y las células *in situ* de los gliomas comparten las características de autorenovación, migración/infiltración a través del parénquima cerebral extendido y un potencial para diferenciarse, parcial o completamente; propiedades no encontradas en las líneas celulares de los gliomas. Una diferencia obvia entre estas líneas celulares y los cultivos de CTN es que estos últimos crecen en un medio libre de suero, ya que este provoca diferenciación irreversible de las CTN. Las CTC derivadas de glioblastomas cultivados en presencia de bFGF y EGF mimetizan mejor el fenotipo y genotipo de los tumores primarios en comparación con aquellas cultivadas en presencia de suero. (J. Lee et al., 2006)

La identificación de las CTC apoya a la teoría jerárquica de la carcinogénesis, la cual propone que el inicio del tumor se debe a esta población celular que es pluripotente y se puede auto-renovar, además dar pie a progenitores más diferenciados por divisiones asimétricas, dando origen a un tumor con heterogeneidad celular. Bradshaw 2016

Las CTC aisladas de los gliomas de mayor grado expresan marcadores típicos de células troncales embrionarias y adultas, los cuales pueden dividirse en:

a) Marcadores embrionarios:

Sall4: Factor de transcripción de tipo dedos de Zinc, promueve la pluripotencialidad y asegura la sobrevivencia del cigoto. Interactúa con Nanog, Sox2 y Oct4. (Yang et al., 2008; L. Zhang et al., 2015)

Oct4: Proteína esencial para el desarrollo del blastocito, presente en la masa celular interna. Mantiene un estado indiferenciado y regula a otros factores como

Nanog para mantener la pluripotencialidad en el desarrollo embrionario y en gliomas. (Du et al., 2009; Zeineddine, Hammoud, Mortada, & Boeuf, 2014)

Sox2: El factor de transcripción Sex determining región Y-box 2 (Sox2), promueve la pluripotencialidad y su delección en el cigoto es letal. Además se requiere su acción conjunta con Oct4 para mantener a las células troncales. (Annovazzi, Mellai, Caldera, Valente, & Schiffer, 2011; Graham, Khudyakov, Ellis, & Pevny, 2003; S. Zhang & Cui, 2014)

Nanog: Factor de transcripción asociado con la tumorigenicidad, y la invasión del GBM. Su acción es similar a la de Oct4 y Sox2, siendo además blanco de estos factores de transcripción. (Rodda et al., 2005; Zbinden et al., 2010)

c-Myc: Proteína parte de la familia de proto-oncogenes MYC. Su función principal es regular el paso de la fase G0/G1 a S promoviendo la proliferación celular, ayuda a mantener la pluripotencialidad dependiendo del tipo celular y su amplificación induce tumorigénesis. c-Myc regula la proliferación, sobrevivencia e infiltración en gliomas. (Dang, 2012; Perez et al., 2011; J. Wang et al., 2008)

STAT3: Proteína transductora de señales que actúa como factor de transcripción al ser fosforilada. Sus funciones incluyen la regulación del ciclo celular, la sobrevivencia celular y la autorenovación de las células troncales. Su pérdida o disminución promueve la diferenciación celular. En GBM la inhibición de STAT3 disminuye el tamaño de los tumores, pero también puede disminuir la respuesta inmune por lo que su papel como proteína supresora tumoral es controversial. (Kim, Patel, Ruzevick, Jackson, & Lim, 2014; Raz, Lee, Cannizzaro, d'Eustachio, & Levy, 1999)

KLF4: Factor de transcripción de tipo dedos de Zinc, Krüppel like factor 4 KLF4, es necesario para la autorenovación y mantenimiento de las células troncales. Además KLF4 induce arresto celular al bloquear el paso de la fase G1 a S en presencia de p53. En células troncales actúa como mediador de la señalización de STAT3 para promover la activación de los genes de Oct4, Sox2 y Nanog. KLF4 tiene efectos contradictorios en cáncer, por un parte se encuentra sobreexpresado en 70% de especímenes de cáncer de mama mientras que en otros tipos de cáncer inhibe la

formación de tumores y metástasis. (Ai, 2013; Nakatake et al., 2006; J. Wang et al., 2010; Yu et al., 2011)

b) Marcadores de progenitores neurales:

Nestina: Proteína expresada en la células en división durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, su expresión disminuye por completo al progresar la diferenciación. En diversas líneas celulares de glioma se ha reportado su presencia, así como en pacientes con GBM. (Michalczyk & Ziman, 2005) (Neradil & Veselska, 2015)

GFAP: Proteína expresada en células con fenotipo glial, al igual que Nestina es un filamento intermedio y su función principal es mantener una citoarquitectura celular específica. En los pacientes con GBM se encuentra sobre-expresada en suero y sangre periférica, por lo que se le considera un marcador de diagnostico estándar.(Fuchs & Weber, 1994; Jung et al., 2007; Tichy et al., 2016)

CD133: Glicoproteína también conocida como Prominina-1, se expresa en células troncales hematopoyéticas, progenitores endoteliales, GBM y en células troncales neurales. (G. Liu et al., 2006; Yin et al., 1997)

A pesar de toda la información que se tiene actualmente de las CTC, cada día se descubren, nuevos papeles en la tumorigénesis de proteínas previamente estudiadas en el desarrollo y la terapia génica , tal es el caso de Gas1.

4. Gas1

La proteína Gas1 (*Growth-arrest-specific*) pertenece a un grupo de 6 proteínas que se expresan en la fase G₀ del ciclo celular y promueven que las células dejen de proliferar y se “arresten”. (Schneider, King, & Philipson, 1988) Los primeros estudios se

realizaron en cultivos de células NIH3T3, donde la falta de suero o la alta densidad promovía la expresión de Gas1, esta expresión promovía que la síntesis de ADN disminuyera. (Ciccarelli, Philipson, & Sorrentino, 1990)

El gen de *gas1*, codifica para una proteína de 345 aa en humano y 343 aa en ratón. Además es un gen sin intrones por lo que se especula que se originó por retrotransposones. (Del Sal, Ruaro, Philipson, & Schneider, 1992) (Hatinen, Holm, & Airaksinen, 2007)

La proteína Gas1, sufre modificaciones post-traduccionales en el retículo endoplásmico; que incluyen: una N-glicosilación, el corte del péptido señal y la adición de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C-terminal. La forma madura de la proteína posee un peso molecular de 37 kDa y se ubica en la cara externa de la membrana celular por su ancla de GPI.

4.1 Funciones de Gas1

Los primeros estudios de la función de Gas1, se relacionaron con la vía de Sonic hedgehog (Shh), la cual tiene profunda importancia en la embriogénesis, los desordenes genéticos y el cáncer. Shh actúa como un morfógeno que define el destino celular de cada población. Gas1 en el desarrollo, actúa cooperativamente con Patched1 (Receptor de Shh), promoviendo su cascada de señalización. (Martinelli & Fan, 2007)

En el 2006 se descubrió que Gas1 compartía homología con los receptores de la familia de los GFR α 1, de los cuales el principal ligando es el “Factor neurotrófico derivado de la glía” (GDNF, por sus siglas en ingles). La unión de GDNF a su receptor, induce el reclutamiento de dos proteínas RET, con actividad tirosina-cinasa, esto puede activar distintas vías de señalización, principalmente las de ERK y PI3K/AKT, que promueven la sobrevivencia y el crecimiento celular. (Schueler-Furman, Glick, Segovia, & Linial, 2006; Segovia, 2016) Gas1 induce arresto celular y apoptosis, al inhibir la

señalización promovida por GDNF, ya que se ha demostrado que previene la activación de Akt (Fig. 2). (Dominguez-Monzon, Benitez, Vergara, Lorenzana, & Segovia, 2009)

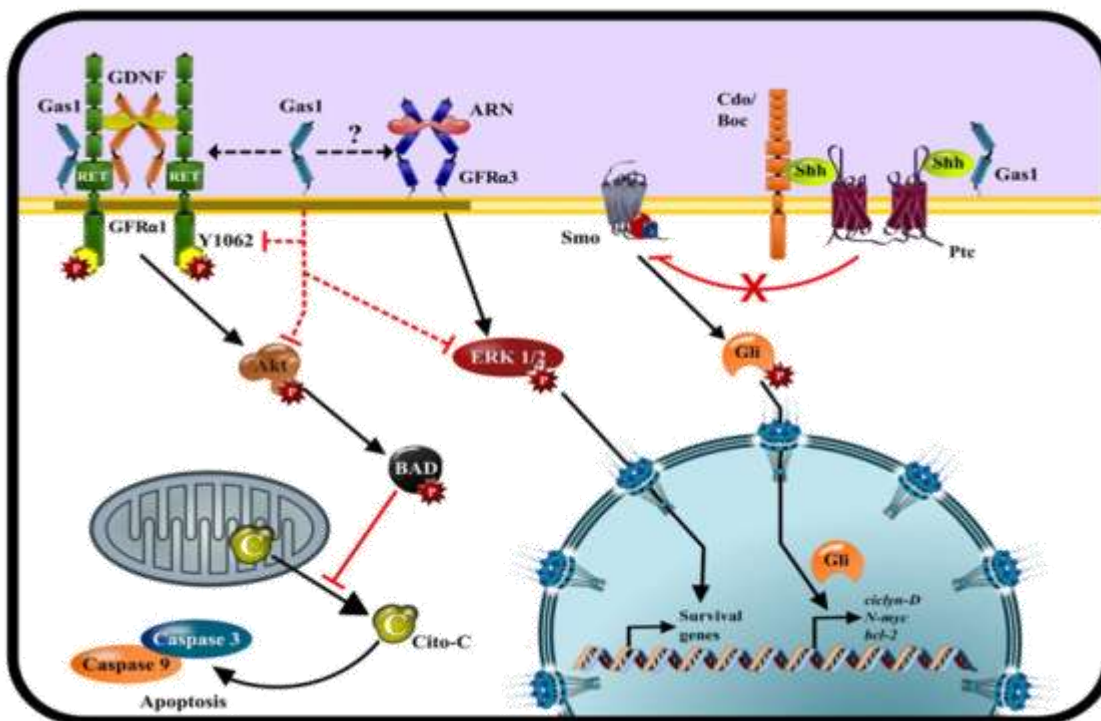


Figura 3. Funciones de Gas1. Adaptado de “Effects of Gas1 on gliomas: a review on current preclinical studies”, por Segovia, J. B., E.; Lara-Lozano, M. (2016). *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*.

4.2 Gas1 en cáncer

Se ha reportado que las proteínas que promueven la proliferación celular como c-Myc y Src reprimen la transcripción de *gas1*. (Grossi et al., 1998; T. C. Lee, Li, Philipson, & Ziff, 1997). Por ello en diversas líneas celulares cancerosas o cultivos de tumores primarios, su expresión disminuye (Tabla 1).

Tipo de cáncer	Expresión de Gas1	Referencia
Carcinoma papilar	Disminuida	(Lapouge et al., 2005)
Cáncer colorectal		(Jiang, Xu, & Cai, 2011)
Recurrente	Disminuida	
No recurrente	Normal	

Cáncer de próstata	Disminuida	(Luo et al., 2002)
Cáncer gástrico	Disminuida	(H. Wang et al., 2012)
Cáncer de vejiga	Normal	(Simoneau et al., 1996)
Cáncer de páncreas	Disminuido	(Tan et al., 2009)
Cáncer de piel (Melanoma)	Disminuido	(Gobeil, Zhu, Doillon, & Green, 2008)
Cáncer de ovario	Disminuido	(Shridhar et al., 2001)

Tabla 1. Disminución de gas1 en diversos tipos de cáncer. En muchos casos, esta disminución correlaciona con la malignidad, la recurrencia y la metástasis del tumor.

Por otro lado, se ha estudiado ampliamente la habilidad que tiene Gas1 de promover la apoptosis y el arresto celular como terapia génica contra el cáncer. Esto ha sido efectivo contra gliomas, adenocarcinomas y en el cáncer de mama. Esto gracias al efecto que tiene Gas1 de impedir la señalización mediada por GDNF y promover la apoptosis celular. (Segovia, 2016)

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

A. Planteamiento

Gas1 es una proteína pleiotrópica, en el desarrollo de mamíferos es pieza clave en la señalización mediada por Shh, promueve el desarrollo del tubo neural y el cerebelo. Mientras que en las líneas celulares diferenciadas y confluentes promueve el arresto celular y apoptosis. Este segundo efecto se ha aprovechado como una terapia contra el cáncer, ya que al incrementar su expresión, los tumores disminuyen de tamaño debido al arresto y muerte celular.

Algunos autores mencionan que Gas1 actúa como una proteína supresora de tumor, al cumplir con las propiedades esperadas de: supresión de metástasis, promover la apoptosis y la frecuente disminución de su expresión en líneas celulares de cáncer y tumores. Por lo tanto su disminución permite la sobrevivencia y proliferación de las células cancerosas. (Evdokiou & Cowled, 1998; Gobeil et al., 2008; Zhao et al., 2009)

En el desarrollo del sistema nervioso entérico la delección de Gas1 promueve el aumento de la proliferación de células progenitoras por la activación de la cascada de señalización mediada por RET, sin embargo se desconoce si este efecto se mimetizara en células troncales pertenecientes al giro dentado (Biau, Jin, & Fan, 2013)

B. Pregunta Científica

¿Qué efecto tendrá silenciar Gas1 en cultivos de neuroesferas derivadas del giro dentado de ratón neonato?

JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio del Dr. Segovia, se describió la presencia de Gas1 en neuroesferas derivadas de la zona subventricular y giro dentado de ratón. Sorpresivamente en las Gliomaesferas derivadas de la línea C6 la expresión de Gas1 fue escasa o nula, por lo que se infiere que en los gliomas disminuye la expresión de Gas1.

Esta disminución podría estar ligada con el mal pronóstico que se tiene de los gliomas, ya que recientemente se encontró que la disminución de la expresión de Gas1 promueve la metástasis en cáncer colorectal (Li et al., 2016) y en el cáncer gástrico promueve la supervivencia, además de formar tumores de mayor tamaño (H. Wang et al., 2012).

Conocer el efecto que tiene la disminución de Gas1 en células troncales neurales nos permitirá averiguar si existe alguna relación en la transformación neoplásica en el SNC.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la disminución de la expresión de Gas1 en las neuroesferas derivadas del GD de ratón neonato.

Objetivos particulares

1. Estandarizar el cultivo de neuroesferas.
2. Evaluar por RT-PCR la expresión de marcadores de troncalidad, Gas1 y RET.
3. Estandarizar el protocolo para silenciar Gas1 en neuroesferas derivadas del GD de raton neonato, con un siRNA comercial.
4. Evaluar si existen cambios morfologicos en las neuroesferas con Gas1 silenciado.
5. Evaluar la proliferación celular por qRT-OCR en las neuroesferas derivadas de GD con Gas1 silenciado.

HIPÓTESIS

La disminución de la expresión de Gas1 promueve la proliferación en las neuroesferas derivadas del GD de ratón neonato.

METODOLOGÍA

1. Generación de neuroesferas a partir de cultivos primarios.

Los procedimientos se realizaron de acuerdo a la norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA) y siguiendo los lineamientos establecidos en la Guía para el Uso de Animales de Laboratorio Institucional (CINVESTAV).

Se utilizaron ratones postnatales de la cepa ICR (CD-1) de 2 a 4 días de nacidos, se sacrificaron por decapitación y se extrajeron los cerebros. Posteriormente se realizó la disección de la ZSV y el GD del hipocampo en solución salina de Hank (HBSS, Thermo Fisher Scientific) al 10 % de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Los tejidos extraídos se lavaron 5 veces en solución HBSS al 10 % de antibiótico centrifugando a 12 000 r.p.m. por 5 minutos y resuspendiendo en medio fresco. Después, los tejidos se incubaron en 0.1 % de tripsina y 0.04 % de ADNasa I disuelta con solución HBSS por 30 minutos a 37 °C. Luego, los tejidos se disgregaron mecánicamente con una micropipeta, se centrifugaron a 12 000 r.p.m. por 5 minutos y el pellet se resuspendió en medio DMEM/F12 suplementado con EGF (20 ng/mL, Goldbio), bFGF (20 ng/mL, Goldbio), suplemento B27 (GIBCO, Invitrogen Life Technologies) al 2 % y antibiótico al 1 %. La suspensión celular se pasó por un filtro estéril de 40 µm para después contar y sembrar a una densidad de 400000-600000 células por caja Petri de 35 mm. Los cultivos se incubaron a 37 °C con 5% CO₂ por 1 semana, para poder hacer el primer pasaje.

2. RT-PCR

Se extrajo ARN mensajero por el método de TRIzol y columnas XXX. Después se realizó el procedimiento estándar con DNasa I y posteriormente la retrotranscripción se llevó a cabo utilizando la enzima MMLV de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Para la PCR de punto final se utilizó KAPA Taq ReadyMix (Nº cat. KK1006) en reacciones de 12.5 mL con 50 ng de cDNA.

Se utilizaron los siguientes pares de oligos:

Nombre	Secuencias 5'→3'	Tamaño de amplicón (pb)
Actina Sen	ATTTGGCACCACACTTTCTACA	378
Actina Ant	TCACGCGATTTCCCTCTCAG	
mGas1-Fw	CCCTCTTCTGTGCGGTTTTTC	161
mGas1-Rv	CCCTTCTCCAAGTCCATTGG	
mKi67-Fw	GTCAGCATGGCATTCTACAG	176
mKi67-Rv	GGGTCTTCTTTGTCTCTTGC	
PANSHH 5'	CCGACATCATATTTAAGGATGA	208
PANSHH 3'	GACGTGGTGATGTCCACTGC	
RETSEN5	CTGGTGAGACGGTACACAA	749
RETANTSEN3	CAGGTGGAGAAGTTCCTGGT	
Sox2 RT-S	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	297
Sox2 RT-AS	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA	
Nanog-S	TCAAGGCAGCCCTGATTCTTCTACC	295
Nanog-AS	CAACCACTGGTTTTTCTGCCACC	
cMyc M-S	TGACCTAACTCGAGGAGGAGCTGGAATC	170
cMyc M-AS	AAGTTTGAGGCAGTTAAAATTATGGCTGA AGC	

Los protocolos de termociclado para cada par de oligos fueron:

<i>Protocolo de Termociclado actina</i>			
Proceso	Ciclos	Temp °C	Tiempo
Desnaturalización	1	95	5 min
Desnaturalización	40	95	30 seg
Alineamiento		53	30 seg
Extensión		72	30 seg
Ext. Final	1	72	10 min
Conservación		4	∞

Protocolo de Termociclado Gas1 y ki67			
Proceso	Ciclos	Temp °C	Tiempo
Desnaturalización	1	95	5 min
Desnaturalización	38	95	30 seg
Alineamiento		56	30 seg
Extensión		72	30 seg
Ext. Final	1	72	10 min
Conservación		4	∞

Protocolo de Termociclado SHH y RET			
Proceso	Ciclos	Temp °C	Tiempo
Desnaturalización	1	95	5 min
Desnaturalización	40	95	30 seg
Alineamiento		57	35 seg
Extensión		72	50 seg
Ext. Final	1	72	5 min
Conservación		4	∞

Protocolo de Termociclado teórico Sox2, Nanog y cMyc			
Proceso	Ciclos	Temp °C	Tiempo
Desnaturalización	1	95	5 min
Desnaturalización	40	95	30 seg
Alineamiento		67	50 seg
Extensión		72	20 seg
Ext. Final	1	72	5 min
Conservación		4	∞

3. Silenciamiento de Gas1

Se realizó el silenciamiento de Gas1 en neuroesferas secundarias, con el siRNA-Gas1 contra ratón (Nº de cat. sc-37436, SCBT), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se probaron dos concentraciones 5 y 10 pmoles del siRNA contra Gas1 en

cultivos con una concentración inicial de 40000 mil células por pozo de caja de 48, el cultivo se mantuvo 3-4 días para poder realizar la transfección utilizando Lipofectamina 3000. (Nº cat. L3000001) Pasando 24 horas se tomaron fotografías para el análisis morfológico, posteriormente se recolectó el contenido de 8 pozos en tubos Corning de 15 mL y se centrifugaron por 5 minutos a 200 g, para poder retirar el medio y realizar la extracción de RNA con columnas Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus (Nº cat. R2070T) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4. qRT-PCR

Se estandarizó la qRT-PCR con los siguientes pares de oligos específicos para ratón:

Nombre	Secuencias 5'→3'
Actina Sen	ATTTGGCACCACACTTTCTACA
Actina Ant	TCACGCGATTTCCCTCTCAG
mGas1-Fw	CCCTCTTCTGTGCGGTTTTTC
mGas1-Rv	CCCTTCTCCAAGTCCATTGG
mKi67-Fw	GTCAGCATGGCATTCTACAG
mKi67-Rv	GGGTCTTCTTTGTCTCTTGC
Sox2 RT-S	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA
Sox2 RT-AS	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA
Nanog-S	TCAAGGCAGCCCTGATTCTTCTACC
Nanog-AS	CAACCACTGGTTTTTCTGCCACC
cMyc M-S	TGACCTAACTCGAGGAGGAGCTGGAATC
cMyc M-AS	AAGTTTGAGGCAGTTAAAATTATGGCTGAAGC

Se realizaron curvas de eficiencia para cada par de oligo, utilizando KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) (Nº cat. KK4600) y el termociclador Eco Real-Time PCR System. Las curvas de eficiencia incluyeron 3 puntos en diluciones 1:10 por duplicado, obteniendo las siguientes eficiencias:

Gen de interés	Eficiencia promedio
Actina	105.41 ± 7.97

Gas1	106.03 ± 5.96
Ki67	102.09 ± 4.24
Sox2	118.33 ± 6.32
Nanog	119.28 ± 4.44
c-Myc	111.36 ± 5.13

n=3-6, Media ± Error estándar

Los experimentos se llevaron a cabo en reacciones de 5 µL con 10 ng de cDNA y 200 nM de cada oligo. El protocolo de termociclado para cada par de oligos fue:

Protocolo de Termociclado Actina			
Proceso	Ciclos	Temp ° C	Tiempo
Activación de la polimerasa	1	95	3 min
Desnaturalización	40	95	30 seg
Alineamiento		53	30 seg
Extensión		72	15 seg
Curva de disociación	1	95-55-95	15-15-15 seg

Protocolo de Termociclado Gas1 y ki67			
Proceso	Ciclos	Temp ° C	Tiempo
Activación de la polimerasa	1	95	3 min
Desnaturalización	38	95	30 seg
Alineamiento		56	30 seg
Extensión		72	15 seg
Curva de disociación	1	95-55-95	15-15-15 seg

Protocolo de Termociclado Sox2, Nanog y cMyc			
Proceso	Ciclos	Temp ° C	Tiempo
Activación de la polimerasa	1	95	3 min
Desnaturalización	35	95	30 seg
Alineamiento/Extensión		60	30 seg
Curva de disociación	1	95-55-95	15-15-15 seg

RESULTADOS

1. Estandarización del cultivo de neuroesferas derivadas de giro dentado

Los nichos neurogénicos tanto de animales neonatos como adultos, proporcionan un medio en el que las células troncales neurales pueden auto-renovarse y ante diversos estímulos, proliferar. (Bjornsson, Apostolopoulou, Tian, & Temple, 2015) Al realizar un cultivo primario de estas regiones en un medio libre de suero y con la presencia de factores de crecimiento y suplementos se forman estructuras esféricas conocidas como neuroesferas.

Existen diferentes cepas de ratones, ampliamente utilizadas en investigación, de las cuales sobresale la cepa C57/BL6 la cual muestra una tasa alta de proliferación celular en el giro dentado de ratones adultos, mientras que la cepa ICR (CD-1) mostró la mayor tasa de supervivencia en este mismo tejido. (Kempermann, Kuhn, & Gage, 1997)

Por estos motivos decidimos comparar estas dos cepas utilizadas en nuestro laboratorio, bajo las condiciones de cultivo iguales.

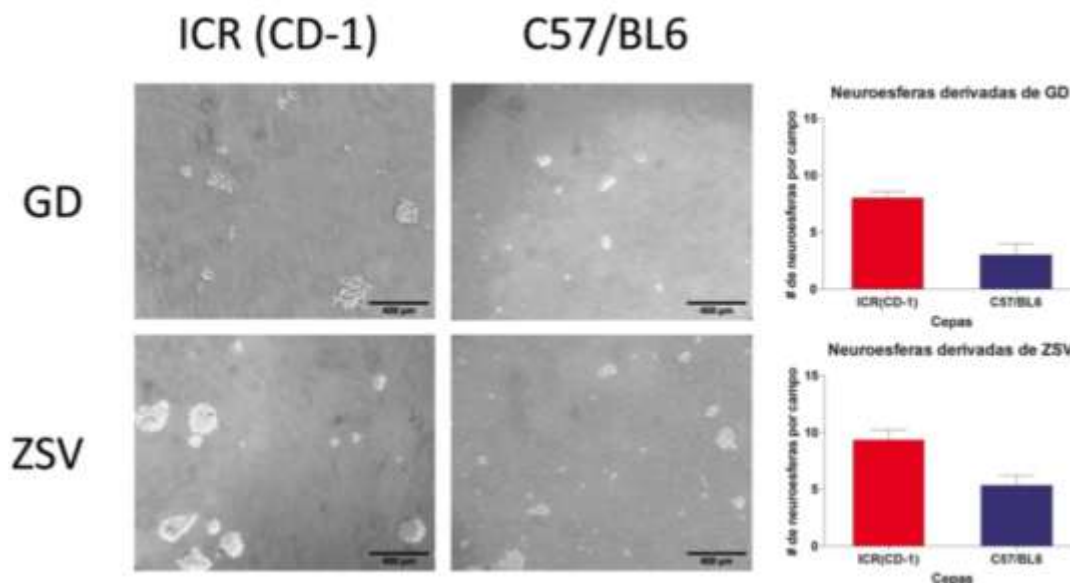


Figura 4. Formación de neuroesferas derivadas de la zona subventricular y el giro dentado de dos cepas de ratones, ICR(CD-1) y C57/BL6. En el lado izquierdo se muestran micrografías tomadas a los 8 días de cultivo. En la parte derecha se muestra la cuantificación de las neuroesferas formadas en cada campo en tres experimentos aislados.

Los cultivos celulares de neuroesferas derivados de la cepa ICR (CD-1) mostraron mejor rendimiento que la cepa C57/BL6 en nuestro laboratorio, siguiendo la metodología señalada. Con base en este resultado, se decidió trabajar con la cepa ICR(CD-1) para los experimentos subsecuentes (Fig. 4)

2. Expresión genica de marcadores de troncalidad, mGas1 y RET

Se evaluó la expresion de la proteina de interes, Gas1, por RT-PCR de punto final en neuroesferasd derivadas de la zona subventricular y el giro dentado de raton neonato (Fig. 5).

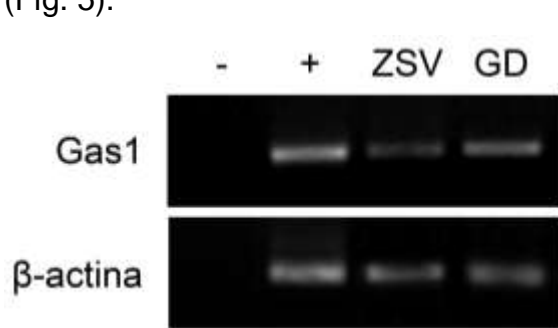


Figura 5. Expresión de mGas1 en neuroesferas derivadas de la ZSV y el GD de ratones neonatos. Como control positivo se utilizó cerebelo de ratón de 4 semanas de edad

Se evaluó la expresión de Shh y RET, siendo dos proteínas importantes en las vías principales que Gas1 modula. Así mismo se observa la expresión de cMyc, Sox2 y Nanog, los cuales son marcadores típicos de células troncales (Fig. 6).

La expresión de cMyc se encuentra disminuida respecto a la línea celular de neuroblastoma N1E-115, lo cual es

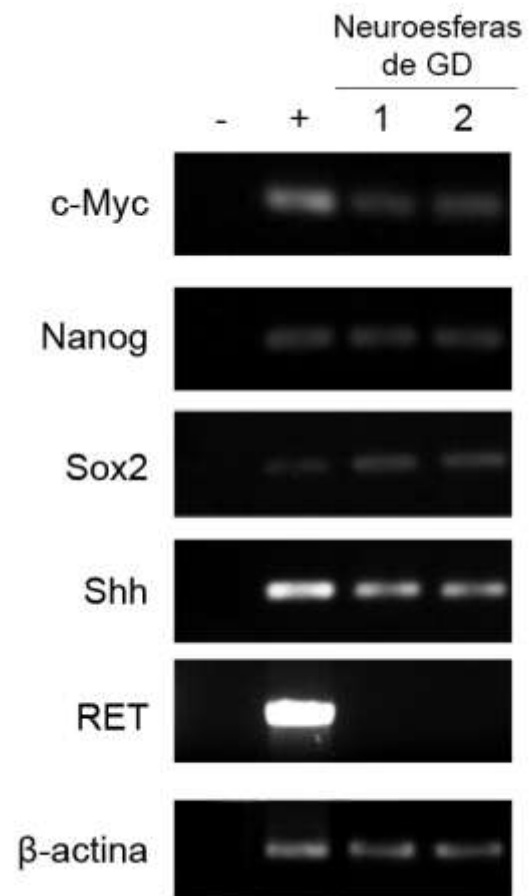


Figura 6. Expresión de marcadores de troncalidad y el proto-oncogen RET en neuroesferas derivadas de GD de ratón neonato. Como control positivo se utilizó a la línea celular de neuroblastoma de ratón, N1E-115.

normal debido a que este tipo de cáncer tiene amplificaciones en el gen de cMyc. El factor de transcripción Nanog no muestra diferencias respecto al control, mientras que Sox2 esta incrementado, esto era de esperarse debido a que las células de la neuroesfera poseen un mayor grado de pluripotencialidad que las de neuroblastoma. La expresión de la proteína Sonic hedgehog (Shh) se observa ligeramente disminuida con respecto a la línea celular N1E-115, Shh se sobreexpresa en diversos tipos de tumores, incluidos el neuroblastoma, por lo tanto este resultado es normal. Por ultimo se observa la ausencia del proto-oncogen RET en las neuroesferas derivadas de giro dentado, mientras que en el control se observa sobreexpresado, siendo algo característico de diversas líneas tumorales. (Schwab, Westermann, Hero, & Berthold, 2003) (Xu et al., 2012)

3. Estandarización de la transfección de las neuroesferas derivadas de GD de ratón neonato.

Se realizó una prueba piloto transfectando un plásmido que expresa a la proteína verde fluorescente bajo un *Enhancer*, pEGFP-N1. Se utilizó una concentración inicial de 40 000 células por pozo de una caja de 48 y se siguieron las recomendaciones del reactivo Lipofectamina 3000 (Nº Cat. L3000001) , usando una concentración de 0.5 µg de pEGFP-N1.

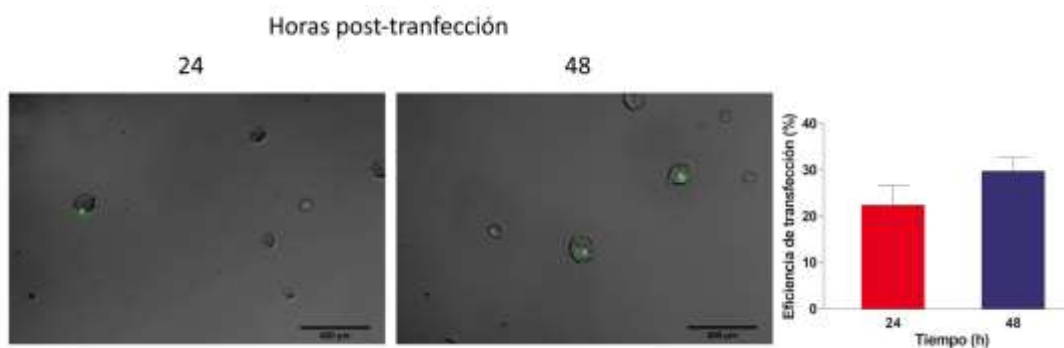


Figura 7. Eficiencia de transfección pEGFP-N1. En el lado derecho se observan dos micrografías de epifluorescencia sobre campo claro de neuroesferas transfectadas con el DNA plasmídico después de 24 y 48 horas. En el lado izquierdo se observa la eficiencia de transfección en 4 experimentos aislados.

La eficiencia de transfección a las 24 horas fue del $22.42 \pm 4.361\%$ y a las 48 horas de $29.8 \pm 2.959\%$ (Fig. 7) similar a los reportado en la bibliografía. (McLenachan, Zhang, Palomo, Edel, & Chen, 2013)

Con este resultado, se decidió utilizar el siRNA contra Gas1 de ratón (Nº Cat. Sc-37436), con dos concentraciones, 5 y 10 pmoles, para escoger la dosis de trabajo. La concentración del mRNA de Gas1 se monitoreó por qRT-PCR.

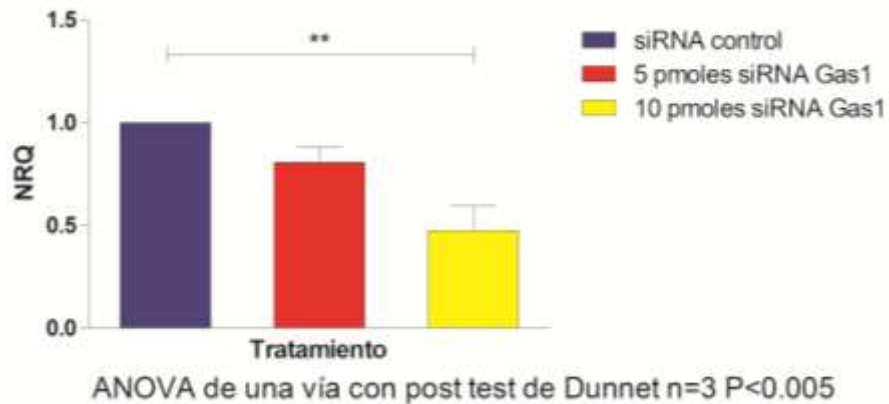


Figura 8. Disminución de la expresión de Gas1. Se muestra la cuantificación relativa del mRNA de Gas1 murino. NQR: Normalized Relative Quantity.

Se observa una disminución del $52.5 \pm 3.01\%$ de la concentración relativa del mensajero de Gas1 con 10 pmoles del siRNA de Gas1 (Fig. 8), por lo tanto se utilizó esta última para los experimentos subsecuentes.

4. Evaluación de los cambios morfológicos de las neuroesferas con el siRNA de Gas1

Se tomaron micrografías a las 24 horas posteriores al silenciamiento de Gas1, se contaron el número de neuroesferas y el tamaño de las mismas para estudiar si hubo algún cambio en estos parámetros (Fig. 9).

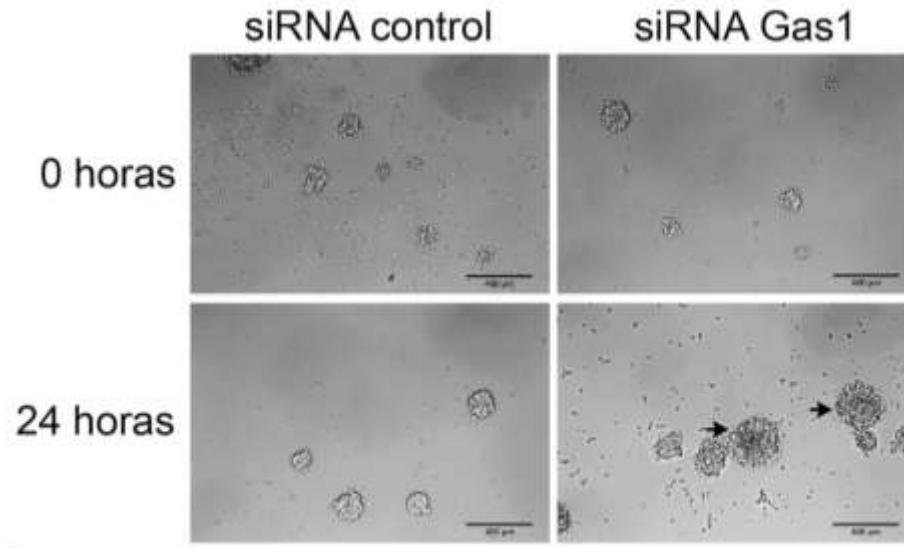
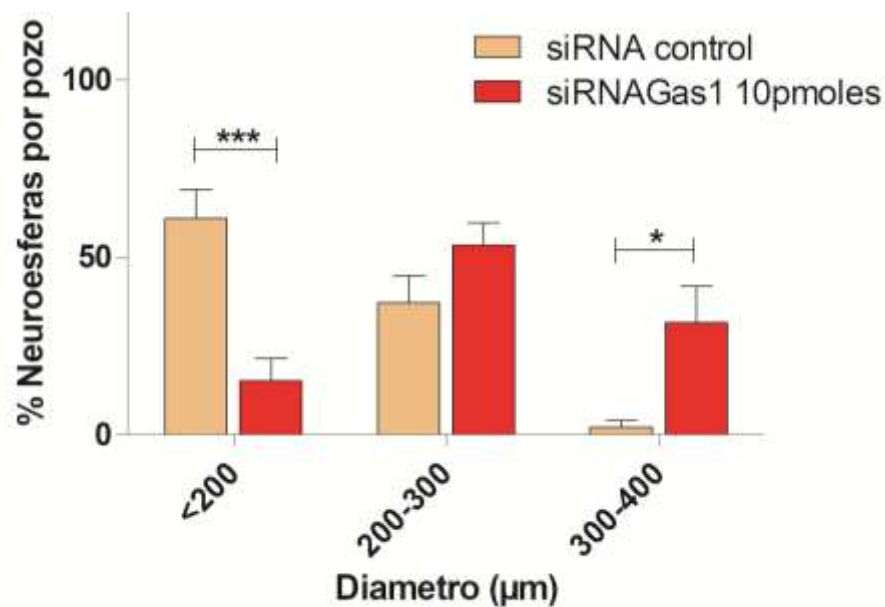


Figura 9. El silenciamiento de Gas1 incrementa el diámetro de las neuroesferas derivadas de ratón neonato. Se muestran micrografías representativas de los cultivos a las 0 y 24 horas con el siRNA control y el siRNA de Gas1. Se observan neuroesferas con diámetros cercanos a 400 μm (Cabezas de flecha \rightarrow)



ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni $P < 0.05$ $n = 8$

Figura 10. El silenciamiento de Gas1 incrementa el tamaño de las neuroesferas derivadas de GD. Cambios en el diámetro en las esferas derivadas de giro dentado con Gas1 silenciado tras 24 horas de cultivo.

El silenciamiento de Gas1 promueve un aumento en el diámetro de las neuroesferas derivadas de GD de ratón neonato a las 24 horas de cultivo, se observa una

disminución del 45.65 ± 4.411 en el porcentaje de neuroesferas con un diámetro menor a 200 micras con respecto al total, mientras que incrementan un $29.39 \pm 6.84\%$ las neuroesferas de diámetro cercano a 400 micras (Fig. 10).

También se observó una disminución en el número de neuroesferas por campo con el silenciamiento de Gas1, el número decrece en 4.5 ± 3.542 esferas por campo (Fig. 11)

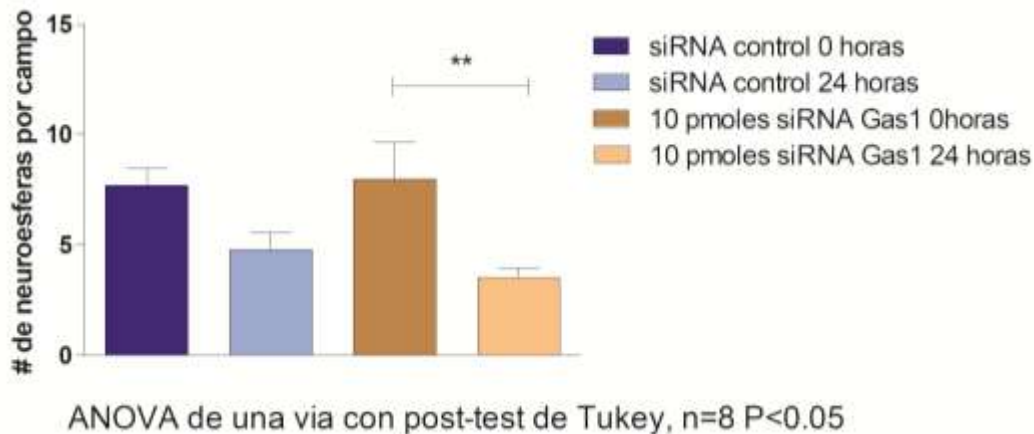
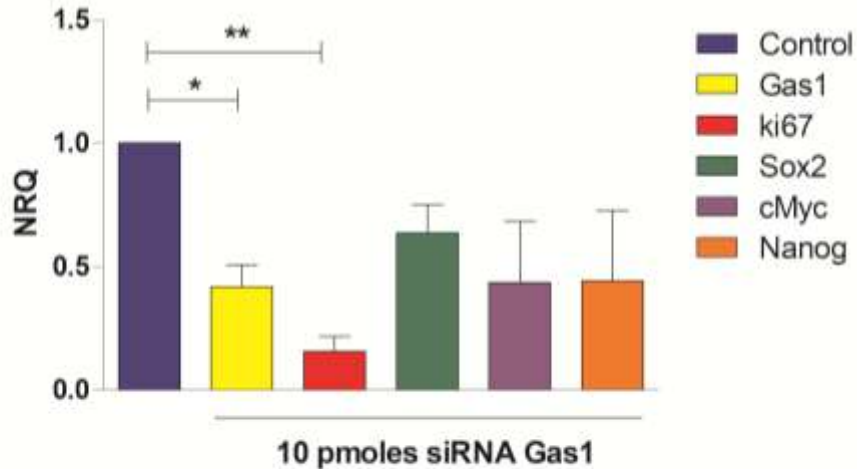


Figura 11. El silenciamiento de Gas1 disminuyó el número de neuroesferas por campo. Se obtuvo el promedio de esferas por campo a las 24 horas tras el silenciamiento de Gas1.

5. Evaluación de la proliferación celular

Al observar el incremento en el tamaño celular con el silenciamiento de Gas1, se decidió evaluar si este efecto se debía a un incremento en la tasa de proliferación, para esto se midió la expresión génica de Ki67, cMyc, Sox2 y Nanog por qRT-PCR.



ANOVA de una vía con post test de Dunnet n=4 P<0.01

Figura 12. El silenciamiento de Gas1 en las neuroesferas disminuyó la expresión relativa de mRNA de ki67. Se evaluaron también tres factores de troncalidad relacionados con la proliferación (cMyc) y la pluripotencialidad (Sox2 y Nanog).

Los resultados de la qRT-PCR de ki67 mostraron una disminución del $84.25 \pm 5.31\%$ en las neuroesferas con Gas1 silenciado. Así mismo se observa una tendencia en los marcadores cMyc, Sox2 y Nanog a disminuir, sin embargo se requiere aumentar el tamaño de muestras para disipar parte del error estadístico (Fig. 12).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Gas1 es una proteína importante en el desarrollo embrionario, el grupo de Cheng-Mi Fan ha mostrado su papel como co-receptor de Shh, así como su importancia en la organogénesis al extender el gradiente de Shh, promover la palatogénesis, la formación del cerebelo, el aparato digestivo, el aparato genitourinario, etc., mientras que regula negativamente la proliferación en la retina o en los progenitores del sistema nervioso entérico. (Y. Liu, May, & Fan, 2001; Martinelli & Fan, 2007; Seppala et al., 2007)

La disminución de la expresión de Gas1 tiene dos efectos contrarios, por un lado al silenciar su expresión promueve la proliferación y metástasis en diversas líneas cancerosas. (Gobeil et al., 2008; Li et al., 2016; Zhao et al., 2009) Este efecto podría deberse a que Gas1 actúa como un modulador negativo de la señalización de GDNF en la vía canónica, en donde se requiere la presencia de la proteína tipo tirosina cinasa RET, la sobreexpresión de Gas1 disminuye la fosforilación de esta proteína y a su vez la de Akt disminuyendo la viabilidad y la proliferación de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.(Lopez-Ramirez, Dominguez-Monzon, Vergara, & Segovia, 2008) (Zarco, Gonzalez-Ramirez, Gonzalez, & Segovia, 2012)

En el presente trabajo se utilizó un modelo que nos permite aislar células troncales neurales, el cultivo de neuroesferas. En este modelo las células no diferenciadas crecen en ausencia de suero fetal bovino y en presencia de factores de crecimiento que actúan como mitógenos para las células no diferenciadas, en estas condiciones las células crecen como agregados esferoidales flotantes. El cultivo de células troncales mediante la formación de neuroesferas se describió por primera vez en 1992 por Reynolds y Weiss, a partir del cultivo de células extraídas del estriado de ratones adultos en presencia de factores de crecimiento demostraron la presencia de células troncales neurales en el cerebro adulto.(Reynolds & Weiss, 1992) Este modelo es una herramienta útil para el análisis de proliferación, autorenovación y diferenciación de las células troncales del sistema nervioso. Cada neuroesfera contiene una población

heterogénea entre células troncales de estirpe neural así como progenitores comprometidos a linajes gliales y neuronales. (Jensen & Parmar, 2006)

El objetivo principal de este trabajo fue indagar el efecto que tendría el silenciar la expresión de Gas1, ya que en un trabajo previo se mostró que esta proteína se expresa abundantemente en neuroesferas derivadas de giro dentado y zona subventricular de ratones neonatos y adultos, mientras que en gliomaesferas derivadas de las líneas celulares C6 y U87 su expresión fue casi nula, lo que concuerda con diversos reportes que muestran la disminución de esta proteína en diversos tipos de cáncer, entre estos el cáncer colorectal y el melanoma. (Aguirre Pineda, 2016) (Tabla 1) Por lo que, en un principio se pensó que el silenciamiento de Gas1 en las células troncales neurales promovería un fenotipo tumoral, al incrementar la proliferación celular como se observó en las neuroesferas entéricas derivadas de un ratón Knock-out para Gas1. (Biau et al., 2013)

En primer lugar se observó la expresión de los factores de troncalidad cMyc, Sox2 y Nanog (Fig. 5). cMyc es un factor de transcripción también conocido como un oncogén, su función principal es promover el paso de la fase G1 a S durante el ciclo celular promoviendo un estado proliferativo. (Perez et al., 2011)

La expresión de cMyc se encuentra disminuida respecto a la línea celular de neuroblastoma N1E-115, lo cual es normal debido a que este tipo de cáncer tiene amplificaciones en el gen de cMyc. (Schwab et al., 2003)

El factor de transcripción Nanog actúa principalmente promoviendo la autorenovación y pluripotencialidad del tejido, este se expresa ampliamente en células madre embrionarias y en células troncales cancerosas. Los resultados de la RT-PCR de punto final no muestran diferencias respecto al control. (Mitsui et al., 2003)

Sox2 es otro factor de transcripción que promueve la pluripotencialidad, durante la neurogénesis se expresa en las células en desarrollo del tubo neural, así como en los progenitores del sistema nervioso central, este factor baja su expresión cuando las células comienzan a diferenciarse. (Graham et al., 2003)

Se encontró un incremento en los cultivos derivados de giro dentado, esto era de esperarse debido a que las células de la neuroesfera poseen un mayor grado de pluripotencialidad que las de neuroblastoma, además que estas últimas crecen en presencia de suero fetal bovino, el cual promueve la diferenciación.

La expresión de la proteína Sonic hedgehog (Shh) se observa ligeramente disminuida con respecto a la línea celular N1E-115, Shh se sobreexpresa en diversos tipos de tumores, incluidos el neuroblastoma, por lo tanto este resultado es esperado. (Schwab et al., 2003)

Por último se observa la ausencia del proto-oncogen RET en las neuroesferas derivadas de giro dentado, mientras que en el control se observa sobreexpresado, siendo algo característico de diversas líneas tumorales. (Manie, Santoro, Fusco, & Billaud, 2001)

La ausencia del mensajero de RET en las células troncales neurales concuerda con la expresión reportada en la embriogénesis de ratón, donde se ha reportado solo se expresa en la cresta neural, el ganglio de la raíz dorsal, el sistema nervioso entérico, la medula espinal, la retina y el riñón, estando ausente en los núcleos profundos del cerebro o en la corteza. (Pachnis, Mankoo, & Costantini, 1993)

Probablemente este patrón diferencial en la expresión de RET delimita el papel que posee Gas1 para promover la apoptosis y/o arresto celular mientras que en la zona ventral del tubo neural promueve la proliferación mediada por Shh para la formación de diversos órganos como el cerebro, el cerebelo, el aparato digestivo y la división del eje derecha-izquierda. (Bond et al., 2002) (Apelqvist, Ahlgren, & Edlund, 1997; Levin, 2003; Roberts et al., 1995)

El aumento de tamaño en las neuroesferas en las que se silenció a Gas1 parece indicar un aumento en la proliferación celular (Fig. 8 y 9), mientras la disminución del marcador de proliferación ki67 arroja una contradicción (Fig. 11). Existe la posibilidad de que el aumento en el diámetro esférico se deba a un fenómeno de hipertrofia, sin embargo no existen reportes que apoyen esta conjetura. Otra explicación recae en la

capacidad de “coalescencia o cohesión” de este modelo celular, en el 2008 Vangipuram y cols., reportan el incremento en el tamaño de esferas cultivadas en presencia de etanol, interesantemente no encontraron cambios en la proliferación celular o apoptosis, sino en la expresión de proteínas de adhesión, las cuales promovían la unión de varias esferas entre si. (Vangipuram, Grever, Parker, & Lyman, 2008) Al contar el número de esferas inicial y después de 24 horas de cultivo, se observó una disminución en la cantidad de las esferas que crecieron en presencia del siRNA de Gas1, este efecto no se observó en el control (Fig. 10). Por lo que sería interesante evaluar cambios en la expresión de proteínas de adhesión, además muchas de estas proteínas se relacionan con la diferenciación y a su vez con cambios en el tamaño celular. (Bian, 2013)

Se requieren más estudios para dilucidar el papel que tiene Gas1 en las células troncales neurales derivadas del giro dentado, tales como corroborar los datos obtenidos por técnicas que nos permitan evaluar la expresión proteínica o monitorear el ciclo celular por citometría de flujo, lo que da pie a futuras investigaciones.

CONCLUSIÓN

La proteína Gas1 se encuentra expresada en las células troncales derivadas del giro dentado de ratones neonatos, estas células expresan marcadores típicos de proliferación y pluripotencialidad, tales como Sox2, cMyc, Nanog y Sonic Hedgehog. Sin embargo no expresan el mRNA de RET, por lo cual la vía principal que actúa en este modelo es la señalización mediada por Shh donde Gas1, promueve la proliferación y su ausencia, la disminuye, esto concuerda con lo observado por qRT-PCR al encontrar a los marcadores ki67 y cMyc disminuidos. Los resultados presentados indican que la disminución de Gas1 disminuye la proliferación celular en las células troncales derivadas de GD.

PERSPECTIVAS

Para evaluar la proliferación:

- Ensayo de BrdU
- Incorporación de PI
- Inmunofluorescencia contra Ki67

Para medir hipertrofia

- Relación Proteína/DNA
- Citometría de flujo de la esfera disgregada

Para evaluar sobrevivencia

- Expresión de p-Akt
- Anexina 5

Para análisis de coalescencia:

- Monitoreo en tiempo real (Grabación)
- Análisis de proteínas de adhesión

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre Pineda, J. N. 2016. "“Silenciamiento de Gas1 en células troncales cancerosas”." Maestria, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV.

Apelqvist, A., U. Ahlgren, and H. Edlund. 1997. "Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas." *Curr Biol* 7 (10):801-4.

Biau, S., S. Jin, and C. M. Fan. 2013. "Gastrointestinal defects of the Gas1 mutant involve dysregulated Hedgehog and Ret signaling." *Biol Open* 2 (2):144-55. doi: 10.1242/bio.20123186.

Bjornsson, C. S., M. Apostolopoulou, Y. Tian, and S. Temple. 2015. "It takes a village: constructing the neurogenic niche." *Dev Cell* 32 (4):435-46. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.010.

Bond, J., E. Roberts, G. H. Mochida, D. J. Hampshire, S. Scott, J. M. Askham, K. Springell, M. Mahadevan, Y. J. Crow, A. F. Markham, C. A. Walsh, and C. G. Woods. 2002. "ASPM is a major determinant of cerebral cortical size." *Nat Genet* 32 (2):316-20. doi: 10.1038/ng995.

Gobeil, S., X. Zhu, C. J. Doillon, and M. R. Green. 2008. "A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene." *Genes Dev* 22 (21):2932-40. doi: 10.1101/gad.1714608.

Graham, V., J. Khudyakov, P. Ellis, and L. Pevny. 2003. "SOX2 functions to maintain neural progenitor identity." *Neuron* 39 (5):749-65.

Jensen, J. B., and M. Parmar. 2006. "Strengths and limitations of the neurosphere culture system." *Mol Neurobiol* 34 (3):153-61. doi: 10.1385/MN:34:3:153.

Kempermann, G., H. G. Kuhn, and F. H. Gage. 1997. "Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (19):10409-14.

Levin, M. 2003. "Motor protein control of ion flux is an early step in embryonic left-right asymmetry." *Bioessays* 25 (10):1002-10. doi: 10.1002/bies.10339.

Li, Q., Y. Qin, P. Wei, P. Lian, Y. Li, Y. Xu, X. Li, D. Li, and S. Cai. 2016. "Gas1 Inhibits Metastatic and Metabolic Phenotypes in Colorectal Carcinoma." *Mol Cancer Res* 14 (9):830-40. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0032.

Liu, Y., N. R. May, and C. M. Fan. 2001. "Growth arrest specific gene 1 is a positive growth regulator for the cerebellum." *Dev Biol* 236 (1):30-45. doi: 10.1006/dbio.2000.0146.

Lopez-Ramirez, M. A., G. Dominguez-Monzon, P. Vergara, and J. Segovia. 2008. "Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling." *Int J Dev Neurosci* 26 (5):497-503. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2008.02.006.

Manie, S., M. Santoro, A. Fusco, and M. Billaud. 2001. "The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation." *Trends Genet* 17 (10):580-9.

Martinelli, D. C., and C. M. Fan. 2007. "Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling." *Genes Dev* 21 (10):1231-43. doi: 10.1101/gad.1546307.

McLenachan, S., D. Zhang, A. B. Palomo, M. J. Edel, and F. K. Chen. 2013. "mRNA transfection of mouse and human neural stem cell cultures." *PLoS One* 8 (12):e83596. doi: 10.1371/journal.pone.0083596.

Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, and S. Yamanaka. 2003. "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." *Cell* 113 (5):631-42.

Pachnis, V., B. Mankoo, and F. Costantini. 1993. "Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis." *Development* 119 (4):1005-17.

Perez, E. A., R. B. Jenkins, A. C. Dueck, A. E. Wiktor, P. P. Bedroske, S. K. Anderson, R. P. Ketterling, W. R. Sukov, K. Kanehira, B. Chen, X. J. Geiger, C. A. Andorfer, A. E. McCullough, N. E. Davidson, S. Martino, G. W. Sledge, P. A. Kaufman, L. A. Kutteh, J. R. Gralow, L. N. Harris, J. N. Ingle, W. L. Lingle, and M. M. Reinholz. 2011. "C-MYC alterations and association with patient outcome in early-stage HER2-positive breast cancer from the north central cancer treatment group N9831 adjuvant trastuzumab trial." *J Clin Oncol* 29 (6):651-9. doi: 10.1200/JCO.2010.30.2125.

Reynolds, B. A., and S. Weiss. 1992. "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* 255 (5052):1707-10.

Roberts, D. J., R. L. Johnson, A. C. Burke, C. E. Nelson, B. A. Morgan, and C. Tabin. 1995. "Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut." *Development* 121 (10):3163-74.

Schwab, M., F. Westermann, B. Hero, and F. Berthold. 2003. "Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology." *Lancet Oncol* 4 (8):472-80.

Seppala, M., M. J. Depew, D. C. Martinelli, C. M. Fan, P. T. Sharpe, and M. T. Cobourne. 2007. "Gas1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interacts with sonic hedgehog." *J Clin Invest* 117 (6):1575-84. doi: 10.1172/JCI32032.

Vangipuram, S. D., W. E. Grever, G. C. Parker, and W. D. Lyman. 2008. "Ethanol increases fetal human neurosphere size and alters adhesion molecule gene expression." *Alcohol Clin Exp Res* 32 (2):339-47. doi: 10.1111/j.1530-0277.2007.00568.x.

Xu, L., X. Wang, J. Wan, T. Li, X. Gong, K. Zhang, L. Yi, Z. Xiang, M. Xu, and H. Cui. 2012. "Sonic Hedgehog pathway is essential for neuroblastoma cell proliferation and tumor growth." *Mol Cell Biochem* 364 (1-2):235-41. doi: 10.1007/s11010-011-1222-6.

Zarco, N., R. Gonzalez-Ramirez, R. O. Gonzalez, and J. Segovia. 2012. "GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway." *Apoptosis* 17 (6):627-35. doi: 10.1007/s10495-011-0696-8.

Zhao, L., Y. Pan, Y. Gang, H. Wang, H. Jin, J. Tie, L. Xia, Y. Zhang, L. He, L. Yao, T. Qiao, T. Li, Z. Liu, and D. Fan. 2009. "Identification of GAS1 as an epirubicin resistance-related gene in human gastric cancer cells with a partially randomized small interfering RNA library." *J Biol Chem* 284 (39):26273-85. doi: 10.1074/jbc.M109.028068.

Aguirre Pineda, J. N. (2016). "Silenciamiento de *Gas1* en células troncales cancerosas". (Maestría), CINVESTAV, México, DF.

Ai, Y. S. W. (2013). Chapter 15 Function of KLF4 in Stem Cell Biology. In D. B. a. N. Lenka (Ed.), "Pluripotent Stem Cells".

Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124(3), 319-335.

Altman, J., & Das, G. D. (1967). Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature*, 214(5093), 1098-1101.

Annovazzi, L., Mellai, M., Caldera, V., Valente, G., & Schiffer, D. (2011). SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics*, 8(3), 139-147.

Apelqvist, A., Ahlgren, U., & Edlund, H. (1997). Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol*, 7(10), 801-804.

Bayer, S. A., Yackel, J. W., & Puri, P. S. (1982). Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*, 216(4548), 890-892.

Bian, S. (2013). Cell Adhesion Molecules in Neural Stem Cell and Stem Cell- Based Therapy for Neural Disorders. In L. Bonfanti (Ed.), *"Neural Stem Cells - New Perspectives"* (pp. 428).

Biau, S., Jin, S., & Fan, C. M. (2013). Gastrointestinal defects of the Gas1 mutant involve dysregulated Hedgehog and Ret signaling. *Biol Open*, 2(2), 144-155. doi:10.1242/bio.20123186

Bjornsson, C. S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., & Temple, S. (2015). It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Dev Cell*, 32(4), 435-446. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.010

Blanpain, C., Lowry, W. E., Geoghegan, A., Polak, L., & Fuchs, E. (2004). Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*, 118(5), 635-648. doi:10.1016/j.cell.2004.08.012

Bond, J., Roberts, E., Mochida, G. H., Hampshire, D. J., Scott, S., Askham, J. M., . . . Woods, C. G. (2002). ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat Genet*, 32(2), 316-320. doi:10.1038/ng995

Cahill, D. P., Levine, K. K., Betensky, R. A., Codd, P. J., Romany, C. A., Reavie, L. B., . . . Louis, D. N. (2007). Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res*, 13(7), 2038-2045. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2149

Chamberlain, M. C. (2010). Temozolomide: therapeutic limitations in the treatment of adult high-grade gliomas. *Expert Rev Neurother*, 10(10), 1537-1544. doi:10.1586/ern.10.32

Chao, S. T., & Suh, J. H. (2006). When should radiotherapy for low-grade glioma be given--immediately after surgery or at the time of progression? *Nat Clin Pract Oncol*, 3(3), 136-137. doi:10.1038/ncponc0455

Ciccarelli, C., Philipson, L., & Sorrentino, V. (1990). Regulation of expression of growth arrest-specific genes in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 10(4), 1525-1529.

Clarke, M. F., & Fuller, M. (2006). Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*, 124(6), 1111-1115. doi:10.1016/j.cell.2006.03.011

Dang, C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell*, 149(1), 22-35. doi:10.1016/j.cell.2012.03.003

Del Sal, G., Ruaro, M. E., Philipson, L., & Schneider, C. (1992). The growth arrest-specific gene, gas1, is involved in growth suppression. *Cell*, 70(4), 595-607.

Dhaliwal, J., & Lagace, D. C. (2011). Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice. *Eur J Neurosci*, 33(6), 1025-1036. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07600.x

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703-716.

Dominguez-Monzon, G., Benitez, J. A., Vergara, P., Lorenzana, R., & Segovia, J. (2009). Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh. *Int J Dev Neurosci*, 27(4), 305-313. doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.03.009

Du, Z., Jia, D., Liu, S., Wang, F., Li, G., Zhang, Y., . . . Hao, A. (2009). Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia*, 57(7), 724-733. doi:10.1002/glia.20800

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-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. doi:10.1038/3305

Evdokiou, A., & Cowled, P. A. (1998). Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines. *Int J Cancer*, 75(4), 568-577.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., . . . Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49(6), 1374-1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027

Fuchs, E., & Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63, 345-382. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.002021

Gobeil, S., Zhu, X., Doillon, C. J., & Green, M. R. (2008). A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene. *Genes Dev*, 22(21), 2932-2940. doi:10.1101/gad.1714608

Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., & Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39(5), 749-765.

Grossi, M., La Rocca, S. A., Pierluigi, G., Vannucchi, S., Ruaro, E. M., Schneider, C., & Tato, F. (1998). Role of Gas1 down-regulation in mitogenic stimulation of quiescent NIH3T3 cells by v-Src. *Oncogene*, 17(13), 1629-1638. doi:10.1038/sj.onc.1202090

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hatinen, T., Holm, L., & Airaksinen, M. S. (2007). Loss of neurturin in frog--comparative genomics study of GDNF family ligand-receptor pairs. *Mol Cell Neurosci*, 34(2), 155-167. doi:10.1016/j.mcn.2006.10.009

Houghton, J., Morozov, A., Smirnova, I., & Wang, T. C. (2007). Stem cells and cancer. *Semin Cancer Biol*, 17(3), 191-203. doi:10.1016/j.semcancer.2006.04.003

Huse, J. T., & Holland, E. C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer*, 10(5), 319-331. doi:10.1038/nrc2818

INEGI. (2015). *Proyecciones de la Población 2010-2050*. Retrieved from

Jensen, J. B., & Parmar, M. (2006). Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol Neurobiol*, 34(3), 153-161. doi:10.1385/MN:34:3:153

Jiang, Z., Xu, Y., & Cai, S. (2011). Down-regulated GAS1 expression correlates with recurrence in stage II and III colorectal cancer. *Hum Pathol*, 42(3), 361-368. doi:10.1016/j.humpath.2010.03.009

Jung, C. S., Foerch, C., Schanzer, A., Heck, A., Plate, K. H., Seifert, V., . . . Sitzer, M. (2007). Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*, 130(Pt 12), 3336-3341. doi:10.1093/brain/awm263

Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19), 10409-10414.

Kim, J. E., Patel, M., Ruzevick, J., Jackson, C. M., & Lim, M. (2014). STAT3 Activation in Glioblastoma: Biochemical and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel)*, 6(1), 376-395. doi:10.3390/cancers6010376

Kleihues, P. B.-S., J.; Ohgaki, H. (2014). 5. 16 *Tumours of the nervous system*. Retrieved from

Knoth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R. P., . . . Kempermann, G. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One*, 5(1), e8809. doi:10.1371/journal.pone.0008809

Kondo, T., Setoguchi, T., & Taga, T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(3), 781-786. doi:10.1073/pnas.0307618100

Lapouge, G., Millon, R., Muller, D., Abecassis, J., Eber, M., Bergerat, J. P., & Klein-Soyer, C. (2005). Cisplatin-induced genes as potential markers for thyroid cancer. *Cell Mol Life Sci*, 62(1), 53-64. doi:10.1007/s00018-004-4329-z

Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., . . . Fine, H. A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9(5), 391-403. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.030

Lee, S. Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, 3(3), 198-210. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>

Lee, T. C., Li, L., Philipson, L., & Ziff, E. B. (1997). Myc represses transcription of the growth arrest gene gas1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24), 12886-12891.

Levin, M. (2003). Motor protein control of ion flux is an early step in embryonic left-right asymmetry. *Bioessays*, 25(10), 1002-1010. doi:10.1002/bies.10339

Li, Q., Qin, Y., Wei, P., Lian, P., Li, Y., Xu, Y., . . . Cai, S. (2016). Gas1 Inhibits Metastatic and Metabolic Phenotypes in Colorectal Carcinoma. *Mol Cancer Res*, 14(9), 830-840. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0032

Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., . . . Yu, J. S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5, 67. doi:10.1186/1476-4598-5-67

Liu, Y., May, N. R., & Fan, C. M. (2001). Growth arrest specific gene 1 is a positive growth regulator for the cerebellum. *Dev Biol*, 236(1), 30-45. doi:10.1006/dbio.2000.0146

Lopez-Ramirez, M. A., Dominguez-Monzon, G., Vergara, P., & Segovia, J. (2008). Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling. *Int J Dev Neurosci*, 26(5), 497-503. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.02.006

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., . . . Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114(2), 97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4

Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Gotz, M., . . . Giachino, C. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, 6(5), 445-456. doi:10.1016/j.stem.2010.03.017

Luo, J. H., Yu, Y. P., Cieply, K., Lin, F., DeFlavia, P., Dhir, R., . . . Becich, M. (2002). Gene expression analysis of prostate cancers. *Mol Carcinog*, 33(1), 25-35.

Manie, S., Santoro, M., Fusco, A., & Billaud, M. (2001). The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet*, 17(10), 580-589.

Martinelli, D. C., & Fan, C. M. (2007). Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes Dev*, 21(10), 1231-1243. doi:10.1101/gad.1546307

McLenachan, S., Zhang, D., Palomo, A. B., Edel, M. J., & Chen, F. K. (2013). mRNA transfection of mouse and human neural stem cell cultures. *PLoS One*, 8(12), e83596. doi:10.1371/journal.pone.0083596

Michalczyk, K., & Ziman, M. (2005). Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol*, 20(2), 665-671. doi:10.14670/HH-20.665

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., . . . Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, *113*(5), 631-642.

Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., . . . Niwa, H. (2006). Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, *26*(20), 7772-7782. doi:10.1128/MCB.00468-06

Natsume, A., Kinjo, S., Yuki, K., Kato, T., Ohno, M., Motomura, K., . . . Wakabayashi, T. (2011). Glioma-initiating cells and molecular pathology: implications for therapy. *Brain Tumor Pathol*, *28*(1), 1-12. doi:10.1007/s10014-010-0011-3

NCI. (2014). General information About Brain Tumors. Retrieved from <https://www.cancer.gov/types/brain/patient/adult-brain-treatment-pdq-section/all>

Neradil, J., & Veselska, R. (2015). Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci*, *106*(7), 803-811. doi:10.1111/cas.12691

OMS. (2014). 10 datos sobre el cáncer. Retrieved from <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>

OMS. (2015). Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., . . . Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*, *17 Suppl 4*, iv1-iv62. doi:10.1093/neuonc/nov189

Pachnis, V., Mankoo, B., & Costantini, F. (1993). Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development*, *119*(4), 1005-1017.

Perez, E. A., Jenkins, R. B., Dueck, A. C., Wiktor, A. E., Bedroske, P. P., Anderson, S. K., . . . Reinholz, M. M. (2011). C-MYC alterations and association with patient outcome

in early-stage HER2-positive breast cancer from the north central cancer treatment group N9831 adjuvant trastuzumab trial. *J Clin Oncol*, 29(6), 651-659. doi:10.1200/JCO.2010.30.2125

Raz, R., Lee, C. K., Cannizzaro, L. A., d'Eustachio, P., & Levy, D. E. (1999). Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), 2846-2851.

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.

Roberts, D. J., Johnson, R. L., Burke, A. C., Nelson, C. E., Morgan, B. A., & Tabin, C. (1995). Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development*, 121(10), 3163-3174.

Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H., & Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 280(26), 24731-24737. doi:10.1074/jbc.M502573200

Schneider, C., King, R. M., & Philipson, L. (1988). Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*, 54(6), 787-793.

Schueler-Furman, O., Glick, E., Segovia, J., & Linial, M. (2006). Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands? *Trends Pharmacol Sci*, 27(2), 72-77. doi:10.1016/j.tips.2005.12.004

Schwab, M., Westermann, F., Hero, B., & Berthold, F. (2003). Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol*, 4(8), 472-480.

Segovia, J. B., E.; Lara-Lozano, M. (2016). Effects of Gas1 on gliomas: a review on current preclinical studies. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 101-109. doi:10.20517/2394-4722.2015.76

Seppala, M., Depew, M. J., Martinelli, D. C., Fan, C. M., Sharpe, P. T., & Cobourne, M. T. (2007). Gas1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interacts with sonic hedgehog. *J Clin Invest*, *117*(6), 1575-1584. doi:10.1172/JCI32032

Shridhar, V., Lee, J., Pandita, A., Iturria, S., Avula, R., Staub, J., . . . Smith, D. I. (2001). Genetic analysis of early- versus late-stage ovarian tumors. *Cancer Res*, *61*(15), 5895-5904.

Simoneau, A. R., Spruck, C. H., 3rd, Gonzalez-Zulueta, M., Gonzalzo, M. L., Chan, M. F., Tsai, Y. C., . . . Jones, P. A. (1996). Evidence for two tumor suppressor loci associated with proximal chromosome 9p to q and distal chromosome 9q in bladder cancer and the initial screening for GAS1 and PTC mutations. *Cancer Res*, *56*(21), 5039-5043.

Song, S., Mao, G., Du, J., & Zhu, X. (2016). Novel RGD containing, temozolomide-loading nanostructured lipid carriers for glioblastoma multiforme chemotherapy. *Drug Deliv*, *23*(4), 1404-1408. doi:10.3109/10717544.2015.1064186

Stewart, B. W., C. (2014). *World Cancer Report 2014*. Retrieved from

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., . . . National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, *352*(10), 987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330

Tan, A. C., Jimeno, A., Lin, S. H., Wheelhouse, J., Chan, F., Solomon, A., . . . Hidalgo, M. (2009). Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol Oncol*, *3*(5-6), 425-438. doi:10.1016/j.molonc.2009.03.004

Taupin, P. (2006). Adult neural stem cells, neurogenic niches, and cellular therapy. *Stem Cell Rev*, *2*(3), 213-219. doi:10.1007/s12015-006-0049-0

Tichy, J., Spechtmeyer, S., Mittelbronn, M., Hattingen, E., Rieger, J., Senft, C., & Foerch, C. (2016). Prospective evaluation of serum glial fibrillary acidic protein (GFAP)

as a diagnostic marker for glioblastoma. *J Neurooncol*, 126(2), 361-369. doi:10.1007/s11060-015-1978-8

van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875), 1030-1034. doi:10.1038/4151030a

Vangipuram, S. D., Grever, W. E., Parker, G. C., & Lyman, W. D. (2008). Ethanol increases fetal human neurosphere size and alters adhesion molecule gene expression. *Alcohol Clin Exp Res*, 32(2), 339-347. doi:10.1111/j.1530-0277.2007.00568.x

Wang, H., Zhou, X., Zhang, Y., Zhu, H., Zhao, L., Fan, L., . . . Fan, D. (2012). Growth arrest-specific gene 1 is downregulated and inhibits tumor growth in gastric cancer. *FEBS J*, 279(19), 3652-3664. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08726.x

Wang, J., Place, R. F., Huang, V., Wang, X., Noonan, E. J., Magyar, C. E., . . . Li, L. C. (2010). Prognostic value and function of KLF4 in prostate cancer: RNAi and vector-mediated overexpression identify KLF4 as an inhibitor of tumor cell growth and migration. *Cancer Res*, 70(24), 10182-10191. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2414

Wang, J., Wang, H., Li, Z., Wu, Q., Lathia, J. D., McLendon, R. E., . . . Rich, J. N. (2008). c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. *PLoS One*, 3(11), e3769. doi:10.1371/journal.pone.0003769

Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359(5), 492-507. doi:10.1056/NEJMra0708126

WHO: Cancer. (2016). Retrieved from <http://www.who.int/cancer/en/> 5/12/16

Xu, L., Wang, X., Wan, J., Li, T., Gong, X., Zhang, K., . . . Cui, H. (2012). Sonic Hedgehog pathway is essential for neuroblastoma cell proliferation and tumor growth. *Mol Cell Biochem*, 364(1-2), 235-241. doi:10.1007/s11010-011-1222-6

Yang, J., Chai, L., Fowles, T. C., Alipio, Z., Xu, D., Fink, L. M., . . . Ma, Y. (2008). Genome-wide analysis reveals Sall4 to be a major regulator of pluripotency in murine-embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(50), 19756-19761. doi:10.1073/pnas.0809321105

Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., . . . Buck, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, *90*(12), 5002-5012.

Yu, F., Li, J., Chen, H., Fu, J., Ray, S., Huang, S., . . . Ai, W. (2011). Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene*, *30*(18), 2161-2172. doi:10.1038/onc.2010.591

Zarco, N., Gonzalez-Ramirez, R., Gonzalez, R. O., & Segovia, J. (2012). GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway. *Apoptosis*, *17*(6), 627-635. doi:10.1007/s10495-011-0696-8

Zbinden, M., Duquet, A., Lorente-Trigos, A., Ngwabyt, S. N., Borges, I., & Ruiz i Altaba, A. (2010). NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J*, *29*(15), 2659-2674. doi:10.1038/emboj.2010.137

Zeineddine, D., Hammoud, A. A., Mortada, M., & Boeuf, H. (2014). The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells*, *3*(2), 74-82.

Zhang, J., & Jiao, J. (2015). Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int*, *2015*, 727542. doi:10.1155/2015/727542

Zhang, L., Yan, Y., Jiang, Y., Cui, Y., Zou, Y., Qian, J., . . . Wu, X. (2015). The expression of SALL4 in patients with gliomas: high level of SALL4 expression is correlated with poor outcome. *J Neurooncol*, *121*(2), 261-268. doi:10.1007/s11060-014-1646-4

Zhang, S., & Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells*, 6(3), 305-311. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.305

Zhao, L., Pan, Y., Gang, Y., Wang, H., Jin, H., Tie, J., . . . Fan, D. (2009). Identification of GAS1 as an epirubicin resistance-related gene in human gastric cancer cells with a partially randomized small interfering RNA library. *J Biol Chem*, 284(39), 26273-26285. doi:10.1074/jbc.M109.028068