

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
BIOLOGÍA



**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IIG9
Y PP1 EN CÉLULAS MADRE NEUROEPITELIALES HUMANAS AF22 Y GLIA
RADIALIZADA**

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

CONSTANZA ALEJANDRA DÍAZ MARCHANT

CONCEPCIÓN – CHILE

ABRIL, 2023.

Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Laboratorio de Neurobiología y Células madre NeuroCellT, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Integrantes comisión evaluadora

Dra. Katterine Salazar Martínez

Profesor Guía de Tesis

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Dr. Francisco Nualart Santander

Profesor Guía de Tesis

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Dr. Fernando Martínez Acuña

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Dr. Víctor Hernández Santander

Coordinador Seminario de título

Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Neurobiología y células madre “NeuroCellT” por su cálido recibimiento y constante apoyo académico durante todo este proceso. Deseo dar un agradecimiento especial a la Dra. Katterine Salazar, quien me recibió como su alumna cuando esta hermosa área de la ciencia era solo un sueño y un completo enigma para mí. Gracias por su paciencia para enseñarme desde cero, su disposición para resolver mis dudas y por su compromiso con este proceso tan importante para mi carrera.

Gracias al Dr. Eder Ramírez por el conocimiento entregado sobre técnicas de laboratorio muy útiles para todo el desarrollo de esta tesis, además de su buena disposición para ayudarme cada vez que tenía algún problema con algún experimento.

Al Dr. Francisco Nualart, gracias por sus aportes y el tiempo que invirtió en los análisis de los resultados de esta investigación, gracias por aquellas tardes en el Microscopio confocal analizando mis resultados de Inmunocitoquímica.

Al Dr. Fernando Martínez, gracias por el cálido recibimiento y el chocolate de bienvenida en aquel primer día en el laboratorio en donde le temía a lo nuevo y desconocido, gracias por su excelente disposición para resolver mis dudas cuando en ocasiones no sabía que explicación dar a algún resultado.

A mi amiga y compañera Paula Campos, gracias por ayudarme a sobrevivir en la carrera todos estos años, gracias por las risas y las tardes haciendo trabajos y estudiando en la biblioteca central, y por agregarle alegría y amenizar aquellos momentos que tal vez, no lo eran tanto.

Finalmente y más importante, agradecer a mis padres, porque sin ellos, nada de esto sería posible. Gracias por siempre creer en mí, por aguantar mi mal humor en periodos de certámenes y mucho estrés, y sobre todo, gracias por sus abrazos y palabras de aliento cada vez que me sentía derrotada.

INDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Células madres neurales humanas y el estudio de sus propiedades <i>in vitro</i>	11
1.2. Glía Radial: Aspectos generales.....	13
1.3. Proteína Fosfatasa 1: función, subtipos, subunidades regulatorias y su expresión en células troncales neurales.....	16
1.4. IIG9 subunidad regulatoria 32 de PP1 (PPP1R32) con una alta expresión en células troncales neurales.....	18
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
III. HIPOSTESIS.....	21
IV. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos específicos.....	21
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1. Consideraciones éticas.....	22
5.2. Cultivo de células AF22.....	22
5.3. Extracción de ARN total.....	23
5.4. Transcripción reversa de ARN total (RT).....	23
5.5. Amplificación del cDNA por PCR.....	24
5.6. Electroforesis en geles de agarosa.....	25
5.7. Obtención de extractos de proteínas totales.....	25
5.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia.....	26
5.9. Inmunodetección de proteínas.....	26
5.10. Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	28
5.11. Inducción de cuerpos embrioides a partir de células AF22.....	29

	5.12 Proceso de diferenciación de células AF22 hacia glía radial.....	29
	5.13. Análisis retrospectivo de la expresión del ARNm de IIIG9 y las isoformas de PP1 en células AF22.....	30
VI.	RESULTADOS.....	31
	6.1. PRIMERA PARTE: Análisis de la expresión de IIIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 en células AF22 del neuroepitelio humano.....	31
	6.1.1. Análisis retrospectivo en bases de datos para la expresión de los genes de IIIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 en células AF22.....	31
	6.1.2. Ensayos de RT-PCR para las isoformas larga y corta de IIIG9.....	31
	6.1.3. Ensayos de RT-PCR para las subunidades catalíticas de PP1 α , PP1 β y PP1 γ	33
	6.1.4. Análisis de expresión de las proteínas IIIG9 y las isoformas de PP1 en células AF22.....	35
	6.1.5. Caracterización inmunocitoquímica de células AF22 mediante el uso de marcadores de linaje celular.....	37
	6.1.6. Estudio de la localización subcelular de las proteínas IIIG9 y subunidades de PP1 alfa, beta y gamma en células AF22.....	38
	6.2 SEGUNDA PARTE: Obtención de cultivos de Glía radializada humana a partir de la diferenciación de células AF22.....	44
	6.3. TERCERA PARTE: Caracterización de la expresión de IIIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 en cultivos de glia radializada.....	44
VII.	DISCUSIÓN.....	50
	7.1. Células AF22 y sus características.....	50
	7.2. Las células AF22 muestran una alta expresión de IIIG9 y una expresión variable de las subunidades catalíticas de PP1.....	51
	7.3. Es posible la generación de cultivos de células gliales radializadas a partir de células neuroepiteliales AF22.....	54
	7.4 IIIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 beta y gama se expresan abundantemente en células radializadas diferenciadas a partir de células AF22...55	55
VIII.	CONCLUSIONES.....	57
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Naturaleza glial de las células madre neurales en el desarrollo y en el adulto (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009).....	15
Figura 2. Análisis retrospectivo para la expresión de genes de linaje celular, de IIG9 y las isoformas de PP1.....	32
Figura 3. Análisis de RT-PCR la expresión de las isoformas de IIG9 en gradiente de temperatura.....	34
Figura 4. Análisis de RT-PCR la expresión de las isoformas de PP1.....	36
Figura 5. Ensayos de western blot en células AF22 para la detección de IIG9 y las isoformas de PP1.....	39
Figura 6. Análisis de expresión de proteínas de linaje de células madres neurales por inmunofluorescencia y microscopía confocal de células AF22.....	41
Figura 7. Análisis de expresión de proteínas de linaje neuronal y glial por inmunofluorescencia y microscopía confocal de células AF22.....	42
Figura 8. Análisis de expresión de proteínas IIG9, PP1 alfa, PP1 beta y PP1 gama mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal de células AF22	43
Figura 9. Protocolo experimental para la obtención de cultivos de glia radializada a partir de células AF22.....	46
Figura 10. Inmunofluorescencia y microscopía confocal de glías radializadas obtenidas a partir de células AF22.....	48
Figura 11. Inmunofluorescencia y microscopía confocal para la detección de IIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 en células gliales radializadas.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados y tamaños de los productos amplificados.....	24
Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunodetección mediante Western blot.....	26
Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	27

RESUMEN

En etapas tempranas de formación del sistema nervioso, el tubo neural contiene células neuroepiteliales que se diferencian en células troncales llamadas "Glía radial", que luego darán origen a todas las neuronas y, posteriormente, a distintas células gliales como astrocitos, oligodendrocitos y ependimocitos. Así, la Glía radial comanda la neurogénesis y gliogénesis en distintos periodos del desarrollo embrionario, por lo que existe gran interés en entender la biología de estas células y los mecanismos moleculares que regulan su mantención y compromiso hacia diferentes linajes de diferenciación. Además, la comprensión del origen de patologías humanas del neurodesarrollo, que se manifiestan durante los primeros años de vida, puede lograrse a partir del estudio de la biología de las células madres neurales y de la Glía radial. Sin embargo, la imposibilidad de contar con células troncales del sistema nervioso humano ha limitado la obtención de este conocimiento. En este contexto, la generación de células pluripotentes inducidas (IPSCs) es una tecnología prometedora para cumplir con este objetivo.

Las células AF22 son células neuroepiteliales humanas comerciales, originadas a partir de IPSCs, que han centrado la atención de diversos grupos de investigación debido a que son fáciles de cultivar y permiten la generación *in vitro* de distintos subtipos de neuronas y astrocitos humanos mediante protocolos de cultivo específicos. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha reportado la generación de otros tipos celulares del sistema nervioso como la Glía radial, oligodendrocitos y ependimocitos.

IIIG9 es la subunidad regulatoria 32 de la proteína fosfatasa 1 (PP1), la cual presenta tres subunidades catalíticas llamadas PP1 alfa, PP1 beta y PP1 gamma. Estas subunidades tienen una expresión ubicua y se encargan de un 30%-50% del total de fosforilaciones proteicas. Datos de nuestro laboratorio, indican que durante el desarrollo del cerebro de rata, IIIG9 y PP1 alfa se localizan en la Glía radial embrionaria, sugiriendo que la acción conjunta de ambas proteínas puede ser clave para regular el estatus de fosforilación de diversas proteínas en estas células. Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún reporte acerca de la expresión y localización de estas proteínas en células troncales del sistema nervioso humano.

En esta tesis, nos centramos en caracterizar la expresión y localización de IIIIG9 y las proteínas PP1 alfa, PP1 beta y PP1 gama en células AF22 y en cultivos radializados obtenidos a partir de estas células. Así, determinamos que las células AF22 expresan todas las isoformas de PP1 pero solo PP1 beta mostró una localización celular abundante, al igual que IIIIG9. Por su parte, la diferenciación de células AF22 en células radializadas mantuvo la expresión de IIIIG9 y PP1 beta a nivel de los procesos radiales, además de inducir la expresión de PP1 gama.

De esta forma, el conocimiento generado en esta tesis puede abrir nuevas líneas de investigación para identificar cuáles son los blancos moleculares de estas proteínas fosfatasas y cómo estas desfosforilaciones impactan la biología de las células troncales y su diferenciación hacia células radializadas tipo Glía radial.

ABSTRACT

In early stages of development of the nervous system, the neural tube contains neuroepithelial cells that differentiate into stem cells called "radial glia", which later will originate all neurons and, subsequently, to different glial cells such as astrocytes, oligodendrocytes and ependymocytes. Thus, radial glia command neurogenesis and gliogenesis at different periods of embryonic development, which is why there is a great interest in understand the biology of these cells and the molecular mechanisms that regulate their maintenance and commitment to different lineages of differentiation. In addition, the understanding of the origin of human neurodevelopmental pathologies, which manifest during the first years of life, can be achieved from the study of the biology of neural stem cells and radial glia. However, the impossibility of obtaining stem cells from the human nervous system has limited the enlargement of this knowledge. In this context, the generation of induced stem cells (IPSCs) is a promising technology to meet this goal.

AF22 cells are commercial human neuroepithelial cells, originated from IPSCs, which have caught the attention of different research groups because they are easy to culture and allow the *in vitro* generation of different subtypes of human neurons and astrocytes through specific culture protocols. However, at the moment, there are no reports of generation of other cell types of the nervous system such as radial glia, oligodendrocytes and ependymocytes.

IIIG9 is the regulatory subunit 32 of protein phosphatase 1 (PP1), which has three catalytic subunits called PP1 alpha, PP1 beta and PP1 gamma. These subunits have ubiquitous expression and are responsible of 30%-50% of all protein phosphorylations. Data from our laboratory indicates that during rat brain development, IIIG9 and PP1 alpha are located in embryonic radial glia, suggesting that the joint action of both proteins may be key to regulating the phosphorylation status of different proteins in these cells. However, until now, there is no report on the expression and location of these proteins in stem cells of the human nervous system.

In this thesis, we focus on characterizing the expression and localization of IIIG9 and the proteins PP1 alpha, PP1 beta and PP1 gamma in AF22 cells and in radialized cultures obtained from these cells. Thus, we determined that AF22 cells express all PP1 isoforms but only PP1

beta showed abundant cellular localization, the same as IIIG9. On the other hand, the differentiation of AF22 cells in radialized cells maintained the expression of IIIG9 and PP1 beta at the level of the radial processes, in addition to inducing the expression of PP1 gamma.

In this way, the knowledge generated in this thesis can open new lines of research to identify the molecular targets of these protein phosphatases and how these dephosphorylation influences the biology of stem cells and their differentiation into radialized cells of the radial glia type.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Células madres neurales humanas y el estudio de sus propiedades *in vitro*

Hasta la fecha, existe escasa información acerca de las células neuroepiteliales tempranas del desarrollo del sistema nervioso humano, debido al cuestionamiento ético que implica la obtención de estas células para ser analizadas *in vitro*. Sin embargo, el advenimiento de la reprogramación celular durante la última década ha permitido conocer un poco más de la biología de estas células, marcando el comienzo de una nueva era en el campo de la biología y medicina regenerativa. Las iPSCs humanas son células pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos obtenidos desde la piel humana y tratadas en cultivo mediante retrovirus para expresar los factores de transcripción Oct4, Sox2, klf4, c-myc, Nanog y lin28 (Takahashi et al. 2007; Falk et al. 2012) esenciales para la mantención de la pluripotencialidad e indiferenciación.

Estas células han servido como base para el establecimiento *in vitro* de líneas celulares humanas de las células madres neurales y la génesis de cultivos neuronas de distintos subtipos (dopaminérgicas, glutamatérgicas, etc) y células gliales como astrocitos (Falk et al. 2012; Lundin et al. 2018). De esta manera, las iPSCs dan una ventaja importante para el estudio de ciertas enfermedades debido a su fácil accesibilidad, capacidad de expansión y pluripotencialidad. De igual forma, las células iPSCs han permitido el establecimiento de líneas celulares humanas obtenidas desde pacientes que padecen distintas enfermedades neurodegenerativas, por lo que son muy útiles para la detección de efectividad y toxicidad de fármacos (Shi et al. 2017). Por otra parte, células diferenciadas a partir de iPSCs han sido utilizadas para la terapia de reemplazo celular en algunas patologías, como por ejemplo en el tratamiento de enfermedades oculares a partir de la génesis de células epiteliales de pigmento retiniano (RPE) derivadas de iPSCs humanas, para tratar la degeneración macular, mejorando así la visión del paciente (Shi et al. 2017).

Estos antecedentes posicionan a las iPSCs como una excelente alternativa para resolver el problema de la poca disponibilidad de fuentes de células primarias humanas de difícil acceso, como lo son células cerebrales y del corazón, lo que por mucho tiempo represento una limitación crítica para el estudio de estas áreas. Además, debido a sus propiedades intrínsecas y gran

potencial de diferenciación, las iPSCs podrían ser obtenidas del mismo paciente que las requiera, permitiendo un modelo personalizado que otorgaría una mayor precisión al estudio de enfermedades (Shi et al. 2017).

Las células AF22 son una línea de células madres neurales, con características de células neuroepiteliales del periodo temprano del desarrollo del sistema nervioso, generadas a partir de células IPSCs humanas (Falk 2012). Estas células muestran una morfología, un potencial de diferenciación y un perfil de expresión génica muy característicos, que permanecen estables incluso después de una propagación a largo plazo durante más de 100 pasajes *in vitro*, en donde crecen formando pequeñas colonias en forma de roseta (Lundin et al. 2018; Lam et al. 2019). Sus características de células madres neurales pueden ser reconocidas mediante el estudio la expresión de marcadores como Pax6, SOX3, prominin, TERT (telomerasa) y proteínas del ciclo celular como CDK4, E2F1, ID2-3, FOXM1, MDM4, MXD3 y MYCN (Falk et al. 2012).

Las células AF22 constituyen una herramienta adecuada para estudiar una variedad de enfermedades neurodegenerativas humanas y del neurodesarrollo, permitiendo analizar los mecanismos moleculares implicados en la génesis de estas patologías en células madres neurales, en neuronas o en células gliales diferenciadas a partir de estas células. En este sentido, existen reportes donde sean utilizado las células AF22 para diferenciarlas *in vitro* hacia neuronas gabaérgicas, glutamatérgicas y serotoninérgicas (Tailor et al. 2013). Además se han establecido líneas celulares de astrocitos humanos diferenciados a partir de las células AF22 (Lundin et al. 2018). Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún reporte del uso de estas células establecer modelos de cultivo de células humanas de oligodendrocitos, endimocitos o en la génesis de células radializadas tipo Glía radial. Esta última reviste gran importancia, debido a que se postula que, patologías del neurodesarrollo (como la dislexia, discapacidad intelectual, trastorno del espectro autista, trastornos de la comunicación, entre otros) se originan por mecanismos que afectan la biología de mantención de las Glías radiales y sus funciones asociadas a la génesis de neuronas y glías del sistema nervioso.

1.2. Glía Radial: Aspectos generales

El sistema nervioso humano se origina a partir del ectodermo, debido a un engrosamiento celular denominado placa neural al día embrionario 17, el que luego se transforma en el tubo neural, una estructura cerrada y hueca que se hace visible a contar del día embrionario 28 (Muller et al.1987). Durante estas primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso, existen las células madres neuroepiteliales multipotentes, cuya identidad posicional y capacidad de diferenciación dependen del tipo de gradiente de morfógenos tales como ácido retinoico (RA), Sonic hedgehog (SHH) FGFs y Wnts (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009). Estas células proliferan rápidamente mediante divisiones simétricas aumentando el número de células neuroepiteliales que se transforman en células de la Glía radial (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009).

La Glía Radial es una célula elongada o "radializada", cuyo cuerpo abarca todo el espesor de la pared del tubo neural, con un proceso apical que alberga el núcleo y que se orienta hacia la cavidad central y un largo proceso basal que contacta la superficie externa. Estas células se encuentran presentes de manera ubicua durante las etapas neurogénicas en todos los vertebrados (Malatesta et al. 2008). Anteriormente se creía que la función de estas células era facilitar la migración neuronal gracias al largo proceso radial que atraviesa todo el espesor del tubo neural. Ahora en cambio, se conoce que la glía radial representa la población principal de progenitoras neurales del SNC, cuya descendencia mediante autorrenovación y diferenciación incluye todos los linajes celulares más importantes, como lo son las neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y ependimocitos (Figura 1) (Malatesta et al. 2003; Spassky et al. 2005).

En cuanto a su punto de aparición, existen datos confusos, ya que algunos autores consideran la inducción de RC2 y la expresión del ARNm de BLBP en el neuroepitelio como el hito que daría origen a estas células; sin embargo, otros consideran la aparición de las características astrogliales como el evento clave en la aparición de la glía radial (Malatesta et al. 2003). Si es ampliamente aceptado que durante su proceso de diferenciación desde una célula neuroepitelial, estas células comienzan a expresar marcadores como el transportador de glutamato, el cual es específico de astrocitos (GLAST), tenascina C (TN-C), la proteína fijadora de calcio S100 β y la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP) (Vives et al. 2003).

Igualmente expresan algunas proteínas de filamentos intermedios característicos de Glía radial, tales como Nestina, Vimentina y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009). En este mismo punto, las uniones estrechas encargadas de unir a las previamente células neuroepiteliales se convierten en uniones adherentes (Stoykova et al. 1997). Estos procesos marcan la transición entre una célula neuroepitelial y una célula Glía radial, la cual ocurre de manera gradual y mantiene la polaridad apical-basal recubriendo los ventrículos laterales y formando un epitelio pseudoestratificado dentro de la ZV, en donde los extremos apicales se anclan entre sí a través de uniones adherentes, las cuales son muy relevantes para la integridad de la ZV (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009).

La Glía radial tiene la capacidad de autorenovarse, para lo cual puede dividirse simétricamente, generando dos células hijas con las características de la célula inicial (célula madre neural), o asimétricamente, generando una nueva glía radial y una célula que puede diferenciarse (célula progenitora de un subtipo celular) (Ortíz-Alvarez et al. 2007). En esta mitosis, la fibra basal es heredada por una de las dos células hijas, por lo cual la otra prolonga un nuevo proceso propio. Estudios mediante inmunofluorescencia respaldan que durante este proceso de división celular, los procesos radializados hacia la superficie pial no se retraen, sino que permanecen en su lugar durante la totalidad del ciclo celular (Weissman et al. 2003). Así también, durante el ciclo celular, los núcleos experimentan un proceso denominado “migración nuclear intercinética”, en el cual los núcleos se encuentran inicialmente en la superficie apical, cerca del ventrículo, hacia la superficie basal durante la fase G1, para así lograr una ubicación basal durante la fase S y, posteriormente, regresar hacia la zona apical durante la fase G2 (Sauer 1935; Malatesta et al. 2008).

Así se ha definido que en el desarrollo del sistema nervioso humano, la Glía radial genera neuroblastos (célula progenitora de neuronas durante la neurogénesis) durante la cuarta a la veinteaava semana del desarrollo embrionario; en cambio, la génesis de células gliales (proceso llamado gliogénesis) como astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias comienza alrededor de la semana 20 y continua hasta el segundo año de vida (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009; Bystron et al. 2008).

Debido a la capacidad de diferenciación que posee la glía radial de transformarse en los linajes celulares más relevantes del sistema nervioso, es que su estudio y la comprensión de

sus bases moleculares es realmente importante, ya que como se mencionó anteriormente, existen diversas patologías humanas del neurodesarrollo cuya génesis temprana radica en alterar la correcta biología y el funcionamiento de células neuroepiteliales y de la glía radial (Louis et al. 2007).

Así, al ser la glía radial la célula troncal que da origen a casi la totalidad de las células del sistema nervioso adulto, a excepción de la microglía, es importante contar con modelos celulares de glía radial *in vitro* que nos permitan estudiar la biología de estas células, la expresión de proteínas y la acción de moléculas que pueden alterar su morfología o función. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos utilizado células troncales embrionarias de ratón llamadas J1ES derivadas de blastocitos 129S4/SvJae (Silva-Álvarez et al. 2017) donde hemos evaluado el efecto del tratamiento con ácido ascórbico y el co-cultivo con meninges para la obtención de cultivos altamente radializados de Glía radial. Sin embargo, hasta la fecha no contamos con protocolos establecidos para la obtención de cultivos radializados de Glía radial humana. De esta forma, contar con células AF22 en nuestro laboratorio representa una gran oportunidad para cumplir este propósito.

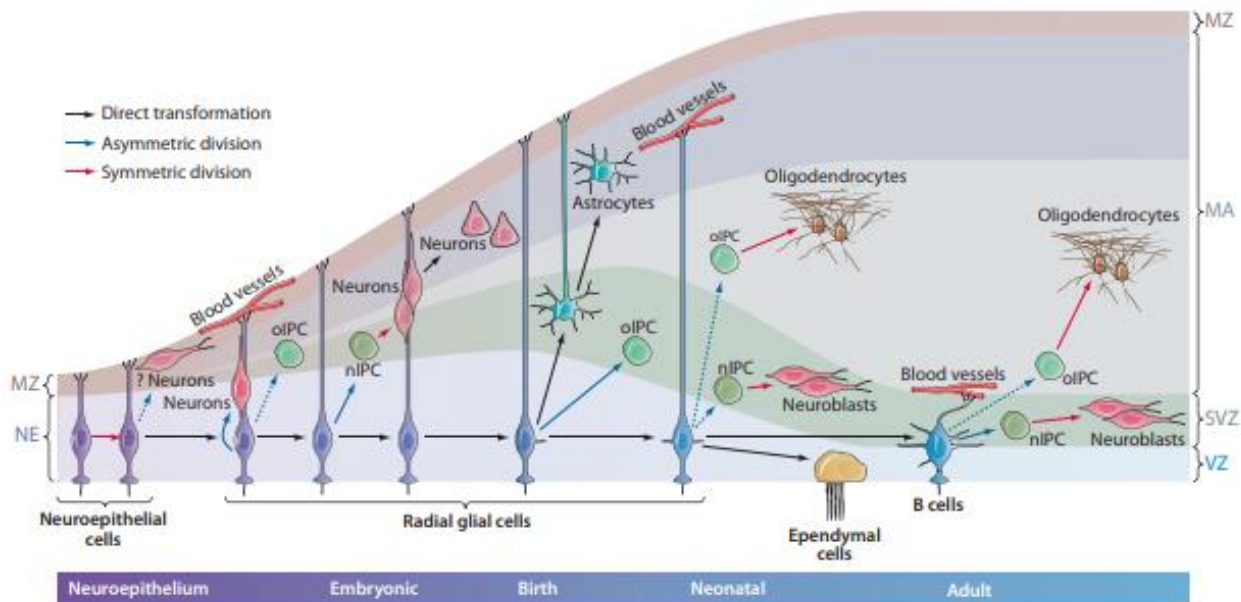


Figura 1. Naturaleza glial de las células madre neurales en el desarrollo y en el adulto. En el desarrollo temprano, las células neuroepiteliales se dividen en forma simétrica para generar más células neuroepiteliales, o en forma asimétrica para generar neuronas tempranas. A

medida que el epitelio cerebral se engrosa, las células neuroepiteliales sufren un elongamiento y se convierten en células de la Glía Radial, las cuales son elongadas o radializadas, poseen polaridad apical-basal y se dividen asimétricamente para generar neuronas de forma directa, o bien, indirectamente a través de células progenitoras intermedias (nIPC). Al final del desarrollo embrionario, la mayoría de las células de la Glía radial se separan de su lado apical y se convierten en astrocitos y oligodendrocitos. Por otra parte, una subpoblación de la Glía radial que se mantiene en la zona ventricular se transforman en células endimarias multiciliadas o continúan funcionando como NSCs en el periodo neonatal (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009).

1.3. Proteína Fosfatasa 1: función, subtipos, subunidades regulatorias y su expresión en células troncales neurales.

Las células eucariotas presentan muchos mecanismos que son regulados por fosforilación reversible de proteínas principalmente en los residuos de tirosina (Tyr), treonina (Thr) y serina (Ser). Este es el tipo de modificación postraduccional más común y se estima que aproximadamente más del 70% de todas las proteínas intracelulares son reguladas mediante fosforilación reversible (Rebelo et al. 2015). Así las fosforilaciones / desfosforilaciones constituyen un mecanismo transversal que regula procesos como la replicación del DNA, la expresión genética, el ciclo celular, el metabolismo, la diferenciación celular, entre otras. Por el contrario, la desregulación de estos mecanismos contribuyen al desarrollo de diversos tipos de neoplasias y numerosas enfermedades (Rebelo et al. 2015).

El estado de fosforilación de una proteína se encuentra determinado por las actividades relativas de dos tipos de enzimas opuestas: proteínas quinasas y proteínas fosfatasas. Ambos tipos representan una gran familia, constituida por alrededor de 500 miembros de proteínas quinasas y cerca de 30 proteínas fosfatasas que solo son subunidades catalíticas (Fardilha et al. 2011). Esta notable diferencia en el número de miembros de cada familia, radica en que las proteínas quinasas han evolucionado para que cada una de estas cumpla una función particular y específica. Por el contrario, las proteínas fosfatasas son holoenzimas donde cada subunidad catalítica es regulada por su interacción con numerosas subunidades regulatorias que otorgan la especificidad de función (Fardilha et al. 2011; Rebelo et al. 2015).

Las proteínas fosfatasa (Ser/Thr) se clasifican en tres grupos o familias denominadas: fosfatasa fosfoproteínicas (PPP), proteína fosfatasa dependientes de metales (PPM) y fosfatasa basadas en aspartato representadas por FCP/SCP (Rebelo et al. 2015). La proteína fosfatasa 1 es una fosfatasa fosfoproteínica encargada de aproximadamente un tercio a la mitad de las desfosforilaciones de proteínas que ocurren en células eucarióticas.

Existen tres genes que codifican para distintas subunidades catalíticas de esta proteína, PPP1CA codificante para la proteína PP1alpha (PP1 α); PPP1CB, el cual codifica para la proteína PP1beta/delta (PP1 β / δ) y PPP1CC para PP1gamma (PP1 γ), gen que también puede sufrir un empalme alternativo, lo que genera una variante PP1 gamma1 (PP1 γ 1) y PP1gamma2 (PP1 γ 2), todas estas isoformas tienen una masa muy similar de aproximadamente 37 kDa (NCBI, base de datos). Análisis de secuencias aminoacídicas muestran que las isoformas de PP1 son idénticas en un 90% siendo secuencias altamente conservadas (largo promedio de 260 aminoácidos) y las principales diferencias se ubican en las secuencias N y C terminales, los cuales determinan su especificidad (Martins et al. 2015).

Respecto a su distribución celular y subcelular, las isoformas de PP1 se localizan en distintas zonas intracelulares, o bien en zonas compartidas, pero desempeñando distintas funciones biológicas. Por ejemplo, PP1 α , PP1 β Y PP1 γ 1 se encuentran localizadas en el núcleo celular, con una acumulación adicional en nucléolos, sin embargo, PP1 α se encuentra asociadas a la matriz, y en centrosomas, PP1 β se distribuye a lo largo del nucléolo y diferentes zonas del núcleo y cromosomas y PP1 γ principalmente a nivel del nucléolo y cinetocoros (Rebelo et al. 2015). Análogamente en neuronas PP1 β se ubica con el soma y PP1 γ 1 interviene en sinapsis (Munton et al. 2004). En el sistema nervioso central de mamíferos como la rata, PP1 α y PP1 γ 1 se localizan en el cuerpo estriado, la corteza cerebral y el hipocampo. A su vez, mediante fraccionamiento celular se ha demostrado la presencia de PP1 β asociada a microtúbulos y PP1 γ 1 al citoesqueleto de actina, resultando así una leve presencia de PP1 β en neuronas corticales (más específicamente en el soma) y PP1 γ 1 en espinas dendríticas (Ouimet et al. 1995).

Debido a que las isoformas de PP1 son altamente ubicadas en las células, su función y distribución subcelular, depende de su interacción con subunidades de unión y regulatorias que indican dónde y cuándo actúa cada una de estas proteínas cumplen su función de

desfosforilación. Hasta la fecha, se han descrito más de 200 subunidades de unión y reguladoras, las cuales interaccionan físicamente con los subtipos de PP1 mediante dominios proteicos como RVxF, MyPhoNE y SILK (Fardilha et al. 2011; Martins et al. 2015). Por esta razón, el estudio de las subunidades regulatorias es de gran relevancia para el desarrollo de terapias que tengan como blanco farmacológico inhibir un proceso celular donde una subunidad catalítica de PP1 actúe.

Respecto de la expresión de proteínas fosfatasas en células madres neurales existen reportes de la expresión de fosfatasas como fosfoserina fosfatasa y la proteína fosfatasa 4 durante el desarrollo del sistema nervioso de la rata y el ratón (Nakano et al. 2007; Lyu et al. 2013). Por el contrario, no existe ningún estudio publicado acerca de la expresión de PP1 en células madres neurales. Antecedentes previamente obtenidos en nuestro laboratorio muestran que PP1 alfa presenta una temprana expresión durante el estadio embrionario E13 del cerebro de rata en formación en adelante y se encuentra localizada en los contactos celulares de la glía radial embrionaria. De igual forma, el aislamiento de células madres neurales (NSC) *in vitro* que crecen como esferoides celulares en cultivo muestra una alta expresión de PP1 alfa, una menor expresión de PP1 beta y la ausencia de expresión de PP1 gama (Oviedo 2023). Lo anterior indica que existe una expresión diferencial de estas subunidades catalíticas de PP1 en células madres neurales presentes en el cerebro de rata.

Sin embargo, hasta la fecha no existen antecedentes en la literatura respecto a la expresión y función de las isoformas de PP1 en células madre neuroepiteliales humanas ni tampoco durante radialización *in vitro* de estas células.

1.4. IIIG9 subunidad regulatoria 32 de PP1 (PPP1R32) con una alta expresión en células troncales neurales.

La proteína IIIG9 o C11orf66 es la subunidad de unión reguladora 32 de fosfatasa 1 (PPP1R32), reconocida como tal debido a la presencia de un dominio RVxF en su estructura (Hendrickx et al. 2009; Oviedo et al. 2022). IIIG9 presenta dos transcritos en rata; uno de 1491 pb que codifica una proteína de 426 aminoácidos y otro de 1355 pb que codifica una proteína de 381 aminoácidos, que corresponden a la isoforma larga (IIIG9L) e isoforma corta (IIIG9C),

respectivamente (Danielson et al. 2002; Oviedo et al. 2022). En rata y humano, IIG9 se expresa como una única proteína de 425 y 428 aminoácidos, respectivamente (Danielson et al. 2002).

Respecto a su expresión, el año 2002 se reportó que el ARNm de IIG9 presenta una exclusiva localización en células endoteliales multiciliadas que tapizan las paredes ventriculares del sistema nervioso central adulto de rata (Danielson et al. 2002). Posteriormente, se demostró en otros epitelios multiciliados como la tráquea y el oviducto, o en testículo que contiene células ciliadas (espermatozoides) (Ivliev et al. 2012). Nuestro grupo de investigación describió por primera vez la localización de IIG9 en cilios de células endoteliales del cerebro de ratas adultas y también durante el desarrollo postnatal (PN10-PN20) (Cifuentes et al. 2018); y en las uniones adherentes de este epitelio (Baeza et al., 2021). Por su parte, la pérdida de función *in vivo* de IIG9 en el cerebro adulto de rata induce la muerte de células endoteliales y el agrandamiento de los ventrículos laterales (proceso llamado ventriculomegalia) que es una etapa temprana del desarrollo de la hidrocefalia (Baeza et al. 2021).

Respecto del desarrollo cerebral, estudios de nuestro laboratorio muestran que IIG9 se expresa tempranamente a partir del día embrionario 13 (E13) del cerebro de rata, localizándose en las uniones adherentes de la glía radial al igual que PP1 alfa. Estos resultados indican que en el desarrollo, IIG9 y PP1 alfa son proteínas que cumplen roles en la biología de las Glías radiales embrionarias, la cual puede estar asociada a la mantención de las uniones adherentes, favoreciendo el correcto desarrollo de la neurogénesis y gliogénesis de la pared ventricular. Esta hipótesis reviste gran importancia y para ser comprobada en la biología del desarrollo cerebral humano, requiere el desarrollo de modelos *in vitro* que permitan primeramente caracterizar la expresión de estas proteínas en células troncales neurales y durante su diferenciación a Glía radial.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, las células troncales neurales se transforman en la Glía radial (célula elongada o radializada) que coordina la génesis de neuronas y células gliales en distintos periodos de tiempo. Así, la mantención y el correcto funcionamiento de estas células es clave para limitar la aparición de patologías humanas del neurodesarrollo que se manifiestan durante los primeros años de vida.

IIIG9 es la subunidad regulatoria 32 de la proteína fosfatasa 1. Datos de nuestro laboratorio, muestran que IIIG9 y la subunidad catalítica alfa de PP1 ($PP1\alpha$) se expresan a partir de cerebros embrionarios de ratas de 13 días y se localizan en las uniones adherentes de la Glía radial que participa en la formación de la corteza cerebral. Por otra parte, la base de datos de “The human protein atlas”, indica que las células neuroepiteliales humanas AF22 representan la línea celular con mayor expresión de ARNm de IIIG9 y expresan niveles variables del ARNm de las subunidades alfa, beta y gama de PP1. Así, la presencia de IIIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 puede implicar la formación de complejos proteicos que regulen mecanismos de desfosforilación que sean claves para la mantención y función de células troncales del sistema nervioso.

Por todo esto, resulta muy interesante caracterizar la expresión y localización de las proteínas IIIG9 y PP1 en células neuroepiteliales AF22. Así como también, evaluar si existen cambios en la expresión de estas proteínas cuando los cultivos de células AF22 son inducidos a radializarse *in vitro*.

De esta forma, el conocimiento generado a partir de estos estudios puede abrir nuevas líneas de investigación para identificar cuáles son los blancos moleculares de estos complejos de proteínas fosfatasas y cómo las desregulaciones de estos pueden contribuir en la génesis de patologías del neurodesarrollo cuyo origen radica en la biología de las células troncales neurales.

III. HIPOTESIS

La proteína IIIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 se expresan en células neuroepiteliales humanas AF22 en estadio no diferenciado y cuando son inducidas a radializarse *in vitro*.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar la expresión y localización de IIIG9 y las isoformas de PP1 en células madre neurales humanas AF22 y en cultivos de glía radializada.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la expresión y localización de IIIG9 y de las subunidades catalíticas de PP1 en células AF22.
- Desarrollar un protocolo de obtención de cultivos de glía radializada a partir de células AF22.
- Caracterizar la expresión y localización de IIIG9 y de las subunidades catalíticas de PP1 en un cultivo de glía radializada.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Consideraciones éticas

Las células pluripotentes inducidas (IPSCs) se obtienen a partir de personas adultas donadoras de muestras de fibroblastos de piel. Esta donación ocurre bajo consentimiento informado por escrito de los donantes aceptando la toma de muestras de fibroblastos dermales como también la fabricación de distintas líneas celulares a partir de las mismas. Algunas de estas líneas son comerciales como es el caso de las células AF22 obtenidas desde la empresa italiana ISENET Biobanking (sample ID: IPS 00008).

5.2. Cultivo de células AF22

Las células AF22 fueron mantenidas en estufa de cultivo con una atmosfera de dióxido de carbono ($5\pm 0.5\%$ v/v) y oxígeno ($21\pm 0.5\%$ v/v) y a 37°C . Estas células fueron cultivadas en placas adheridas a un sustrato de Poli-L-ornithina y laminina. Para ello, las placas fueron previamente tratadas con solución de Poly-L-Ornithina diluida 1:2 en PBS estéril (SIGMA; Cat # P4957) por 30 minutos a 37°C . Luego se lavaron dos veces con PBS y cubiertas con laminina diluida $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS (Invitrogen; Cat # 23017-015) durante toda la noche a 4°C . Posteriormente, se aspiró la solución sin lavar antes de sembrar las células. Una vez sembradas las células se cultivaron en placas de 100 mm (Falcon) con 10 ml de medio D-MEM/F12 con GlutaMAX (Invitrogen; Cat # 3133-093), 1% N2 (GIBCO; Cat # 17502-048), 0.1% B27 (GIBCO; Cat # 17504-044), 10 ng/ml EGF (factor de crecimiento epidermal, Peprotech; Cat # 100-15) y 10 ng/ml bFGF factor de crecimiento de fibroblasto básico (Peprotech; Cat # 100-18B), con cambio de medio de cultivo cada dos días. Cuando las células alcanzaron un 80-90% de confluencia, fueron expandidas en una proporción de 1:3 para lo cual se incubaron con solución TryPLE Express durante 2 minutos a 37°C . Posteriormente, se detuvo la acción del TryPLE

Express con 5ml de medio de cultivo sin factores de crecimiento y las células se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min a temperatura ambiente.

5.3. Extracción de ARN total

El ARN total se obtuvo desde células AF22 en cultivo utilizando 500 μ L de Trizol® e incubándolas por 5 min a temperatura ambiente. Luego se trataron con 200 μ L de cloroformo, se agitó el tubo en un vortex por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 min.

Posteriormente, se centrifugaron a 12.000 rpm por 15 min a 4°C, para separar las fases y una vez recuperada la fase acuosa o inorgánica, se agregó 500 μ L de isopropanol al tubo, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y centrifugó a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado con 500 μ L de etanol 70% v/v y centrifugado a 7.500 rpm por 5 min a 4°C. El nuevo sobrenadante se desechó y el pellet fue resuspendido en 40 μ L de agua libre de ARNasa. El ARN total se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm y su pureza por la relación 260/280 nm.

5.4. Transcripción reversa de ARN total (RT)

Para la obtención de un volumen final de 20 μ L de ADN copia (cADN) se utilizó 6.5 μ L de ARN total, al cual se le agregó 2 μ L de DNAsa, 2 μ L de Tampón DNAsa 10X y se completó el volumen para alcanzar los 20 μ L con agua libre de ARNasa. Este mix se incubó en termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems) durante 30 min a 37°C para luego agregarle 2 μ L de solución EDTA 25 mM y continuar con la incubación, esta vez durante 10 min a 65°C. Cumplido este tiempo, se agregaron 2 μ L de OligodT, denaturado a 70°C por 5 min. Durante este tiempo se preparó un mix en un tubo aparte, que contenía Tampón RT 5X, RiboLock 20U/ μ L y dNTPS 10mM. De este mix se agregaron 14 μ L al tubo RT y se continuó con el siguiente ciclo de incubación de 5 min a 37°C para después agregar 2 μ L de enzima Transcriptasa Reversa RevertAid (Thermo Scientific™) e incubar durante 1 hora a 42°C.

Finalmente, se realizó una última incubación de 10 min a 70°C para la inactivación de la enzima. El control negativo para la transcripción reversa se trató con el mismo protocolo de transcripción, aunque sin OligodT y sin la enzima transcriptasa reversa.

5.5 Amplificación del cDNA por PCR

La reacción de amplificación del cADN obtenida se realizó en un termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems) en presencia de partidores específicos para amplificar las secuencias humanas de IIG9, PP1 alfa, PP1 beta y PP1 gama (Tabla 1). Como control interno se amplificó el cADN de GAPDH. La mezcla de reacción consistió en MgCl₂ 25 mM, Tampón PCR 10X, mezcla de dNTPs 10 mM, agua libre de ARNasa, partidores sentido (Sn) y antisentido (As) específicos para la secuencia a amplificar (0.25 µL por reacción), Taq ADN polimerasa 0,31 U (Fermentas) y 1 µL del producto de transcripción reversa, para un volumen final de 12,5 µL por tubo. La mezcla fue incubada inicialmente a 95°C por 5 min, luego se realizaron 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55-60°C (dependiendo del partidador utilizado) por 30 segundos y 72°C por 30 a 40 segundos, por último se realizó una extensión final de 72°C por 7 min. Los partidores utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa Oligo Primer®, teniendo en cuenta su T_m, el porcentaje de GC y la formación de dímeros y loops.

Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados y tamaños de los productos amplificados.

Todos los partidores amplifican específicamente las respectivas secuencias humanas.

Partidor	Secuencia 5` - 3`	Tamaño que amplifica
hLIIIG9-Sn	CTT CCT CCC CAA GAC TCA CC	100 pb
hLIIIG9-As	ATT CCT TTC ATT CCC TCG GCT	
hLSIIIG9-Sn	GAC CCT CTA GAC CAG CCA GA	223 pb (isoforma larga)
hLSIIIG9-As	CTC TGG CCA ACA CAG GTA GG	163 pb (isoforma corta)
GAPDH-Sn	CTT CTT TTG CGT CGC CAG CC	239 pb

GAPDH-As	CTT CCC GTT CTC AGC CTT GAC G	
hPP1 alfa-Sn	CCT GCT GGA AGT GCA GGG	395 pb
hPP1 alfa-As	TGA TGT TGT AGC GTC TCT TGC	
hPP1 beta-Sn	TCA TTC GCA CGG AAC ACC TT	237 pb
hPP1 beta -As	GTC CCA CTG ACC AGC ATT CA	
hPP1 gama-Sn	AGC CCA TCA GGT GGT TGA AG	262 pb
hPP1 gama-As	GTC CCA CTA GGC AGT GTC AA	

5.6. Electroforesis en geles de agarosa

Para la identificación de los productos de PCR se prepararon geles de agarosa 1,2% p/v en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y GelRed® el cual se utilizó en una proporción 1:20000. Se utilizó tampón de carga 6X que contiene glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,5% p/v en tampón TAE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM). Se hizo uso de 5 µL de marcador de peso molecular GeneRuler™ (SM1173 fermentas). Los geles fueron sometidos a un campo eléctrico de 100 V por 40 min en tampón TAE en una cámara de electroforesis. Los fragmentos de ADN plasmados en el gel fueron visualizados en un equipo fotodocumentador ImageQuant™ LAS 500.

5.7. Obtención de extractos de proteínas totales

Para ello, se hicieron extractos totales de proteínas aisladas desde cultivos de células AF22 crecidas en una placa de cultivo de 100 mm que fue lavada con PBS 1X estéril e incubada con 500 ml de solución NP40 en presencia de cocktail inhibidor de proteasas/fosfatasa (Cell Signaling). Luego los extractos fueron sonicados a 4°C y centrifugados por 10 min a 8.000 g a 4°C y el sobrenadante resultante se mantuvo a -80°C. La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford (Bio-Rad) midiendo su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

5.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia

Para resolver las proteínas de interés, utilizamos geles en gradiente del 5 al 15% de acrilamida/bisacrilamida. El gel separador fue preparado utilizando dos mezclas, una que contenía acrilamida/bisacrilamida al 5% y otra al 15%, además de SDS al 0.4%, TEMED al 0.1%, persulfato de amonio al 0.02%, preparados ambos en tampón Tris – HCl 0.8 M pH 8.8. El gel espaciador fue preparado utilizando una mezcla acrilamida/bisacrilamida al 5%, además de SDS al 0.5%, TEMED al 0.1%, persulfato de amonio al 0.02%, preparado en tampón Tris – HCl 0.07 M. Como tampón de corrida se utilizó Tris-glicina que contenía: Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% (pH 8.3). Se sembraron 10, 20 y 40 µg de extractos de proteínas diluidas en tampón de carga 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 4% p/v, glicerol 20% v/v, β-mercaptoetanol 1,25 M, azul de bromofenol 0,04% p/v). Se aplicó un voltaje de 70 V al gel montado en la cámara de electroforesis por 6 horas. Las proteínas fueron transferidas a membranas de Immobilon™- P (Millipore). Para esto el gel fue puesto en contacto con la membrana en una sistema de electrotransferencia en presencia de un tampón que contiene Tris 25 mM, Glicina 192 mM y metanol al 20%. La electrotransferencia fue realizada a 40 mA durante toda la noche.

5.9. Inmunodetección de las proteínas

Una vez realizada la transferencia se tiñó la membrana con una solución de rojo Ponceau-S 0,2% p/v para confirmar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana. Posteriormente, la membrana se lavó con tampón TBS-T (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,4, Tween-20 0,05% v/v) y bloqueo con una solución TBS-TL que contiene leche descremada 5% p/v en tampón TBS-T durante 1 hora. Luego, las membranas se incubaron con el primer anticuerpo respectivo (Tabla 2), diluido en TBS-TL por 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se hicieron cinco lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T y con TBS-TL. Luego, la membrana se incubó por 2 horas con un segundo anticuerpo (Tabla 2). Todas las incubaciones se realizaron con agitación suave a temperatura ambiente y en oscuridad. Una

vez finalizada la incubación, se realizaron cinco lavados de 5 minutos con solución TBS-TL y TBS-T y luego se reveló con un sistema de detección quimioluminiscente Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer), incubando la membrana durante 1 a 5 minutos con el reactivo. La emisión de luz se capturó en el equipo fotodocumentador ImageQuant™ LAS 500. Las membranas fueron reutilizadas para detectar β -actina, previa eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios mediante su incubación en una solución de stripping (Restore™ Plus Western Blot Stripping Tampón). Esta incubación se realizó por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-T, bloqueadas con TBS-TL por 30 min e incubadas con el respectivo anticuerpo (Tabla 2) durante 1 hora y 30 minutos. El revelado y la obtención de imagen se llevó a cabo de la forma descrita previamente.

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunodetección mediante Western blot.

Nombre anticuerpo	Código y empresa	Especie	Dilución de trabajo
Anti-IIIG9	HPA039068 (Prestige Antibodies® Powered by Atlas Antibodies, Merck)	Conejo	1: 5.000
Anti-PP1 α	sc-271762 (Santa Cruz Biotechnology)	Cabra	1: 250
Anti-PP1 β	sc-6106 (Santa Cruz Biotechnology)	Cabra	1: 200
Anti-PP1 γ	sc-6108 (Santa Cruz Biotechnology)	Cabra	1: 1000
Peroxidase Rabbit Anti-Goat	305-035-045 (Jackson Laboratories)	Burro	1: 5.000
Peroxidase Goat Anti-Rabbit	111-035-144 (Jackson Laboratories)	Burro	1: 5.000

5.10. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las muestras fijadas en cubreobjetos de vidrio fueron lavadas en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y luego tratadas con solución permeabilizante Tritón X-100 0,2% v/v en Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8). Los anticuerpos fueron preparados en Tris-BSA y se incubó por 16 horas. Posterior a la incubación con el primer anticuerpo y sus respectivos lavados en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) la muestra se incubó durante 2 hrs con el segundo anticuerpo acoplado a un fluoróforo determinado (anti-conejo-Cy2, anti-cabra-Cy3 o anti-ratón-CY3; todos obtenidos desde Jackson Laboratories), el cual se diluyó en Tris-BSA. Adicionalmente se agregó un marcador nuclear Hoechst (1:1000). Se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las muestras se lavaron en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8). Finalmente, las muestras fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako) y se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta su visualización. El análisis de inmunomarcaje múltiple se realiza utilizando dos o tres anticuerpos primarios respectivamente generados en especies animales distintos de modo que no exista reacción cruzada. Las muestras se analizaron en el centro de microscopía avanzada CMA BIO-BIO que cuenta con un microscopio confocal espectral LSM780 (Zeiss).

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Nombre anticuerpo	Código y empresa de origen	Dilución de trabajo
Anti-IIIIG9	Hecho en nuestro laboratorio (Cifuentes y et al. 2018)	1: 1000
Anti-PP1 α	PA5-119781 (Invitrogen)	1: 250
Anti-PP1 β	sc-6106 (Santa Cruz Biotechnology)	1: 20
Anti-PP1 γ	sc-6108 (Santa Cruz Biotechnology)	1: 20
Anti-Nestina	MAB353 (Merk-Millipore)	1: 50
Anti-Vimentina	AB5733 (Merk-Millipore)	1: 400

Anti-Tubulina β III	G7121 (Promega)	1: 1000
Anti-GFAP	Z033429-2 (Dako)	1: 100

5.11. Inducción de cuerpos embrioides a partir de células AF22

Se utilizaron células AF22 para la formación de cuerpos embrioides durante 12 días previo a la radialización. Para ello se llevó a cabo lo descrito en Bos et al. (2019). Las células AF22 se sembraron en placas cubiertas con poli-L-ornitina/laminina en condiciones de adherencia durante el curso de 12 días en medio de diferenciación: Neurobasal/Advanced DMEM/F12 (Gibco; Cat# 12634010) suplementado con GlutaMAX 1% (Gibco; Cat# 35050061), β -mercaptoetanol 0,1% (Gibco; Cat# 31350010), N2 1% (GIBCO; Cat# 17502-048), B27 2% (GIBCO; Cat# 17504-044) y ácido ascórbico 10 μ M (Sigma-Aldrich; Cat# A4544). Además, el medio se suplementó con los siguientes factores: CHIR99021 3 μ M (días 1-6) (Tocris Bioscience; Cat# 4423), ácido retinoico 100 nM (días 2-12) (Sigma-Aldrich; Cat# R2625), SAG 500 nM (días 2-12) (MedChem Express; Cat# HY-12848C), DAPT 10 μ M (días 9-12) (Tocris Bioscience; Cat# TB2634-RMU) y BDNF 10 ng/mL (días 7-12) (Peprotech; Cat #AF-450-02). Se realizó cambio de medio de cultivo completo cada día durante los 12 días que duro este proceso.

5.12. Proceso de diferenciación de células AF22 hacia glía radial

Los cuerpos embrioides previamente generados fueron cultivados en suspensión en un medio DMEM/GlutaMAX (Invitrogen; Cat # 3133-093) 2mM, Pen/Strep 100 μ g/ml, aminoácidos no esenciales al 1% y FBS al 10%. Dos días después, se comenzó un tratamiento con ácido retinoico 1:100, se agregó al medio previamente antes de cambiarlo. Se realizó un cambio por día de únicamente la mitad del medio de cultivo (5 ml) con la precaución de no aspirar los cuerpos embrioides. Luego de 4 días de iniciar el tratamiento con ácido retinoico, los cuerpos embrioides que se encontraban en suspensión se sembraron en placas previamente tratadas con Poly-L-Ornithina y laminina para que crecieran adheridos. Se cambió el medio por un medio

de cultivo Neurobasal suplementado con factores de crecimiento B27 al 2%, bFGF 10 ng/ml y EGF 10 ng/ml. Las células fueron mantenidas en una estufa de cultivo en una atmosfera de dióxido de carbono ($5\pm 0.5\%$ v/v) y oxígeno ($21\pm 0.5\%$ v/v) a 37°C y se realizó cambio de la mitad del medio de cultivo día por medio durante 12 días. Posteriormente, fueron fijadas para proceder con el análisis inmunocitoquímico.

5.13. Análisis retrospectivo de la expresión del ARNm de IIG9 y las isoformas de PP1 en células AF22

Se realizó un análisis retrospectivo a través de la base de datos de RNA-seq de “The human Protein Atlas” (<https://www.proteinatlas.org/>). Los datos transcriptómicos analizados corresponden a líneas celulares humanas de tipo: AF22 (neuroepitelio); GAMG, SH-SY5Y, U-138MG, U-251MG, y U-87MG (líneas tumorales del sistema nervioso); PC-3, SuSa, HeLa y MCF7 (líneas tumorales provenientes de tejidos epiteliales); JURKAT y HL-60 (líneas tumorales de tejido sanguíneo). Para ello se seleccionaron genes de linaje celular como Proliferin (CD133), Nestina y SOX2 para el linaje de células madres neurales; Vimentina y GFAP para el linaje glial; y Tubulina β III para el linaje neuronal, además de IIG9 y las isoformas alfa, beta y gamma de PP1. El agrupamiento y mapa de calor fueron generados usando el software web Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

VI. RESULTADOS

6.1. PRIMERA PARTE: Análisis de la expresión de IIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 en células AF22 del neuroepitelio humano.

6.1.1. Análisis retrospectivo en bases de datos para la expresión de los genes de IIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 en células AF22.

Con el fin de buscar antecedentes que nos orientaran acerca de la expresión de genes de linaje celular de las proteínas de interés en este estudio en células AF22 se realizó un análisis retrospectivo, con información obtenida a través la base de datos “The human protein atlas”.

Primeramente, nos orientamos de la expresión de estas proteínas mediante el análisis retrospectivo donde observamos que las células AF22 expresan niveles altos de los marcadores de células madres neurales (Prominina, NES y SOX2), a diferencia de lo observado en las demás líneas celulares humanas mostradas. De igual forma, las células AF22 expresan un nivel muy reducido de los genes Vimentina (compromiso glial), Tubulina β III (compromiso neuronal) y una expresión casi nula de GFAP, también de compromiso glial.

Además, que las células AF22 expresan altos niveles de IIG9 y PP1 beta (Figura 2). Por su parte, estas células muestran una menor expresión de PP1 gama y una ausencia de PP1 alfa (Figura 2).

6.1.2. Ensayos de RT-PCR para las isoformas larga y corta de IIG9

Para corroborar los datos entregados por el análisis retrospectivo previo, se realizaron ensayos de RT-PCR utilizando partidores específicos para las isoformas larga y corta de las secuencias humanas de IIG9 y las isoformas alfa, beta y gama de PP1. Para ello, se obtuvo un extracto de ARNm que fue sometido a transcripción reversa para generar un ADN copia (cDNA).

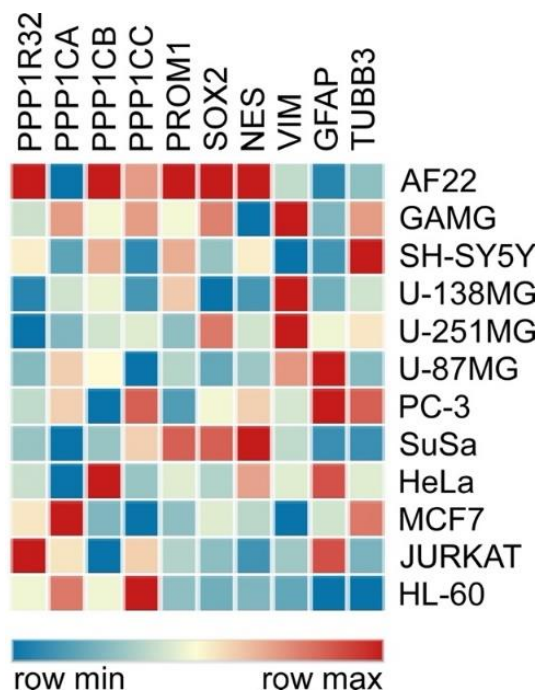


Figura 2. Análisis retrospectivo para la expresión de genes de linaje celular, de IIG9 y las isoformas de PP1. El eje X superior muestra los genes testados que fueron: PPP1R32 (IIG9), PPP1CA (PP1 alfa), PPP1CB (PP1 beta), PPP1CC (PP1 gamma), PROM1 (CD133), SOX2, NES (nestina), VIM (vimentina), GFAP (Proteína ácida fibrilar glial), TUBB3 (Tubulina β III). En el eje Y se muestran las distintas líneas celulares humanas testeadas. La expresión relativa de los ARNm de cada gen se representa en una escala de colores que va desde el azul al rojo y donde el color azul indica ausencia de expresión y el color rojo indica alta expresión.

A modo de control de calidad de este proceso, se amplificó la secuencia de GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), debido a que su expresión permanece constante en la gran mayoría de células estudiadas, por lo que es considerado un gen tipo “housekeeping”.

Los resultados muestran la amplificación de un único producto de PCR del tamaño esperado (239 pb) en el carril de RT+, que corresponde de cDNA que se sintetizó en presencia de partidores específicos para GAPDH y la enzima transcriptasa reversa (Figura 3A).

Posteriormente, se evaluó la expresión de IIIG9 lo cual se realizó en un termociclador, en el cual las muestras fueron sometidas a cuatro temperaturas de alineamiento de los partidores (T_m) distintas (56°, 58°, 60° y 62°C). Esto con el objetivo de encontrar la temperatura ideal para la amplificación de cada secuencia. Mediante el uso de partidores que amplifican una secuencia presente en la isoforma larga, se detectó una banda del tamaño esperado (100 pb) en todas las temperaturas testeadas (Figura 3B).

En esta misma línea y con el fin de observar si las células AF22 expresan el ARNm de la isoforma corta de IIIG9, se utilizaron partidores que alinean en los extremos comunes de cada isoforma y entre la región que se pierde entre la isoforma corta y se mantiene en la isoforma larga. De esta manera, se amplificaron las secuencias de 223 pb y 163 pb, las cuales son los tamaños de la isoforma larga y corta de IIIG9 entre los 58°C y 62°C (Figura 3C).

De esta forma, los análisis muestran la expresión de los ARNm de las isoforma larga y corta de IIIG9. Además definimos que la temperatura óptima de alineamiento de los partidores (T_m), para la amplificación de la isoforma larga IIIG9 va en el rango de 58°C-60°C y de 62°C para los partidores que discriminan la presencia de ambas isoformas.

6.1.3. Ensayos de RT-PCR para las subunidades catalíticas de PP1 α , PP1 β y PP1 γ

Para el análisis de RT-PCR con las isoformas de fosfatasa 1 se utilizó el mismo método de diferentes temperaturas en un gradiente creciente para identificar temperatura ideal de amplificación. Para PP1 alfa observamos una amplificación de la banda a la altura de 395 pb (Figura 4A), tamaño correspondiente con el esperado. Además, se muestra que la temperatura

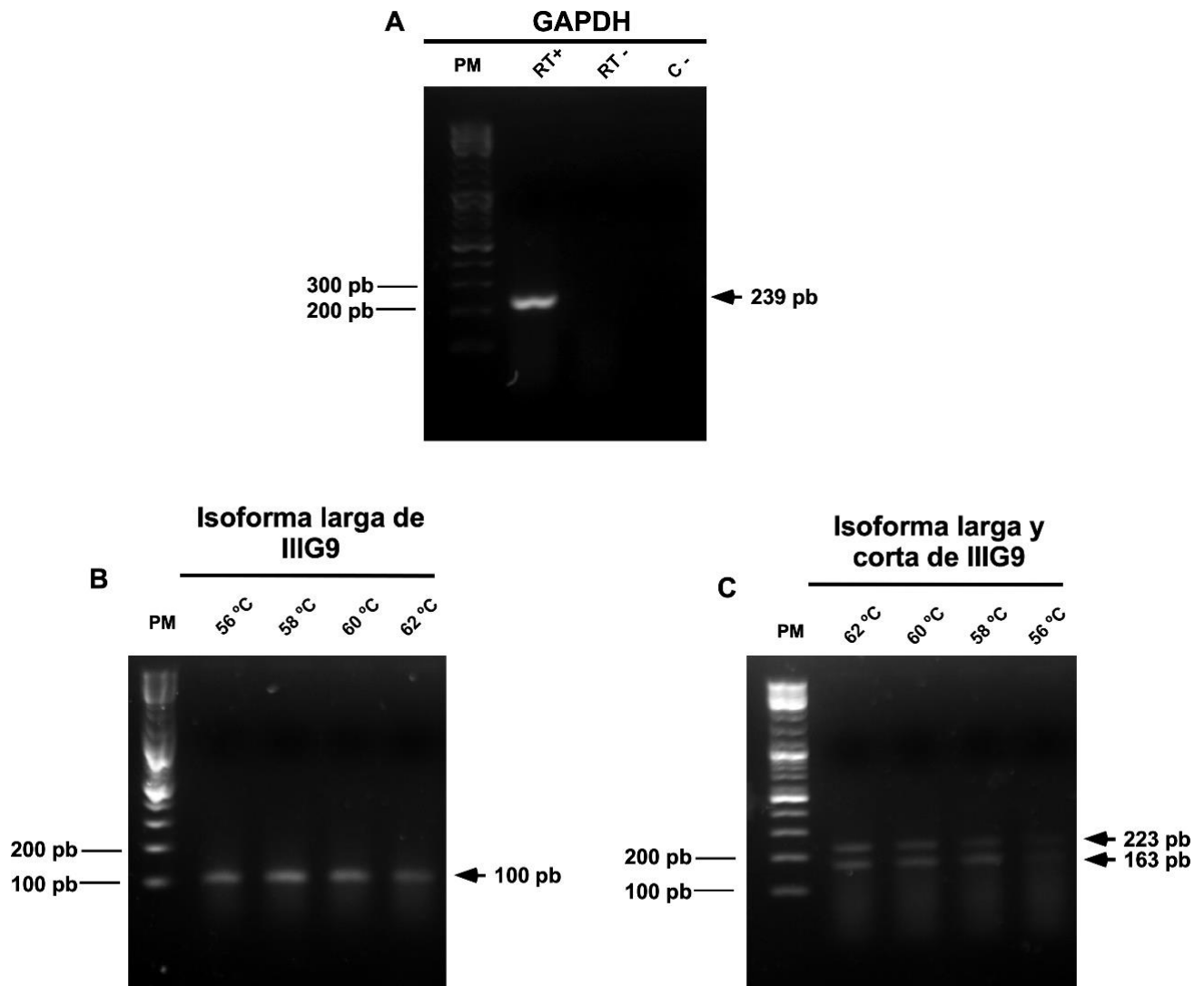


Figura 3. Análisis de RT-PCR la expresión de las isoformas de IIIG9 en gradiente de temperatura. A. Amplificación de la secuencia de GAPDH. Carril (1): marcador de peso molecular; carril (2): RT+; carril (3): RT-; Carril (4): H₂O. Se observa una banda de 239 pares de bases amplificadas en la muestra RT+ (carril 2). **B.** Amplificación de la secuencia de la isoforma larga de IIIG9, a distintas temperaturas. Tamaño amplificado de 100 pb. **C.** Amplificación de la secuencia de isoformas larga y corta de IIIG9 a distintas temperaturas. Tamaño amplificado: 223 y 163 pares de bases, correspondiente a los tamaños esperados.

ideal para la amplificación de su secuencia oscila entre los 60 y 62°C, que es en donde la banda se con mayor intensidad. Para PP1 beta ocurrió una amplificación de la secuencia de 237 pares de bases (Figura 4B) correspondiente con el tamaño de la secuencia esperada, sin embargo, la amplificación solo ocurrió a los 60 y 62°C. Por último, para PP1 gamma (Figura 4C) se amplificó una la secuencia de tamaño de 262 pb y se evidencia que la temperatura ideal para este proceso es de 58°C. Estos resultados indican que a nivel de ARNm las células AF22 expresan las isoformas alfa, beta y gama de fosfatasa 1.

6.1.4. Análisis de expresión de las proteínas IIIG9 y las isoformas de PP1 en células AF22.

Posteriormente, se evaluó la expresión de las proteínas IIIG9, y las subunidades alfa, beta y gama de PP1 mediante estudios de Western blot, utilizando anticuerpos específicos en extractos de proteínas totales (EPT) obtenidos de células madre neurales humanas AF22. Para cada detección se sembraron diferentes concentraciones de extracto de proteínas en orden creciente: 10 µg, 20 µg y 40 µg, las cuales se separaron en geles SDS-PAGE según su peso molecular, tal como puede observarse en la tinción con rojo Ponceau-S 0,2% p/v de las membranas de Inmobilón-P obtenidas luego de la electrotransferencia del gel (Figura 5A).

Para la detección de IIIG9, se utilizó como control positivo un extracto de proteínas aisladas desde células HEK293 transfectadas con un vector para la sobreexpresión de la isoforma larga de IIIG9 de rata (Figura 5A y B), donde fue posible observar tres bandas proteicas de 42 kDa, 51 kDa y 53 kDa que han sido previamente descritas por nuestro laboratorio en extractos de pared ventricular adulta del cerebro de rata (Baeza et al. 2021). Por su parte, las células AF22 muestran un componente proteico de 42 kDa la cual se vuelve más intensa según aumenta la concentración de proteínas sembradas (Figura 5B).

A través del método de Stripping y reincubación con anticuerpos primarios y secundarios se hizo uso de la misma membrana de nitrocelulosa para la detección de PP1 α (Figura 5C, panel del medio) en donde se detectó una banda del tamaño esperado (37 kDa) en todas las concentraciones evaluadas.

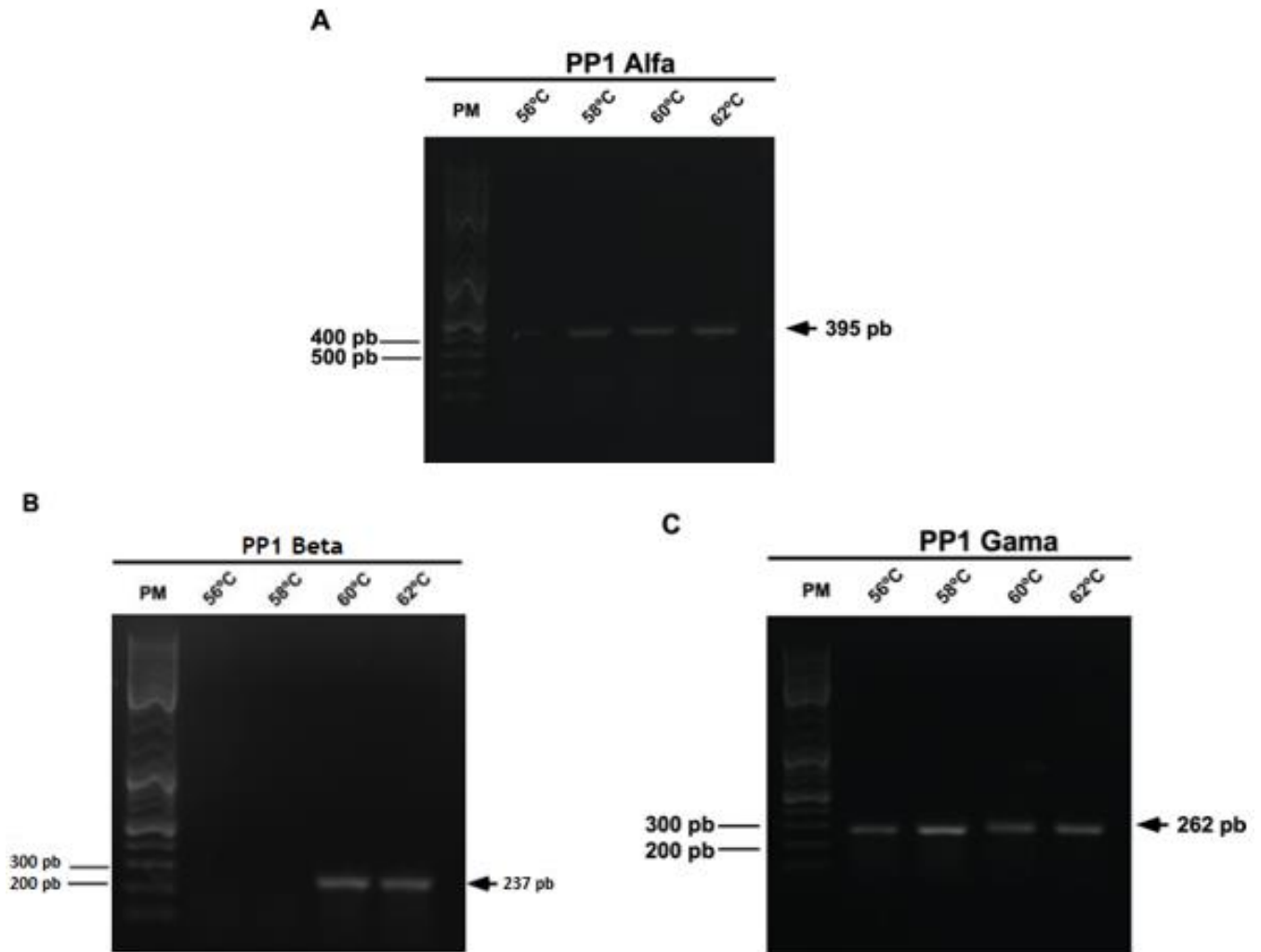


Figura 4. Análisis de RT-PCR la expresión de las isoformas de PP1. A. Amplificación de la secuencia de la isoforma alfa de PP1, a distintas temperaturas. Tamaño amplificado de 395 pb. **B.** Amplificación de la secuencia de la isoforma beta de PP1, a distintas temperaturas. Tamaño amplificado de 237 pb. **C.** Amplificación de secuencia de la proteína PP1 gamma a distintas temperaturas, cuyo tamaño de amplificación fue de 262 pb.

El mismo procedimiento de Western blot se realizó para PP1 β y PP1 γ , utilizando un anticuerpo específico para cada proteína, donde se detectaron bandas de los tamaños esperados (a nivel de 37 kDa) para fosfatasa 1 beta (Figura 5D) y fosfatasa 1 gamma (Figura 5E), observándose una intensidad mayor de las bandas a medida que aumenta la concentración de proteínas. Sin embargo, PP1 β muestra bandas de menor intensidad en comparación con las otras isoformas, no siendo detectada a 10 μ g de proteínas, lo que inicialmente podría indicar una menor expresión de esta en células AF22.

Los resultados obtenidos indican que las células madre neurales AF22 expresan la isoforma alfa, beta y gamma de PP1 como proteínas de 37 kDa cada una de ellas, así como también una proteína de 42 kDa de IIG9 (PPP1R32).

6.1.5. Caracterización inmunocitoquímica de células AF22 mediante el uso de marcadores de linaje celular.

Primeramente, se realizó una caracterización inmunocitoquímica en las células AF22 para proteínas de linaje celular (CD133, nestina, SOX2, tubulina β III, GFAP y Vimentina) (Figura 6 Y 7). Para ello, se utilizaron anticuerpos primarios específicos, anticuerpos secundarios acoplados a un fluoróforo (Cy2, Cy3, Cy5) y el núcleo fue teñido con el intercalador de ADN, Hoechst (azul). Los resultados muestran la presencia de la proteína nestina, localizada de forma abundante en el citoplasma (color rojo), como también SOX2, para el cual se detectó su localización dentro del núcleo celular (color blanco) en algunas de las células (Figura 6). Las células también resultaron inmunopositivas para el anticuerpo contra CD133, mostrando una localización en un patrón punteado a lo largo del citoplasma celular (color verde) (Figura 6). La imagen de superposición de las señales nos muestra una escasa colocalización de las proteínas Nestina y CD133 (superposición) en ciertas zonas del citoplasma, ya que ambas proteínas denotan patrones de distribución diferentes (Figura 6). Estos resultados comprueban la naturaleza de células madres troncales de la línea humana AF22 y se correlacionan con los datos de expresión de genes observados en el análisis retrospectivo (Figura 2).

Mediante inmunofluorescencia también se evaluó la expresión de las proteínas vimentina

(marcador de célula troncal), tubulina BIII (marcador de neuroblastos) y GFAP (marcador de astrocitos) (Figura 7), donde se evidenció también que las células AF22 presentan inmunotinción para cada una de estas proteínas. Estos resultados indican que a diferencia de lo observado en los estudios de RNA-Seq (Figura 2), las células AF22 también expresan proteínas de linaje neuronal y glial.

6.1.6. Estudio de la localización subcelular de las proteínas IIIG9 y subunidades de PP1 alfa, beta y gamma en células AF22

Finalmente, se evaluó mediante inmunomarcaje con anticuerpos para detectar las proteínas de interés IIIG9 y anticuerpos que reconocen de forma específica las distintas isoformas de PP1 (Figura 8). Las células AF22 expresan la proteína IIIG9 la cual se distribuye en forma punteada por todo el citoplasma de estas células, pero también en regiones cercanas a la membrana celular (color verde, flechas).

Por su parte, solo se observó inmunoreactividad positiva y consistente para PP1 beta en todo el citoplasma celular, distribuyéndose en el citoplasma celular (color en rojo). En cuanto a PP1 alfa, no se observó tinción (color rojo) y para PP1 gama se observó una escasa inmunoreactividad en el citoplasma (color rojo). Los resultados indican que las células AF22 localizan a IIIG9 a nivel de la membrana celular y el citoplasma, sugiriendo la funcionalidad de esta proteína en estas células. Por su parte, mediante nuestros estudios inmunocitoquímicos solo pudimos localizar la isoforma beta de PP1 de forma abundante en el citoplasma de las células AF22 y no así para las isoformas alfa y gama.

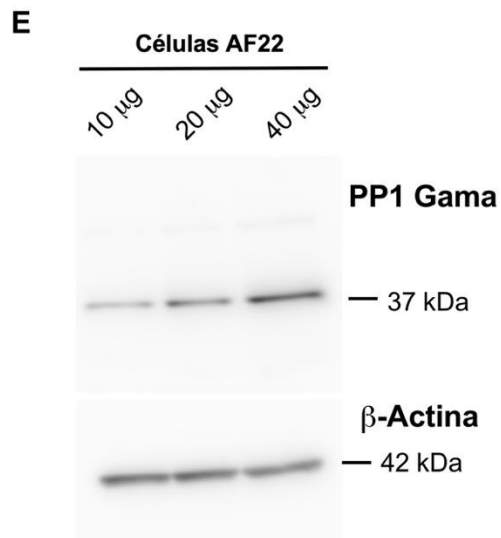
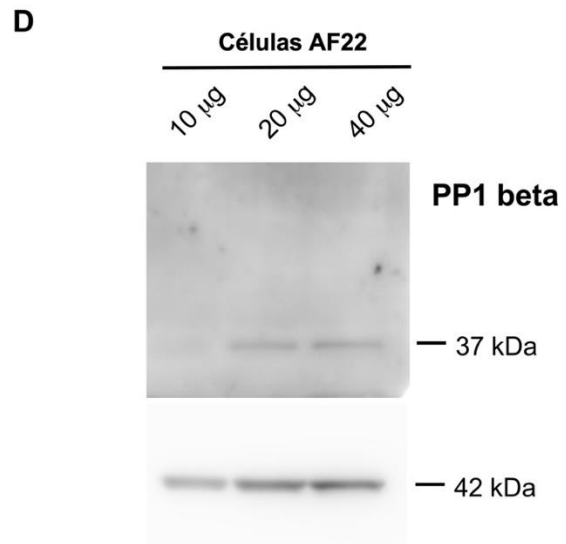
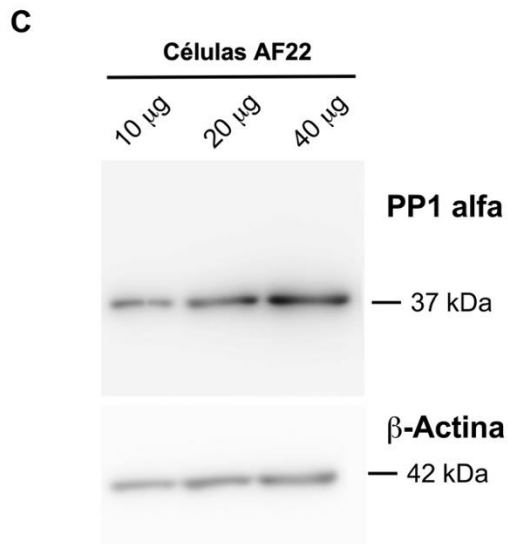
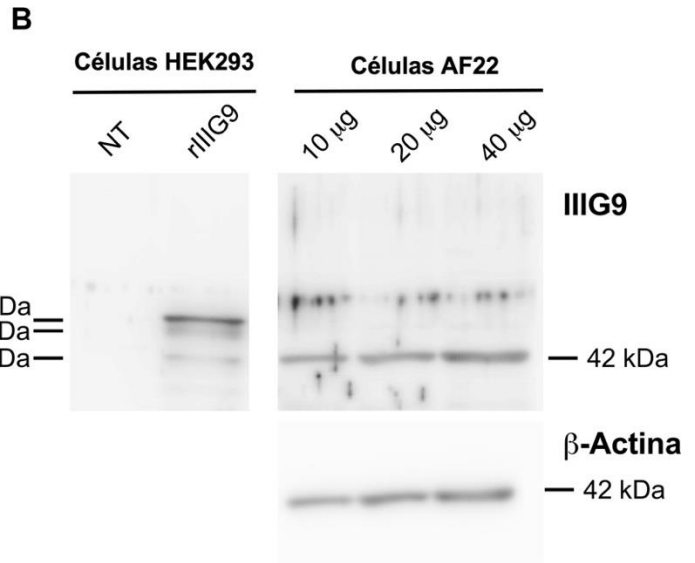
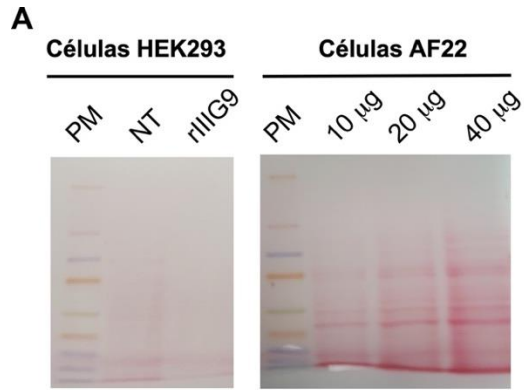


Figura 5. Ensayos de western blot en células AF22 para la detección de IIIG9 y las isoformas de PP1. **A.** Tinción con rojo Ponceau-S 0,2% p/v de las membranas electrotransferidas, donde se observa: extracto total de proteínas (ETP) de células HEK293 no transfectadas (NT) y ETP de células HEK que sobreexpresan la secuencia de rata de IIIG9 (rIIIG9, imagen izquierda) y ETP aisladas desde células AF22 en concentraciones de 10, 20 y 40 µg (imagen derecha). **B.** Análisis de Western blot para IIIG9 en ETP de células HEK293 y AF22 donde el carril 1 es el marcador de peso molecular y carril 2, 3 y 4, corresponden a 10, 20 y 40 µg de proteínas totales. **C-E.** Análisis de Western blot para PP1 alfa, PP1 beta y PP1 gama en donde el carril 1 es el marcador de peso molecular y carril 2, 3 y 4, corresponden a 10, 20 y 40 µg de ETP de células AF22. En todos los casos se detectó como control de carga la proteína β-actina observándose una banda de 42 kDa cuya intensidad aumenta a mayor concentración de proteínas (Figura 5 B-E, panel inferior).

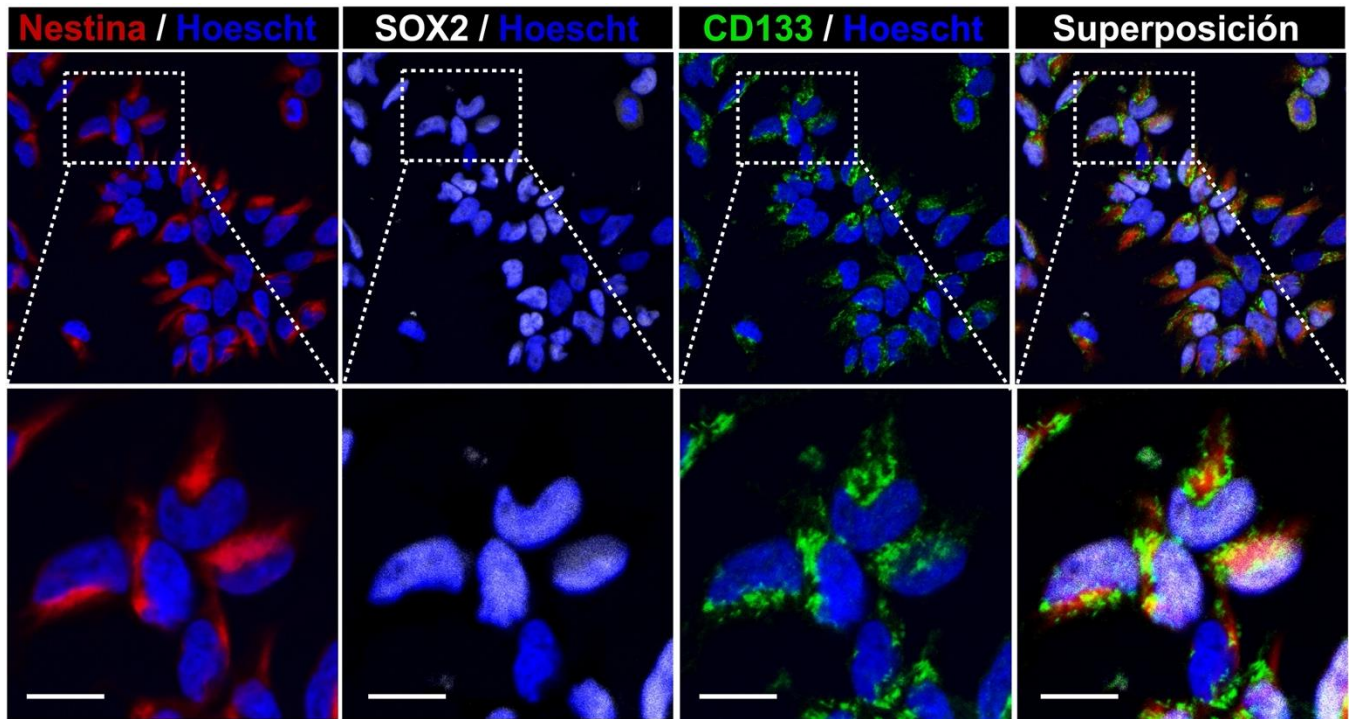


Figura 6. Análisis de expresión de proteínas de linaje de células madre neurales por inmunofluorescencia y microscopía confocal de células AF22. Células madre neurales AF22 inmunomarcadas con Anti-Nestina (Cy3, rojo), Anti-SOX2 (Cy5, blanco) y Anti-CD133 (Cy2, verde). El núcleo fue teñido con Hoechst (azul). La imagen de superposición muestra los distintos colores generados por cada inmunotinción junto con el colorante nuclear. Los paneles inferiores corresponden a ampliación de los recuadros en los paneles superiores. Barra de tamaño: 7 μm .

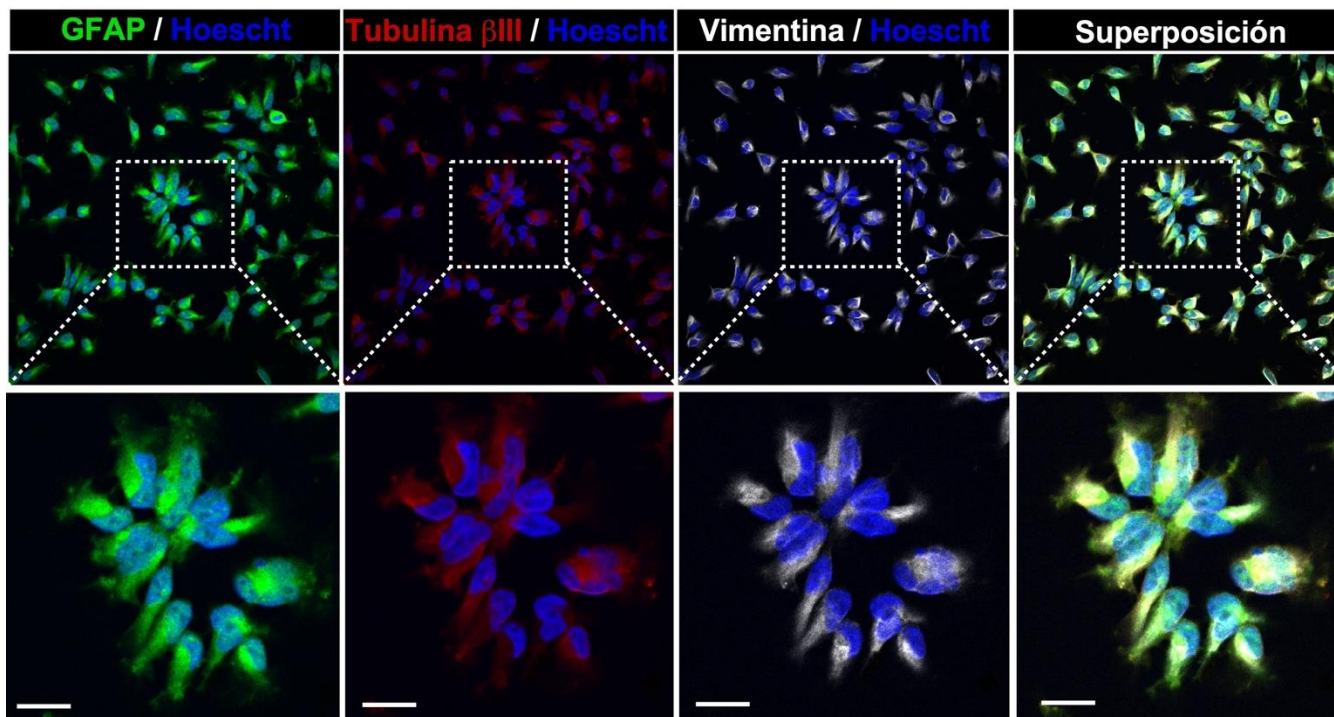


Figura 7. Análisis de expresión de proteínas de linaje neuronal y glial por inmunofluorescencia y microscopía confocal de células AF22. Células madre neurales AF22 inmunomarcadas con Anti-GFAP (Cy2, verde), Anti-tubulina β III (Cy3, rojo) y Anti-vimentina (Cy5, blanco). El núcleo fue teñido con Hoechst (azul). La imagen de superposición muestra los distintos colores generados por cada inmunotinción junto con el colorante nuclear. Los paneles inferiores corresponden a ampliación de los recuadros en los paneles superiores. Barra de tamaño: 7 μ m.

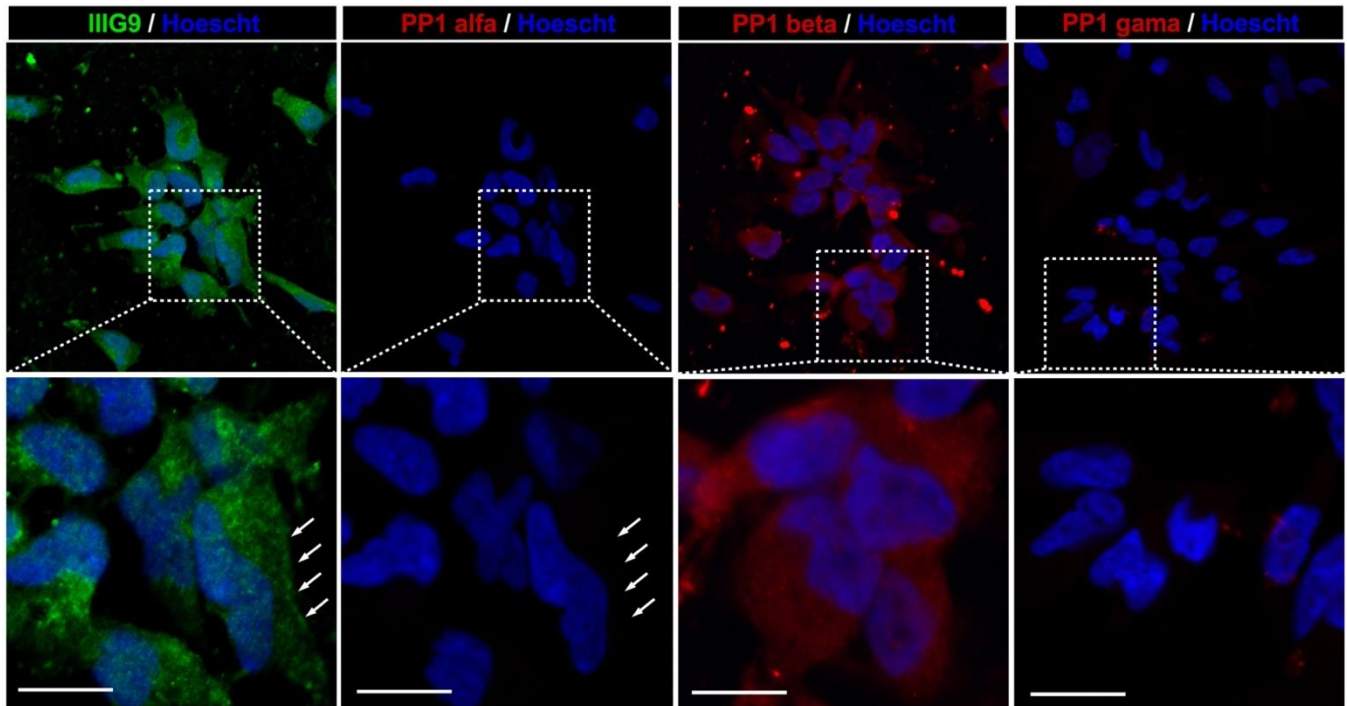


Figura 8. Análisis de expresión de proteínas IIIIG9, PP1 alfa, PP1 beta y PP1 gama mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal de células AF22. Células madre neurales AF22 inmunomarcadas con Anti-IIIIG9 (Cy2, verde) y las distintas isoformas de PP1 (Cy3, rojo). El núcleo fue teñido con Hoechst (azul). Los paneles inferiores corresponden a ampliación de los recuadros en los paneles superiores. Barra de tamaño: 7 μ m.

6.2. SEGUNDA PARTE: Obtención de cultivos de Glía radializada humana a partir de la diferenciación de células AF22.

Con el fin de inducir la diferenciación de células AF22 a células gliales radializadas, se procedió a generar cuerpos embriodes de acuerdo al protocolo descrito por Bos y col (2019). Posteriormente, estos cuerpos fueron radializados durante 4 días en un medio con 10% de suero bovino fetal y ácido retinoico 500 mM, para finalmente ser cultivados durante 12 días en un medio neuralizante en presencia de factores de crecimiento (EGF y bFGF) (Figura 9A). Mediante la microscopía de Nomarski, fue posible comparar los cambios morfológicos experimentados en las células AF22, que se caracterizan por presentar una morfología triangular carente de procesos finos y largos (Figura 9B). Por el contrario, mediante el protocolo aplicado fue posible observar esferoides neurales (E) (Figura 9C) de los cuales se proyectan células alargadas y numerosos procesos celulares finos de distinta longitud (Figura 9C-E, flechas). Mediante inmunocitoquímica se evaluó la expresión y localización de los marcadores de glía radial vimentina (color rojo) y nestina (color verde) (Figura 10A-C) donde se observó que los largos procesos radiales que salen del acúmulo celular son positivos para ambos marcadores (flechas). Estos resultados indican que es posible generar cultivos de glía radializada humana a partir de células neuroepiteliales AF22.

6.3. TERCERA PARTE: Caracterización de la expresión de IIIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 en cultivos de glia radializada.

Posteriormente, se evaluó la inmunotinción para IIIG9 y las isoformas catalíticas de PP1 en estos cultivos (Figura 11A-B), donde se observó que los largos procesos radializados teñidos con vimentina son fuertemente positivos a IIIG9, PP1 beta y PP1 gama. Las imágenes de superposición muestran la colocalización entre IIIG9/PP1 beta (Figura 11A) y IIIG9/PP1 alfa (Figura 11B). Por su parte, en nuestros estudios no fue posible detectar la localización de PP1 alfa en estas estructuras (datos no mostrados). Nuestros resultados indican que al igual que las células AF22, los cultivos de glía radializada mantienen la expresión de IIIG9 y PP1 beta,

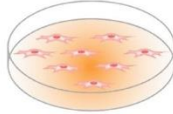
localizando ambas proteínas a nivel de los largos procesos radiales. De igual forma, en ambos cultivos no fue posible localizar a PP1 alfa. Sin embargo, a diferencia de las células AF22, los cultivos de glía radializada mostraron una alta inmunotinción de la isoforma gama de PP1 a nivel de los procesos radiales que colocalizó con IIIIG9.

En conjunto, mediante estos análisis podemos concluir que es posible obtener cultivos radializados de células AF22 *in vitro* que mantienen la expresión de IIIIG9 y PP1 beta, además de inducir la expresión y distribución de PP1 gama a nivel de los largos procesos celulares.

A

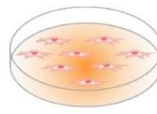
1. Inducción de cuerpos embrioides a partir de células AF22

1.1



Células AF22 en placas cubiertas con Poly-L-Ornithina y laminina. Medio de cultivo: DMEM/F12, 1% N2, 0.1% B27, EGF 10 ng/ml y bFGF 10 ng/ml

1.2



Células AF22 en placas cubiertas con Poly-L-Ornithina y laminina. Medio de diferenciación: Neurobasal/Advanced DMEM/F12, 1% GlutaMAX, 0.1 %β-mercaptoetanol, 1% N2, 2% B27 y ácido ascórbico 10 μM



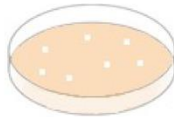
1.3

Durante los 12 días que dura la diferenciación, se agregó al medio de cultivo diferentes suplementos y se cambió el medio diariamente

Días	Suplemento y concentración
1-6	CHIR99021 3 μM
2-12	Ácido retinoico 100 nM
2-12	SAG 500 nM
7-12	BDNF 10 ng/ml
9-12	DAPT 10 μM

2. Proceso de diferenciación hacia glía radial

2.1



Cuerpos embrioides sembrados en suspensión. Medio DMEM/GlutaMAX 2mM, Pen/Strep 100 μg/ml, 1% NEAA y 10% FBS. Dos días después, se agregó ácido retinoico 500 μM

2.2



4 DIV, los cuerpos embrioides se sembraron en placas con Poly-L-Ornithina y laminina. Medio Neurobasal, 2% B27, EGF 10 ng/ml y bFGF 10 ng/ml. El medio se cambió cada 2 días

2.3



12 DIV en adherencia, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% para el análisis inmunocitoquímico

3. Análisis de Inmunocitoquímica

3.1



Las células ya fijadas fueron sometidas a Inmunocitoquímica para identificar las características de las células obtenidas

Anticuerpos utilizados

- ➔ Anti - Nestina
- ➔ Anti - Vimentina
- ➔ Anti - I1IG9
- ➔ Anti - PP1 β
- ➔ Anti - PP1 γ

Incubación overnight

3.2



Los anticuerpos secundarios unidos a un fluoróforo Cy2 (verde), Cy3 (rojo) y Cy5 (blanco) permitieron ver en un microscopio confocal los resultados del inmunomarcaje

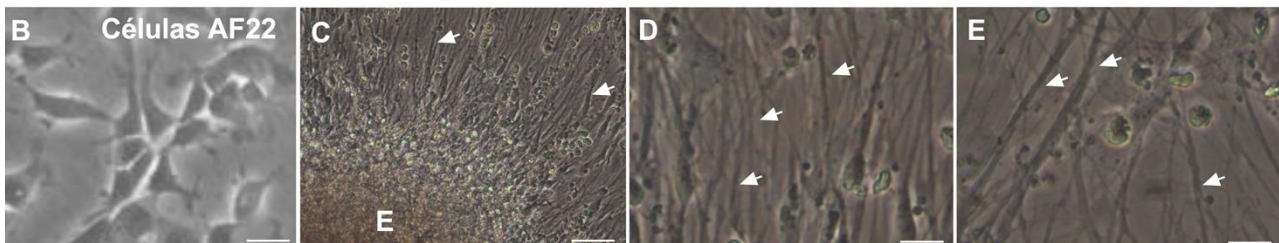


Figura 9. Protocolo experimental para la obtención de cultivos de glia radializada a partir de células AF22. **A.** Esquema detallado de la formación de cuerpos embriones obtenidos a partir de células AF22, su posterior radialización *in vitro* y los análisis inmunocitoquímicos realizados. **B.** Imágenes de microscopía de Nomarski de las células AF22. **C.** Imagen de microscopía de Nomarski obtenidas luego de 12 días de radialización, donde es posible observar esferoides celulares (E) del cual salen células alargadas y largos procesos celulares finos. **D-E.** Ampliación digital de los procesos observados en C. Barra de tamaño: B 10 μm , C 20 μm , D-E 60 μm .

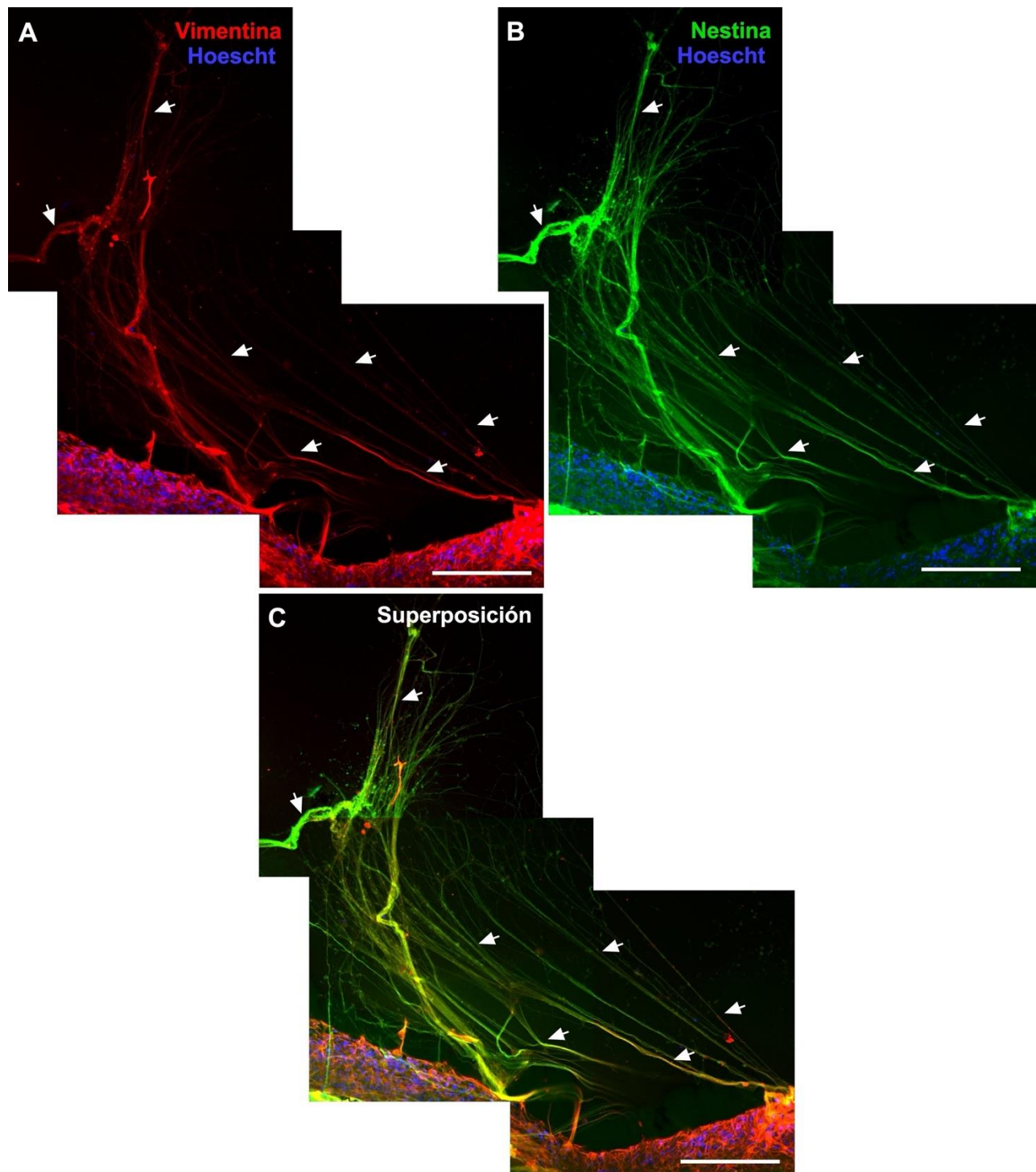


Figura 10. Inmunofluorescencia y microscopía confocal de glías radializadas obtenidas a partir de células AF22. A-B. Imagen obtenida por microscopía confocal de glías radializadas inmunomarcadas con Vimentina (Cy3) y Nestina (Cy2). Los núcleos fueron marcados con Hoescht (azul). **C.** Superposición de las imágenes confocales. Barra de tamaño: A-C: 100 μm .

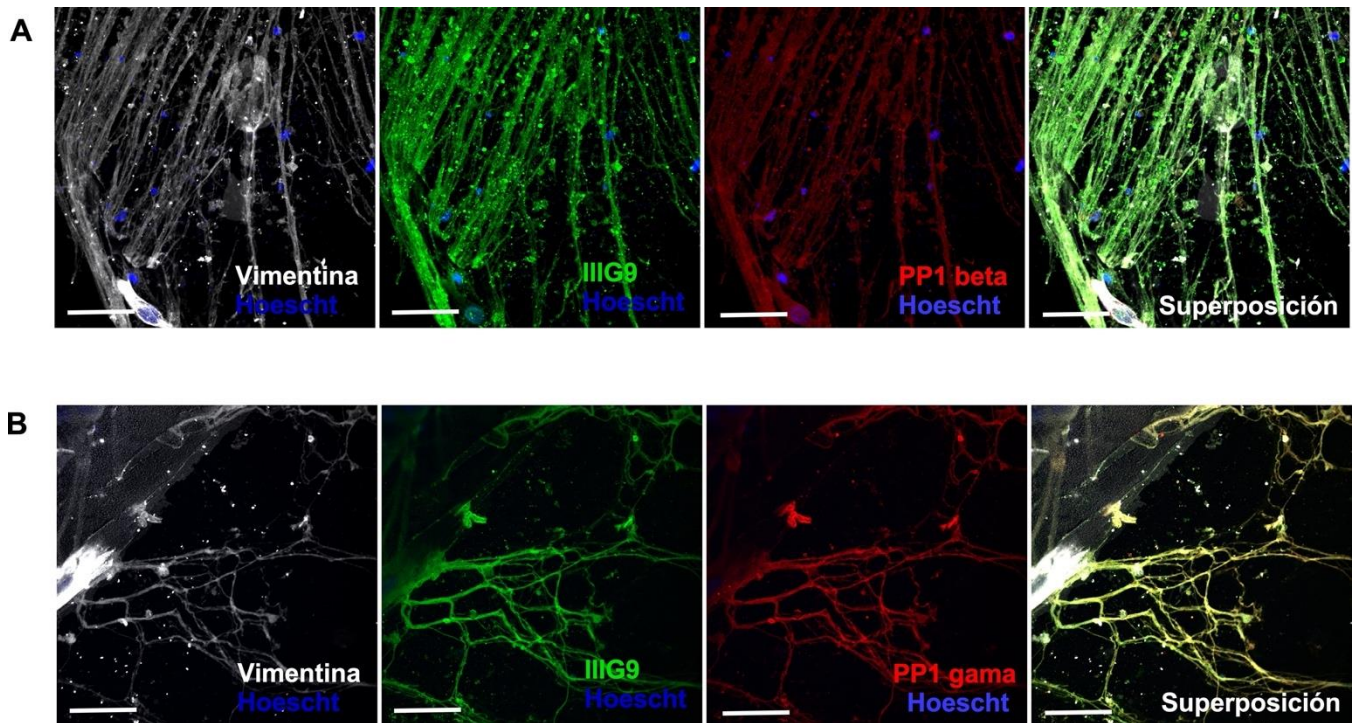


Figura 11. Inmunofluorescencia y microscopía confocal para la detección de IIIIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 en células gliales radializadas. A-B. Inmunomarcaje para Vimentina (Cy5), IIIIG9 (Cy2) y PP1 beta (Cy3) o Vimentina (Cy5), IIIIG9 (Cy2) y PP1 gama (Cy3), respectivamente. Los núcleos fueron marcados con Hoescht (azul). En cada caso, la última imagen corresponde a la superposición de las imágenes confocales. Barra de tamaño: A-B 20 μm .

VII. DISCUSIÓN

7.1. Células AF22 y sus características

Las células AF22 representan una línea celular derivada de células madre pluripotentes inducidas humanas, las cuales fueron programadas con características especiales, para lograr un buen modelo de la biología de células madre neurales del desarrollo temprano del SNC, y cumplen con el potencial para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Baeza et al. 2021; Falk et al. 2012). El uso de anticuerpos marcadores de proteínas tales como SOX2, Nestina, CD133, entre otros, fueron utilizados para corroborar esta afirmación e identificar las cualidades que hacen a las células AF22 una línea celular excepcional para el estudio de diferentes patologías desarrolladas durante el desarrollo del sistema nervioso humano.

SOX2 es un factor de transcripción, perteneciente a la familia de genes SOX (determinantes del sexo del cromosoma Y) cuya expresión se ha reportado en células madre pluripotentes del neuroepitelio con la capacidad de autorrenovación, y que participa activamente en la división de estas células en la zona neurogénica del cerebro de rata adulta (Komitova & Eriksson 2004) Esta proteína forma parte de un conjunto de proteínas reconocidas por consenso, las cuales otorgan la identidad de células madre neurales junto a CDH2, HES1 y JAG1 (Lam et al. 2019; Takahashi et al. 2007). Debido a que SOX2 es un marcador de indiferenciación celular, Nestina un marcador de células madre neurales con compromiso glial (Yamamoto et al. 2009) y CD133, es una glicoproteína cuya localización ha sido reportada en células neuroepiteliales de ratones (Shmelkov et al. 2005), resultan un buen indicativo para confirmar la naturaleza troncal de estas células. Los resultados obtenidos a través de inmunocitoquímica muestran una inmunoreacción positiva contra CD133, y Nestina. Sin embargo, en el caso de SOX2, se aprecian células positivas y algunas células negativas al anticuerpo utilizado, lo cual sería un indicativo de una heterogeneidad del cultivo celular. Es decir, no todas las células poseen la misma condición de indiferenciación, por lo que algunas células estarían en vías de diferenciación.

Por otro lado, tubulina β III se encuentra posicionado como un marcador de células neuronales del SNC, tanto en periodos de desarrollo como maduro (Dráberová et al. 2008). La localización de esta proteína presente en el citoesqueleto, luego de la inducción de células madre a la diferenciación, ha sido utilizada como un método de confirmación de identidad de neuronas, y sugiere que podría estar regulada por factores de transcripción necesarios para el compromiso neuronal (Katsetos et al. 2003; Dennis et al. 2002). Comparando el análisis retrospectivo y los resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica presentados en este estudio, encontramos un contraste importante. Se señala que las células AF22 expresan una muy baja o casi nula concentración de tubulina β III, afirmación que no coincide con los datos extraídos por inmunofluorescencia, en donde se muestra una reacción inmunopositiva abundante a lo largo de todo el citoplasma. Esta situación podría relacionarse con el hecho de que algunas células presentan cierto grado de diferenciación, ya que está comprobado que las células AF22 pueden diferenciarse in vitro en neuronas de tipo serotoninérgicas, gabaérgicas y glutamatérgicas (Tailor et al. 2013).

Las células AF22 también resultaron positivas al marcaje contra GFAP (proteína ácida fibrilar glial) y contra vimentina, ambas proteínas de compromiso glial (Castanheira et al. 2008). GFAP en particular representa un indicador de estrés en astrocitos del SNC, los cuales tienen como célula progenitora a la glía radial (Lewis et al. 2003). Estos resultados sirven como una confirmación para el potencial de las células AF22 para diferenciarse en líneas celulares de astrocitos (Lundin et al. 2018), característica muy relevante para el estudio y modelo de enfermedades neurodegenerativas.

7.2. Las células AF22 muestran una alta expresión de IIG9 y una expresión variable de las subunidades catalíticas de PP1

De acuerdo a “The human Protein Atlas” (<https://www.proteinatlas.org/>) las células AF22 son la línea celular con mayor expresión de la proteína IIG9, la cual es una proteína cuya expresión se detecta desde el día embrionario 13 en la glía radial, una célula madre multipotente, esto según datos aún no publicados obtenidos en nuestro laboratorio. Los

resultados obtenidos de este estudio nos permiten confirmar la alta expresión de esta proteína, a través de distintas técnicas como lo son RT-PCR, Western blot e Inmunocitoquímica, arrojando un resultado positivo en cada una de ellas. Mediante RT-PCR fue amplificada por sí sola la isoforma larga de IIIG9 y también en conjunto la isoforma larga y corta, arrojando un producto de 223 y 163 pb. De igual forma, mediante western blot detectamos un solo componente de 42 kDa que está también presente en extractos de células HEK 293 que sobreexpresan la secuencia de ADN codificante de IIIG9. Cabe destacar que en esta última muestra, también fue posible detectar otros dos componentes proteicos adicionales de 51 kDa y 53 kDa. Estos tres componentes proteicos (42 kDa, 51 kDa y 53 kDa) han sido recientemente descritos por nuestro grupo de laboratorio en extracto de proteínas aisladas desde células ependimarias que tapizan las paredes ventriculares del cerebro adulto (Baeza et al. 2021). Nosotros creemos que la banda de 42 kDa detectadas en extractos de proteínas de células AF22 corresponde a la expresión de la isoforma corta de IIIG9 y que esta proteína abundantemente detectada en estas células podría ser necesaria para el rol de IIIG9 en células troncales neuroepiteliales presentes durante el desarrollo del sistema nervioso. Por otra parte, en inmunocitoquímica se detectó la presencia de IIIG9 en un patrón punteado y discontinuo, cercano a la membrana y en el citosol, lo que podría sugerir que esta proteína puede focalizar la acción de PP1 en ambas regiones subcelulares.

Respecto de los estudios para la expresión de isoformas alfa, beta y gama de PP1, determinamos que para PP1 α se obtiene un componente proteico del tamaño esperado mediante western blot (37kDa), y también fue posible amplificar su secuencia correspondiente a 395 pb mediante RT-PCR. Sin embargo, hubo una inmunoreacción negativa en ensayos de inmunocitoquímica, en donde solo es posible apreciar la tinción nuclear Hoescht. Esta situación podría tener una explicación por dos fenómenos: i. Que la concentración en el citoplasma de PP1 alfa sea muy escasa, por lo que se encuentra muy diluida para ser detectada por inmunocitoquímica. ii. Que exista un enmascaramiento u ocultamiento de epítipo (zonas de unión para el anticuerpo) que impide la detección de esta en la proteína de conformación nativa presente en las células. El enmascaramiento de epítopos representa un problema importante para los análisis de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, y por lo general, esto ocurre por las técnicas de fijación celular, ya que esta involucra una modificación en la organización tridimensional de las proteínas, lo que podría resultar en el ocultamiento de la zona de unión

del anticuerpo (D'Amico et al. 2009). Las células utilizadas en este estudio fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y luego mantenidas en paraformaldehído al 0.4%. Una forma de verificar esta información sería testear con otras soluciones fijadoras, realizar técnicas de exposición de antígenos (por ejemplo regulando la temperatura y el pH de la solución) o el uso de otros anticuerpos para detectar PP1 alfa.

En el caso de los ensayos la detección de PP1 γ , detectamos la amplificación de un producto de tamaño esperado (262 pb) mediante RT-PCR y en análisis de Western blot se detectamos un componente del tamaño esperado (37 kDa). Sin embargo, mediante el estudio de inmunocitoquímica, detectamos una escasa localización subcelular. De esta forma, nuestros resultados se correlacionan con la expresión del ARNm para PP1 gama observada en análisis retrospectivo de expresión de ARNm en células AF22.

Por su parte, los ensayos de western blot e inmunocitoquímica para la detección de PP1 β en células AF22, y de acuerdo con los análisis retrospectivos de expresión de ARNm, hemos determinado que estas células presentan una alta concentración de PP1 β a nivel citoplasmático y en la membrana de células AF22. También a través de RT-PCR los resultados muestran una amplificación de la secuencia de 237 pb, correspondiente con el producto esperado, al igual que sucede con las isoformas alfa y gamma, lo que confirmaría la información entregada por el análisis retrospectivo, en donde se señalaba una alta expresión del ARNm de la isoforma beta de PP1.

Según todos estos antecedentes, nosotros creemos que la expresión de la isoforma corta de IIIG9 en conjunto con la abundante expresión de PP1 β sugiere que ambas proteínas podrían ser parte de un complejo proteico que regula la acción de esta fosfatasa durante el desarrollo embrionario. El rol biológico de este complejo proteico, podría estar relacionado con la función de PP1 β en el proceso de división celular, el cual ocurre con alta eficiencia en células neuroepiteliales. Por otra parte, el estudio de la función de PP1 β y de sus subunidades regulatorias, como IIIG9, en células neuroepiteliales puede ser clave para determinar si la desregulación de estas proteínas puede ser un evento que promueva el desarrollo de patología cerebrales humanas que se generan en etapas tempranas del desarrollo a nivel del neuroepitelio como la dislexia, autismo, tumores cerebrales pediátricos, entre otras.

7.3. Es posible la generación de cultivos de células gliales radializadas a partir de células neuroepiteliales AF22

La glía radial ha sido reconocida como una población heterogénea de células progenitoras de otras células variablemente comprometidas con diferentes funciones y destinos neurales, y mucha evidencia sugiere que el fenotipo de esta célula glial es un intermedio entre toda célula madre neural y su progenie diferenciada (Malatesta et al. 2008). Durante las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso humano, la glía radial se origina a partir de células neuroepiteliales que se encuentran recubriendo los ventrículos y la transición de célula neuroepitelial a glía radial se encuentra marcada por una serie de cambios estructurales y funcionales, reconocidas como características gliales (Kriegstein & Götz 2003). Hasta la fecha, no existen registros de la obtención de cultivos de células con estas características a partir de células madre neuroepiteliales humanas AF22. Sin embargo, se extrapoló un protocolo en donde se utilizó una línea celular denominada J1ES para generar cultivos altamente radializados de glía radial (Silva-Alvarez et al. 2017) para aplicarlo a nuestro modelo de diferenciación con células AF22.

En los resultados obtenidos a partir de microscopía de Nomarski e Inmunocitoquímica realizado en estas células, se pueden observar prolongaciones largas y finas llamados procesos celulares, las cuales fueron positivas para inmunomarcaje con anticuerpos anti vimentina y nestina, proteína que forma filamentos intermedios en el citoesqueleto de la glía (Chivava & Nuñez 2018), por lo que ambos resultan buenos marcadores gliales por su alta expresión en este tipo de células. Estos resultados nos señalan que a partir de un protocolo específico, si es posible diferenciar células neuroepiteliales AF22 en células que presentan las características típicas de células glía radial, lo cual representa una buena oportunidad para el estudio de las propiedades de estas células *in vitro* y así, conocer más sobre estas células y sus mecanismos moleculares, ya que se encuentran involucradas en procesos altamente especializados en el SNC, como lo es la migración neuronal y la neurogénesis de todos los linajes celulares principales. Por esto, resulta muy importante ampliar el conocimiento de la estructura y fisiología de estas células, para una mejor comprensión del desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas que afectan el sistema nervioso.

No obstante, aunque estas células cumplen con el fenotipo característico de glía radial, como la alta expresión de las proteínas vimentina, nestina y su morfología elongada, existen algunos criterios que deben cumplirse para definir si estas células corresponden a un cultivo de glía radial. Diversos autores sugieren que los eventos más importantes que definen la aparición de una glía radial son la aparición del ARNm de BLBP (proteína de unión a lípidos del cerebro) y la expresión de marcadores como tenascina C, S100 β y el transportador de glutamato (GLAST) (Malatesta et al. 2003; Vives et al. 2003), además de las proteínas de filamentos intermedios como nestina, vimentina y GFAP, por lo que una caracterización más completa y detallada, la cual incluya ensayos de RT-PCR para los genes de relevancia, inmunomarcaje en extractos de proteínas mediante western blot para las proteínas ya mencionadas y el uso de otros anticuerpos contra S100 β y GFAP en Inmunocitoquímica nos podría entregar una mayor y más exacta información sobre la naturaleza de estas células y lograr definir si se trata de un cultivo de glía radial.

7.4 IIIG9 y las subunidades catalíticas de PP1 beta y gamma se expresan abundantemente en células gliales radializadas diferenciadas a partir de células AF22

A partir de las células gliales radializadas generadas por diferenciación de células AF22 se analizó la expresión de las proteínas IIIG9 y PP1 beta y gamma, a través de ensayos de Inmunocitoquímica, para así definir si existe una variación en la expresión de estas proteínas entre la célula radializada ya diferenciada y su estado de indiferenciación.

Los resultados nos muestran una expresión abundante de IIIG9 y la subunidad beta de PP1 en el citoplasma y procesos celulares presentes en células ya radializadas, situación que se replica en su estado de indiferenciación como célula madre neuroepitelial. La subunidad beta de PP1 cumple importantes funciones intracelulares, además de su implicación en el ciclo celular. A nivel de citosol se encuentra asociada a microtúbulos (Rebelo et al. 2015) y en neuronas corticales se expresa en el soma (Ouimet et al. 1995). Al ser IIIG9 una subunidad reguladora de PP1, y, al ambas presentar una amplia distribución en estas células radializadas, podría existir una acción conjunta de estas células en forma de complejo proteico.

Sin embargo, en cuanto a la expresión de PP1 gama se ve una notable diferencia en células con características de glía radial con respecto a sus células precursoras en su estado de indiferenciación. En células radializadas se observa una abundante expresión y amplia localización a lo largo de sus procesos celulares, lo cual contrasta mucho con los resultados obtenidos en células AF22, en donde la expresión y localización de esta proteína observada por inmunofluorescencia es muy escasa. Estos resultados indican que la diferenciación de células AF22 hacia células gliales radializadas induce la expresión de PP1 gama.

La razón de este contraste no se encuentra claro, debido a que se requieren más estudios para establecer la función de estas proteínas en estas células obtenidas por diferenciación de células neuroepiteliales. Sin embargo, su distribución y localización subcelular, en conjunto con la literatura nos pueden acercar postular un posible motivo de este importante incremento en la expresión de PP1 gama. La subunidad gama de PP1 se encuentra involucrada en importantes acontecimientos celulares, como lo es la sinapsis en células neuronales (Munton et al. 2004), además de encontrarse asociada al citosqueleto de actina, el cual se distribuye por toda la célula y su función es permitir la motilidad y mantener la morfología celular.

Entre las funciones más relevantes de la glía radial se encuentra la neurogénesis de los linajes más importantes de células del SNC y la migración neuronal (Spassky et al. 2005), la que ocurre gracias a la generación de largas prolongaciones celulares denominadas procesos. En la formación de estos procesos, la actina es un participante activo indispensable, debido a que son las fibras de actina, las que ejercen la fuerza contra la membrana plasmática para extenderla y provocar esta prolongación del citoplasma (Pellegrin & Mellor 2007), lo que podría sugerir que el aumento de la expresión de PP1 gama en estas células con característica de glía radial se encontraría relacionada con esta importante función de las células gliales.

VIII. CONCLUSIONES

1. Las células madre neurales AF22 expresan de manera consistente las proteínas de linaje de célula troncal (Nestina, SOX2 y CD133). Sin embargo, en nuestros análisis inmunocitoquímicos nosotros detectamos una alta expresión de Vimentina, GFAP y tubulina β III, a diferencia de lo observado en el análisis retrospectivo.
2. IIIG9 se expresa abundantemente en el citosol de células AF22 y además cerca de la membrana, lo que sugiere que esta proteína puede focalizar la acción de PP1 en ambas regiones.
3. Se localizaron todas las isoformas de PP1 a nivel de proteína en células AF22, sin embargo, solo se detectó una expresión abundante de la isoforma beta.
4. Los resultados sugieren que al menos IIIG9 y PP1 beta podrían ser parte de un complejo proteico que regule la función de PP1 en estas células troncales neurales humanas.
5. Es posible inducir la radialización de las células neuroepiteliales AF22 mediante un protocolo de cultivo.
6. La células gliales radializadas mantienen la expresión de IIIG9 y PP1 beta e inducen la expresión de PP1 gama.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baeza, V., Cifuentes, M., Martínez, F., Ramírez, E., Nualart, F., Ferrada, L., & Salazar, K. 2021. IIIIG9 inhibition in adult ependymal cells changes adherens junctions structure and induces cellular detachment. *Scientific Reports*, 11(1), 18537.
- Bos, P., Lowry, E., Costa, J., Thams, S., Garcia-Diaz, A., Zask, A., Wichterle, H., Stockwell, B. 2019. Development of MAP4 Kinase Inhibitors as Motor Neuron-Protecting Agents. *Cell Chemical Biology*. 26(12), 1703-1715.
- Bystron, I., Blakemore, C., & Rakic, P. 2008. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(2), 110-122.
- Castanheira, P., Torquetti, L., Nehemy, M. B., & Goes, A. M. 2008. Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 71, 644-650.
- Chivava, C. N. L., & Núñez, L. G. 2018. Las neuroglías y su relación con las enfermedades neurodegenerativas/Glial cells and their relationship with neurodegenerative diseases. *Ciencia&Conciencia*, 1(1), 47-51.
- Cifuentes, M., Baeza, V., Arrabal, P. M., Visser, R., Grondona, J. M., Saldivia, N., & Salazar, K. 2018. Expression of a novel ciliary protein, IIIIG9, during the differentiation and maturation of ependymal cells. *Molecular Neurobiology*, 55, 1652-1664.
- D'Amico, F., Skarmoutsou, E., & Stivala, F. 2009. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of immunological methods*, 341(1-2), 1-18.
- Danielson, P. E., Sautkulis, L. N., Foye, P. E., Hedlund, P. B., & Carson, M. J. 2002. A novel mRNA expressed along brain ventricles. *Gene Expression Patterns*, 1(2), 83-88.
- Dennis, K., Uittenbogaard, M., Chiaramello, A., & Moody, S. A. 2002. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat neuron-specific Class III β -tubulin gene. *Gene*, 294(1-2), 269-277.

- Dráberová, E., Del Valle, L., Gordon, J., Marková, V., Šmejkalová, B., Bertrand, L., & Katsetos, C. D. 2008. Class III β -tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(4), 341-354.
- Falk, A., Koch, P., Kesavan, J., Takashima, Y., Ladewig, J., Alexander, M., & Brüstle, O. 2012. Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons. *PLoS one*, 7(1), e29597.
- Fardilha, M., Esteves, S. L., Korrodi-Gregório, L., Vintém, A. P., Domingues, S. C., Rebelo, S., & e Silva, E. F. D. C. 2011. Identification of the human testis protein phosphatase 1 interactome. *Biochemical pharmacology*, 82(10), 1403-1415.
- Hendrickx, A., Beullens, M., Ceulemans, H., Den Abt, T., Van Eynde, A., Nicolaescu, E., & Bollen, M. 2009. Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. *Chemistry & biology*, 16(4), 365-371.
- Ivliev, A. E., 't Hoen, P. A., van Roon-Mom, W. M., Peters, D. J., & Sergeeva, M. G. 2012. Exploring the transcriptome of ciliated cells using in silico dissection of human tissues. *PLoS One*, 7(4), e35618.
- Katsetos, C. D., Herman, M. M., & Mörk, S. J. 2003. Class III β -tubulin in human development and cancer. *Cell motility and the cytoskeleton*, 55(2), 77-96.
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*, 32, 149-184.
- Kriegstein, A. R., & Götz, M. 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia*, 43(1), 37-43.
- Komitova, M., & Eriksson, P. S. 2004. Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neuroscience letters*, 369(1), 24-27.
- Lam, M., Sanosaka, T., Lundin, A., Imaizumi, K., Etal, D., Karlsson, F. H., & Falk, A. 2019. Single-cell study of neural stem cells derived from human iPSCs reveals distinct progenitor populations with neurogenic and gliogenic potential. *Genes to Cells*, 24(12), 836-847.

- Lewis, G. P., & Fisher, S. K. 2003. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *International review of cytology*, 230, 264-290.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., ... & Kleihues, P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114, 97-109.
- Lundin, A., Delsing, L., Clausen, M., Ricchiuto, P., Sanchez, J., Sabirsh, A., & Falk, A. 2018. Human iPS-derived astroglia from a stable neural precursor state show improved functionality compared with conventional astrocytic models. *Stem cell reports*, 10(3), 1030-1045.
- Lyu, J., Kim, H. R., Yamamoto, V., Choi, S. H., Wei, Z., Joo, C. K., & Lu, W. 2013. Protein phosphatase 4 and Smek complex negatively regulate Par3 and promote neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells. *Cell reports*, 5(3), 593-600.
- Malatesta, P., Appolloni, I., & Calzolari, F. 2008. Radial glia and neural stem cells. *Cell and tissue research*, 331(1), 165-178.
- Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., & Götz, M. 2003. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*, 37(5), 751-764.
- Müller, F., & O'Rahilly, R. 1987. The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation at stage 12. *Anatomy and embryology*, 176(4), 413-430.
- Munton, R. P., Vizi, S., & Mansuy, I. M. 2004. The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS letters*, 567(1), 121-128.
- Nakano, I., Dougherty, J. D., Kim, K., Klement, I., Geschwind, D. H., & Kornblum, H. I. 2007. Phosphoserine phosphatase is expressed in the neural stem cell niche and regulates neural stem and progenitor cell proliferation. *Stem Cells*, 25(8), 1975-1984.
- Ortiz-Álvarez, G., & Spassky, N. 2021. One progenitor to generate them all: new evidence for multi-fated neural progenitors. *Current Opinion in Neurobiology*, 66, 186-194.

- Ouimet, C. C., Da Cruz e Silva, E. F., & Greengard, P. 1995. The alpha and gamma 1 isoforms of protein phosphatase 1 are highly and specifically concentrated in dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8), 3396-3400.
- Oviedo, M.J. 2023. Rol de IIG9 en la mantención de uniones adherentes y la polaridad de células endimarias normales y tumorales. Tesis de Doctorado (en escritura). Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- Pellegrin, S., & Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *Journal of cell science*, 120(20), 3491-3499.
- Rebelo, S., Santos, M., Martins, F., e Silva, E. F. D. C., & e Silva, O. A. D. C. 2015. Protein phosphatase 1 is a key player in nuclear events. *Cellular signalling*, 27(12), 2589-2598.
- Sauer, F. C. 1935. The cellular structure of the neural tube. *Journal of Comparative Neurology*, 63(1), 13-23.
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. 2017. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature reviews Drug discovery*, 16(2), 115-130.
- Shmelkov, S. V., Clair, R. S., Lyden, D., & Rafii, S. 2005. AC133/CD133/Prominin-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(4), 715-719.
- Silva-Alvarez, C., Salazar, K., Cisternas, P., Martínez, F., Liour, S., Jara, N., & Nualart, F. 2017. Apical polarization of SVCT2 in apical radial glial cells and progenitors during brain development. *Molecular neurobiology*, 54, 5449-5467.
- Spassky, N., Merkle, F. T., Flames, N., Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *Journal of Neuroscience*, 25(1), 10-18.
- Stoykova, A., Götz, M., Gruss, P., & Price, J. 1997. Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. *Development*, 124(19), 3765-3777.
- Taylor, J., Kittappa, R., Leto, K., Gates, M., Borel, M., Paulsen, O., & Smith, A. 2013. Stem cells expanded from the human embryonic hindbrain stably retain regional specification and high neurogenic potency. *Journal of Neuroscience*, 33(30), 12407-12422.

- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., & Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature protocols*, 2(12), 3081-3089.
- Vives, V., Alonso, G., Solal, A. C., Joubert, D., & Legraverend, C. 2003. Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *Journal of Comparative Neurology*, 457(4), 404-419.
- Weissman, T., Noctor, S. C., Clinton, B. K., Honig, L. S., & Kriegstein, A. R. 2003. Neurogenic radial glial cells in reptile, rodent and human: from mitosis to migration. *Cerebral cortex*, 13(6), 550-559.
- Yamamoto, A., Shofuda, T., Islam, M. O., Nakamura, Y., Yamasaki, M., Okano, H., & Kanemura, Y. 2009. ABCB1 is predominantly expressed in human fetal neural stem/progenitor cells at an early development stage. *Journal of neuroscience research*, 87(12), 2615-2623.