
Trabajo Fin de Máster
Máster en Investigación Biomédica
Curso 2021-2022

Caracterización de la expresión de
DLK1 y DLK2 en células madre neurales y
tejido nervioso

Autor:

Ruth Basanta Torres

Tutor:

Jose Ramón Pineda Martí y Patricia García-Gallastegui

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
1. RUTA NOTCH.....	5
1.1. <i>DLK1 Y DLK2</i>	6
2. NEUROGÉNESIS.....	7
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
MATERIAL Y MÉTODOS	8
1. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	8
1.1. <i>Inmunodetección basada en DAB</i>	9
2.1. <i>Tinción Nissl</i>	9
3.1. <i>Tinción Hematoxilina-Eosina</i>	9
2. CULTIVO CELULAR.....	10
3. INMUNOCITOQUÍMICA.....	11
1.3. <i>Fijación celular</i>	11
2.3. <i>Inmunodetección por fluorescencia</i>	11
3.3. <i>Cuantificación</i>	12
4. CUANTIFICACIÓN POR PCR.....	12
1.4. <i>Extracción ARN</i>	12
2.4. <i>Retrotranscripción</i>	13
3.4. <i>RT-qPCR</i>	13
RESULTADOS	14
1. INMUNODETECCIÓN DE DLK1 Y DLK2 EN HIPOCAMPO Y NICHOS NEUROGÉNICOS.....	15
2. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE DLK1 Y DLK2 EN NSCs <i>IN VITRO</i>	17
3. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE DLK1 Y DLK2 EN NSCs <i>IN VITRO</i>	17
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

bHLH: hélice-bucle-hélice básico (del inglés "basic Helix-Loop-Helix")

BSA: Seroalbúmina bovina (del inglés "Bovine Serum Albumin")

cADN: Ácido desoxirribonucleico complementario

CT: Umbral de ciclo (del inglés "Cycle Threshold")

DAB: 3,3'-Diaminobencidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCX: Doblecortina

DEPC: dietilpirocarbonato

DLL1: Delta like canonical Notch ligand 1

DLK1: Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1

DLK2: Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 2

DSL: Delta/Serrate/Lag2

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (del inglés "Epidermal Growth Factor")

EtOH: Etanol

FGF2: Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (del inglés "Fibroblast Growth Factor")

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

H/E: Hematoxilina-Eosina

NGS: suero normal de cabra

NEXT: Fragmento extracelular de Notch (del inglés: "Notch extracellular truncation")

NICD: Dominio intracelular de Notch (del inglés: "Notch intracellular domain")

NSCs: células madre neurales (del inglés: "Neural stem cells")

OCT: Compuesto de temperatura de corte óptima (del inglés: "optimal cutting temperature")

PBS: tampón fosfato salino (del inglés "Phosphate buffer saline")

PCR: Reacción de polimerasa en cadena (del inglés: "Polymerase chain reaction")

PFA: Paraformaldehído

RT-pPCR: PCR cuantitativa a tiempo real (del inglés: "Real time quantitative PCR")

SGZ: Zona subgranular (del inglés: "Subgranular zone")

SRC: Dominio de homología SRC 3 (del inglés: "SRC Homology 3")

SVZ: Zona subventricular (del inglés: "Subventricular zone")

RESUMEN

El cerebro contiene regiones donde se encuentran las células madre neurales capaces de generar nuevas neuronas a lo largo de la vida de todos los mamíferos. Este proceso, también conocido como neurogénesis, ocurre principalmente en las regiones subventricular (SVZ) y subgranular (SGZ) del hipocampo. Dlk1 (Delta like Homolog 1) es un ligando no canónico de la ruta de señalización Notch que se ha relacionado con procesos como la neurogénesis y la plasticidad neuronal. En el presente estudio se ha caracterizado la expresión de DLK1 y su homólogo DLK2 en las regiones neurogénicas cerebrales de modelos murinos. Además, se ha estudiado la expresión de ambos ligandos en células madre neurales *in vitro* provenientes del área subventricular, tanto en estado de proliferación como en estado de diferenciación neuronal y astrogliar. Los resultados obtenidos permiten afirmar la presencia de DLK1 y DLK2 en ambas regiones neurogénicas (SVZ y SGZ). Además, una vez aisladas las células madre neurales del área subventricular y cultivadas *in vitro* en estado de proliferación se demostró que expresaban ambas proteínas. Tras la inducción de la diferenciación celular se observó que las progenitoras neuronales mantuvieron niveles altos de DLK1 y DLK2 mientras que en las progenitoras astrogliales su expresión decayó drásticamente.

INTRODUCCIÓN

1. Ruta Notch.

El gen *Notch* fue identificado hace más de 100 años en *Drosophila Melanogaster* y recibió su nombre del fenotipo “Notched Wing” (ala mellada) de moscas con mutaciones de pérdida de función en Notch (1). La señalización mediada por Notch es considerada una ruta antigua y altamente conservada en organismos pluricelulares puesto que está involucrada en una gran cantidad de procesos biológicos en diferentes especies, teniendo un papel fundamental en el desarrollo embrionario y la homeostasis de tejidos y órganos. En humanos, el gen que codifica los receptores Notch presenta 4 parálogos (NOTCH1-4) situados en los cromosomas 9, 1, 19, y 6 respectivamente (2). Su expresión es específica de tejido y tipo celular y se diferencian principalmente por el número de dominios de repetición similar al factor de crecimiento epidérmico (abreviado como “EGF”) y por las modificaciones transcripcionales en estos (1,3). Todos ellos constan de una porción extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular (NICD abreviatura del inglés “*Notch intracellular domain*”), siendo este último el encargado de la señalización intracelular (3).

Los receptores Notch se generan en el retículo endoplasmático de las células receptoras de señal, donde se glicosilan los dominios de repetición similares a EGF. Una vez transportados al aparato de Golgi tiene lugar una primera escisión (S1) que da lugar a heterodímeros que se transportan a la membrana plasmática. Un porcentaje de los receptores expresados en la membrana son endocitados y pueden segmentarse en NICD. Los ligandos de Notch se generan en las células emisoras de señal y se expresan en la membrana celular para interactuar con las células receptoras. Cuando un ligando se une a un receptor se genera una fuerza de tracción que posibilita la segunda escisión (S2). El fragmento restante, denominado NEXT (abreviatura del inglés “*Notch extracellular truncation*”), puede sufrir una tercera escisión en la membrana plasmática y liberar al NICD o ser endocitado y segmentado en la membrana de los endosomas. En total, el fragmento NICD puede generarse por 3 vías: activación independiente de ligando, activación dependiente de ligando e independiente de endocitosis y activación endocítica dependiente de ligando (2). NICD puede translocar al núcleo y regular la expresión génica de la célula o permanecer en el citoplasma para interactuar con otras vías de señalización como NFκB, mTORC2, AKT o Wnt (2). En el caso de alcanzar el núcleo NICD activará la expresión de genes diana y efectores de la vía Notch, siendo Hes y Hey los más relevantes y mejor estudiados. Los genes Hes y Hey codifican una pequeña familia de proteínas con el motivo de hélice-bucle-hélice básico (bHLH; del inglés “basic Helix-Loop-Helix”), se consideran factores represores y poseen un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso, del corazón y de los vasos sanguíneos entre otros (4,5).

Todos los ligandos de Notch tienen en común un dominio Delta/Serrate/Lag-2 (DSL), un dominio

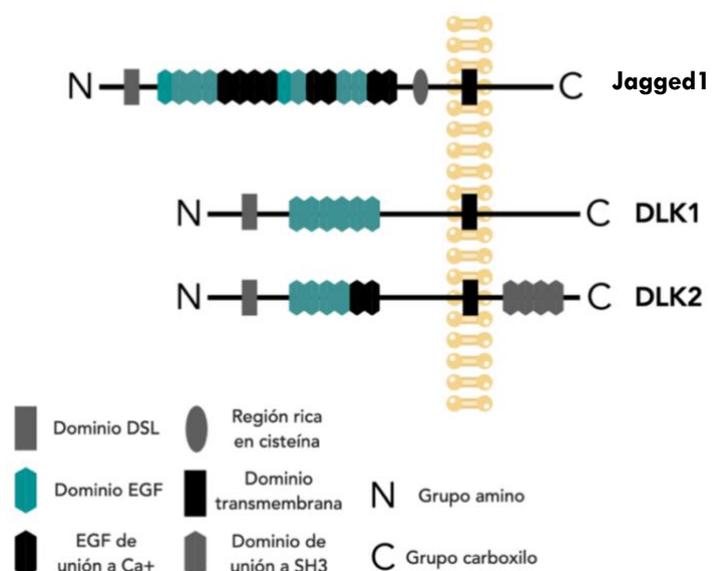


Figura 1: Estructura proteica de los ligandos de Notch Jagged1, DLK1 y DLK2.

N-terminal y un número variable de dominios EGF. Existen dos familias de ligandos, Serrate/Jagged, la cual posee una región rica en cisteína, y Delta/Delta-like que carece de ella (Figura 1), siendo los receptores son capaces de diferenciar entre ambas familias (1,6).

La desregulación de esta ruta está profundamente relacionada con consecuencias patológicas. Se han asociado a Notch enfermedades de diverso carácter, como síndromes genéticos y trastornos del desarrollo (7,8) o enfermedades autoinflamatorias (9). Además, se sabe que la señalización descontrolada de Notch tiene un alto potencial oncogénico ya que inhibe la apoptosis y favorece la proliferación celular. Se ha asociado con la progresión tumoral (10) y se ha descrito su relevancia tanto en las células transformadas como en su interacción con el microambiente tumoral (11). Siguiendo esta línea, estudios actuales proponen emplear componentes de esta ruta como dianas terapéutica frente a diversos tipos de cáncer (10,12).

1.1. *DLK1 Y DLK2.*

DLK1 Y DLK2 son dos proteínas transmembrana homólogas pertenecientes a la familia de proteínas con repeticiones del dominio similar a EGF, en la que se incluyen los receptores de Notch y sus ligandos (13). Se consideran ligandos no canónicos de la ruta Notch y se ha descrito que interactúan con Notch1 e inhiben su activación y señalización en diferentes líneas celulares (13,14).

El gen de DLK1 está situado en el cromosoma 14q32 en humanos (15), su ARNm consta de 5 exones (Figura 2) y puede sufrir procesamiento alternativo para dar lugar a variantes polimórficas. La proteína madura está formada por 383 aminoácidos y puede actuar como una proteína transmembrana o secretada (15). En multitud de tejidos, DLK1 aparece altamente expresado durante la embriogénesis, sin embargo, su expresión se ve reducida tras el desarrollo, quedando restringida a tejidos endocrinos como las glándulas adrenales, testículos, ovarios y cerebro (15). Respecto a su función en tejidos adultos, se ha descrito que DLK1 es un importante regulador de la homeostasis de las células madre y que está involucrado en la regeneración tisular tras una lesión. Estos fenómenos se han observado en músculo esquelético (16,17), glándulas salivares (18), tejido hematopoiético (19), hígado (16) y en el sistema nervioso (16,20) entre otros.

Respecto al gen *DLK2* es altamente homólogo a *DLK1* y presenta similitudes con el ligando DLL1. Se encuentra en el cromosoma 6p21.1 en humanos y está compuesto por 6 exones, 5 de ellos codificantes (Figura 2). La gran similitud estructural con DLK1 sugiere que DLK2 surgió debido a una duplicación genética durante la evolución. La principal diferencia entre las proteínas homólogas que codifican, es la presencia de cuatro dominios de unión a SH3 en la región intracelular de DLK2 que no aparecen en DLK1 (Figura 1)(21). Esto sugiere que DLK2 podría estar implicado en vías de señalización intracelular (21,22). La bibliografía describe que DLK2 se expresa en diversos tejidos durante la embriogénesis (15), al igual que DLK1, pero a diferencia de esta, su expresión se mantiene en todos los tejidos adultos de ratón, con la excepción del corazón, el bazo y el tejido muscular (15). A pesar de que las funciones de DLK2 se han estudiado en menor profundidad que las de DLK1, diversos estudios han relacionado DLK2 con procesos de morfogénesis y diferenciación (22,23).

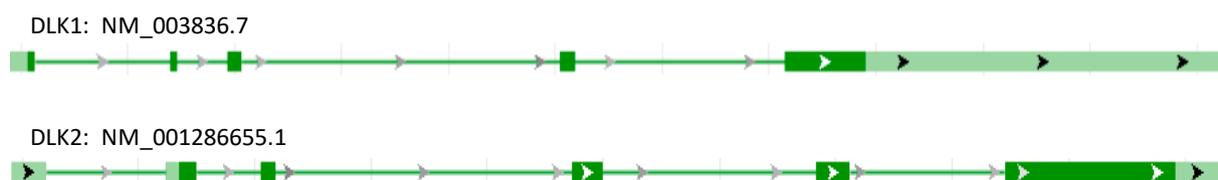


Figura 2: Secuencia genómica de DLK1 y DLK2 (24).

2. Neurogénesis.

El desarrollo del sistema nervioso central en el ser humano es un proceso complejo y altamente controlado espacial y temporalmente en el que es crucial la neurogénesis, definida como la generación de nuevas neuronas a partir de las células madre neurales (NSCs; del inglés "*Neural Stem Cells*") (25). Estas son células indiferenciadas que poseen un alto potencial proliferativo, capacidad de autorrenovación a largo plazo y de diferenciación a todos los linajes neurales (26). Durante mucho tiempo se creyó que el sistema nervioso central no poseía capacidad proliferativa o regenerativa una vez completado su desarrollo, sin embargo, en la década de los 90 multitud de evidencias establecieron la presencia de células madre adultas en el cerebro, y por lo tanto la existencia de la neurogénesis adulta incluso en humanos (27,28). Este es un proceso compuesto por diferentes fases bien definidas que incluyen la proliferación celular, la diferenciación neuronal, la maduración y la integración funcional en los circuitos neuronales preexistentes (29).

Las NSCs fueron aisladas por primera vez hace 30 años tras su extracción del cuerpo estriado de ratones adultos, además, se consiguió demostrar su capacidad de proliferación y diferenciación a nuevas neuronas y astrocitos (30). Esto ayudó al cambio de paradigma sobre la neurogénesis adulta y la plasticidad cerebral. Las NSCs en cultivo crecen en suspensión y forman agregados que se denominan neuroesferas, estas han sido ampliamente caracterizadas, lo que ha permitido que en la actualidad se empleen con diversos fines en investigación (31). En el cerebro adulto las NSCs están ubicadas principalmente en dos regiones especializadas denominadas nichos neurogénicos, en los cuales se genera un microambiente único y permisivo para la proliferación celular y la generación de nuevas neuronas inmaduras. Además de la matriz extracelular y diferentes factores de señalización este microambiente viene dado por diversas poblaciones celulares (células gliales, endoteliales, inmunes, etc.) cuya contribución se encuentra en estudio en la actualidad (26). Así, los nichos más extensamente estudiados en la literatura, y sobre todo en modelos murinos, son dos; la zona subventricular (SVZ; del inglés "*Subventricular Zone*") adyacente a los ventrículos laterales y la zona subgranular (SGZ; del inglés "*Subgranular Zone*") del giro dentado (Figura 3)(25). No obstante, recientemente se han encontrado neuronas nuevas fuera de los nichos neurogénicos clásicos, en áreas como el hipotálamo, cuerpo estriado, sustancia negra, corteza y amígdala (29,32). Esto ha suscitado el estudio de estas regiones y la descripción de nuevos nichos neurogénicos en el hipotálamo, además, se han encontrado precursores locales en la corteza y la amígdala. Sin embargo, se ha visto que la renovación neuronal encontrada en el cuerpo estriado se debe a la migración de células generadas en la SVZ (29).

Las NSCs presentes en el área subgranular provienen de la glía radial formada en el desarrollo embrionario a partir de células neuroepiteliales del tubo neural. Se denominan células similares a la glía radial de tipo 1 y tienen la capacidad de dar lugar a nuevas células granulares maduras que pasarán a formar parte de la capa granular del giro dentado (33). La mayoría de las células tipo 1 llevarán a cabo una división asimétrica dando lugar a una nueva célula madre y una célula diferenciada, mientras que una minoría lleva a cabo divisiones simétricas para mantener la población de células madre (32).

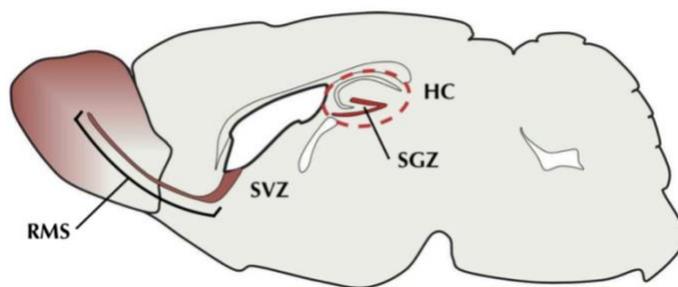


Figura 3: Esquema de la ubicación de los nichos neurogénicos (SGZ, SVZ), el hipocampo (HC), el bulbo olfatorio (BO) y la corriente migratoria rostral (RMS; del inglés “Rostral Migratory Stream”) en un corte sagital de cerebro murino.

En el caso del área subventricular las NSCs se denominan células de tipo B, estas expresan el filamento intermedio GFAP común para astrocitos y son capaces de generar progenitores neurales transitorios llamados células de tipo C, que tras rápidas divisiones generarán nuevas neuronas inmaduras (células tipo A o neuroblastos), las cuales migrarán hacia el bulbo olfatorio a través de la vía de migración rostral o RMS (del inglés “Rostral Migratory Stream”) (Figura 3)(34). Así, el destino final de los neuroblastos generados en la SVZ en un cerebro sano es integrarse en la capa granular del bulbo olfatorio, sin embargo se sabe que solo un pequeño porcentaje de estas células sobreviven y se convierten en células granulares maduras (29). En resumen, las células B pueden dividirse simétricamente para su autorrenovación y asimétricamente para generar las células de tipo C y dar lugar a nuevas neuronas diferenciadas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En estudios anteriores del departamento se ha descrito la presencia de los ligandos DLK1 y DLK2 en el sistema nervioso de embriones de ratón. En continuidad con dichos resultados y teniendo en cuenta que DLK1 se ha relacionado en la bibliografía con procesos neurogénicos, se pretende caracterizar la expresión de los ligandos DLK1 y DLK2 en las áreas neurogénicas del cerebro de ratón adulto, así como en células madre neurales *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Inmunohistoquímica.

Para realizar la caracterización en cerebro murino en ratones adultos C57BL/6, los animales fueron sacrificados y perfundidos en el departamento de biología celular de la facultad de medicina de la Universidad del País Vasco. Se anestesiaron profundamente con una solución de Avertina al 2,5% y se realizó una perfusión intracardiaca con una solución de lavado PBS para retirar la sangre del sistema vascular y se utilizó la misma vía para administrar la solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4%. Una vez fijados los animales, se extrajeron los cerebros y se post-fijaron durante 2h. Se crioprotegieron por inmersión en una solución de sacarosa al 10%, se congelaron rápidamente por inmersión en una solución a -80°C de isopentano y se encastraron en medio OCT para su posterior seccionado al criostato. Se realizaron cortes sagitales seriados de 14 µm de espesor directamente adheridos sobre portaobjetos previamente polisitados y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

1.1. *Inmunodetección basada en DAB.*

La presencia y distribución de las proteínas DLK1 y DLK2 se realizó mediante inmunodetección basada en DAB (diaminobencidina). Esta técnica emplea la conjugación de los complejos avidina-biotina para amplificar la señal y se emplea la enzima peroxidasa para revelar la DAB dando su típica coloración marrón. Por ello, el primer paso que se desarrolla en la técnica es bloquear la peroxidasa endógena que abunda tanto en los peroxisomas del epitelio vascular como en los eritrocitos. Para ello las preparaciones se incubaron en una solución saturante de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% durante 30'. Tras la realización de 3 lavados de 5' en PBS se creó una barrera hidrofóbica sobre el portaobjetos con la ayuda de un rotulador PAP para poder llevar a cabo las incubaciones en gota. A continuación, para impedir la unión inespecífica de los anticuerpos primarios y secundarios los cortes se incubaron durante 60' en una solución de PBS con seroalbúmina bovina (BSA) al 5% que a su vez estaba suplementada con el detergente Tween-20 al 0,1% y suero de cabra (NGS) 10%, llevando así a cabo el bloqueo de uniones inespecíficas. Se prepararon los anticuerpos primarios α -DLK1 y α -DLK2 (hechos en conejo) a una concentración 1:200 en PBS-BSA 1%-Tween-20 0,1%; se retiró la solución de bloqueo y se añadió la solución de anticuerpos sobre las preparaciones, procediendo a una incubación a 4°C *over night*.

Al día siguiente se realizaron tres lavados en PBS para eliminar el exceso de anticuerpos primarios no unidos y se inició la incubación con el anticuerpo 2º en PBS-BSA 1% a una concentración 1:200 durante 60'. El anticuerpo empleado es específico frente a anticuerpos de conejo y pertenece al Kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) de amplificación enzimática basada en avidina/biotina. A continuación, se realizaron de nuevo 3 lavados en PBS y se inició la incubación con los reactivos A (avidina; 1:56) y B (peroxidasa biotinilada; 1:56) del mismo kit. Tras 90' minutos en oscuridad para permitir su conjugación y unión a los anticuerpos secundarios, se llevó a cabo el revelado con el Kit DAB Substrate (Vector Laboratories). La solución de revelado se preparó con 50µl de reactivo 1 (tampón), 60µl de reactivo 2 (DAB) y 48µl de reactivo 3 (H₂O₂). Una vez se aplicó sobre el control negativo (sin anticuerpo primario) y sobre la primera preparación marcada con anticuerpos se observó que la aparición del marcaje marrón bajo el microscopio aparecía específicamente en la segunda, estableciéndose un tiempo óptimo de incubación de 3' antes de frenar la reacción mediante dilución con H₂O. Por último, se revelaron las preparaciones restantes empleando exactamente el mismo tiempo establecido en 3'.

2.1. *Tinción Nissl.*

Sobre las mismas preparaciones se empleó la tinción de Nissl como contratinción para visualizar el tejido. Para ello se sumergieron los cubres en el colorante (Violeta de cresilo al 0,1 %) durante 10' para evitar una tinción excesiva del ARN que dificultase la observación de la DAB. Seguidamente se inició un ciclo de deshidrataciones con concentraciones crecientes de etanol (EtOH 50º > 70º > 96º > 100º) y dos baños del agente intermediario Citrosol para permitir el montaje de los cubreobjetos con medio de montaje DPX, dejándose secar durante al menos 48h y eliminando su exceso sobre el cubre con una cuchilla afilada.

3.1. *Tinción Hematoxilina-Eosina.*

Paralelamente, y para complementar la visualización histológica se realizó una tinción de Hematoxilina-Eosina (H/E) en los cortes inmediatamente sucesivos a los cortes seriados empleados para la inmunotinción. La H/E es una tinción de gran utilidad para visualizar las estructuras tisulares,

pero enmascara en gran medida los marcajes convencionales, por lo que no se utilizó de manera simultánea a la inmunodetección basada en DAB.

La tinción se llevó a cabo utilizando el equipo de tinciones Shandon Varistain® V24-4, empleando el programa nº1 (“HE + EO”) que tiene una duración 1:05h en la cual se desarrollan los pasos del proceso detallados en la Tabla 1.

	Compuesto	Tiempo		Compuesto	Tiempo
1	Citrosol	10 min	13	Agua corriente	5 min
2	Citrosol	10 min	14	Eosina Y	25 seg
3	Citrosol	5 min	15	Agua corriente	5 min
4	Alcohol 50%	10 seg	16	Alcohol 50%	10 seg
5	Alcohol 96%	10 seg	17	Alcohol 70%	10 seg
6	Alcohol 96%	10 seg	18	Alcohol 96%	10 seg
7	Alcohol 70%	10 seg	19	Alcohol 100%	10 seg
8	Alcohol 50%	10 seg	20	Alcohol 100%	10 seg
9	Agua corriente	5 min	21	Citrosol:Alcohol 100% 1:1	10 seg
10	Hematoxilina Harris	2,5 min	22	Citrosol	5 min
11	Agua corriente	5 min	23	Citrosol	5 min
12	Agua clorhídrica 0,3%	3 seg	24	Citrosol	5 min

Tabla 1. Protocolo de la tinción Hematoxilina-Eosina.

2. Cultivo celular.

En este estudio se emplearon células madre neuronales (Neural Stem Cells; NSCs) murinas. Estas fueron extraídas de la zona subventricular del cerebro de ratones adultos C57Bl/6 y se conservaron a -80°C. Con el objetivo de descongelar las células se introdujeron los criotubos en un baño termostatzado a 37°C hasta su descongelación, diluyéndose posteriormente su contenido con 10 mL de medio de cultivo. Para poder retirar los agentes crioprotectores diluidos, se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min desechándose el sobrenadante y resuspendiendo el pellet celular con 5 mL de medio fresco “NeuroCult™ proliferación” que seguidamente se vertió en un frasco de cultivo T25 de baja adherencia (Ref.431463, Corning, NY, USA).

El medio “NeuroCult™ de proliferación” está optimizado para mantener la capacidad proliferativa de las células madre neurales en cultivo durante largos períodos de tiempo sin perder su potencial de autorrenovación, proliferación o posterior diferenciación (tras el cambio de medio). Este medio se preparó a partir de una solución stock Neurocult Basal con un suplemento de proliferación en un ratio 9:1 (Ref.05702, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) y esta mezcla, además se suplementó con 20 ng/mL del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 10 ng/mL del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2)(Peprotech, Londres, Reino Unido), 2 µg/mL heparina (cat# 07980, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada), suplemento “B27”, 2mM L-Glutamina (G7513, Sigma, St. Louis, MO, USA) y antimicrobianos (penicilina y estreptomycin (100 U/mL y 150 µg/mL respectivamente (15140-122, Gibco)). El medio NeuroCult™ de diferenciación es una variación de este al que se le sustituye el suplemento de proliferación con el suplemento de diferenciación (cat# 05704,

Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) y el suplemento B27 con vitamina A, manteniéndose la presencia de L-Glutamina y los antibióticos penicilina y estreptomycinina.

Las células se mantuvieron en cultivo durante 3 semanas y se realizó un pase cada 7 días para realizar su expansión o subcultivo celular. A partir del séptimo día de cultivo la neuroesfera generada a partir de las células madre adquiere un tamaño de unas 100 μm , y si se agregan entre ellas puede empezar a darse la muerte celular en su interior debido al súbito tamaño que alcanzan los agregados celulares, por lo que necesitan disgregarse mecánica y enzimáticamente empleando la Accutase (Sigma, St. Louis, MO, USA) a cada pase. El subcultivo se realiza partiendo de una densidad de 100.000 células para un frasco T25. Para el estudio, conociendo el número de células y la densidad deseada, se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos que previamente se les colocó un cubreobjetos de 12mm y se las trató con laminina 1:1000 durante 2h a 37°C (L2020, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para generar una matriz extracelular fijada al vidrio y se lavó con PBS para retirar la fracción soluble. Así, las células se sembraron en dos placas de cultivo con el objetivo de generar dos condiciones, estado de proliferación e inducción de diferenciación. Para ello, en la primera condición se añadieron 20.000 células por pocillo (para evitar su confluencia), y se cultivaron durante 48h en medio NeuroCult™ de proliferación. En cambio, en la segunda condición se indujo una diferenciación, y dado a los procesos de muerte subyacente en el proceso de diferenciación se cultivaron 60.000 células por pocillo durante 7 días en NeuroCult™ empleando el suplemento de diferenciación previamente descrito.

Inicialmente las células se incubaron en forma de gota en la estufa durante 60 minutos aproximadamente y una vez plenamente adheridas al cristal se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS y se añadió a cada pocillo 500 μl del medio de cultivo correspondiente en cada placa. Ambas placas se introdujeron en la estufa, la placa de proliferación se retiró transcurridas 48h y la placa de diferenciación tras 7 días (168h) de incubación.

3. Inmunocitoquímica.

1.3. Fijación celular.

Al extraer cada placa de la estufa se llevó a cabo la fijación de las células con paraformaldehído (PFA) al 4%. En la campana de flujo se retiró delicadamente el medio de cultivo contenido en cada pocillo y se añadieron 500 μl de la solución de PFA precalentado a 37°C. Tras 10 minutos se recogió la solución de PFA y se realizaron 3 lavados con PBS. Por último, se añadieron 500 μl de PBS a cada pocillo y se sellaron las placas con la ayuda de una lámina de Parafilm.

2.3. Inmunodetección por fluorescencia.

La detección y cuantificación de las proteínas de interés en las NSCs en cultivo se llevó a cabo por medio de una inmunodetección por fluorescencia. En primer lugar, se retiró el PBS de los pocillos en los que se encontraban las células fijadas y se añadió PBS-BSA 1%-Tritón 0,3%. Las placas se mantuvieron en agitación durante 30' para permitir la permeabilización de las membranas y a su vez el bloqueo de uniones inespecíficas. Una vez transcurrido este tiempo se llevó a cabo la incubación en gota con los anticuerpos primarios (Tabla 2). Las soluciones de los anticuerpos se prepararon en PBS-BSA 1% -Tritón 0,1% a una concentración 1:200 y se empleó un volumen de 50 μl para cada cristal. Cada cubreobjetos se depositó boca abajo sobre la gota de solución de anticuerpo primario y se dejaron incubar durante 24h a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se llevaron a cabo 3 lavados de 5' en PBS-Tween-20 (0,1%) y se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 2) durante 1h en oscuridad y temperatura ambiente. Los anticuerpos

secundarios se prepararon de igual manera que los primarios, y se les añadió el marcador fluorescente DAPI a una concentración 1:1000 para visualizar los núcleos celulares. Para finalizar se lavaron los cristales con PBS y se montaron en portaobjetos con medio de montaje Fluoromont™.

Ac 1º		Ac 2º	
Diana	Origen	Diana	Fluorocromo
DLK1	Conejo	α-Conejo	Verde
DLK2	Conejo	α-Conejo	Verde
DCX	Cabra	α-Cabra	Rojo
GFAP	Conejo	α-Conejo	Verde
GFAP	Ratón	α-Ratón	Rojo
Nestina	Ratón	α-Ratón	Rojo

Tabla 2. Anticuerpos primarios y sus anticuerpos secundarios correspondientes empleados en la inmunodetección por fluorescencia.

3.3. Cuantificación.

Las preparaciones se observaron en el microscopio confocal de fluorescencia y se realizaron aproximadamente 3 fotografías de diferentes campos en cada una de ellas. La cuantificación de las señales observadas en las fotografías se llevó a cabo con el programa de análisis de imagen ImageJ. Se determinó la intensidad de señal de los diferentes marcajes que mostraba cada célula y se normalizó esta cifra respecto al área celular. En el caso de las células agregadas se determinó la señal colectiva y se estimó la señal individual teniendo en cuenta el número de células formadoras del agregado.

4. Cuantificación por PCR.

Con el objetivo de cuantificar el ARNm de los diferentes genes de interés en cada condición se llevó a cabo una PCR en tiempo real. Para obtener un lisado celular a partir de las NSCs en proliferación y diferenciación de los cultivos celulares sin fijar se realizó el procedimiento que se describe a continuación.

1.4. Extracción ARN.

Para extraer el ARN del interior celular se utilizó el RNeasy® MicroKit de Qiagen. Teniendo en cuenta que la muestra celular se encuentra adherida en cubreobjetos de vidrio el protocolo se inicia directamente con la lisis celular. Se añadió el buffer de lisis RLT en los pocillos y se rascaron los cubreobjetos con una punta de pipeta para romper las uniones adherentes y lisar las células. Se recogieron los 200µl de buffer empleados en cada placa, y se dividieron en 2 tubos eppendorf que se conservaron a -20°C.

Para retomar el protocolo de extracción se descongeló la muestra, se añadieron 50µl de etanol 100% en cada tubo de muestra y se transfirió el volumen total de cada tubo (150µl) a las columnas de

centrifugado del kit. Se realizó una primera centrifugación de 10s a 14.000 r.p.m. y se descartó el volumen eluido. En este paso la muestra pasa a través del filtro de la columna y el ARN se queda adherido a este. A continuación, se añadieron 180µl de la primera solución de lavado (Wash Solution 1) y se centrifugó la columna durante 10s a 14.000 r.p.m. Del mismo modo se empleó la segunda solución (Wash Solution 2), en este caso realizando dos lavados. Se eliminó el volumen total del tubo de recogida y se lleva a cabo una centrifugación de secado del filtro (60s a 14.000 r.p.m.) con la tapa del eppendorf abierta y se descartó su contenido. Por último, se colocó un nuevo tubo de recogida y se procedió a añadir 10µl de buffer de elución previamente calentado a 75°C y dejándolo actuar durante 60'' a temperatura ambiente. Tras una centrifugación de 30s a 14.000 r.p.m. se repitió este paso con otros 10 µl de la solución de elución.

El volumen final presente en el tubo de recogida (20µl) se pasa a un eppendorf para cuantificar el ARN extraído. La cuantificación se lleva a cabo en un aparato Nanodrop (Espectrofotómetro Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific) utilizando el programa "Nucleic acid quantification", que determina la cantidad de ARN en ng/µl e indica la pureza de la muestra por medio de la ratio de absorbancia 260/280nm.

2.4. Retrotranscripción.

Una vez obtenido el extracto de ARN total debe llevarse a cabo la transcripción reversa para obtener el ADN complementario (cADN), para lo que se utilizó el kit comercial iScript™ de Bio-Rad (Ref.1708890 Bio-Rad). Para cada tubo de ARN se preparó un nuevo eppendorf con 4µl de mix iScript, 1µl de la enzima transcriptasa reversa y un máximo de 1.000ng de ARN. Los microlitros de solución de ARN necesarios se calcularon gracias a la concentración determinada anteriormente mediante el nanodrop y se añadió agua libre de nucleasas (o DEPC) hasta alcanzar un volumen final de 20µl. Los tubos se introdujeron en el termociclador utilizando el programa predefinido "iScript", cuya duración es de 30', obteniendo una concentración de cADN de 50 ng/µl en las muestras de proliferación, y de 18 ng/µl en las muestras de diferenciación.

3.4. RT-qPCR.

Las qPCRs se llevaron a cabo en el termociclador de Bio-Rad CFX96™ Real-Time System. Las placas se diseñaron para detectar 11 genes (Tabla 3) tanto en las muestras de NSCs en proliferación como en las de NSCs en diferenciación.

Gen de interés	(Lectura)	Secuencia (5' → 3')	Amplicón	TM (°C)
<i>Genes de diferenciación linaje neuronal</i>				
<i>DCX</i>	Forward	TCAGCATCTCCACCCAACCA	94	61.13
<i>DCX</i>	Reverse	TTGTGCTTTCCCGTTGACA	94	60.39
<i>NeuN</i>	Forward	CAGAGTGCCCTCGGGAAAAT	94	60.04
<i>NeuN</i>	Reverse	CACCAGTTCAGTCCAAA	94	59.89
<i>Genes diferenciación linaje astrogial</i>				
<i>GFAP</i>	Forward	CTGGACTGCGTCATTTTCCC	256	59.20
<i>GFAP</i>	Reverse	CGATGGAGCCTCAGGGATGA	256	61.12
<i>S100b</i>	Forward	TGGCTCGGAAGTTGAGATT	84	59.96
<i>S100b</i>	Reverse	ATGGCTCCCAGCAGCTAAAG	84	60.11

Genes vía Notch				
NOTCH1	Forward	CCCTTGCTCTGCCTAACGC	162	61.1
NOTCH1	Reverse	GGAGTCCTGGCATCGTTGG	162	60.4
HEY1	Forward	AGCCGAGATCCTGCAGATGA	274	59.4
HEY1	Reverse	GCCGTATGCAGCATTTTCAG	274	57.3
HEY2	Forward	AGATGCTTCAGGCAACAGGG	70	59.4
HEY2	Reverse	CAAGAGCGTGTGCGTCAAAG	70	59.4

Genes vías no-canónicas de Notch				
DLK1	Forward	AGTGCGAAACCTGGGTGTC	148	60.2
DLK1	Reverse	GCCTCCTTGTGAAAGTGGTCA	148	61.0
DLK2	Forward	GGCCAGTGTGTATGACGG	170	61.0
DLK2	Reverse	CGGCATGTGAAGTTGAGGG	170	58.8

Genes normalizadores				
GAPDH	Forward	CCAGTATGACTCCACTCACG	153	57.43
GAPDH	Reverse	GACTCCACGACATACTCAGC	153	57.80
RNA18S	Forward	ATACATGCCGACGGGCGCTG	83	65.66
RNA18S	Reverse	AGGGAGCTCACCGGTTGGTT	83	65.87

Tabla 3. Genes cuantificados en la PCR a tiempo real.

Inicialmente se prepararon las soluciones con los diferentes pares de cebadores o *primers* (forward y reverse) a una concentración 6,25 μ M. A todas ellas se les añadió el fluoróforo SYBR Green (5 μ l / pocillo) para permitir la cuantificación en tiempo real. En segundo lugar, se agregaron 4 μ l de las muestras de cADN diluidas y se selló la placa con la ayuda de un adhesivo para evitar la evaporación del contenido de los pocillos durante el transcurso de los ciclos del programa.

El programa establecido en el termociclador constaba de las siguientes etapas:

1º Desnaturalización: 5' a 95°C

2º Amplificación (40 ciclos):

- Desnaturalización: 10s a 95°C
- Alineamiento: 20s a 60°C
- Polimerización: 20s a 72°C

3º Extensión: 2' a 72°C

4º Conservación: 4°C (sin límite de tiempo)

Los resultados de CT ("Cycle Threshold") obtenidos al finalizar el programa fueron normalizados respecto al gen constitutivo GAPDH.

RESULTADOS

Los resultados de este estudio pueden dividirse en tres grupos respecto a los experimentos realizados: La inmunodetección de DLK1 y DLK2 en hipocampo y nichos neurogénicos, la

cuantificación de la expresión génica de DLK1, DLK2 y otros genes de interés en NSCs *in vitro*, y por último, la cuantificación de la expresión proteica de DLK1 y DLK2 en NSCs *in vitro* por medio de inmunofluorescencia.

1. Inmunodetección de DLK1 y DLK2 en hipocampo y nichos neurogénicos.

En primer lugar, se analizaron las fotografías resultantes de la inmunodetección realizada sobre cortes de cerebros de ratón adulto. En los cortes que se emplearon para realizar el control negativo (en ausencia de anticuerpo primario) no se detectó ninguna señal o falso positivo (Figura 4.A), lo que indica que la técnica se realizó correctamente. En estas mismas imágenes se puede apreciar que la contratinción de Nissl fue poco intensa para evitar enmascarar señales débiles de marcaje, sin embargo, esto dificultó apreciar las estructuras tisulares, dado al escaso tiempo de tinción. No obstante, para solucionar el contratiempo realizamos tinciones con H/E en cortes seriados inmediatamente adyacentes observando perfectamente en ellos las áreas estudiadas.

En la Figura 4 se muestran las regiones donde se localizó el característico marcaje marrón de la DAB. La primera región es el giro dentado del hipocampo (Figura 4.B), y más concretamente en la SGZ (Figura 4.C), se detectaron tanto DLK1 como DLK2. Esta señal aparece localizada en células distribuidas en el hilus y a lo largo de la SGZ donde se encuentra el nicho neurogénico hipocampal. También se localizó señal positiva muy intensa en la región neurogénica subventricular (SVZ), inmediatamente debajo de las células endociliales (Figura 4.D). Así, en estas imágenes se pueden apreciar las células endociliales ciliadas que bordean los ventrículos y las células inferiores en las que se observa una señal positiva muy localizada tanto de DLK1 como DLK2. En esta área es donde se encuentran las NSCs formadoras del nicho neurogénico ubicado en esta región. Por último, se detectaron ambos ligandos en todo el plexo coroideo (Figura 4.E). Cabe destacar que en esta estructura la señal de DLK1 muestra una intensidad muy superior a la señal observada de DLK2.

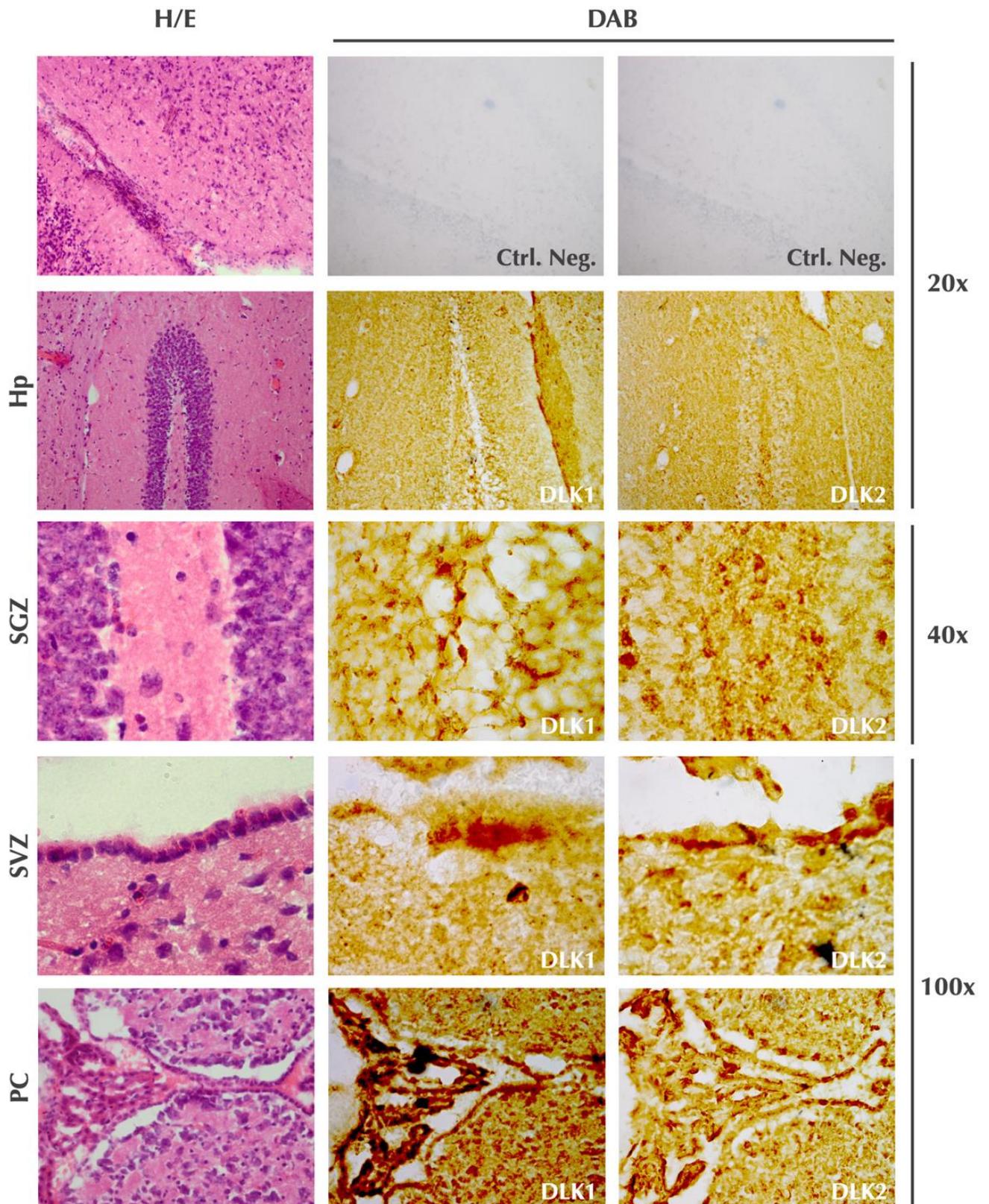


Figura 4. Imágenes tomadas de cortes seriados de cerebro de ratón adulto teñidos con H/E (columna izquierda) y de inmunotinción DAB contra DLK1 y DLK2 (centro y derecha). Abreviaturas: Hp: giro dentado del hipocampo, CP: plexo coroideo, SGZ: zona subgranular, SVZ zona subventricular.

Así, tras determinar la presencia de señal por DAB en la región neurogénica subventricular, se decidió hacer cultivos primarios para la generación de neuroesferas y comprobar la presencia de la señal en un entorno con la población celular de interés aislada. Tras el cultivo en forma de neuroesferas se disociaron las células para poder determinar su correcta viabilidad y establecer un número de células replicable para analizar la expresión de DLK1 y DLK2 tanto por RT-qPCR como por inmunofluorescencia.

2. Cuantificación de la expresión génica de DLK1 y DLK2 en NSCs *in vitro*.

Para determinar los niveles de expresión de los genes *DLK1*, *DLK2*, *Notch*, *Hey1*, *Hey2*, *DCX*, *GFAP*, *NeuN*, *S100B* y *RNA18S*; tanto en neuroesferas en proliferación como en neuroesferas en inducción de diferenciación se realizó un lisado celular de cada condición, una extracción de ARNm, una retrotranscripción a ADNc y una amplificación cuantitativa por RT-qPCR. Todos los genes mostraron una cantidad de RNAm mayor en las neuroesferas en diferenciación, con la excepción de *DLK2* y *Notch*, que se mantuvieron estables y no mostraron diferencias significativas. La expresión de *DLK1*, *Hey1* y *Hey2* se vio aumentada en la condición de diferenciación mostrando diferencias significativas. *DCX*, *NeuN*, *GFAP* y *S100B* aumentaron su expresión drásticamente mostrando las mayores diferencias entre las medias (Figura 5).

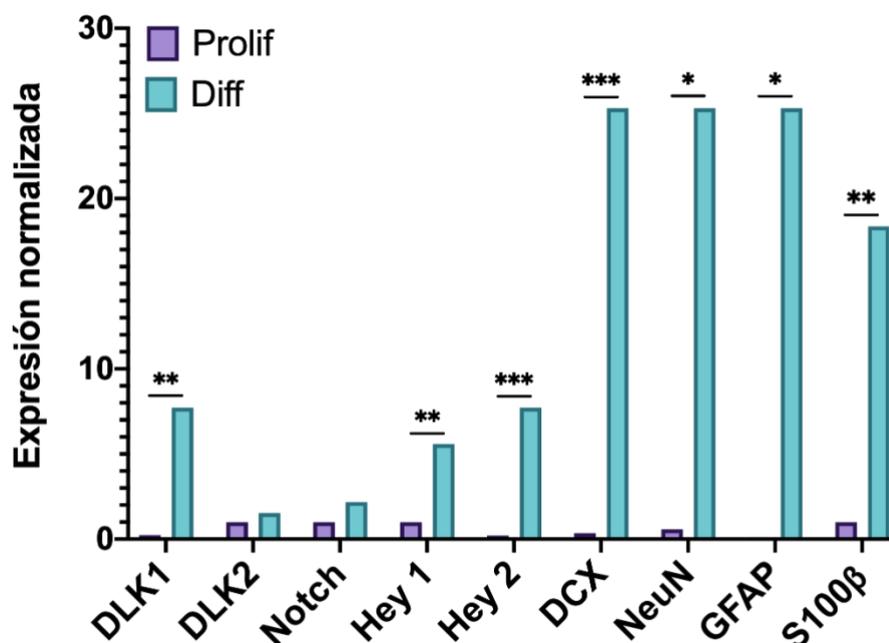


Figura 5. Representación de la cantidad de ARNm de los genes diana presente en las NSCs cultivadas en medio de proliferación y tras 14 días en medio de diferenciación. La significancia se expresa según el siguiente código: ns= no significativa, *=p-valor<0.05, **=p-valor<0.01, ***=p-valor<0.001.

3. Cuantificación de la expresión proteica de DLK1 y DLK2 en NSCs *in vitro*.

Tras determinar la presencia de ARNm por RT-qPCR en muestras paralelas se comprobó la expresión proteica tanto de DLK1 como DLK2. En las imágenes se puede apreciar que las células en estado de proliferación muestran mayor señal de DLK1 y DLK2 que aquellas inducidas a diferenciación, además, la señal de ambos ligandos es bastante similar en cada condición (Figura 6).

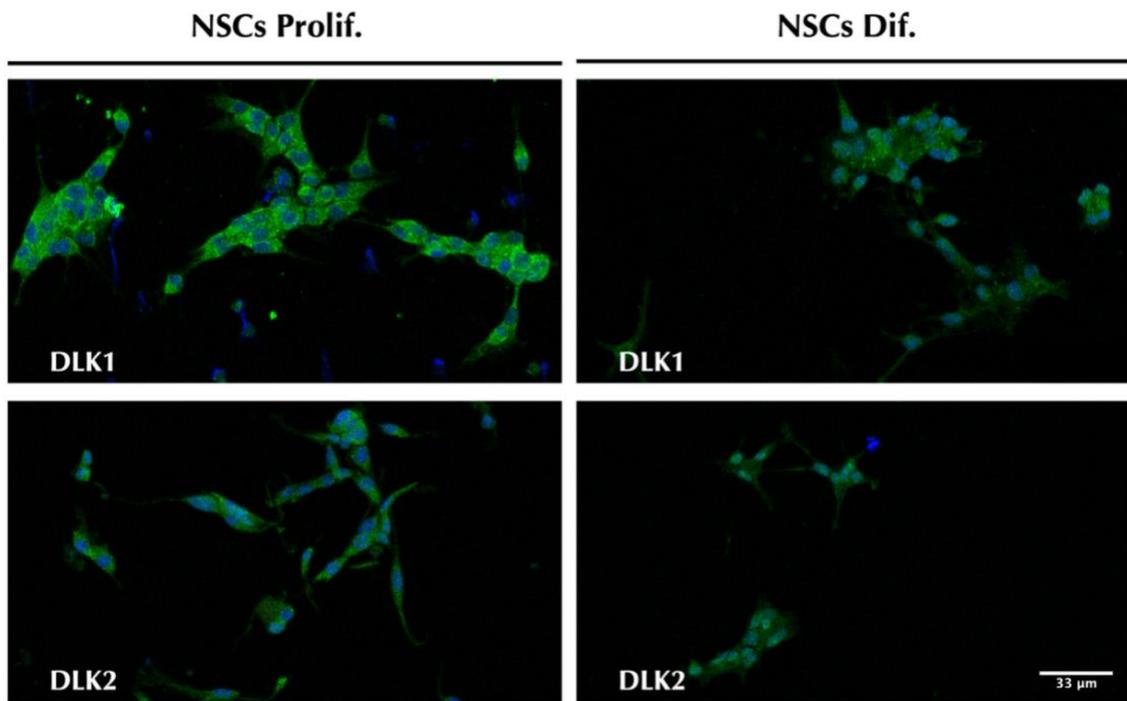


Figura 6. Imágenes representativas de la expresión de DLK1 y DLK2 en NSCs en proliferación y en inducción de diferenciación. Barra de escala: 33 micras.

Tras realizar la detección de la señal de la fluorescencia con el programa ImageJ los resultados de las cuantificaciones por medio de análisis de imagen no mostraron diferencias significativas entre la expresión de DLK1 y DLK2 en las neuroesferas en proliferación (Figura 7A), así como tampoco en aquellas en diferenciación (Figura 7B). Por tanto, la expresión de los ligandos se mantiene equivalente en ambas condiciones. Analizando la expresión de DLK1 se observó un descenso de la expresión altamente significativo (p -valor $<0,01$) entre la condición de proliferación y la de inducción a diferenciación (Figura 8A). De igual manera, la expresión de DLK2 decae en la condición de diferenciación, mostrando en este caso una diferencia de menor significancia (Figura 8B).

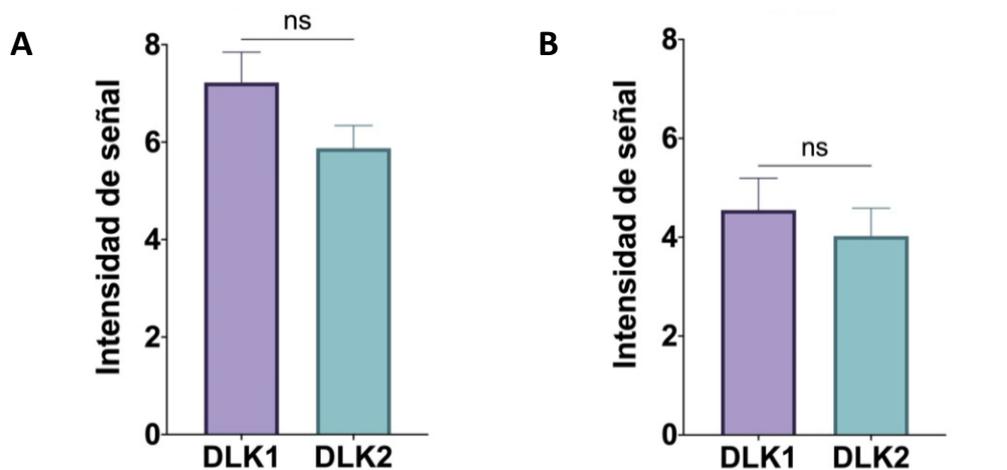


Figura 7. A. Cuantificación de la expresión de DLK1 y DLK2 en las neuroesferas en proliferación; **B.** Cuantificación de la expresión de DLK1 y DLK2 en las neuroesferas en inducción de diferenciación. La significancia se expresa según el siguiente código: ns= no significativa, *= p -valor <0.05 , **= p -valor <0.01 , ***= p -valor <0.001 .

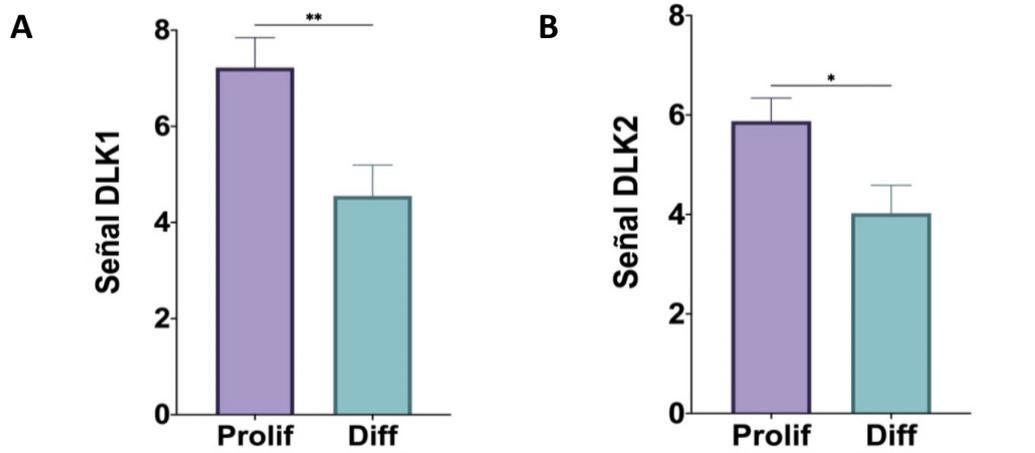


Figura 8. A. Cuantificación de la expresión de la proteína DLK1 en las neuroesferas en proliferación y en inducción de diferenciación; **B.** Cuantificación de la expresión de la proteína DLK2 en las neuroesferas en proliferación y en inducción de diferenciación. La significancia se expresa según el siguiente código: ns= no significativa, *=p-valor<0.05, **=pvalor<0.01, ***=p-valor<0.001.

A mayores, se realizó la comparación de la expresión de DLK1 y DLK2 entre los diferentes linajes neurales presentes en las neuroesferas en inducción de diferenciación. La cuantificación se llevó a cabo identificando la co-expresión de los ligandos con dos marcadores de diferenciación. La doblecortina (DCX) se expresa en aquellas células diferenciadas a progenitoras neuronales y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; del inglés “glial fibrillary acidic protein”) en las progenitoras astrogliales. En la figura 9 se muestran las imágenes representativas de las fotografías tomadas y empleadas en la cuantificación. En cada condición se fotografiaron entre 3 y 4 campos y se analizaron una media de 15 células por campo.

La diferencia de expresión observada entre ambos tipos de progenitores es estadísticamente significativa tanto en DLK1 como en DLK2 (Figura 10). En las células progenitoras neuronales se encuentra una expresión alta de DLK1, manteniendo niveles cercanos a los encontrados en la condición de proliferación. Sin embargo, en las progenitoras astrogliales se observa una expresión muy reducida, indicando que su expresión decae drásticamente durante el proceso de diferenciación (Figura 10A). En el caso de la expresión de DLK2 se observa un patrón similar, resultando en este caso una diferencia muy significativa entre ambas poblaciones (p-valor<0,001). La expresión de DLK2 apenas desciende en los progenitores neuronales en relación con la expresión de las células en proliferación. En contraposición, la expresión de DLK2 en los progenitores astrogliales es prácticamente nula (Figura 10B).

NSCs Dif.

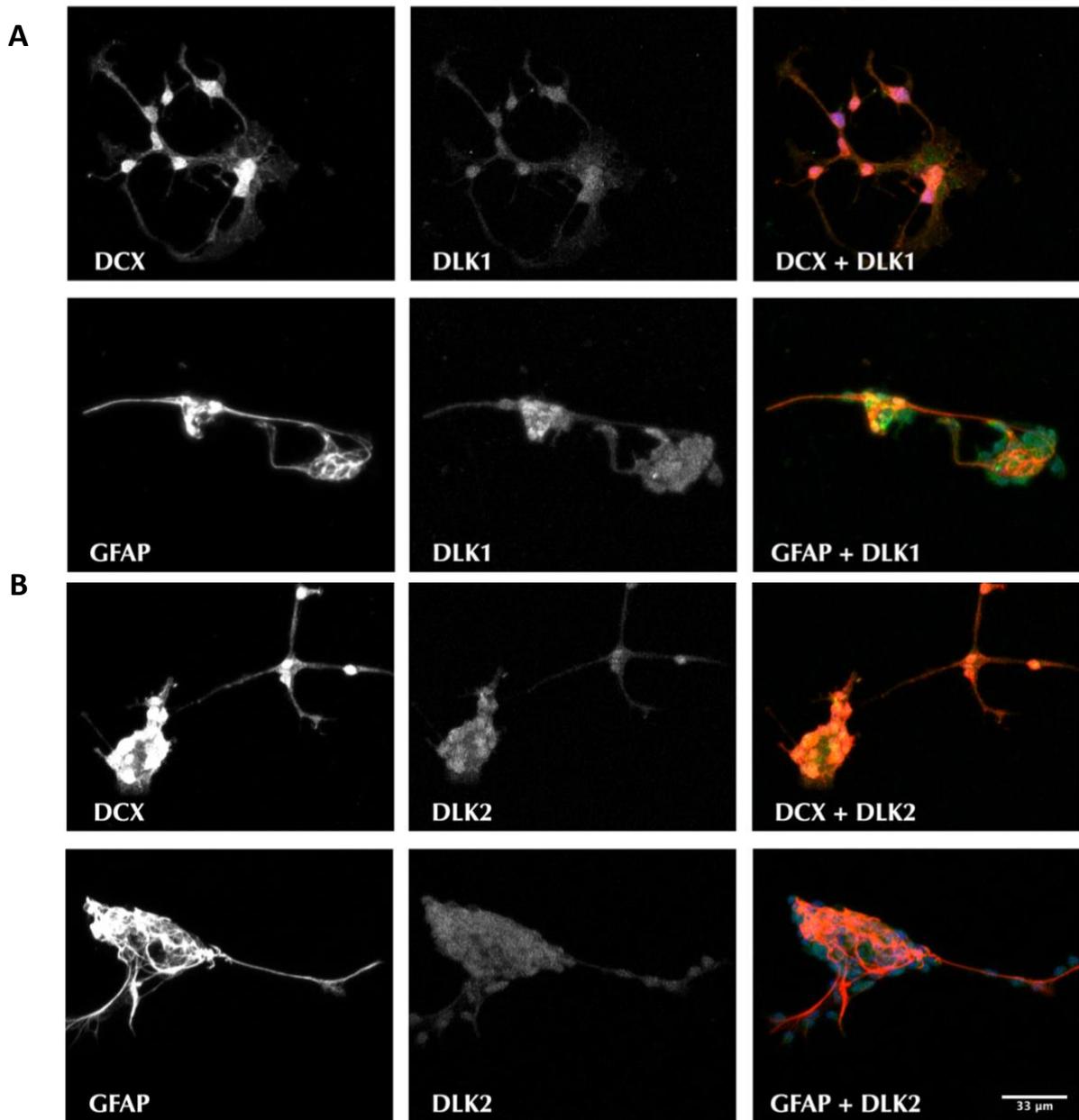


Figura 9.A. Imágenes representativas de la coexpresión de DLK1 con DCX y DLK1 con GFAP en NSCs en estado de diferenciación; **B.** Imágenes representativas de la coexpresión de DLK2 con DCX y DLK2 con GFAP en NSCs en estado de diferenciación. Barra de escala: 33 micras.

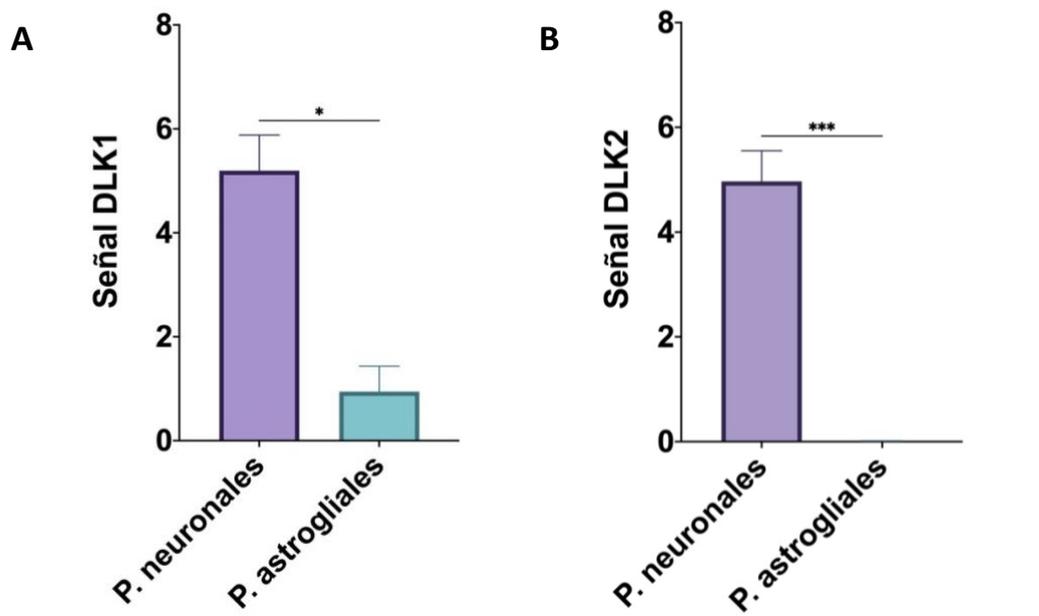


Figura 10. A. Comparativa de la expresión de la proteína DLK1 en las neuroesferas en diferenciación a células progenitoras neuronales y progenitoras astrogliales; **B.** Comparativa de la expresión de la proteína DLK2 en las neuroesferas en diferenciación a células progenitoras neuronales y progenitoras astrogliales. La significancia se expresa según el siguiente código: ns= no significativa, *=p-valor<0.05, **=pvalor<0.01, ***=p-valor<0.001.

DISCUSIÓN

El presente estudio tiene como objetivo tratar de caracterizar la expresión de los ligandos no-canónicos de la ruta Notch DLK1 y DLK2 en el sistema nervioso central y más concretamente en las células madre y progenitores neurales adultos y su descendencia. Para ello se detectó la presencia de ambas proteínas en los nichos neurogénicos de cerebro de ratón adulto y se cultivaron NSCs *in vitro* provenientes de cerebros murinos adultos para estudiar su expresión génica y proteica en estado de proliferación, y una vez inducida la diferenciación.

Como se ha expuesto en el apartado de resultados, en los cortes histológicos se detectó presencia de señal positiva DAB en 3 regiones principales, tanto para DLK1 como para DLK2. Ambos marcajes se observaron en el plexo coroideo, apareciendo DLK1 en mayor medida. Estudios anteriores del departamento han descrito la presencia de las dos proteínas en el plexo coroideo de embriones de ratón, así como en el epitelio endimario (15).

Ambos ligandos fueron detectados en los nichos neurogénicos clásicos localizados en la SGZ y la SVZ. Respecto a DLK1, su expresión disminuye en todos los tejidos tras el nacimiento, con la excepción de los tejidos endocrinos. Sin embargo, se ha descrito que su expresión aumenta en las células madre formadoras de los nichos neurogénicos, lo que coincide con nuestros resultados (35). El aumento de expresión que se da de forma selectiva en estas regiones está regulado por un cambio en el patrón de la impronta genómica y se ha asociado al microambiente que se genera en los nichos neurogénicos (20). Por el contrario, apenas se había descrito con anterioridad la expresión de DLK2 en el sistema nervioso. Aunque su función es incierta, se ha observado que su ausencia está relacionada con

problemas conductuales (36). Todavía no se ha asociado a neurogénesis o a la plasticidad celular, sin embargo, su presencia en ambos nichos sugiere que podría estar involucrado en estos procesos.

Teniendo en cuenta la presencia de ambas proteínas, se emplearon NSCs extraídas del área subventricular de cerebros de ratón adulto para realizar ensayos *in vitro*. Estas células fueron cultivadas en forma de neuroesferas y se mantuvieron en estado de proliferación. Posteriormente, las mismas neuroesferas fueron inducidas a un estado de diferenciación neuronal y astrogial con el objetivo de comparar ambas condiciones. En primer lugar, se estudió la expresión génica y proteica de las neuroesferas en estado de proliferación, empleando RT-qPCR e inmunofluorescencia. Los resultados de la PCR mostraron presencia de ARNm de *DLK2*, sin embargo, la cantidad detectada de *DLK1* fue muy inferior. Además, se detectaron pequeñas cantidades de *Notch*, *Hey1*, *NeuN* y *S100B*. La cuantificación realizada gracias a la inmunofluorescencia reveló expresión proteica de *DLK1* y *DLK2*, observándose una señal ligeramente superior de *DLK1* sin llegar a mostrar una diferencia significativa. Teniendo en cuenta estos resultados y la bibliografía, podemos concluir que alguna variable ha contribuido a la obtención de valores más bajos ARNm de *DLK1* en la muestra de proliferación.

Tras cultivar las neuroesferas en medio de diferenciación durante 14 días, se realizaron los ensayos equivalentes. Analizando la expresión génica se observó un aumento de expresión muy marcado en los genes indicadores de diferenciación, tanto hacia el linaje neuronal (*DCX* y *NeuN*), como hacia el astrogial (*GFAP*, *S100B*). Esto indica que la inducción de diferenciación se ha realizado correctamente y que la diferenciación de las células madre adultas pueden dar lugar a ambos linajes en cultivo. Por un lado, *DLK1* se detectó en cantidades elevadas, aumentando respecto al valor observado en proliferación. En cambio, *DLK2* mantuvo un nivel de expresión muy similar tras la diferenciación, lo que podría indicar que no juega un rol relevante en este proceso. El receptor *Notch1* se mantuvo invariable, pero las proteínas efectoras *Hey1* y *Hey2* aumentaron su expresión indicando un aumento de la activación y señalización de esta vía. La ruta *Notch*, y concretamente las familias de proteínas *Hes* y *Hey* tienen rol fundamental durante el desarrollo del sistema nervioso regulando la diferenciación celular (37,38). Los genes *Hes* ya se han relacionado con la neurogénesis en los nichos neurogénicos (1), por lo que las diferentes proteínas *Hey* podrían estar involucradas en la diferenciación neuronal que tiene lugar durante la neurogénesis adulta.

En último lugar se llevó a cabo la cuantificación de la expresión proteica. Se observó que la señal global detectada tanto de *DLK1* como de *DLK2* había disminuido en relación con la expresión observada en las imágenes de neuroesferas en proliferación, en contraposición con el patrón observado en los resultados de la PCR. Cabe destacar que ambos ligandos mantuvieron un nivel de expresión parejo, al igual que en estado de proliferación. Tras analizar la co-expresión con los marcadores *DCX* y *GFAP* y de este modo diferenciar la expresión de los ligandos según el linaje neuronal y astrogial se observó un patrón claramente diferencial. Las células progenitoras neuronales mantenían niveles altos de ambas proteínas, mientras que en las células progenitoras astrogiales su expresión decaía drásticamente. *DLK1* se detectaba en el linaje astrogial a pesar de encontrarse en cantidades inferiores, sin embargo, *DLK2* resultó inusualmente bajo en comparación con la señal observada en las imágenes. Esta discordancia probablemente se deba a la mayor cantidad de agregados presentes en el linaje astrogial. Como se detalló con anterioridad, los agregados celulares se analizaban con una metodología diferente a las células individualizadas, y eso ha podido aumentar la variabilidad de los datos recogidos.

En ensayos posteriores sería interesante realizar la cuantificación por análisis de imagen de diferentes efectores de la ruta en ambos linajes celulares, una vez se ha inducido el estado de diferenciación, con el objetivo de observar diferencias entre la activación y el funcionamiento de la señalización en cada proceso de diferenciación. Como se ha mencionado con anterioridad, convendría modificar el protocolo con el objetivo de disgregar en mayor medida la muestra celular de manera previa a su fijación. Por otro lado, sería interesante también emplear activadores o inhibidores de la

ruta para observar su efecto sobre las NSCs en proliferación, y su efecto sobre el proceso de diferenciación hacia células progenitoras.

CONCLUSIONES

Tras haber analizado y discutido los resultados del presente estudio se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- En el cerebro murino adulto los ligandos DLK1 y DLK2 se expresan tanto en el plexo coroideo como en los nichos neurogénicos clásicos.
- En NSCs cultivadas *in vitro* en estado de proliferación, *DLK1* y *DLK2* se expresan en cantidades similares. A mayores, cuando se induce la transición a un estado de diferenciación en las NSCs los niveles de las dos proteínas descienden, manteniendo de nuevo un nivel similar entre ambas.
- Las NSCs en diferenciación que expresan DCX, marcador del linaje neuronal, mantienen una expresión elevada de ambos ligandos. Mientras que las NSCs en diferenciación que expresan GFAP, marcador del linaje astrogial, pierden la expresión de ambos ligandos

BIBLIOGRAFÍA

1. Tetzlaff F, Fischer A. Molecular Mechanisms of Notch Signaling. Vol. 1066, Molecular Mechanisms of Notch Signaling. 2018. 319–338 p.
2. Zhou B, Lin W, Long Y, Yang Y, Zhang H, Wu K, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):1–33.
3. UniProt [Internet]. [cited 2022 May 31]. Available from: <https://www.uniprot.org/>
4. Zhou M, Yan J, Ma Z, Zhou Y, Abbood NN, Liu J, et al. Comparative and evolutionary analysis of the HES/HEY gene family reveal exon/intron loss and teleost specific duplication events. *PLoS One*. 2012;7(7).
5. Fischer A, Gessler M. Delta-Notch-and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(14):4583–96.
6. Chillakuri CR, Sheppard D, Lea SM, Handford PA. Notch receptor-ligand binding and activation: Insights from molecular studies. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23(4):421–8.
7. De Los Angeles Serrano M, Demarest BL, Tone-Pah-Hote T, Tristani-Firouzi M, Joseph Yost H. Inhibition of notch signaling rescues cardiovascular development in Kabuki Syndrome. Vol. 17, *PLoS Biology*. 2019. 1–39 p.
8. Mitchell E, Gilbert M, Loomes KM. Alagille Syndrome. *Clin Liver Dis*. 2018;22(4):625–41.
9. Gratton R, Tricarico PM, D’adamo AP, Bianco AM, Moura R, Agrelli A, et al. Notch signaling regulation in autoinflammatory diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1–13.
10. Aggarwal V, Tuli HS, Varol M, Tuorkey M, Sak K, Parashar NC, et al. NOTCH signaling: Journey of an evolutionarily conserved pathway in driving tumor progression and its modulation as a therapeutic target. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;164(April):103403.
11. Meurette O, Mehlen P. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2018;34(4):536–48.
12. Xiu M, Zeng X, Shan R, Wen W, Li J, Wan R. Targeting notch4 in cancer: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Cancer Manag Res*. 2021;13(September):7033–45.
13. Sánchez-Solana B, Nueda ML, Ruvira MD, Ruiz-Hidalgo MJ, Monsalve EM, Rivero S, et al. The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other’s activities. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2011;1813(6):1153–64.
14. Nueda ML, Naranjo AI, Baladrón V, Laborda J. The proteins DLK1 and DLK2 modulate NOTCH1-dependent proliferation and oncogenic potential of human SK-MEL-2 melanoma cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014;1843(11):2674–84.
15. García-Gallastegi P, Ruiz-García A, Ibarretxe G, Rivero-Hinojosa S, González-Siccha AD, Laborda J, et al. Similarities and differences in tissue distribution of DLK1 and DLK2 during E16.5 mouse embryogenesis. *Histochem Cell Biol*. 2019;152(1):47–60.
16. Grassi ES, Pietras A. Emerging Roles of DLK1 in the Stem Cell Niche and Cancer Stemness. *J Histochem Cytochem*. 2022;70(1):17–28.
17. Andersen DC, Laborda J, Baladron V, Kassem M, Sheikh SP, Jensen CH. Dual role of delta-like 1 homolog (DLK1) in skeletal muscle development and adult muscle regeneration. *Dev*. 2013;140(18):3743–53.
18. García-Gallastegui P, Luzuriaga J, Aurrekoetxea M, Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, García-Ramírez JJ, et al. Reduced salivary gland size and increased presence of epithelial progenitor cells in DLK1-deficient mice. *Cell Tissue Res*. 2016;364(3):513–25.
19. Mirshekar-Syahkal B, Haak E, Kimber GM, van Leusden K, Harvey K, O’Rourke J, et al. Dlk1 is a negative regulator of emerging hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica*. 2013;98(2):163–71.
20. Ferrón SR, Charalambous M, Radford E, McEwen K, Wildner H, Hind E, et al. Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis. *Nature*. 2011;475(7356):381–7.
21. Nueda ML, Baladrón V, García-Ramírez JJ, Sánchez-Solana B, Ruvira MD, Rivero S, et al. The Novel Gene

- EGFL9/Dlk2, Highly Homologous to Dlk1, Functions as a Modulator of Adipogenesis. *J Mol Biol.* 2007;367(5):1270–80.
22. Rivero S, Díaz-Guerra MJM, Monsalve EM, Laborda J, García-Ramírez JJ. DLK2 is a transcriptional target of KLF4 in the early stages of adipogenesis. *J Mol Biol.* 2012;417(1–2):36–50.
 23. Xu W, Wang Y, Zhao H, Fan B, Guo K, Cai M, et al. Delta-like 2 negatively regulates chondrogenic differentiation. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6574–82.
 24. National Center for Biotechnology Information [Internet]. 2019 [cited 2022 Jun 7]. p. 1723–1723. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 25. Niklison-Chirou MV, Agostini M, Amelio I, Melino G. Regulation of adult neurogenesis in mammalian brain. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):1–21.
 26. Andreotti JP, Silva WN, Costa AC, Picoli CC, Bitencourt FCO, Coimbra-Campos LMC, et al. Neural stem cell niche heterogeneity. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;95:42–53.
 27. Moreno-Jiménez EP, Terreros-Roncal J, Flor-García M, Rábano A, Llorens-Martín M. Evidences for adult hippocampal neurogenesis in humans. *J Neurosci.* 2021;41(12):2541–53.
 28. Terreros-Roncal J, Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Rodríguez-Moreno CB, Trinchero MF, Cafini F, et al. Impact of neurodegenerative diseases on human adult hippocampal neurogenesis. *Science (80-).* 2021;374(6571):1106–13.
 29. Jurkowski MP, Bettio L, K. Woo E, Patten A, Yau SY, Gil-Mohapel J. Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Front Cell Neurosci.* 2020;14(September):1–36.
 30. Reynolds BA, Weiss S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science (80-).* 1992;255:1707–1710.
 31. da Silva Siqueira L, Majolo F, da Silva APB, da Costa JC, Marinowic DR. Neurospheres: a potential in vitro model for the study of central nervous system disorders. *Mol Biol Rep.* 2021;48(4):3649–63.
 32. Calzà L, Aloe L, Giardino L. Recent Advances in NGF and Related Molecules. In 2021. p. 77–94.
 33. Abbott LC, Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol.* 2020;49(1):3–16.
 34. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia JM, Alvarez-buylla A. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. 1999;97:703–16.
 35. Montalbán-Loro R, Lassi G, Lozano-Ureña A, Perez-Villalba A, Jiménez-Villalba E, Charalambous M, et al. Dlk1 dosage regulates hippocampal neurogenesis and cognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(11).
 36. Navarrete F, García-Gutiérrez MS, Laborda J, Manzanares J. Deletion of Dlk2 increases the vulnerability to anxiety-like behaviors and impairs the anxiolytic action of alprazolam. *Psychoneuroendocrinology.* 2017;85(February):134–41.
 37. Boareto M, Iber D, Taylor V. Differential interactions between Notch and ID factors control neurogenesis by modulating Hes factor autoregulation. *Dev.* 2017;144(19):3465–74.
 38. Weber D, Wiese C, Gessler M. Hey bHLH transcription factors. 1st ed. Vol. 110, *Current Topics in Developmental Biology.* Elsevier Inc.; 2014. 285–315 p.