

Establecimiento de una plataforma molecular *in vitro* para desarrollar oocitos a partir de células madre embrionarias

Establishment *in vitro* of a molecular platform to develop oocytes from embryonic stem cells

EDUVIGES BURROLA-BARRAZA¹, VERÓNICA MORENO-BRITO², IRENE LEAL-BERUMEN², FELIPE ALONSO RODRÍGUEZ-ALMEIDA¹, EVERARDO GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ^{1,3}

Resumen

Las células madre embrionarias (CME) son derivadas de la masa celular interna de blastocitos de mamíferos y debido a su pluripotencia *in vitro* e *in vivo* son capaces de generar los 200 tipos celulares identificados en el organismo. El uso de medios selectivos suplementados con determinados factores y la expresión artificial de genes que regulan vías de diferenciación específicas, ha permitido dirigir *in vitro* la diferenciación de las CME hacia tipos celulares especializados somáticos como células neuronales, cardíacas, etc. Recientes estudios han demostrado que la diferenciación espontánea de las CME, también puede dar origen *in vitro* a células de tipo germinal que posteriormente se desarrollan hacia células similares a gametos, como son los espermatozoides y óvulos. Lo anterior plantea la interesante idea de generar sistemas *in vitro*, que permitan dirigir la diferenciación de las CME hacia la formación *in vitro* de gametos. El desarrollo de estos sistemas tendrá un impacto directo en el entendimiento molecular de la programación genética, que interviene en los procesos de la oogénesis y espermatogénesis, así como el desarrollo de protocolos más eficientes para la clonación animal, clonación terapéutica, fertilización *in vitro* y transferencia de embriones. En relación a lo anterior, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado al estudio de genes denominados "maestros", cuya expresión además de darse en etapas muy tempranas de la determinación de la línea germinal, está en relación directa con el correcto desarrollo de las células germinales en los ovarios y testículos, características que los hace candidatos a ser utilizados para dirigir la diferenciación de las CME hacia células de linaje germinal.

Palabras clave: Diferenciación, Células Germinales, Transfección, Oogénesis.

Abstract

Embryonic stem cells (ESC) are derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts, and because of their *in vitro* and *in vivo* pluripotency they are able to generate the 200 cell types identified in the body. The use of selective media and artificial gene expression that regulate specific routes of differentiation have allowed direct *in vitro* differentiation of ESC toward specialized somatic cell types like neural cells, heart cells, etc. Recent studies have shown that spontaneous *in vitro* differentiation of ESC can also give place to a type of germ cells which later on could develop into gametes: sperm and oocytes. This raises the idea of generating an *in vitro* system, to allow the differentiation of ESC toward the formation of gamete cell. This will have a direct impact on understanding the genetics programming processes of oogenesis and spermatogenesis, that could allow the development of more efficient protocols for animal cloning, therapeutic cloning, *in vitro* fertilization and embryo transfer. In relation to this, our research group has focused on the study of genes called «masters» that are expressed on early stages of determining germ line, and have direct relation to proper development of germ cells in the ovaries and testicles. So, those are genes that could be candidates to direct differentiation of ESC toward a germ cell lineage.

Keywords: Differentiation, Germ Cell, Transfection, Oogenesis.

¹Profesor de la Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua. Periférico Francisco R. Almada, Km 1 de la carretera Chihuahua-Cuahtémoc. C.P. 31031. Chihuahua, Chihuahua. México. Teléfono (614)-434-0303

²Profesor de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Chihuahua. Ave. Colón No. 1003, Chihuahua, Chih. Tel: (614)-439-18-46, ext. 3518

³Dirección electrónica del autor de correspondencia: evegonzal@uach.mx

Introducción

Las células madre embrionarias (CME), son células que han sido aisladas *in vitro* a partir de la masa celular interna (MCI) de blastocistos de mamíferos como el ratón (Evans y Kaufman, 1981), primate (Pau et al., 2004) y humano (Amit et al., 2000). Debido a que las células de la MCI son las que contribuyen a la formación de todos los tejidos de un embrión, éstas retienen bajo condiciones muy específicas de cultivo *in vitro* su capacidad pluripotencial, esto es, pueden permanecer en un estado de indiferenciación o indeterminación celular (Wobus y Boheler, 2005). Estas células pueden ser inducidas a diferenciarse de manera espontánea cuando son cultivadas en suspensión sobre una superficie no adherente en ausencia del factor inhibidor de la leucemia, formando así agregados multicelulares de células diferenciadas denominados cuerpos embrioides, los cuales están compuestos de mezclas de células diferenciadas como neuronas, cardiocitos, miocitos, entre otras, (Blyszczuk et al., 2003; Doetschman et al., 1985; Hamazaki et al., 2001; Wernig et al. 2002).

Uno de los logros más importantes en el estudio de las CME en los últimos 10 años, ha sido la posibilidad de inducir y dirigir *in vitro* la diferenciación de las CME hacia un determinado tipo celular especializado, lo que actualmente está permitiendo en el campo de la medicina, el desarrollo de terapias de reemplazo celular así como el desarrollo de modelos experimentales *in vitro* que permiten el estudio, a nivel molecular, de los procesos que intervienen en la determinación de una célula especializada.

Diferenciación de la CME *in vitro* a tipos celulares especializados.

Distintos grupos de investigación han desarrollado algunas estrategias para inducir la diferenciación de las CME hacia un determinado tipo celular especializado. Básicamente se han utilizado dos enfoques: (i) El uso de factores, que son incorporados al medio de cultivo en el que crecen CME y que inducen o regulan determinados programas de diferenciación, como son el factor de crecimiento de neuritas y el factor de crecimiento de fibroblastos (NGF y FGF respectivamente, por sus siglas en inglés) utilizados como inductores de programas de

diferenciación a neuronas (Lovell-Badge et al., 2001; Odorico et al., 2001). Y (ii) Mediante procedimientos de biología molecular, como la incorporación de un gen al genoma de las CME, que dispara un estado de diferenciación específico. Esta estrategia solo se utiliza cuando se tiene identificado el gen que define la vía de diferenciación de interés (Park et al. 2003). Por medio de estos dos procedimientos, se ha logrado dirigir la diferenciación de las CME a varios tipos celulares especializados como células vasculares (Yamashita et al., 2000), neuronas que liberan dopamina y serotonina para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Lee et al., 2000), neuronas para la reparación de lesiones en medula espinal (Espinosa-Jeffrey et al., 2002; Wiestler et al., 2002; Tang et al., 2002), cardiocitos con actividad contráctil para el tratamiento de infarto al miocardio (Doetschman et al., 1993; Maltsev et al., 1999; Muller et al., 2002) y células de Langerhans productoras de insulina para el tratamiento de la diabetes (Lumelsky et al., 2001).

El interés que ha generado la capacidad pluripotente de las CME y su uso potencial en terapias de reemplazo celular ha dado lugar a un importante número de trabajos que constantemente reportan la generación de

células especializadas somáticas a partir de CME. Sin embargo, en el área de la Biología de la Reproducción Animal, en los últimos 4 años se ha comprobado que la diferenciación espontánea de las CME *in vitro* también puede dar origen a células primordiales germinales que dan origen a espermatozoides y óvulos, las cuales son células no somáticas que poseen la capacidad biológica de asegurar la perpetuación de la especie, resguardando, transfiriendo y diversificando el contenido genético específico de cada organismo (Clark et al., 2004; Geijsen et al., 2003; Hübner et al., 2003, Kerkis et al., 2007; Lacham y Trounson, 2006; Nayernia et al., 2006; Toyooka et al., 2003). Estos resultados plantean la posibilidad del desarrollo de sistemas que mediante el uso de factores o de la expresión artificial de genes, nos permitan inducir los mecanismos moleculares que especifican la línea germinal como la oogenénesis y espermatogénesis.

¿Cuál es el impacto y la aplicación de la generación de óvulos y espermatozoides producidos en laboratorio a partir de las CME?

Actualmente, se encuentra disponible bastante información acerca de los mecanismos genéticos y moleculares que utilizan las células para dirigir su diferenciación a un tipo celular especializado (como los neuronales, las cardíacas, entre otros). Sin embargo, se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares y celulares por los cuales las células primordiales germinales restringen su diferenciación a gametos. Por lo tanto, el desarrollo de un sistema *in vitro* que recapitule los eventos que especifican la línea germinal, permitirá el estudio de los mecanismos moleculares, la identificación de sus genes y de cómo sus productos proteicos regulan los procesos de oogenénesis y espermatogénesis en humanos

y de animales de interés económico.

En el campo de la reproducción animal, particularmente el área de mejoramiento genético de bovinos, el desarrollo de bancos de esperma no solo ha permitido la propagación de animales de alta producción de carne y leche; además, ofrece la posibilidad de asegurar de forma permanente el contenido genético de estas especies a través de la congelación de sus células germinales. Sin embargo, actualmente el aporte genético materno solo es aprovechado en el tiempo en que el animal es productivo, como es el caso del ganado vacuno de leche. En base a lo anterior, la derivación de CME a partir de embriones de animales bovinos de alto valor económico y el futuro desarrollo de protocolos de producción de óvulos bovinos más eficientes a través de la diferenciación controlada de las CME por medio de la expresión artificial de un gen inductor, podrían permitir la reproducción, propagación y aseguramiento de la calidad genética por la vía materna a través de la derivación *in vitro* de óvulos.

Por otro lado, una de las tecnologías que actualmente se están desarrollando vertiginosamente por el impacto que en un futuro tendrá en la salud humana y en la producción animal, es la tecnología de la clonación; particularmente la clonación terapéutica. Su procedimiento consiste en la introducción del núcleo celular de una célula donadora adulta al interior de un óvulo enucleado, para generar un embrión del cual pueden derivar CME genéticamente compatible al donador. Estas CME eventualmente pueden ser utilizadas para terapias de reemplazo celular sin el riesgo del rechazo. Sin embargo, aunque los resultados obtenidos en modelos de ratón son muy alentadores, su aplicación práctica

en humanos y animales de importancia económica presenta importantes limitaciones. Una de ellas es la baja eficiencia con la que se pueden obtener clones. Actualmente la tasa de éxito de embriones de ratón clonados para el estudio de protocolos de terapia celular es de aproximadamente el 8.2%. Se ha calculado que serían necesarios 100 óvulos humanos para obtener una sola línea celular de CME para un individuo. Una diferencia crucial es que 100 óvulos de ratón pueden ser obtenidos de pocas hembras superovuladas. Esta diferencia hace que en el caso de humanos y bovinos, los óvulos deben ser colectados de una gran cantidad de mujeres voluntarias o bovinos hembras superovuladas. Además de la complejidad del procedimiento clínico en sí, el costo de la obtención de óvulos humanos es de 1000 a 2000 dólares; así que para generar una sola línea de CME humana por clonación terapéutica se requiere entre 100,000 a 200,000 dólares, una cantidad de recursos financieros elevados que impiden la aplicación práctica de esta tecnología (Mombaerts, 2003). Lo anterior establece definitivamente la necesidad del desarrollo de protocolos más eficientes de clonación, ya sea con fines de producción animal o de aplicación biomédica y es en este punto en que la derivación de oocitos *in vitro* puede ser una herramienta importante en el mejoramiento de dichos procesos.

Actualmente, nuestro grupo de investigación se encuentra trabajando en los efectos que tiene la expresión artificial del gen NOBOX en las CME, particularmente en el encendido de la programación genética que regula el proceso de diferenciación y maduración de óvulos, mejor conocido como la oogénesis, como un medio para evaluar si la expresión artificial de este gen puede ser un factor de inducción para la diferenciación

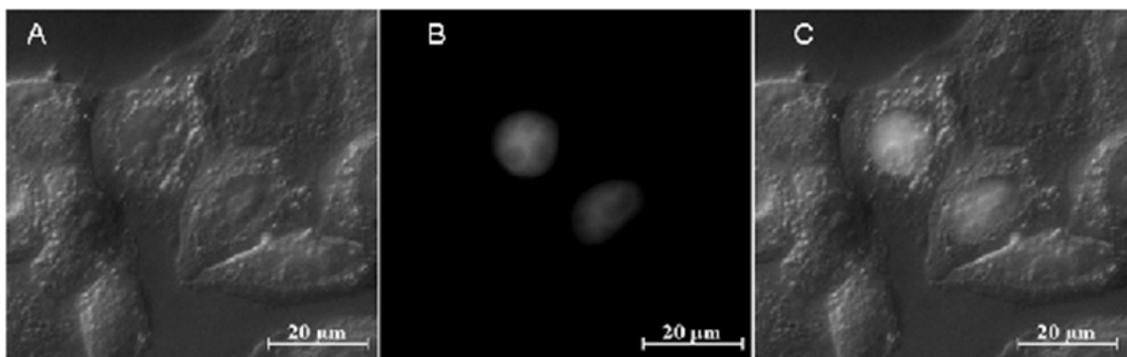
in vitro de las CME a óvulos. Algunas de las características importantes que lo han hecho ser un candidato importante, son el hecho de que codifica para una proteína nuclear homeobox que es expresada exclusivamente en el ovario embrionario. Además, el desarrollo de ratones "knockout" a los que se les ha eliminado NOBOX, revela que durante el desarrollo postnatal (15 días después del nacimiento) sus ovarios desarrollan una degeneración en la formación de folículos primarios y secundarios que culminan con una pérdida total de formación de óvulos. Interesantemente, la ausencia del gen NOBOX, a nivel molecular suprime la expresión de genes específicos involucrados en el desarrollo de la línea germinal como *Mos*, *Oct-4*, *Rfp14*, *Fgf8*, *Zar1*, *Dnm1o*, *Gdf9*, *Bmp15* y *H1oo*, así como que su expresión precede a la de algunos de los genes más importantes en la oogénesis temprana como *Oct4*, *Gdf9* y *Rfp14*. Estos resultados sugieren que la expresión de NOBOX se encuentra estrechamente relacionada con las etapas muy tempranas del desarrollo folicular y a nivel molecular regula la expresión secuencial de genes relacionados con el proceso de oogénesis, lo que sugiere que la expresión de NOBOX regula los primeros pasos de la cascada de señales moleculares que determinan la línea germinal que lo catalogan como un gen "maestro" (Rajkovic et al. 2003). Por tal motivo, es un excelente gen candidato para dirigir *in vitro* la diferenciación de las ESC hacia células germinales.

Nuestra estrategia general se ha basado en el aislamiento del gen NOBOX por la técnica de Transcripción Inversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), a partir de RNA total

de ovario embrionario de ratón y su posterior clonación en el vector pQBI25 que posee el gen reportero que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), con la finalidad de generar proteínas de fusión GFP-NOBOX. La proteína GFP fue identificada en la medusa *Aqua victoria* y tiene la característica de generar fluorescencia de manera natural *in vivo*, cuando es excitada por la luz a una longitud de onda de 474 nm, además de no alterar la

función de la proteína que se le ha fusionado, de tal manera que la ubicación de la fluorescencia nos indica de manera indirecta la localización de la proteína NOBOX. Así lo revela la fluorescencia emitida y localizada exclusivamente en el núcleo de las células HeLa, cuando la secuencia nucleotídica que codifica a la fusión GFP-NOBOX, es introducida al interior de estas células por medio de transfección, donde esta proteína de fusión

Figura 1. Expresión proteica de NOBOX-GFP en células HeLa. Células HeLa transfectadas con el plasmido pQBI25/NOBOX-GFP, fijadas con paraformaldehído al 4% y observadas en microscopio AxiosCOP plus II de fluorescencia con un aumento de 40X. A). Normasky (DIC). B). Fluorescencia, y C). Normasky-Fluorescencia



es expresada. Localización que es acorde con las funciones de factor de transcripción que tiene NOBOX dentro del núcleo celular (Figura 1).

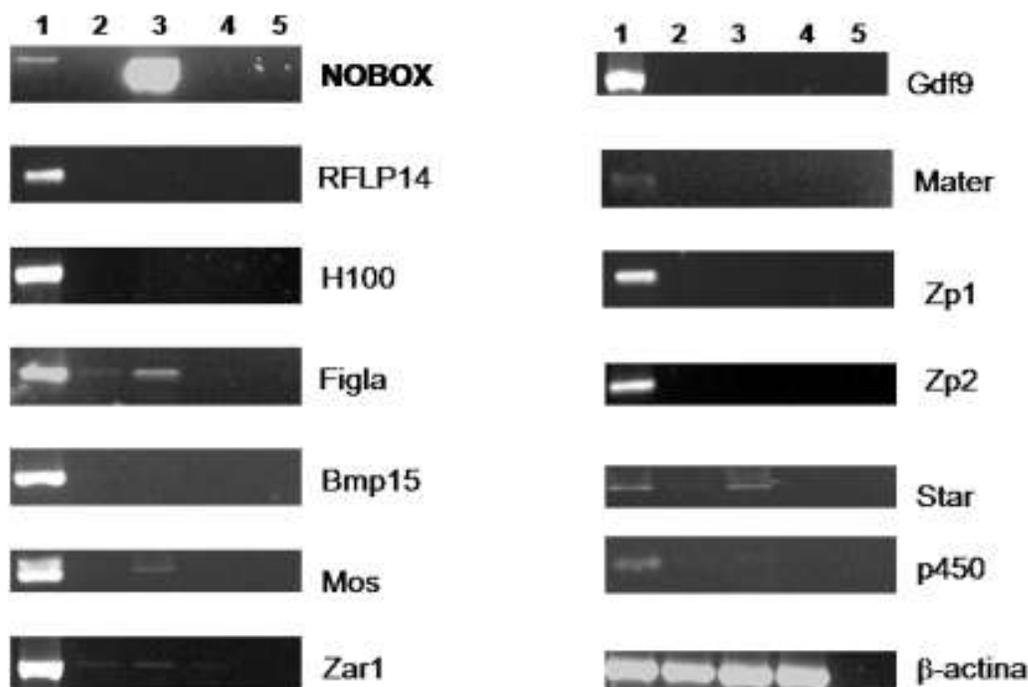
Mediante la misma técnica de transfección, hemos introducido y expresado artificialmente la fusión GFP-NOBOX en las CME de ratón, con la finalidad de evaluar si la expresión artificial de este gen tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes como: Rfp14, H100, Figla, Bmp15, Mos, Zar1, Gdf9, Vasa, Mater, Zp1, Zp2, Star y p450, que a la fecha se han documentado que intervienen en el proceso de la determinación de la línea germinal particularmente en la oogénesis (Castrillon et al., 2000; Lan et al.

2003; Senson et al., 2003; Rajkovic et al., 2004). Interesantemente, después de 46 horas postransfección, mediante RT-PCR a partir de RNA total de CME que expresan artificialmente la fusión GFP-NOBOX, obtuvimos la amplificación positiva por medio de los genes Figla, Mos y Star (Figura 2, carril 3), que de manera natural se encuentran suprimidos en las CME indiferenciadas (Figura 2, carril 2) y en las CME que solo son transfectadas con el gen GFP el cual no tiene ningún efecto funcional en estas células (Figura 2, carril 4). A la fecha, estos resultados nos demuestran la capacidad real que tiene el gen NOBOX de participar *in vitro* en la regulación del

programa genético que determina la línea germinal. Sin embargo, es importante señalar que la expresión negativa para el resto de los genes puede ser debida a que la expresión de la fusión GFP-NOBOX en las

CME es de carácter transitorio, esto quiere decir que después de un plazo de más de 72 horas, las CME inician el proceso de expulsión del ADN que codifica a la fusión GFP-NOBOX, lo que no permite evaluar a

Figura 2. Análisis de la expresión de genes que intervienen en la determinación de la línea germinal en Células Madre Embrionarias transfectadas con el gen NOBOX (46 hrs de transfección).



tiempos más prolongados sus efectos en la expresión en aquellos genes que presentaron una amplificación negativa.

Las RT-PCR se realizaron a partir de 1ug de RNA total utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de los marcadores. Carril 1: control positivo de PCR, ovario de ratón. Carril 2: CME indiferenciadas. Carril 3: CME indiferenciadas transfectadas con el gen NOBOX-GFP. Carril 4: CME indiferenciadas transfectadas con el gen GFP. Carril 5: control negativo de PCR.

Las perspectivas futuras de nuestro diseño, involucran el desarrollo de un sistema de expresión estable de la fusión GFP-NOBOX en las CME, a través del uso de sistemas de recombinación genética viral como son los sistemas lentivirales, que nos permita la inserción de nuestra secuencia de DNA que codifica la fusión GFP-NOBOX al genoma de las CME, lo que permitirá su expresión en forma permanente y así evaluar sus efectos a más largo plazo, en los genes que intervienen en la determinación de la línea germinal.

Literatura citada:

- AMIT, M., Carpenter, M.K., Inokuna, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., Thomson, J.A. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* 227:271-278
- BLYSZEZUK P., Czyz J., Kania G., Wagner M., Roll U., St Onge L., Wobus A.M. 2003. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:998-1003
- CASTRILLON, D. H., Bradley, J. Q., Wang, T. Y., Quigley, C., and Crum, Ch. P. 2000. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *PNAS* 97:9585-9590
- CLARK A.T., Bodnar M.S., Fox M., Rodriguez R.T., Abeyta M.J., Firpo M.T., Pera R.A. 2004. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum. Mol. Genet.* 13 (7):727-739
- DOETSCHMAN, T., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87: 27-45
- DOETSCHMAN T., Shull M., Kier A., Coffin J.D. 1993. Embryonic stem cell model systems for vascular morphogenesis and cardiac disorders. *Hypertension.* 22(4):618-629
- EVANS, M.J., Kaufman, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156
- ESPINOSA, Jeffrey A., Becker-Catania S.G., Zhao P.M., Cole R., Edmond J., de Vellis J. 2002. Selective specification of CNS stem cells into oligodendroglial or neuronal cell lineage: cell culture and transplant studies. *J. Neurosci. Res.* 69(6):810-825
- GEIJSEN N., Horoschak M., Kim K., Gribnau J., Eggan K., Daley G. Q. 2003. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2003
- HATTAN N., Kawaguchi H., Ando K., Kuwabara E., Fujita J., Murata M., Suematsu M., Mori H., Fukuda K. 2005. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc. Res.* 65(2):334-344
- HAMAZAKI, T., Iiboshi, Y., Oka, M., Papst, P.J., Meacham, A.M., Zon L.I., Terada, N. 2001. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* 497: 15-19
- HÜBNER K., Fuhrmann G., Christenson L.K., Kheler J., Reinbold R., De la FR., Wood J., Strauss III J.F., Boiani M., Schöler H.R. 2003. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300:1251-1256
- KERKIS A., Fonseca S., Serafin R.C., Lavagnoli T., Abdelmassih S., Abdelmassih R., Kerkis I. 2007. In vitro differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cells* 9(4):535-548
- LACHAM-KAPLAN O., Trounson A. 2006. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structure containing oocytes. *Stem cells* 24:266-273
- LAN, Z., Gu, P., Xu, X., Jackson, K. J., De Mayo, F. J., O'Malley, B. W. O., and Cooney, A. J. 2003. GDNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-19 mediates gamete regulation of female fertility. *The EMBO Journal* 22:4070-4081
- LEE S.H., Lumelsky N., Studer L., Auerbach J. M., McKay R.D. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Development* 127(6):675-679
- LEON-QUINTO T., Jones J., Skoudy A., Burcin M., Soria B. 2004. In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* 47:1442-1451
- LOVELL-BADGE, R. 2001. The future for stem cell research. *Nature* 414(6859):88-91
- Lumelsky N., Blondel O., Laeng P., Velasco I., Ravin R., McKay R. 2001. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292:1389-1394
- MALTSEV V.A., Ji G.J., Wobus A.M., Fleschmann B.K., Hescheler J. 1999. Establishment of beta-adrenergic modulation of L-type Ca²⁺ current in the early stages of cardiomyocyte development. *Circ. Res.* 84:136-145
- MOMBAETS, P. 2003. Therapeutic cloning in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 11924-11925
- MULLER M., Fleischmann B.K., Selbert S., Ji G.J., Endl E., Middeler G., Muller O.J., Schelenke P., Frese S., Wobus A.M., Hescheler J., Katus H.A., Franz W.M. 2000. Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro. *FASEB J.* 14:2540-2548
- NAYERNIA K., Nolte J., Michelmann H.W., Lee J.H., Rathack K., Drusenheimer N., Dev A., Wulf G., Ehermann I.E., Elliott D.J., Okpanyi V., Zechner U., Haaf T., Meinhardt A., Engel W. 2006. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev. Cell.* 11(1):125-132
- ODORICO J. S., Kaufman D.S., Thomson J.A. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19(3):193-204
- PARK, S., Kim, E.Y., Ghil, G.S., Joo, W. S., Wang, K. C., Kim, Y.S., Lee, Y.S., Lee, Y. J., Lim, J. 2003. Genetically modified human embryonic stem cells relieve symptomatic motor behavior in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 325:91-9
- PAU, K.Y., Wolf, D.P. 2004. Derivation and characterization of monkey embryonic stem cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 41
- RAJKOVIC, A., Pangas, S. A., Ballow, D., Suzumori, N., and Matzuk, M. M. 2004. Nobox deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte specific gene expression. *Science* 305:1157-1159
- SENBON, S., Hirao, Y., and Miyano, T. 2003. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J. Reprod. Dev.* 49:259-269
- TANG F., Shang K., Wang X., Gu J. 2002. Differentiation of embryonic stem cell to astrocytes visualized by green fluorescent protein. *Cell Mol. Neurobiol.* 22:95-101
- TOYOOKA Y., Tsunekawa N., Akasu R., Noce T. 2003. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11457-11462
- WIESTLER O.D., Barde Y.A., Brüstle O. 2002. Tau EGFP embryonic stem cells: an efficient tool for neuronal lineage selection and transplantation. *J. Neurosci. Res.* 69:918-924
- WOBUS, A.M., Boheler, K. R. 2005. Embryonic stem cells: Prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* 85:635-678
- YAMASHITA J., Itoh H., Hirashima M., Ogawa M., Nishikawa S., Yurugi T., Naito M., Nakao K., Nishikawa S. 2000. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Development* 127(6808):92-96

Este artículo es citado así:

Burrola-Barraza E., V. Moreno-Brito, I. Leal-Berumen, F. A. Rodríguez-Almeida, E. González-Rodríguez. 2008. Establecimiento de una plataforma molecular in vitro para desarrollar oocitos a partir de células madre embrionarias. *TECNOCENCIA Chihuahua* 2(1):56-62.