



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Inducción de diferenciación neuronal de células precursoras neurales de
hipocampo fetal humano con Ácido retinoico, Forskolina y Sonic
hedgehog”**

TESIS

Que presenta

BIOL. ADRIANA IRAIS ROCHA MARTÍNEZ

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de tesis:

DR. MARCO ANTONIO MERAZ RÍOS

México, DF.

Agosto, 2016

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Profesor investigador titular del departamento de Biomedicina Molecular
Cinvestav-IPN

ASESORES

Dr. Michael Schnoor

Profesor investigador titular del departamento de Biomedicina Molecular
Cinvestav-IPN

Dra. María del Carmen Vivar Estudillo

Profesor investigador titular del departamento de Fisiología, Biofísica y
Neurociencias Cinvestav-IPN

DURANTE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO SE CONTO CON EL APOYO
DE UNA BECA DE DOCTORADO OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL
DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT), PERIODO 2014-2016



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutor de tesis, el **Dr. Marco Antonio Meraz Ríos** por su apoyo, asesoría, orientación y motivación a lo largo de toda mi maestría.

A mis asesores de tesis, **Dr. Michael Schnoor y Dra. María del Carmen Vivar Estudillo**, por su valioso tiempo, observaciones y sus atinados comentarios para el proyecto.

Al **Dr. Ubaldo García Hernández** y a su auxiliar de investigación **M. en C. Rosana S. Fiorentino Pérez**, por compartir su conocimiento, asesoría y apoyo con los ensayos de electrofisiología.

Al **Dr. Héctor Romero Ramírez**, por su apoyo y asesoría en los ensayos de citometría de flujo.

A la **M. en C. Pilar Figueroa Corona** y **C. Julio Cesar Ramírez Gómez** por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

Y también quiero agradecer a la **M. en C. Laura Gómez**, **M. en C. Berenice Jiménez**, **Dra. Mónica Graciela Mendoza Rodríguez**, **Dra. María del Carmen Cardenas Aguayo** y a la **Dra. María del Carmen Silva Lucero**, por sus asesorías y apoyo en el trabajo teórico y experimental a lo largo de este proyecto.

DEDICATORIAS

A mis padres Mary y Lalo por su cariño, confianza y porque gracias a ellos he logrado todas mis metas, ya que soy el reflejo de todo su esfuerzo y dedicación.

A mis hermanas Erika, Ivonne y Edith, por su ejemplo y apoyo incondicional.

A mis suegros y cuñada Raymundo, Susana y Sandy, por considerarme parte de su familia.

A mis sobrinos Meli, Emi y David, por darle alegría a mi vida.

Y especialmente a mi compañero de vida **Roberto Alejandro Zarraga**, por su amor, cuidados, paciencia y sobre todo por siempre creer en mí.

ÍNDICE GENERAL

	PAGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	
I.1. Sistema Nervioso Central.....	1
I.2. Neurulación.....	1
I.3. Neurogénesis.....	3
I.4. Células Precursoras Neurales (CPNs).....	4
I.5. Formación del hipocampo.....	7
I.6. Factores y vías de señalización en la neurogénesis.....	7
II. ANTECEDENTES	11
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	15
V. OBJETIVOS	16
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	
VI.1. Cultivo de CPNs de hipocampo fetal humano.....	17
VI.2. Pase del cultivo de CPNs de hipocampo fetal humano.....	17
VI.3. Diferenciación de CPNs de hipocampo fetal humano.....	18
VI.4. Inmunofluorescencia.....	18
VI.5. Citometría de flujo.....	19
VI.6. Ensayo de incorporación de BrdU por inmunofluorescencia.....	20
VI.7. Extracción de proteínas celulares.....	20
VI.8. Electroforesis Transferencia e Inmunodetección (Western Blot).....	21
VI.9. Registros electrofisiológicos.....	21

VII. RESULTADOS

VII.1. Caracterización de CPNs de hipocampo fetal humano en condiciones de proliferación.....	22
VII.2. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre los cambios morfológicos de las CPNs de Hipocampo fetal humano.....	23
VII.3. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre el porcentaje de células que están en la fase de síntesis del ciclo celular.....	23
VII.4. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de células precursoras neurales, marcadores de linaje neural y marcadores de actividad neuronal.....	26
VII.5. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de maduración neuronal.....	32
VII.6. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre las características electrofisiológicas.....	32
VIII. DISCUSIÓN.....	36
IX. CONCLUSIÓN.....	44
X. PERSPECTIVAS.....	44
XI. REFERENCIAS.....	45
XII. ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1. Micrografía electrónica de luz, vista dorsal de blastodermo de pollo.....	2
Figura 2. Esquema de la polarización y migración nuclear células neuroepiteliales, de la glía radial y progenitores basales.....	3
Figura 3. Esquema neurogénesis del SNC embrionario en vertebrados.....	5
Figura 4. Las Células Precursoras Neuronales pueden diferenciarse a Neuronas, Oligodendrocitos y Astrocitos.....	6
Figura 5. Formación del hipocampo y CPNs del hipocampo.....	8
Figura 6. Vía de señalización Notch.....	9
Figura 7. Vía de señalización Sonic hedgehog.....	9
Figura 8. Vía de señalización del Ácido retinoico.....	10
Figura 9. Caracterización de CPNs de hipocampo humano HIP-009 por Inmunofluorescencia.....	12
Figura 10. Inmunofluorescencia. Células de neuroepitelio olfatorio diferenciadas a neuronas.....	13
Figura 11. Efecto del tratamiento RA1FN55Shh en la incorporación de Brdu y en la expresión de marcadores neuronales.....	13
Figura 12. Efecto en la diferenciación neuronal de Ácido retinoico (RA), BDNF (B), Forskolina (F) y Dopamina (D) en CPNs.....	14
Figura 13. Caracterización de las CPNs de hipocampo fetal humano en condiciones de proliferación.....	24
Figura 14. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre los cambios morfológicos de las CPNs de Hipocampo fetal humano.....	25

Figura 15. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre el porcentaje de células que están en la fase de síntesis del ciclo celular mediante incorporación de BrdU.....	28
Figura 16. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de células precursoras neurales.....	29
Figura 17. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de linaje neural.....	30
Figura 18. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de actividad sináptica.....	31
Figura 19. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de neuronas maduras, marcadores de células precursoras neurales y marcadores de linaje neural.....	33
Figura 20. Registros electrofisiológicos de las células precursoras neurales inducidas a diferenciación.....	34
Figura 21. Registros electrofisiológicos en configuración de fijación de corriente, de célula tratada durante 28 días, con los factores de diferenciación.....	35
Figura 22. Efecto del Glutamato en la resistencia de entrada de células precursoras neurales inducidas a diferenciación.....	35

ABREVIATURAS

4-AP	4 -Aminopiridina
AR	Ácido retinoico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	Albumina de suero bovino
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
BLBP	Proteína de unión a lípidos del cerebro
BMP	Proteína morfogénica ósea
BrdU	5-Bromo-2'-deoxiüridina
CDKs	Cinasas Dependientes de ciclinas
CPNs	Células precursoras neurales
DCX	Doblecortina
DMSO	Dimetilsulfoxido
DII1	Deltalike 1
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPSPS	Potenciales postsinápticos excitadores espontáneos
FN	Forskolina
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAD67	Ácido glutámico descarboxilasa 67
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glia
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GS	Glutamina sintetasa
GLAST	Transportador de glutamato específico de astrocitos
iPSCs	Célula troncal pluripotente inducida
IGF	Factor de crecimiento de insulina
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
IPSPs	Potenciales postsinápticos inhibidores espontáneos
LIF	Factor inhibidor de leucemia
MAP2	Proteína asociada a microtubulos 2
NBC	Neurobasal completo

Ncam	Molécula de adhesión celular neuronal
NeuN	Nucleína neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PSD-95	Proteína de densidad postsináptica
Ptch	Receptor patched
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TNC	Tenascina-C
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

RESUMEN

La neurogénesis en el hipocampo ocurre en etapas tempranas y postnatales del desarrollo, manteniéndose a lo largo de la vida adulta. Se sabe que las células de la glia radial son células troncales, a partir de las cuales se da inicio la neurogénesis en el hipocampo, ya que éstas dan lugar a progenitores intermedios que a su vez se diferencian a neuronas o células gliales. Las células de la glia radial y los progenitores intermedios, en conjunto, se denominan células precursoras neurales (CPNs), las cuales se pueden aislar y cultivar *in vitro*, resultando ser un buen modelo para el estudio de la diferenciación y maduración neuronal. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el proceso de diferenciación de las CPNs aisladas de hipocampo fetal humano, mediante el tratamiento con los factores de diferenciación Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog. Los resultados mostraron que las CPNs de hipocampo en condiciones de proliferación, expresan a las proteínas Nestina, B3 tubulina, Ki67 y PCNA. Después de 28 días de tratamiento con los factores de diferenciación las células perdieron la expresión de las proteínas Nestina, Ki67 y PCNA y expresaron a las proteínas GAD67 y Map2. Adicionalmente, las células expresaron PSD-95 un marcador de actividad neuronal y la subunidad del receptor de glutamato NMDAR2., Mediante registros electrofisiológicos, se determinó que las CPNs tratadas expresan receptores a glutamato funcionales exhiben actividad espontánea postsináptica excitadora e inhibitoria, lo que sugiere que las células son capaces de formar contactos sinápticos funcionales *in vitro*. Por lo tanto, concluimos que los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog promueven la diferenciación y maduración de las células precursoras neurales de hipocampo humano hacia neuronas funcionales *in vitro*.

ABSTRACT

Neurogenesis in the hippocampus occurs early during postnatal development and maintains itself throughout adult life. Cells of the radial glia are stem cells that start neurogenesis in the hippocampus to generate intermediate progenitors which in turn differentiate into neurons or glial cells. These radial glia and intermediate progenitors together are called neural precursor cells (NPCs) which can be isolated and cultured *in vitro* resulting in a good model for the study of neuronal maturation and differentiation. The objective of this study was to evaluate the process of differentiation of NPCs isolated from human fetal hippocampus after treatment with Retinoic Acid, Forskolin and Sonic hedgehog. We observed that hippocampal NPCs that proliferate, expressed Nestin, B 3 tubulin, Ki67 and PCNA. By contrast, after 28 days of treatment with these differentiation factors expression of Nestin, Ki67 and PCNA was lost, and instead they expressed GAD67, Map2, the marker of neuronal activity PSD-95, and glutamate receptor subunit NMDAR2. Using electrophysiological assays, we determined that the treated NPCs had functional glutamate receptors. current spontaneous synaptic excitatory and inhibitory revealed that NPCs could communicate *in vitro* leading us to conclude that retinoic acid, Forskolin and Sonic hedgehog promote the differentiation and maturation of neural precursor cells of human hippocampus *in vitro* into functional neurons.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso central (SNC) es una estructura altamente compleja encargada de recibir, procesar y responder a diversos estímulos, conformada por el encéfalo que a su vez se divide en prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo y por la médula espinal. Estas estructuras se encuentran cubiertas por un conjunto de membranas denominadas meninges, que funcionan como una barrera de protección importante para el mantenimiento de la homeostasis. El SNC se compone de diversos tipos celulares, la denominada sustancia gris que se compone de células neuronales y gliales, y la sustancia blanca que se compone de fibras nerviosas (Snell, 2009).

I.2. Neurulación

El SNC se desarrolla a partir de la formación del tubo neural, el cual deriva del ectodermo en un proceso que se divide en cuatro etapas, la primera es la formación de la placa neural (Figs. 1A y G), posteriormente ésta placa neural sufre un alargamiento rostro-caudal, estrechamiento medio-lateral y engrosamiento ápico-basal (Figs. 1B-D). La tercera etapa a su vez, implica tres eventos morfogénicos clave, la formación de los puntos de articulación, la formación de los pliegues neurales y el plegado de la placa neural (Figs. 1H-J). Finalmente la cuarta etapa comprende la fusión de los pliegues neurales, donde el ectodermo epidérmico de cada pliegue se fusionan, lo que da lugar a la piel dorsal del embrión y la fusión del ectodermo neuroepitelial, que da lugar a la pared del tubo neural (Fig. 1K), (Smith & Schoenwolf, 1997).

La pared del tubo neural se compone de una capa pseudoestratificada de células neuroepiteliales, éstas son células troncales neurales altamente polarizadas (Huttner & Brand, 1997), multipotenciales y con capacidad de auto-renovación, que se caracterizan por el movimiento de su núcleo a lo largo de la región ápico-basal, fenómeno conocido como migración intercinética nuclear (Fig. 2).

La auto-renovación de las células neuroepiteliales está dada por divisiones simétricas que generan dos células hijas iguales a la célula madre troncal (Gotz & Huttner, 2005).

Uno de los primeros marcadores descritos para las células de la glia radial, es la expresión del factor de transcripción Sox1 (Pevny et al., 1998); también se ha observado que proteínas de membrana como la prominina-1 (CD133), se expresa de forma específica en la superficie apical de las células neuroepiteliales (Weigmann et al., 1997); mientras que en la superficie basal se encuentran proteínas como las integrinas, que son receptores de superficie celular que sirven como enlace entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, modulando la adhesión y migración celular.

Se ha demostrado, que la integrina $\alpha3\beta1$ juega un papel importante en la migración neuronal y la localización en la corteza cerebral (Schmid et al., 2004).

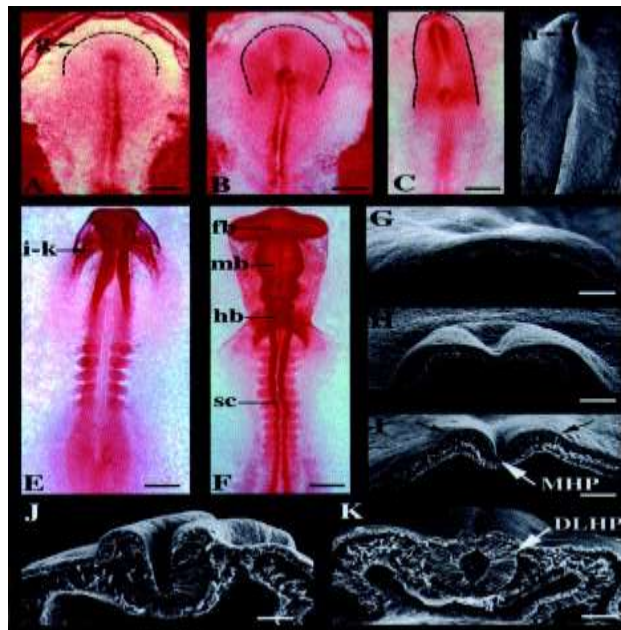


Figura 1. Micrografía electrónica de luz, vista dorsal de blastodermo de pollo. (A) Formación de la placa neural. (B) Alargamiento rostro-caudal. (C) Estrechamiento medio-lateral. (D) Pliegue neural. (E) Tubo neural Incipiente. (F) Tubo neural definitivo. (G-K) Micrografías electrónicas de barrido de secciones transversales a través de blastodermo de pollo a nivel neuroaxial, representadas por las correspondientes letras minúsculas en las vistas dorsales. (I-K) pliegues neurales y formación del tubo incipiente. Abreviaturas: fb, cerebro anterior; mb, cerebro medio; hb, cerebro posterior; sc, médula espinal. MHP, punto

de articulación media; DLHP, punto de articulación dorso-lateral. (Tomado de Smith & Schoenwolf, 1997).

I.3. Neurogénesis

Las células neuroepiteliales forman un nicho germinal altamente polarizado conocido como zona ventricular (Fig. 3), el inicio de la neurogénesis significa la salida de esta zona y la transición de células neuroepiteliales a células de la glía radial, a través de divisiones asimétricas, cambios en la polarización celular y pérdida de uniones estrechas (Singh & Solecki, 2015).

Las células de la glía radial poseen características típicas de astrocitos, como la presencia de: gránulos de glucógeno, la expresión de la proteína de filamentos intermedios acídica fibrilar glial (GFAP) (Levitt & Rakic, 1980), la presencia del transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST) (Shibata et al., 1997), glutamina sintetasa (GS) (Akimoto et al., 1993), la subunidad β de la proteína de unión a calcio (S100 β), tenascina-C (TNC), Vimentina y la expresión de la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP) (Pinto & Gotz, 2007).

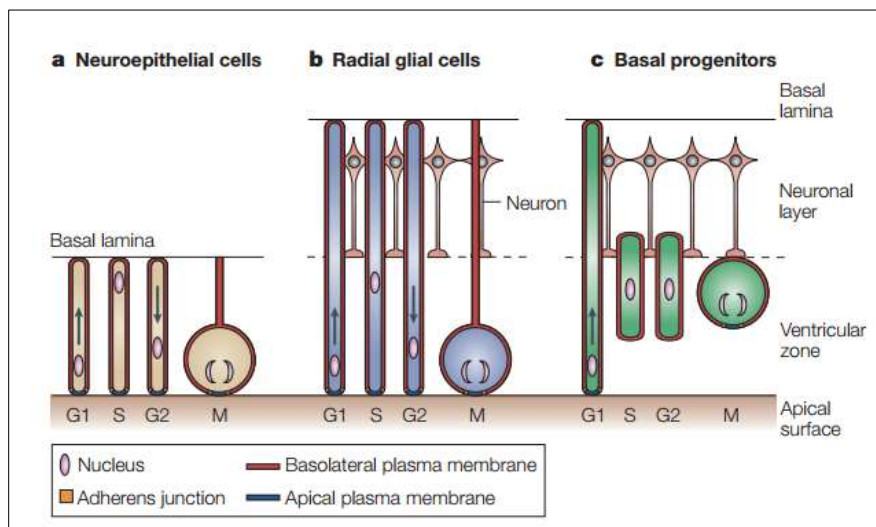


Figura 2. Esquema de la polarización y migración nuclear células neuroepiteliales, de la glia radial y progenitores basales. (a) El núcleo migra a la parte basal durante la fase G1, se localiza en la parte basal durante la fase S, regresa a la parte apical durante la fase G2, y la mitosis ocurre en la superficie apical. (b) Migración nuclear limitada en células de la

glia radial. (c) En progenitores basales, el núcleo migra desde la superficie apical al límite de la zona subventricular (línea punteada), (Tomado de Gotz & Huttner, 2005).

Las células de la glia radial, conservan características de las células neuroepiteliales como la expresión de Nestina, proteína de filamentos intermedios (Hartfuss et al., 2001), la expresión de la proteína prominina-1 (CD133) (Weigmann et al., 1997), la presencia de los antígenos RC1 y RC2, y al igual que las células neuroepiteliales, tienen migración nuclear y polaridad ápico-basal (Fig. 2).

Una de las primeras funciones descritas para las células de la glía radial, es la de apoyo y guía para la migración de las neuronas (Hatten, 1990). Ahora se sabe que las células de la glía radial funcionan como células precursoras neurales que dan lugar a neuronas y a células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) (Anthony et al., 2004).

Las células de la glía radial también generan progenitores intermedios, llamados progenitores basales, que se localizan en la zona subventricular (ZSV) y en conjunto con las células de la glía radial conforman a las células precursoras neurales (CPNs) (Fig. 3) (Noctor et al., 2004; Martinez-Cerdeno et al., 2006).

I.4. Células Precursoras Neurales (CPNs)

Las CPNs son células heterogéneas con capacidad de dar origen a tres diferentes linajes durante la embrionogénesis: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos en el SNC (Fig. 4), así como células de Schwann en el Sistema nervioso periférico (SNP).

CPNs se han aislado de embriones de mamíferos a partir de diferentes regiones del SNC como el hipocampo, la corteza, el cerebelo, la médula, y la cresta neural en el SNP. Adicionalmente, con el hallazgo de nichos neurogénicos en el adulto, se han aislado células precursoras neurales de la ZSV del ventrículo lateral y de la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo, así como de los bulbos olfatorios y del epitelio nasal (Temple, 2001).

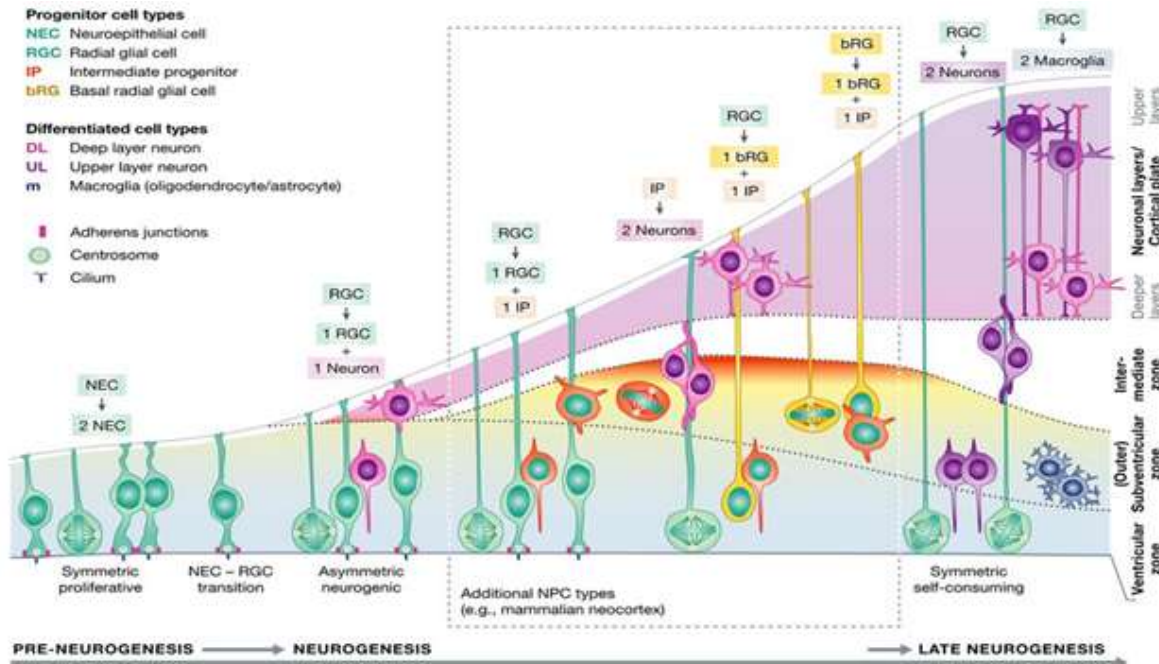


Figura 3. Esquema neurogénesis del SNC embrionario en vertebrados. (Tomado de Paridaen & Huttner, 2014).

CPNs se han aislado de embriones de mamíferos a partir de diferentes regiones del SNC como el hipocampo, la corteza, el cerebelo, la médula, y la cresta neural en el SNP. Adicionalmente, con el hallazgo de nichos neurogénicos en el adulto, se han aislado células precursoras neurales de la ZSV del ventrículo lateral y de la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo, así como de los bulbos olfatorios y del epitelio nasal (Temple, 2001).

Las CPNs se pueden identificar *in vitro* por la expresión de nestina, y porque son células mitóticamente activas. Diversos estudios *in vitro* en CPNs de humano han arrojado diversos datos importantes sobre los factores que regulan su mantenimiento en cultivo y sobre sus requerimientos celulares. Se comparó el efecto de cuatro sustratos (Poli-L-ornitina, Fibronectina, Laminina y Matrigel) en la migración y clonogenicidad de CPNs aisladas de corteza, donde se observó que la laminina mejora la migración y la capacidad clonogénica (Flanagan et al; 2006). Adicionalmente, por citometría de flujo se comprobó que las CPNs expresan en su superficie las integrinas $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 1$ y $\beta 4$, lo que indica que la laminina en conjunto

con las integrinas juegan un papel importante en la adherencia y supervivencia de los precursores neurales humanos (Flanagan et al; 2006).

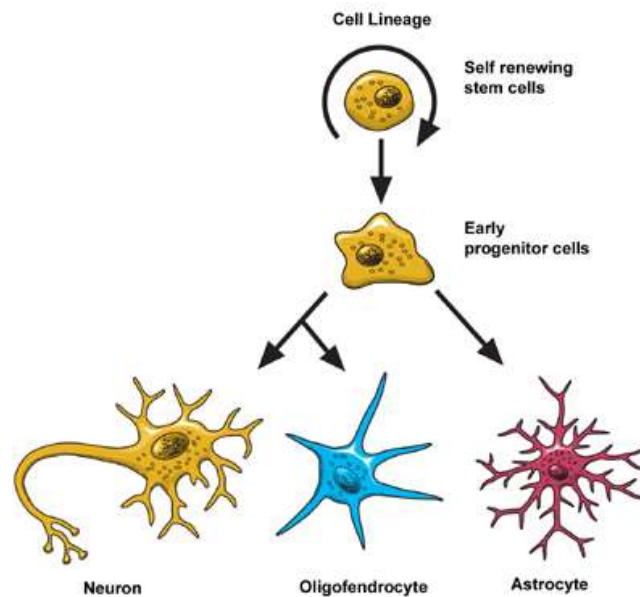


Figura 4. Las Células Precursoras Neurales pueden diferenciarse a Neuronas, Oligodendrocitos y Astrocitos. (Tomado del National Institute of Neurological Disorders and Stroke NIH, consultado el 20 de Junio del 2016 en el sitio web: http://www.ninds.nih.gov/disorders/brain_basics/ninds_neuron.htm).

Por otra parte se sabe que el factor inhibidor de leucemia (LIF) aumenta la tasa de expansión en células precursoras humanas impidiendo la senescencia y permitiendo la auto renovación a largo plazo (Wright et al., 2003), además, las células precursoras neurales humanas pueden expandirse y mantener su multipotencia por largo tiempo cuando son crecidas en medio que contiene el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento básico de Fibroblastos (bFGF) y LIF (Carpenter et al., 1999).

I.5. Formación del hipocampo

El hipocampo se desarrolla a partir del borde caudomedial del neuroepitelio telencefálico dorsal, donde se forma el primordio del hipocampo el cual es una estructura transitoria encontrada durante el desarrollo, poblada por células de Cajal-Retzius y células de la glía radial (Lee et al., 2000). Las células de la glía radial dan lugar a progenitores intermedios, que en conjunto forman a las CPNs del hipocampo, las cuales migran hacia el giro dentado para dar lugar a las neuronas granulares. La ZSG del giro dentado del hipocampo se mantiene como nicho neurogénico a lo largo de la vida adulta (Fig. 5) (Yu. et al., 2014).

El giro dentado del hipocampo, es una de las dos regiones del cerebro en donde la neurogénesis continúa a lo largo de toda la vida. Las nuevas neuronas que se integran a los circuitos existentes en el hipocampo, juegan un papel muy importante en los procesos de memoria y aprendizaje (Eriksson et al., 1998). Alteraciones en la neurogénesis del hipocampo se han asociado con déficits cognitivos en diversas neuropatologías como la depresión, bipolaridad esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer (Patricio et al., 2013; Walton et al., 2012; Hagihara et al., 2013; Faure et al., 2011).

I.6. Factores y vías de señalización en la neurogénesis.

El desarrollo del SNC está regulado por diversas vías y moléculas de señalización, como la proteína morfogénica ósea (BMP), el factor de crecimiento de insulina (IGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y vías como Notch, Wnt y Hedgehog.

Se sabe que la señalización de Notch es importante para el mantenimiento del “pool” de células troncales y CPNs. Los productos de genes proneurales como *Mash1* y *Ngn2* inducen la expresión de ligandos de Notch como Deltalike1 (Dll1), que activan la señalización de Notch en células vecinas; tras la activación, el dominio intracelular de Notch (NICD) se libera y forma un complejo con la proteína de unión al DNA RBPj, este complejo induce la expresión de los factores de transcripción Hes1 y Hes5, los cuales reprimen la expresión de genes proneurales (Fig. 6) (Kageyama et al., 2008).

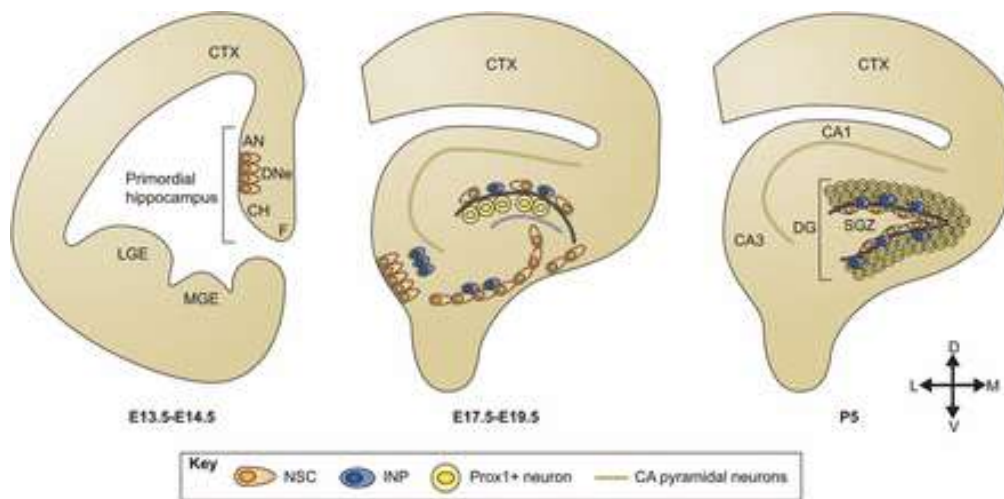


Figura 5. Formación del hipocampo y CPNs del hipocampo (Tomado de Yu. et al., 2014).

La señalización de Wnt/ β -catenina es esencial para el correcto desarrollo del hipocampo y para la especificidad celular. Ratones deficientes de Wnt3a, el cual codifica para la proteína de señalización Wnt canónica, presentan graves defectos en el tamaño y la organización del giro dentado del hipocampo (Lee et al., 2000).

Otra de las vías de señalización importante en el desarrollo del sistema nervioso y del hipocampo, es la señalización de Sonic Hedgehog (Shh), la cual juega un papel importante durante el desarrollo y en el comportamiento de células troncales y CPNs. Cuando la glicoproteína Shh se une al receptor patched (Ptch), el cual se encuentra inhibiendo a Smoothened (Smo), este se activa y desencadena a su vez, la activación del factor de transcripción *Gli*, que regula la proliferación, la migración y la diferenciación durante el desarrollo (Fig. 7) (Palma et al., 2005).

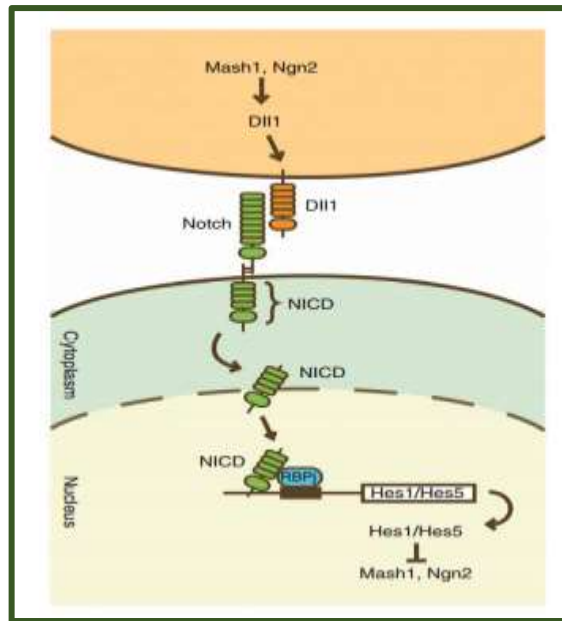


Figura 6. Vía de señalización Notch (Tomado de Kageyama et al., 2008).

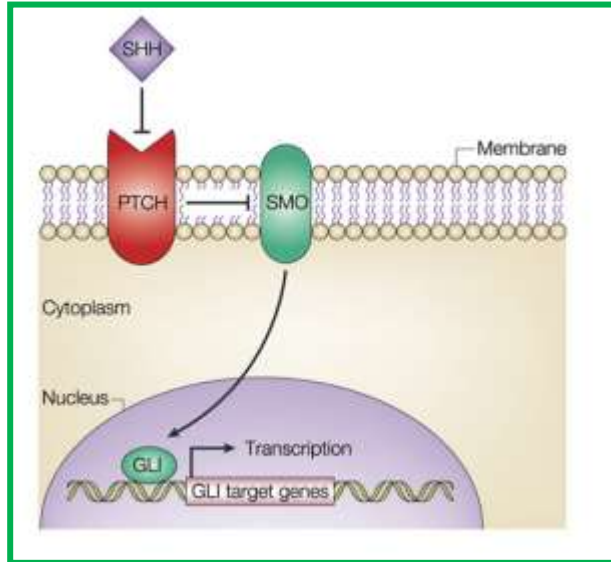


Figura 7. Vía de señalización Sonic hedgehog (Owens & Watt, 2003).

En períodos postnatales tempranos, la expresión de Shh y su receptor (Ptch1) se encuentra en la región CA3 del hipocampo, en la región hiliar del giro dentado y a lo largo de las fibras que proyectan hacia el hipocampo (Lai et al., 2003 ; Machold et

al., 2003). La ablación de Smo en ratón, reduce el número de células granulares del giro dentado (Machold et al., 2003), y la inhibición farmacológica de la señalización de Shh con ciclopamina, reduce la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo (Lai et al., 2003). Por el contrario, la estimulación de la vía de señalización de Shh produce el aumento de la proliferación celular en el giro dentado, confirmando así, su papel como mitógeno *in vivo* (Machold et al., 2003).

Por otra parte, el ácido retinoico (AR) es un regulador importante en el desarrollo y morfogénesis del sistema nervioso de los mamíferos. Se ha reportado que el AR induce el crecimiento de neuritas y diferenciación neuronal en cultivos primarios de células cerebrocorticales y neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de embriones de rata, mediante la inducción de la fosforilación del factor de transcripción CREB (Fig. 8) (Canon et al., 2004).

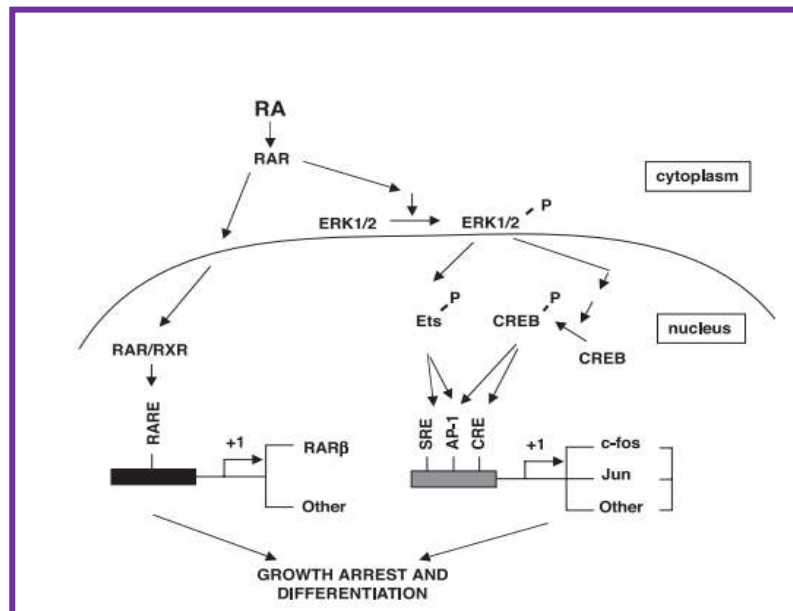


Figura 8. Vía de señalización del Ácido retinoico (Tomado de Canon et al., 2004).

Adicionalmente, se ha evaluado *in vitro* el papel del AR en el proceso de diferenciación neuronal. El AR aumenta la expresión del remodelador de la cromatina CHD5, el cual regula la transcripción de genes que programan la diferenciación neuronal (Higashi et al., 2015). Por otra parte en el desarrollo, la eliminación de CHD5, bloquea la diferenciación neuronal y aumenta el número de CPNs,

disminuyendo la expresión de genes proneurales como β 3-tubulina, NeuN, Ncam, NeuroD2 y Dcx (Egan et al., 2013).

Diferentes protocolos de diferenciación han sido desarrollados con el fin de generar neuronas funcionales, a partir de células troncales y CPNs, donde se ha observado que los factores neurotróficos juegan un papel importante en la inducción de la diferenciación.

Se ha demostrado que el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) promueve la supervivencia y diferenciación a neuronas dopaminérgicas a partir de células troncales embrionarias humanas (Buytaert-Hoefen et al., 2004).

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) promueve la diferenciación neuronal a partir de precursores neurales embrionarios de ratón (Ahmed et al., 1995). Adicionalmente, en diferentes protocolos de diferenciación neuronal *in vitro*, se utiliza Forskolina, activador de la adenilato ciclasa que aumenta los niveles de AMPc intracelular, el cual favorece el crecimiento axonal y neurítico, y modula las conexiones sinápticas (Nicol X, & Gaspar P, 2014).

II. ANTECEDENTES

II.1. Caracterización de CPNs aisladas de hipocampo humano.

En el 2014 Fukushima y cols., caracterizaron células precursoras neurales (HIP-009) derivadas de hipocampo fetal humano, en condiciones de proliferación, crecidas con el medio comercial “Neural StemCell Growth” de PhoenixSongs Biologicals (21001250). En estas condiciones, las CPNs expresaron marcadores como Nestina, PAX6, y SOX1, así como el marcador de proliferación Ki67 (Fig. 9A-D). Después de 4 semanas en el medio comercial Neural Differentiation de PhoenixSongs Biologicals (21004-250), se observaron células que expresaron marcadores neuronales como β 3-tubulina, Hu C/D, y MAP2, así como células que expresaron al marcador de astrocitos GFAP (Figs. 9E-G). Algunas de las neuronas MAP2 positivas fueron positivas a vGlut1 (marcador de neuronas Glutamatérgicas) o positivas a GABA (marcador de neuronas GABAérgicas) (Fig. 9H). El análisis de población indicó que el 49,1% de células diferenciadas fueron positivas para el marcador neuronal Hu C/D

y 66,5% fueron positivas para el marcados astrocítico GFAP (Fig. 9I), lo que demuestra que el medio comercial favorece la diferenciación astrocítica.

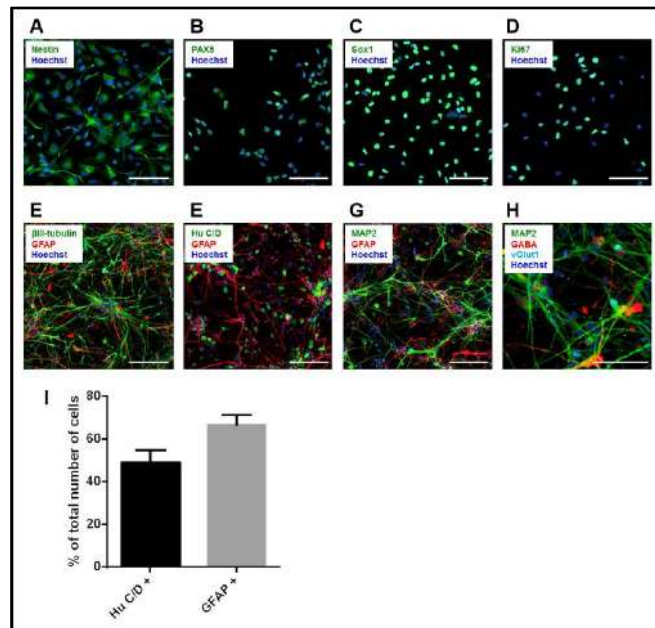


Figura 9 Caracterización de CPNs de hipocampo humano HIP-009 por Inmunofluorescencia, (Fukushima et al., 2014).

II.2. Diferenciación *in vitro* de CPNs aisladas de epitelio olfatorio.

Zhang y col., en el 2006, demostraron en progenitores aislados de neuroepitelio olfatorio de humano adulto, que el ácido retinoico (RA), la Forskolina (FN), y la molécula Shh, promueven la diferenciación neuronal y la formación de neuritas. Las células del neuroepitelio olfatorio fueron pre-tratadas durante 4 días con 1 μ M de RA, 5 μ M de FN, seguido de 3 días con 1 μ M de RA y 15nM de Shh durante siete días; Al finalizar el tratamiento, un alto porcentaje de células expresaron marcadores específicos de neuronas, el 97% \pm 4,7% de las células fueron positivas para β 3-tubulina y periferina (Fig. 10A), el 82 \pm 5,9% fueron positivas para tau (Fig. 10B), y 86 \pm 7,4% fueron α internexina (Fig. 10C). Adicionalmente, se observó que el tratamiento de las moléculas adicionales de forma individual no tenían el mismo efecto en la inducción de la diferenciación neuronal (Fig. 11).

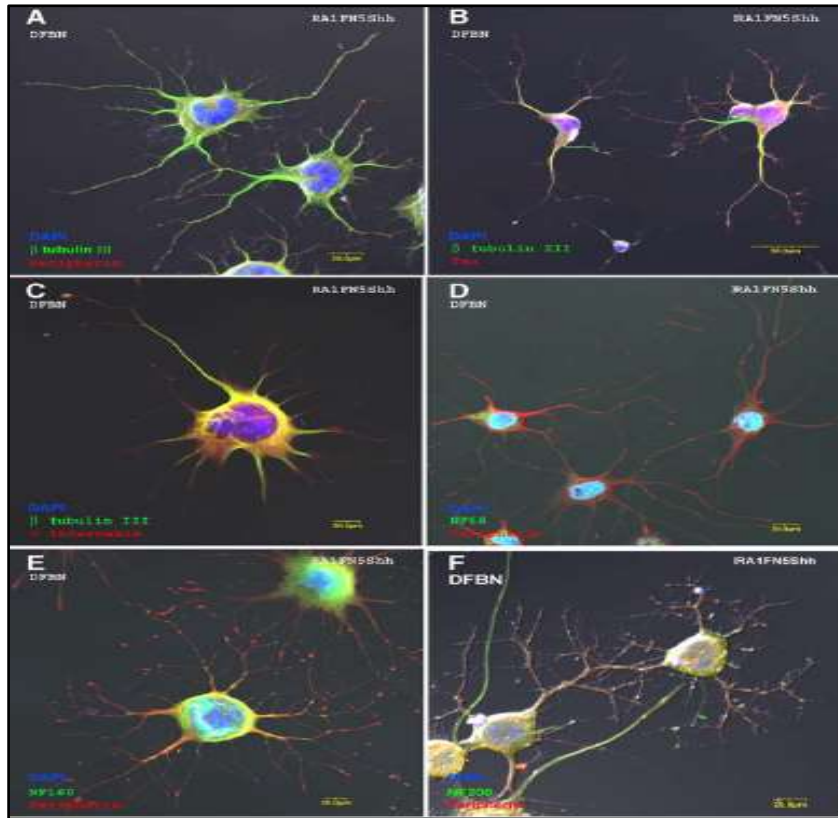


Figura 10. Inmunofluorescencia. Células de neuroepitelio olfatorio diferenciadas a neuronas (Zhang et al., 2006).

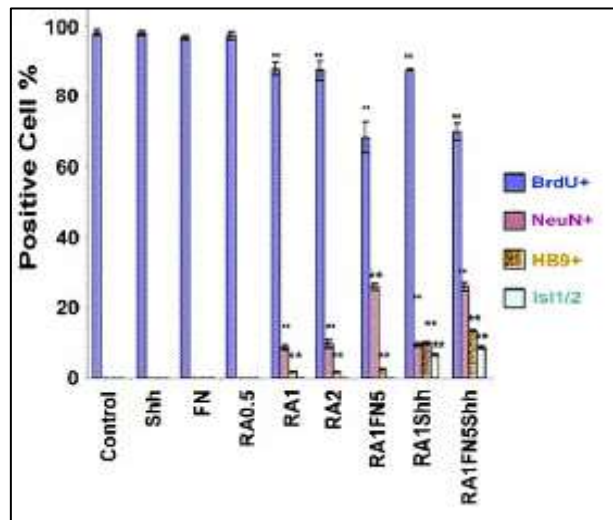


Figura 11. Efecto del tratamiento RA1FN5Shh en la incorporación de Brdu y la expresión de marcadores neuronales (Zhang et al., 2006).

II.3. Diferenciación *in vitro* de CPNs aisladas de mesencéfalo.

Riaz y col., en el 2004, demostraron que CPNs aisladas del mesencéfalo fetal humano, tratadas con 50ng/ml de BDNF (B), 10 μ M de Forskolina (F) y 10 μ M de Dopamina (D) durante 3 semanas, se diferencian hacia neuronas Dopaminérgicas (TH+). Además, la adición de 0.5 μ M de Ácido retinoico (RA) al tratamiento junto con estas moléculas aumentó el número de neuronas TH+ y reprimió la diferenciación hacia el linaje glial (Células GFAP+) (Fig. 12).

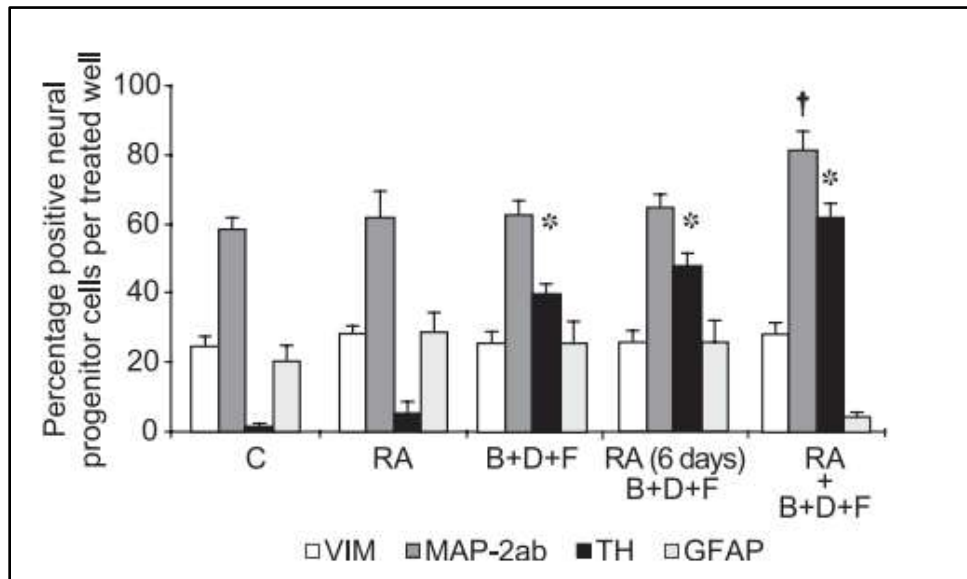


Figura 12. Efecto en la diferenciación neuronal de Ácido retinoico (RA), BDNF (B), Forskolina (F) y Dopamina (D) en CPNs. C (vehículo), RA (solo RA), B+D+F (BDNF, Forskolina y Dopamina). RA (6 días) B+D+F (Pre tratamiento con Ácido retinoico), RA+ B+D+F (Ácido retinoico, BDNF, Forskolina y Dopamina), VIM (Vimentina), (Riaz et al., 2004).

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que las células precursoras neurales aisladas de hipocampo fetal humano pueden diferenciarse hacia neuronas y astrocitos *in vitro*; Sin embargo, aún se desconoce todos los mecanismos que les permite diferenciarse y tampoco se sabe la participación que moléculas como el Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog, pudieran tener en promover la diferenciación y maduración neuronal. De igual forma, no se cuenta con una caracterización robusta que nos permita conocer el grado de plasticidad y evaluar el potencial que tienen estas células para ser usadas como modelos biológicos o de terapia celular.

El desarrollo de protocolos de diferenciación neuronal, *in vitro*, en células de hipocampo humano, nos permitirá entender y mejorar los programas de diferenciación, con el objetivo de tener células funcionales que sirvan como modelo de estudio para el mejor entendimiento de su fisiología, regulación y su comportamiento ante diversos estímulos biológicos, así como para realizar pruebas con nuevos fármacos y posteriormente, en el desarrollo de terapias celulares, como posible tratamiento para diversas enfermedades neurodegenerativas.

IV. HIPÓTESIS

Los factores: Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog promueven la diferenciación neuronal en las células precursoras neurales de hipocampo y participan en los procesos de maduración y la funcionalidad de las neuronas diferenciadas.

V. OBJETIVOS

A) GENERAL

Evaluar la participación del Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog en los procesos de diferenciación, maduración y funcionalidad de las células precursoras neurales de hipocampo fetal humano.

B) PARTICULARES

- Caracterizar a las células precursoras neurales de hipocampo fetal humano en condiciones de proliferación, a través de la expresión de marcadores moleculares específicos.
- Evaluación y cuantificación de los cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con los factores, Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog.
- Determinar el número de células que se encuentran en la fase de síntesis del ciclo celular bajo el tratamiento con los factores, Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog.
- Evaluación de la proliferación celular activa, a través de la cuantificación del porcentaje de células que se encuentran en la fase de síntesis del ciclo celular bajo el tratamiento con los factores, Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog.
- Evaluación de la diferenciación neuronal, a través de la expresión de marcadores específicos, en las células precursoras neurales de hipocampo fetal humano cuando son tratadas con los factores, Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog.
- Evaluación del estado de maduración y funcionalidad de las células precursoras de hipocampo fetal humano después del tratamiento con los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1. Cultivo de células precursoras neurales de hipocampo fetal humano.

El cultivo primario de las CPNs de hipocampo fetal humano de 19 semanas de gestación, se adquirió a través de la compañía “PhoenixSongs Biologicals” Branford EE.UU. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37°C, a concentración de CO₂ al 6% y una humedad relativa de 95%.

Las botellas donde se sembraron las CPNs fueron tratadas previamente con laminina (10 ug/ml, Sigma L-2020) durante 2 horas a 37°C, posteriormente se retiró el exceso de laminina de la botella y las células se sembraron directamente en la superficie.

Las condiciones de crecimiento en el medio de proliferación fueron las siguientes: Aproximadamente 3 millones de células fueron crecidas en una botella T-25 durante 72 hrs en Neurobasal Completo (NBC) como medio de cultivo, el cual contiene: Neurobasal (Invitrogen/Gibco 21103-049), 2% de B-27 (Invitrogen/Gibco 17504044), 0.25% de Glutamax (Gibco 35050-061), 10% de penicilina-estreptomina (Cellgro 30-004-CI) y 0.02% de glucosa, suplementado con el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, 20ng/ml), factor de crecimiento epidérmico (EGF, 20ng/ml) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF, 1ug/ml). Las células se mantuvieron en este medio con cambios cada tercer día hasta obtener la confluencia requerida para cada experimento.

VI.2. Pase del cultivo de CPNs de hipocampo fetal humano.

Para la expansión de las CPNs, el medio de cultivo fue retirado al alcanzar una confluencia del 80% y se realizó un lavado con NBC a 37°C. Posteriormente, las células fueron despegadas de la superficie de la botella con Tripsina-EDTA al 0.05% (PhoenixSongs 41004-100) incubada durante 3 min a 37°C. Se adicionó un inhibidor de tripsina 0.25% (PhoenixSongs 41005-100) y se centrifugó 5 minutos a 1000 rpm. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1ml de medio Neurobasal Completo. Las células fueron sembradas en una placa nueva previamente tratada con laminina como se explicó anteriormente.

VI.3. Diferenciación de CPNs de hipocampo fetal humano.

Para la inducción de la diferenciación se estableció un protocolo modificado de acuerdo a lo publicado por Zhang y col., (2006) y Fukushima y col., (2014).

Aproximadamente 3 millones de células fueron crecidas en una botella T-25 durante 72 hrs en el medio de proliferación (Neurobasal Completo, suplementado con el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, 20ng/ml), factor de crecimiento epidermal (EGF, 20ng/ml) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF, 1ug/ml))., Después de las 72 hrs en el medio de proliferación, las células fueron sembradas en una nueva botella T-25 previamente tratada con laminina y en medio de cultivo de transición, el cual contiene: Medio Neurobasal Completo suplementado con el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, 5ng/ml) y el factor de crecimiento epidermal (EGF, 5ng/ml) durante 72 hrs., Al finalizar este periodo, las células fueron sembradas en una nueva botella T-25 tratada previamente con Poli-D-lisina (50 ug/ml Sigma P6407) en medio de diferenciación el cual contiene: Neurobasal Completo, suplementado con Ácido retinoico (1 μ M Sigma R2625) y Forskolina FN (5 μ M TOCRIS 1099) durante 4 días, y a partir del 5° día y hasta completar 24 días, Ácido retinoico y Sonic hedgehog (15 nM Peprtech 100-45) fue adicionado al medio de cultivo. Los cambios de medio y factores se llevaron a cabo cada tercer día.

VI.4. Inmunofluorescencia.

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente; Terminado el tiempo de fijación, se realizaron dos lavados con PBS 1X. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con PBS1X-Triton X-100 al 0.2% durante 30 minutos. Para el bloque de los sitios inespecíficos de interacción con el anticuerpo primario, las células fueron incubadas con buffer de bloqueo (1% de BSA en PBS1X-Tritón X-100 al 0.2%) durante una hora. Al término se adicionaron los anticuerpos primarios con su dilución correspondiente (ver anexo I) en buffer de bloqueo y se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS1X, finalizado el ultimo lavado se adicionaron los anticuerpos secundarios marcados con Alexa fluor 488 (Invitrogen) y Alexa fluor 594 (Thermo) a una dilución de (1:500) en PBS1X-Tritón X-100 al 0.2% y se incubo

durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz, posterior a la incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS1X, seguidos de la tinción con DAPI (10ug/ml) en agua destilada durante 15 minutos, finalmente las células se lavaron dos veces con agua destilada y se montaron en portaobjetos con 5ug de fluorogel (Electron Microscopy Sciences 17985-10). La captura de imágenes de las preparaciones se realizó en un microscopio confocal (Leica TCS SP8) con el objetivo de 40X.

VI.5. Citometría de flujo

Para los ensayos de citometría, se utilizaron de 200 mil a 300 mil células por tubo, Para retirar el medio, los tubos se centrifugaron por 5 min a 1500 rpm, después de decantar el medio, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para las tinciones citoplasmáticas las células fueron permeabilizadas durante 15 minutos con PBS-Tween-20 al 0.7%; Para la tinción nuclear, las células fueron permeabilizadas durante 15 minutos, con PBS-Tritón al 0.2%, BSA al 1% y suero de chivo al 10%, se adicionaron los anticuerpos primarios, con su respectiva dilución (ver anexo I), en 100 µl de buffer de bloque, y se incubaron 1 hora en agitación y oscuridad; al término de la hora de incubación, se adicionaron los anticuerpos secundarios, marcados con Alexa fluor 488 y Alexa fluor 594, en una dilución 1:500 en 100 µl de buffer de bloqueo, y se incubaron 30 min en agitación y oscuridad. Finalmente se colocó una solución de PBA (2% de SFB y 0.1% de azida de sodio en PBS), y las muestras se guardaron a 4°C protegidas de la luz hasta su lectura. Los datos se capturaron en un citómetro de flujo Fortessa (BD) y se analizaron en el programa Flowjo version 7.6.

VI.6. Ensayo de incorporación de BrdU por inmunofluorescencia.

Para este ensayo se utilizó el Kit BrdU (Roche 11296736001). Las CPNs fueron inducidas a diferenciación mediante el protocolo ya antes mencionado; Al término de cada condición: proliferación, transición y diferenciación, se adicionó BrdU a una dilución 1:500 en medio Neurobasal Completo y se incubó durante una hora a 37°C. Terminado el tiempo de incubación, se retiró el medio y se realizaron tres lavados con PBS 1X., Posteriormente, las células fueron fijadas con etanol acidificado

durante 20 min a -20°C ; al término, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se adicionó la solución que contiene el anticuerpo anti-BrdU (1:20), incubada durante 1 hora a 37°C . Después se realizaron tres lavados con PBS 1X y se adicionó el anticuerpo anti-ratón Ig-fluoresceinado (1:20), se incubó 1 hora a 37°C protegiéndose de la luz; Se realizaron tres lavados con PBS 1X y se adicionó DAPI (10ug/ml) durante 3 minutos. Finalmente, las células se lavaron dos veces con agua destilada y se montaron en portaobjetos con 5 ul de fluorogel (Electron Microscopy Sciences 17985-10). La captura de imágenes de las preparaciones se realizó en un microscopio de epifluorescencia Leica con el objetivo 40X.

VI.7. Extracción de proteínas celulares.

Se realizó la extracción proteica de las células crecidas en el medio de proliferación, transición y diferenciación. Al término de cada condición se realizó un lavado con buffer de glucosa salino (GBS 1X). Posteriormente, se adicionó buffer RIPA 1X (ver anexo II) y se incubó 5 minutos en hielo. Al término de la incubación y con ayuda de un "cell scraper" (TPP 99002) se raspó hasta despegar la monocapa y se recuperó el buffer RIPA con la proteína. Las muestras fue guardada a -20°C toda la noche, al día siguiente la muestras fueron resuspendidas y centrifugadas durante 10 minutos a 14,000 rpm a una temperatura de 4°C . El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se determinó la concentración proteica mediante el método de BCA (Pierce BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific 23225), a las muestras se les adicionó buffer de carga (LB4X) y se pusieron en baño a 85°C durante 5 minutos. Al finalizar las muestras fueron guardadas a -20°C , hasta su uso.

VI.8. Electroforesis Transferencia e Inmunodetección (Western Blot).

De cada extracto, se cargaron 10ug de proteína por pozo; Las proteínas fueron separas en geles de poliacrilamida al 15%, 10% y 8%, en condiciones desnaturalizantes durante 120 minutos, a voltaje constante (100 Volts). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, en condiciones de corriente constante (500 mA), en un rango de 1 hora hasta 3 horas; Al término de la transferencia, las

membranas se tiñeron durante 1 minuto con Rojo de Ponceau (Sigma P7170-1L). Las membranas se lavaron con TBS-Tween-20 al 0.05% y se bloquearon con leche libre de grasas al 5% (BioRad 170-6404), en TBS-Tween-20 al 0.05%, durante una hora y media, en agitación. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (ver anexo I), en una dilución 1:500, en leche libre de grasas al 5% (BioRad 170-6404), en TBS-Tween-20 al 0.05%, durante toda la noche, en agitación, a 4°C; Al día siguiente se recuperó el anticuerpo y las membranas se lavaron 3 veces, durante 10 minutos, con TBS-Tween-20 al 0.05%; Al finalizar, se incubaron 1 hora con sus respectivos anticuerpos secundarios, conjugados con HRP (1:5000). Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos, y finalmente las proteínas inmunoreactivas, se visualizaron usando el sistema ECL (Enhanced Chemiluminescence Detection System, Immobilon), y en el fotodocumentador ChemiDoc XRS de BioRad.

VI.9. Registros electrofisiológicos.

Las CPNs de hipocampo fetal humano fueron inducidas a diferenciación mediante el protocolo antes mencionado. Se realizaron registros electrofisiológicos de “patch-clamp” en configuración de célula completa, en la modalidad de fijación de voltaje en células con 7 y 28 días del tratamiento de diferenciación. Utilizando un amplificador Axopatch-200, las corrientes iónicas se digitalizaron en un convertidor analógico-digital DigiData 1200, y las señales se almacenaron en el disco duro de una computadora. Para la construcción de las micropipetas de registro se utilizaron capilares de borosilicato con O.D. 1.5 mm e I.D. 0.86 mm (Sutter Instruments) que fueron estirados en un estirador vertical (David Kopf modelo 730). Las micropipetas utilizadas tenían una resistencia de entre 6 y 8 M Ω cuando se llenaron con solución intracelular que contenía (en mM): 130 KCl, 1 MgCl₂, 1 EGTA, 5 HEPES, 2 ATP-Na, ajustada a pH 7.4. La solución extracelular utilizada contenía (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES y 24 D-glucosa, ajustada a pH 7.4.

Los registros de las corrientes iónicas se obtuvieron a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV y a partir de ese potencial, se aplicaron pulsos

despolarizantes de 10 mV hasta 50 mV. Para el registro de potenciales postsinápticos espontáneos, las células fueron registradas en la modalidad de fijación de corriente utilizando el software de adquisición Axotape (Axon Instruments) y analizados con el programa Clampfit (Axon Instruments).

VII. RESULTADOS

VII.1. Caracterización de CPNs de hipocampo fetal humano en condiciones de proliferación.

Se caracterizaron las CPNs de hipocampo fetal humano, en condiciones de proliferación, de acuerdo a la expresión de marcadores de células precursoras neurales. Para lo cual, las células se crecieron durante 72 horas en medio de proliferación. Se evaluó la expresión de marcadores mediante inmunofluorescencia y se determinó el porcentaje de células positivas a los marcadores mediante citometría de flujo.

La caracterización de las CPNs de hipocampo fetal humano, mostró que el 93.7% de las células expresan a la proteína Nestina, marcador de células precursoras, mientras que el 40% de las células expresan Ki67, un marcador de proliferación (Fig. 13). Adicionalmente, se observó que un 96.5% de las células fueron positivas para B3 Tubulina, un marcador del compromiso neuronal temprano, y el 16% de las células fueron positivas para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), marcador de astrocitos.

VII.2. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre los cambios morfológicos de las CPNs de Hipocampo fetal humano.

Para determinar el efecto del tratamiento de diferenciación con los factores, Ácido retinoico (AR), Forskolina (FN) y Sonic hedgehog (Shh), sobre los cambios morfológicos de las CPNs, las células se sometieron a un proceso de diferenciación el cual consistió en mantenerlas en cultivo durante 72 hrs en medio de proliferación: Neurobasal Completo, suplementado con 20ng/ml del factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), 20ng/ml del factor de crecimiento epidermal (EGF) y 1ug/ml

del factor inhibidor de la leucemia (LIF), seguido de 72 hrs en medio de transición: Neurobasal Completo suplementado con 5ng/ml bFGF y 5ng/ml de EGF., Al finalizar este periodo las células fueron crecidas en medio de diferenciación: Neurobasal Completo, suplementado con 1 μ M de AR y 5 μ M de FN durante 4 días, y 24 días con 1 μ M de AR y 15 nM de Shh (Figs. 14A y 14B).

Al finalizar el protocolo de diferenciación, las células fueron cuantificadas y clasificadas de acuerdo a su morfología en dos tipos: células ramificadas, las cuales fueron consideradas como células diferenciadas y células bipolares, consideradas como células precursoras (Fig. 14C). La cuantificación mostró que los factores inducen un 85% de células ramificadas y 14% de células bipolares, mientras que el control, mostró un 20% de células ramificadas y un 80% de células bipolares.

VII.3. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre el porcentaje de células que están en la fase de síntesis del ciclo celular.

Con la finalidad de determinar si el tratamiento de diferenciación favorecía la salida del ciclo celular, se cuantificó el número de células que incorporan BrdU. Las CPNs fueron inducidas a diferenciación mediante el protocolo ya antes mencionado. Al término de cada condición de crecimiento: proliferación, transición y diferenciación se aplicó un pulso de BrdU durante 1 hora, para marcar las células que en ese momento estuvieran en la fase de síntesis del ciclo celular.

Mediante la técnica de inmunofluorescencia para BrdU, se realizó el conteo de células que incorporaron este análogo de la timidina y se analizaron con respecto al número total de células positivas a DAPI (Fig.15).

En la condición de proliferación el 20% de las células incorporaron BrdU y no se encontraron diferencias significativas con respecto a la condición de transición en donde el 17% de las células fueron positivas para BrdU; sin embargo, en la condición de diferenciación, se observó una disminución significativa del porcentaje de células que incorporan BrdU, ya que solo el 2% de las células fueron BrdU+.

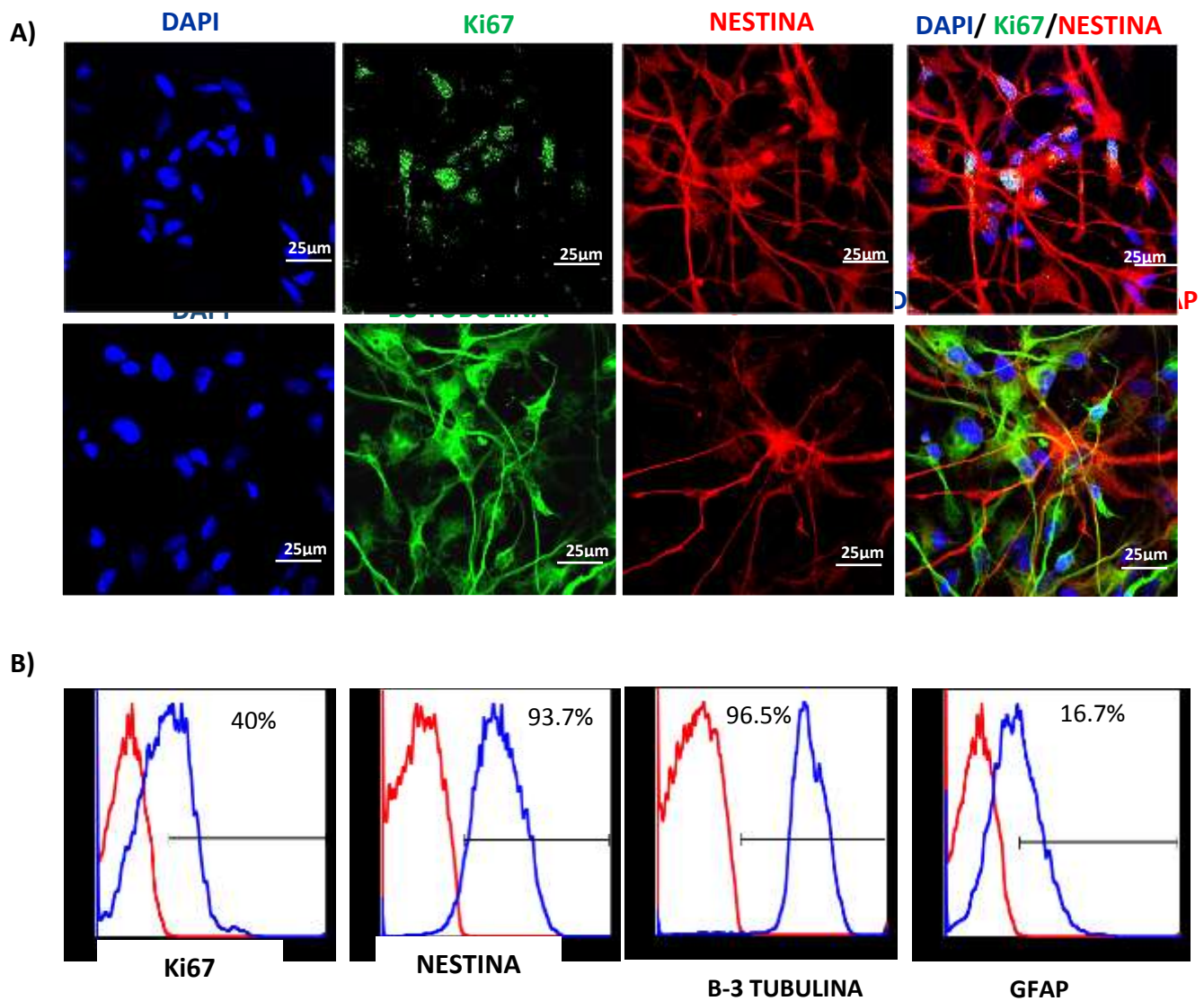
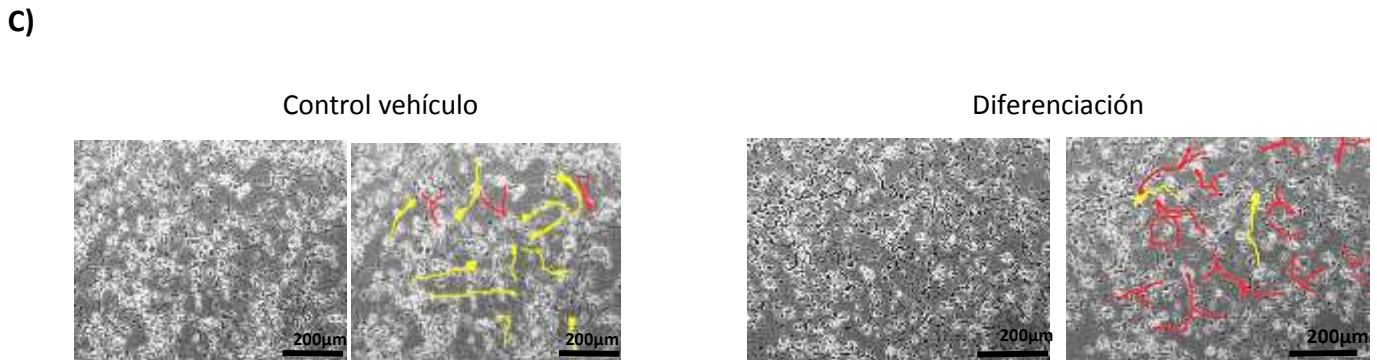
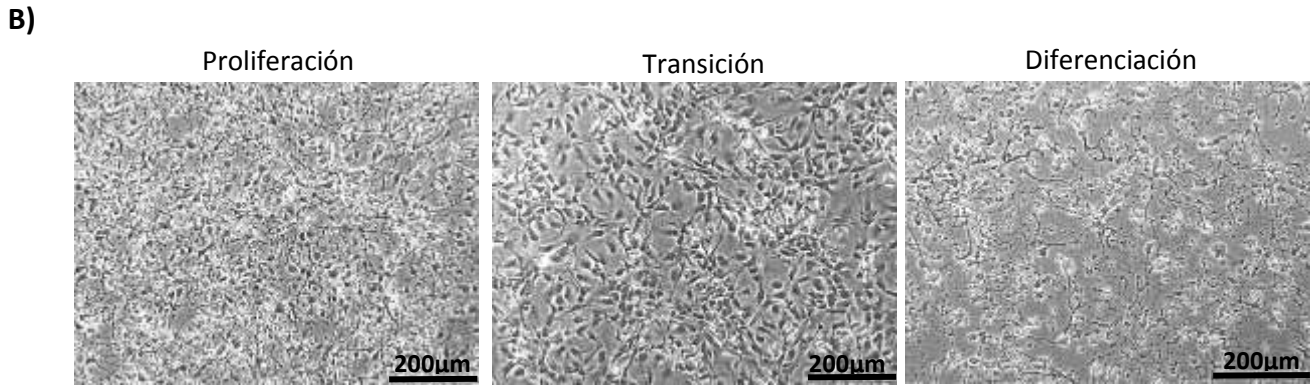
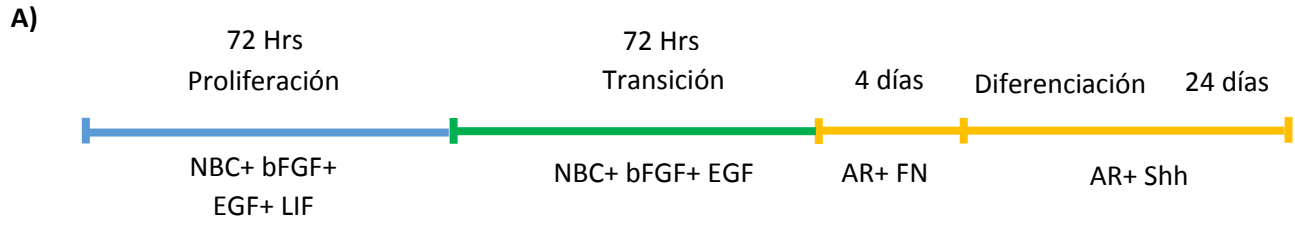


Figura 13. Caracterización de las CPNs de hipocampo fetal humano en condiciones de proliferación. A) Imágenes representativas de tinciones de inmunofluorescencias con los marcadores Ki67 y β 3-tubulina (verde), Nestina y GFAP (rojo) y núcleos teñidos con DAPI (azul). B) Histogramas representativos de tinciones de citometría de flujo donde se muestran los porcentajes promedio ($n = 3$) de células positivas para los marcadores Ki67, Nestina, β 3-tubulina y GFAP.



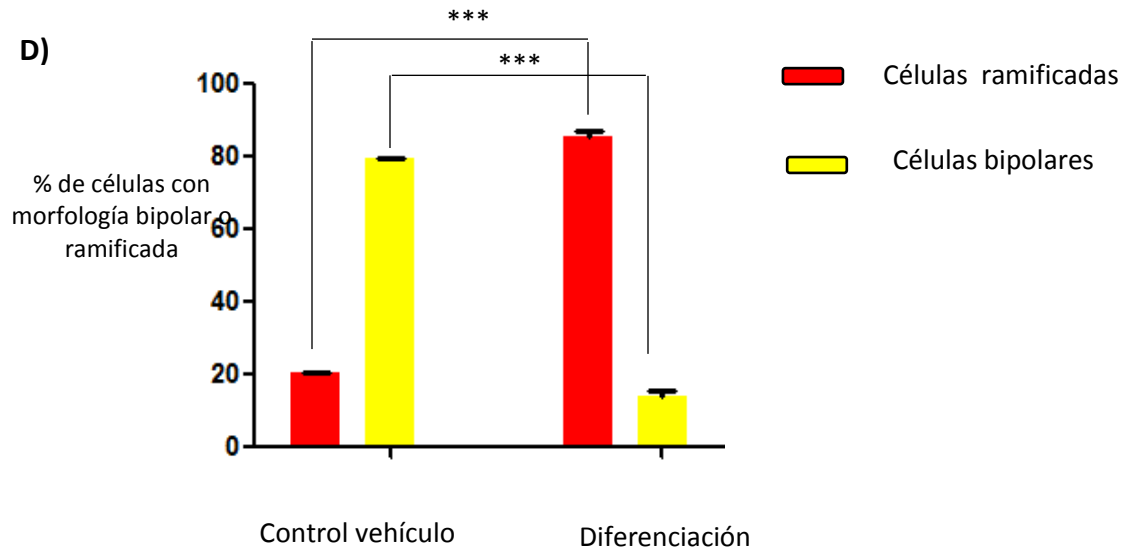


Figura 14. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre los cambios morfológicos de las CPNs de Hipocampo fetal humano. A) Diseño experimental, en donde se indican los factores y tiempos de los tratamientos en cada condición: proliferación, transición y diferenciación: AR, Ácido retinoico; FN, Forskolina; Shh, Sonic Hedgehog. B) Imágenes de contraste de fases de CPNs en las diferentes fases del proceso de diferenciación. C) Imágenes de contraste de fases de CPNs a los 28 días del tratamiento de diferenciación, en rojo se marcan a las células ramificadas y en amarillo a las células bipolares. D) Porcentaje de CPNs de acuerdo a su morfología bipolar o ramificada a los 28 días del tratamiento de diferenciación (n = 3), los resultados se analizaron con ANOVA de dos vías, ($P < 0.05$), *** $p < 0.001$.

VII.4. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de células precursoras neurales, marcadores de linaje neural y marcadores de actividad neuronal.

Se determinó el efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de células precursoras como Nestina, PCNA y β -3 tubulina a los 7 y 28 días de tratamiento, así como la expresión de éstas proteínas en la condición de proliferación, transición, y al inducir la diferenciación de CPNs utilizando el medio

comercial reportado por Fukushima y col., (2014), mediante la técnica de Western Blot (Fig. 16). Se observó que las proteínas Nestina, marcador de células precursoras, y PCNA, marcador de células en proliferación, se expresan en la condición de proliferación y transición, disminuyendo significativamente a los 7 días en la condición de diferenciación, no así, en el control el cual se trató solo con vehículo. Cuando se evaluó la expresión de estos marcadores a los 28 días, se observó una disminución de la expresión de ambos marcadores tanto en las células sometidas a diferenciación como en el control, así como en las células que se sometieron a diferenciación con el protocolo publicado por Fukushima y cols., (2004).

Adicionalmente, se evaluó la expresión de β -3 tubulina, el cual es un marcador del linaje neural. Los resultados mostraron que no hay diferencia significativa en la expresión de β -3 tubulina, tanto en células cultivadas en el medio de proliferación como en el medio de transición; sin embargo, si se observó un aumento significativo de la expresión de β -3 tubulina, en células con el tratamiento de diferenciación a los 7 y 28 días, al igual que en las células inducidas a diferenciación con el protocolo comercial.

Para determinar el linaje al que se habían diferenciado las CPNs se evaluó la expresión de GAD67, el cual es un marcador de células GABAérgicas, y GFAP, marcador de astrocitos, mediante la técnica de Western Blot (Fig. 17). Se observó que GAD67 se expresó a partir del día 7 de diferenciación, tanto en las células tratadas como en las células control. La expresión de GAD67 a pesar de ser mayor en el control a los 7 días, se enriquece en células tratadas con los factores de diferenciación a los 28 días. La expresión de GFAP fue significativamente incrementada en células con el medio de cultivo control y con el medio comercial.

Se evaluó la expresión de marcadores de actividad sináptica como NMDAR, el cual es una subunidad del receptor a glutamato, y PSD-95, una proteína que se expresa en las neuronas postsinápticas, mediante la técnica de Western Blot (Fig.18). Se observó que las células inducidas a diferenciación a los 28 días, expresan la subunidad del receptor a glutamato NMDAR y la proteína PSD-95, al igual que las células tratadas con el protocolo de diferenciación publicado por Fukushima y col.,

(2014), no así, las células crecidas en la condición de proliferación, y transición ni a los 7 días del tratamiento.

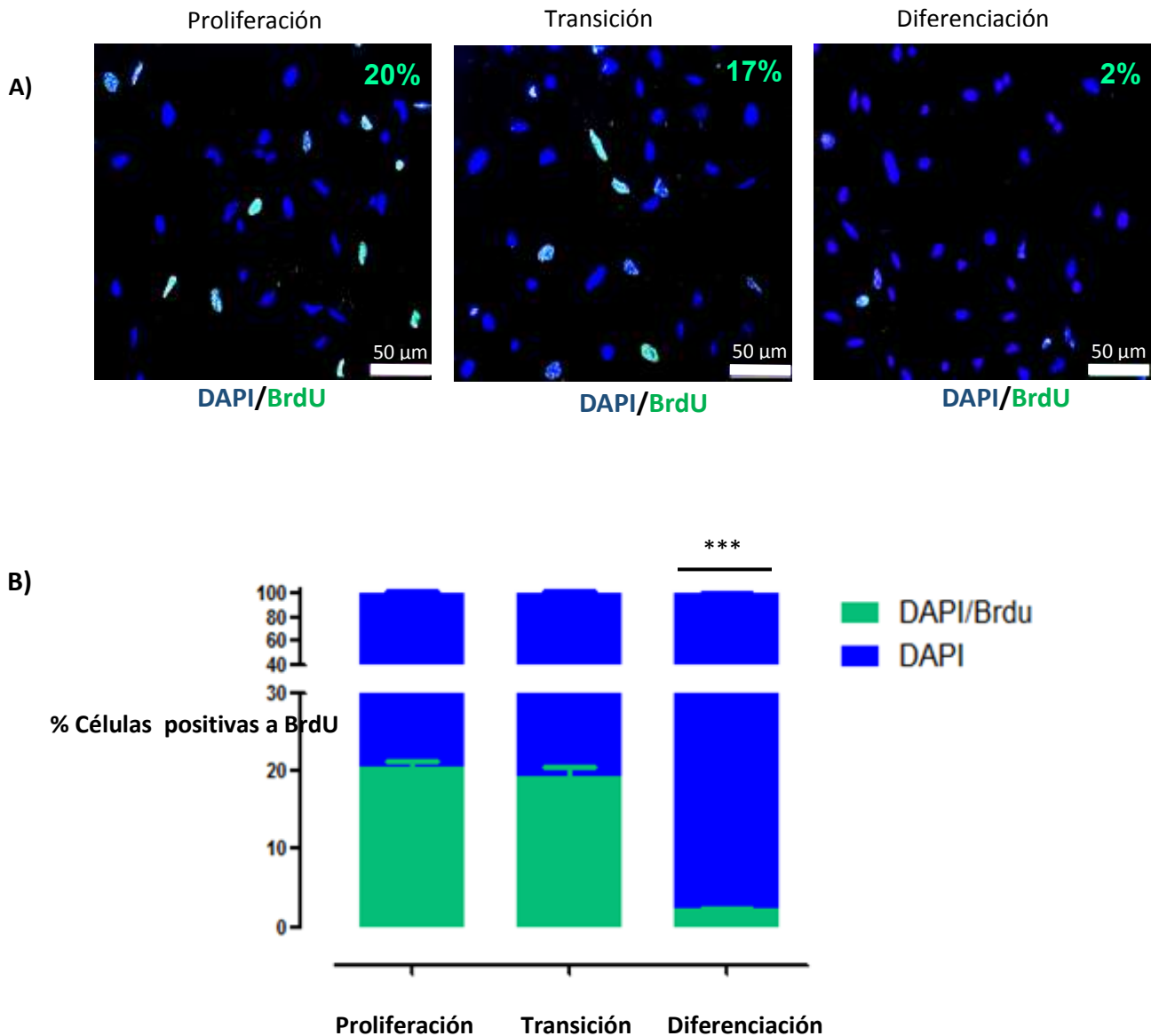


Figura 15. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre el porcentaje de células en fase de síntesis del ciclo celular mediante incorporación de BrdU. A) Micrografías representativas de inmunofluorescencias para BrdU (verde) y DAPI (Azul), en cada imagen se muestra el porcentaje de las células positivas a BrdU con respecto al número total de núcleos en DAPI. B) Gráfica que muestra la cuantificación del número de CPNs BrdU+ con respecto al número total de CPNs DAPI+ (n = 3), los resultados se analizaron con ANOVA de dos vías, ($P < 0.05$), $***p < 0.001$.

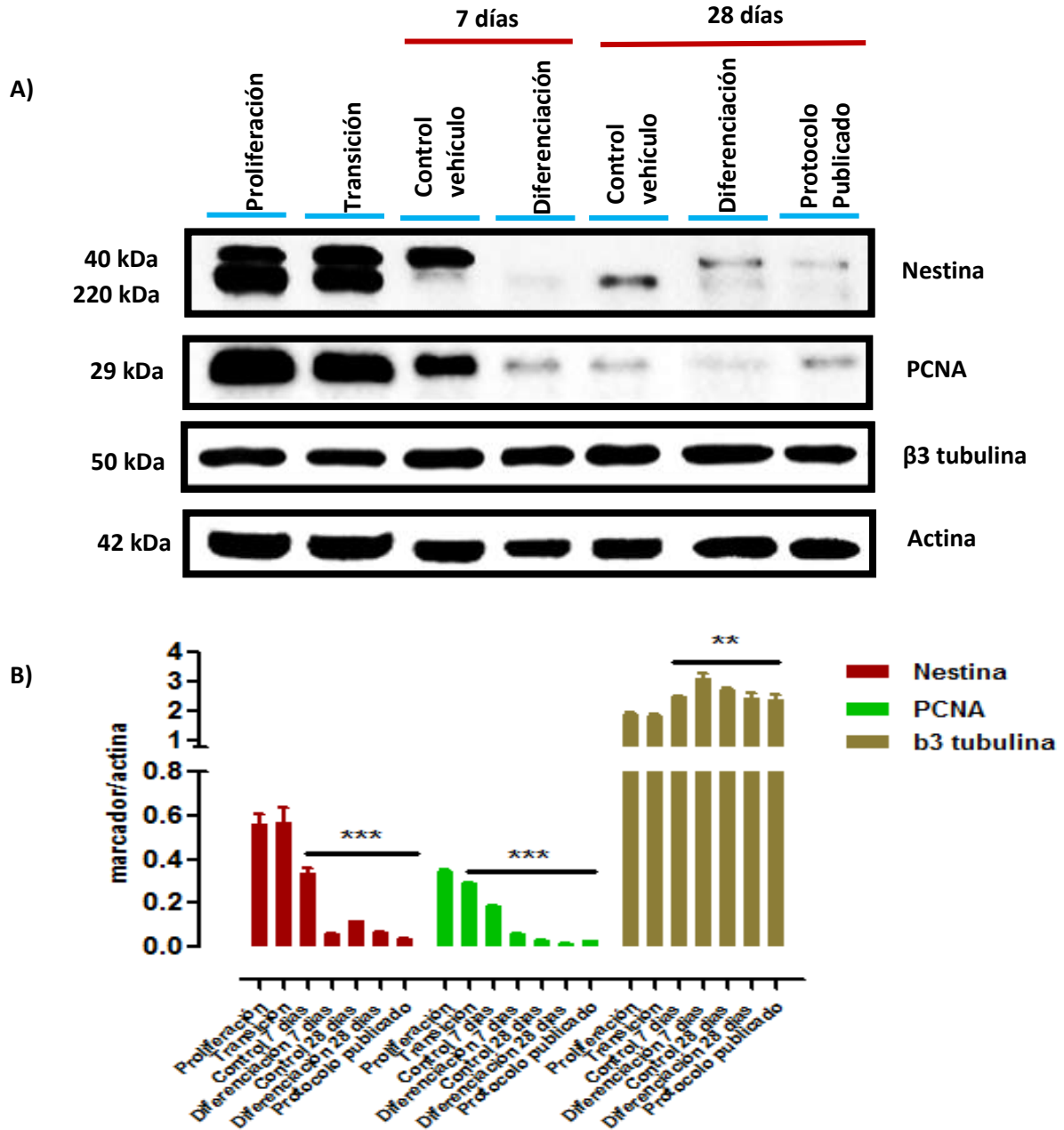


Figura 16. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de células precursoras neurales. A) Western Blot que muestra la expresión las proteínas Nestina, PCNA y β -3 tubulina en las diferentes fases del proceso de diferenciación, a 7 y 28 días, con sus respectivos controles (tratados solo con vehículo), y el protocolo publicado por Fukushima y col., (2014). B) Análisis densitométrico de la expresión de los marcadores Nestina, PCNA y β -3 tubulina con respecto al control de carga actina. El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de una vía ($n=3$), ($P<0.05$), *** $p < 0.0001$, ** $p<0.001$.

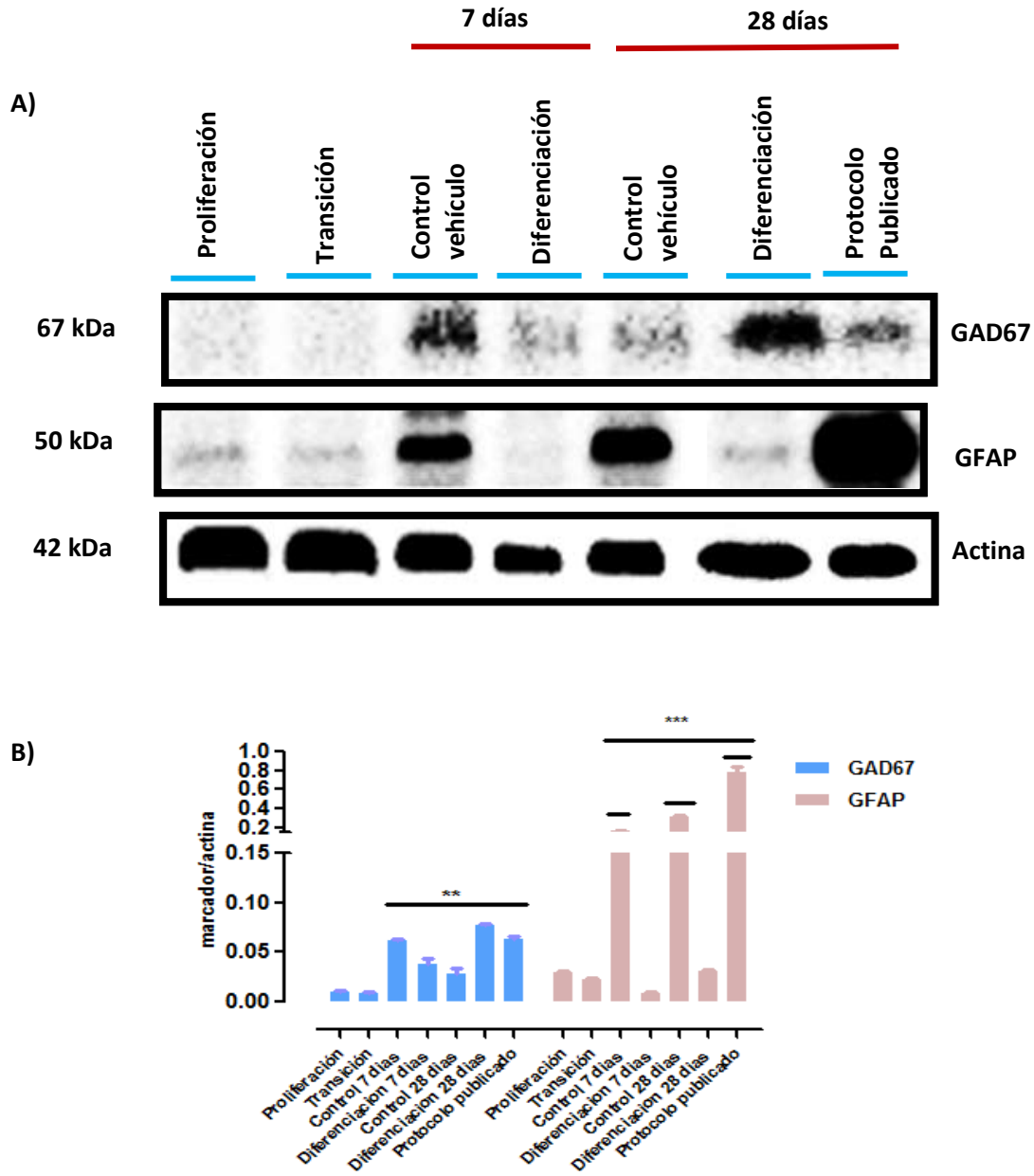


Figura 17. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de linaje neural. A) Western Blot que muestra la expresión las proteínas GAD67 y GFAP en las diferentes fases del proceso de diferenciación, a 7 y 28 días, con sus respectivos controles (tratados solo con vehículo) y con el protocolo publicado por Fukushima y col., (2014). B) Análisis densitométrico de la expresión de los marcadores GAD67 con respecto al control de carga actina. El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de dos vías (n=3), (P<0.05), ***p < 0.0001, **p<0.001.

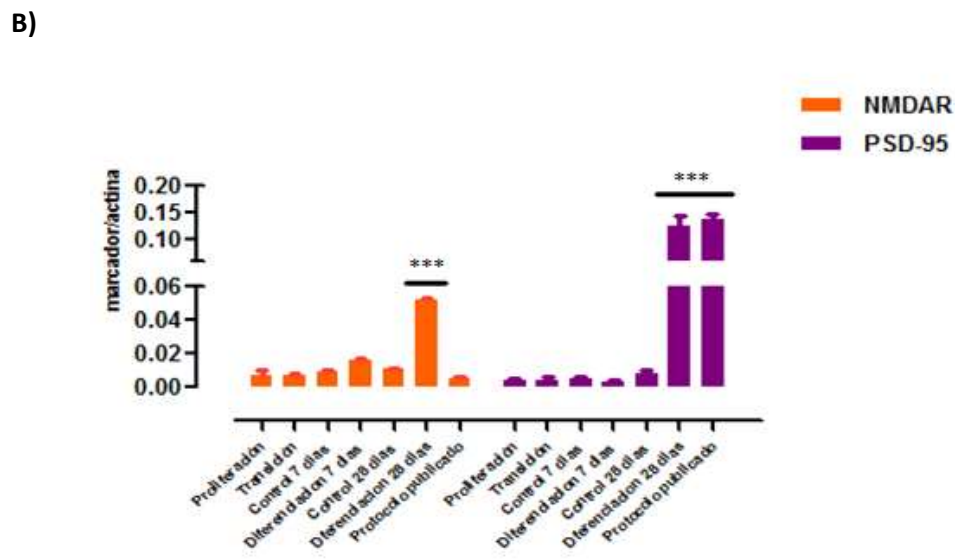
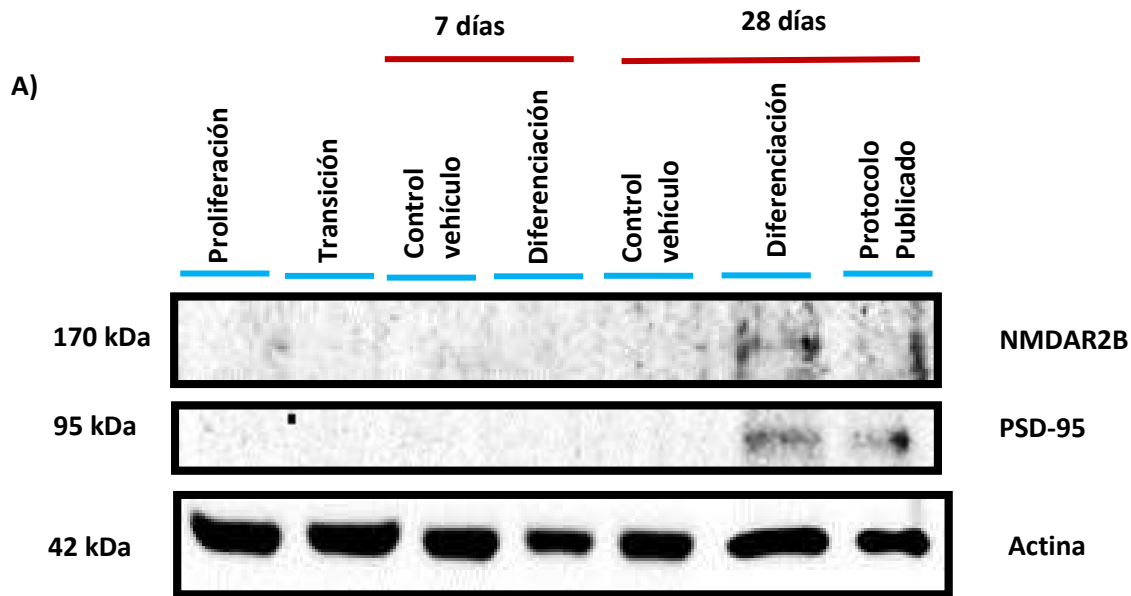


Figura 18. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de actividad sináptica. A) Western Blot que muestra la expresión las proteínas PSD-95 y la subunidad del receptor a glutamato NMDAR en las diferentes fases del proceso de diferenciación a los 7 y 28 días, con sus respectivos controles (tratados solo con vehículo) y el protocolo publicado por Fukushima y col., (2014). B) Análisis densitométrico de la expresión de las proteínas PSD-95 y NMDAR con respecto al control de carga actina. El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de dos vías (n=3), ($P < 0.05$), $***p < 0.0001$.

VII.5. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de maduración neuronal.

Con la finalidad de evaluar si el tratamiento de diferenciación es capaz de llevar a las CPNs de hipocampo fetal humano hacia neuronas maduras, se evaluó la expresión de la proteína Map2 y de otros marcadores de células precursoras neurales como Nestina, β -3 tubulina y el marcador astrocítico GFAP, mediante inmunofluorescencias (Fig.19). Los resultados mostraron que las CPNs tratadas expresan a la proteína Map2 a los 28 días, contrario a las células control que no expresaron la proteína.

VII.6. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre las características electrofisiológicas.

La figura 20 muestra trazos de corrientes representativos de las CPNs obtenidas a los 7 y 28 días de tratamiento con los factores de diferenciación. A los 7 días de tratamiento las corrientes salientes tuvieron una amplitud máxima de 300 pA a 50 mV de potencial (Fig. 20A), mientras que las células con 28 días de tratamiento, tuvieron corrientes de salida entre 1 y 6 nA a los mismos valores de potencial (Fig. 20 B y C). Estos datos sugieren que la densidad de canales de potasio fue en aumento. De la misma manera, la amplitud de la corriente entrante debida a sodio aumentó, compare los registros de la figura 20A con los de la figura 20C.

Para determinar la naturaleza iónica de las corrientes salientes, se adicionó a la solución de registro extracelular 4-aminopiridina (10 mM), un bloqueador de los canales de potasio. Los resultados mostraron que la 4-AP disminuye la amplitud de las corrientes salientes, sugiriendo que una fracción de la corriente es sensible al bloqueo por 4-AP y que dicho efecto es reversible (Fig. 20C).

En algunas células diferenciadas durante 28 días de tratamiento observamos potenciales postsinápticos espontáneos (Fig. 21). La mayoría fueron de tipo excitador (EPSPs) y ocasionalmente observamos de tipo inhibitor (IPSPs). Esta observación permite sugerir que algunas células establecieron contactos sinápticos funcionales posiblemente glutamatérgicos (EPSPs) y GABAérgicos (IPSPs).

Para aportar evidencias a cerca de la presencia de receptores a Glutamato en las células diferenciadas, evaluamos el cambio en la resistencia de entrada aplicando pulsos de corriente hiperpolarizante antes y después de la perfusión de glutamato (50 μ M), la deflexión en el trazo del potencial de membrana fue menor en presencia de Glutamato, indicando una disminución de la resistencia de entrada o dicho de otra forma, un aumento en la conductancia de la membrana. Estos datos sugieren la presencia de receptores a Glutamato (Fig. 22).

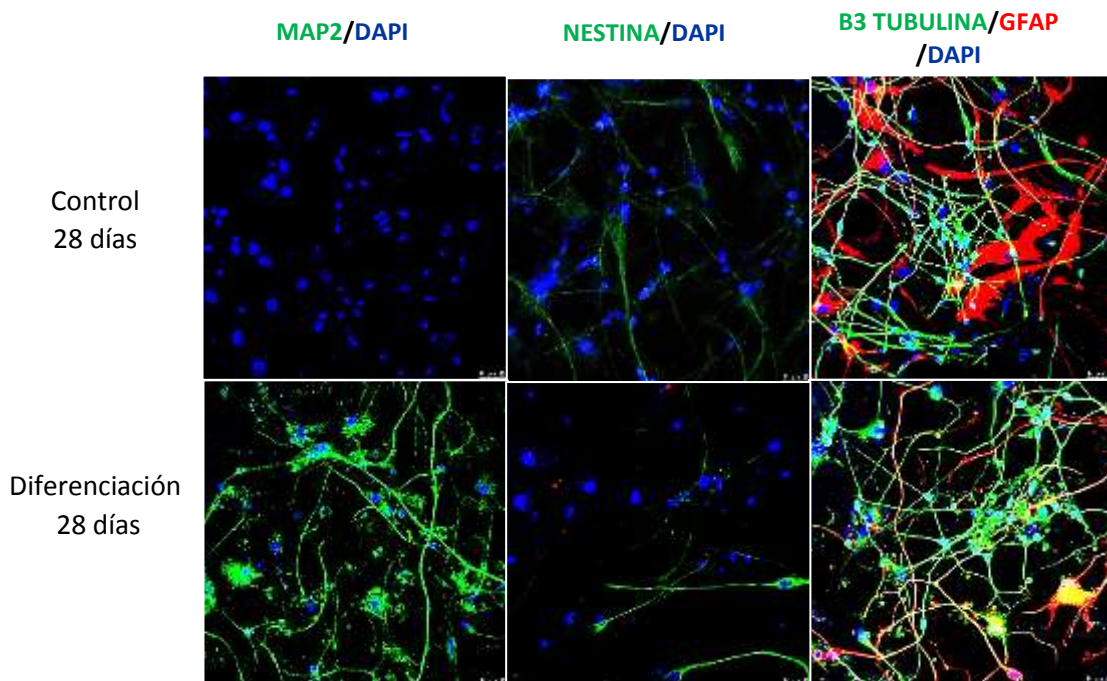


Figura 19. Efecto del tratamiento de diferenciación sobre la expresión de marcadores de neuronas maduras, marcadores de células precursoras neurales y marcadores de linaje neural. Imágenes representativas de inmunofluorescencias con los marcadores MAP2, Nestina, B3 tubulina y GFAP a los 28 días de diferenciación y su control tratado solo con vehículo.

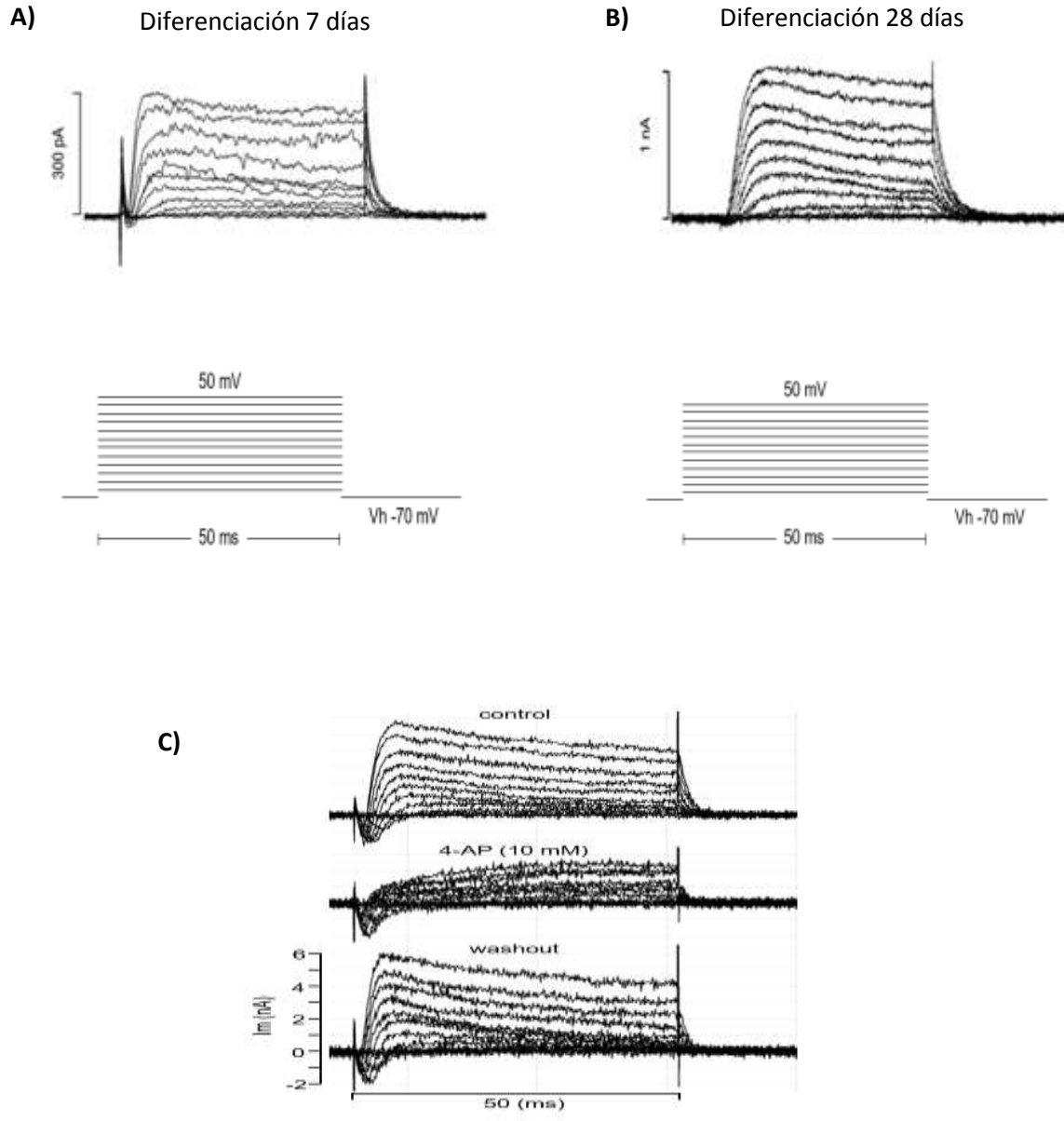


Figura 20. Registros electrofisiológicos de las células precursoras neurales inducidas a diferenciación. Registros electrofisiológicos representativos de patch-clamp en configuración de célula completa. A) Corrientes salientes de hasta 300 pA y pequeñas corrientes de entrada, de célula tratada durante 7 días con los factores de diferenciación. B) Corrientes salientes de hasta 1 nA y pequeñas corrientes de entrada, de célula tratada durante 28 días con los factores de diferenciación. C) Corrientes salientes bloqueadas con 10 mM de 4-AP, de célula tratada durante 28 días con los factores de diferenciación.

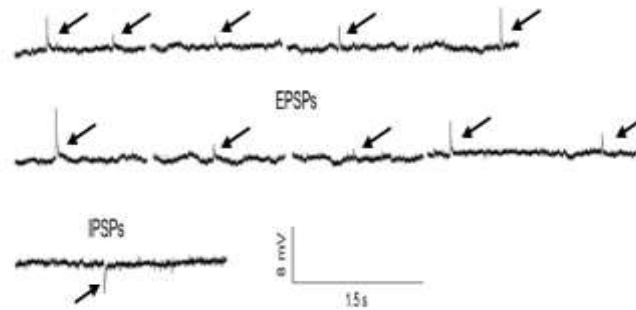


Figura 21. Registros electrofisiológicos en configuración de fijación de corriente, de célula tratada durante 28 días con los factores de diferenciación. Potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) e inhibidores (IPSPs) espontáneos exhibidos por una célula tratada durante 28 días con los factores de diferenciación.

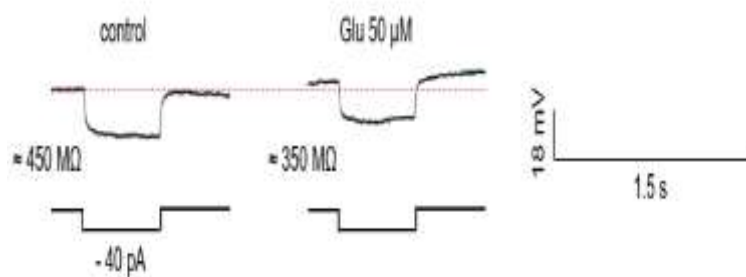


Figura 22. Efecto del Glutamato en la resistencia de entrada de células precursoras neurales inducidas a diferenciación. Disminución de la resistencia de la membrana y despolarización inducida por 50 μM de glutamato en célula tratada durante 28 días con los factores de diferenciación.

VIII. Discusión

La obtención de células troncales de humano y el desarrollo de cultivos primarios para su estudio, han arrojado valiosa información sobre su potencialidad, plasticidad y fisiología; sin embargo, poco se sabe acerca de las CPNs del SNC de humano ya que éstas, solo se encuentran en dos regiones muy específicas, el bulbo olfatorio, que son células que derivan de la ZSV del ventrículo lateral (Lim & Alvarez-Buylla 2016) y células de la ZSG del giro dentado del hipocampo (Kempermann et al., 2015), regiones que anatómicamente son de difícil acceso.

El aislamiento de las CPNs de humano de estos nichos neurogénicos resulta en complicaciones éticas y metodológicas, sin embargo durante el desarrollo embrionario, CPNs se pueden encontrar en todas las regiones del SNC (Temple 2001), por lo cual fetos humanos, resultan ser una fuente importante de obtención de estas células como fuente alternativa al uso de iPSCs humanas.

Cultivos primarios de CPNs aisladas de diferentes regiones del cerebro de fetos humanos, ha permitido conocer parte de su comportamiento, plasticidad y requerimientos celulares, (Flanagan et al., 2006, De Filippis et al., 2007, Pan et al., 2013 y Guo et al., 2013); sin embargo, uno de los grandes retos en el campo es el uso de CPNs como fuente para la obtención de neuronas maduras y funcionales, que sirvan como modelo de estudio para el mejor entendimiento de su fisiología, regulación y la respuesta a diversos estímulos, así como para realizar pruebas con nuevos fármacos y en el desarrollo de terapias celulares, como posible tratamiento para diversas enfermedades neurodegenerativas (Podrygajlo et al., 2010; Zhuo et al., 2015).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog en la diferenciación, maduración y funcionalidad de las CPNs de hipocampo fetal humano.

Primero se realizó la caracterización de las CPNs aisladas de hipocampo, cultivadas en medio de proliferación, el cual contenía medio Neurobasal suplementado con B-27 y los factores (bFGF, 20ng/ml), (EGF, 20ng/ml) y (LIF, 1ug/ml).

Los resultados mostraron que más del 90% de las células fueron positivas para el marcador Nestina y β -3 tubulina. Por lo tanto, concluimos que el medio de proliferación utilizado, fue capaz de mantener a las CPNs en estado precursor.

También, se determinó que el cultivo era heterogéneo y asincrónico, ya que 16% de las células fueron positivas para el marcador astrocítico GFAP (Fig.13B), y solo el 40% de las células fueron positivas para Ki67 (Fig. 13B). Estos datos complementan lo reportado por Fukushima y col., (2014), ya que CPNs de hipocampo humano crecidas en medio comercial de proliferación, expresan Nestina, Ki67 y los factores de transcripción SOX1 y PAX6, todos éstos marcadores de CPNs.

Para que una neurona sea capaz de comunicarse con otra o múltiples neuronas, se necesita de características morfológicas específicas y especializadas, como son: el cuerpo axonal, las ramificaciones dendríticas y las espinas (Kapitein & Hoogenraad 2011). Para poder evaluar si el tratamiento con los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog inducía cambios morfológicos en las CPNs de hipocampo humano, las cuales, de inicio tenían una morfología bipolar, se realizó la cuantificación de las células con morfología ramificada.

Después de 28 días de tratamiento, 85% de células, presentaron morfología ramificada, lo cual representó una diferencia significativa con respecto al control, con 20% (Fig. 14D). Estos datos sugieren que el tratamiento con los factores favorece la diferenciación y maduración de las CPNs. Sin embargo, se sugiere realizar éste ensayo utilizando microscopia de súper resolución, microscopia electrónica y el etiquetado de moléculas específicas, para el mejor análisis morfológico de las neuronas y su densidad dendrítica.

El papel de AMPc en promover el crecimiento axonal y neurítico, ha sido ampliamente demostrado, tal es el caso de los trabajos realizados por Roisen y col., (1972), donde observaron, que el tratamiento con AMPc, aumentó el número de axones y su longitud, favoreciendo el ensamblaje de los microtubulos, en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de embriones de pollo. Por lo anterior sugerimos que la Forskolina, activador de la adenilato ciclasa, enzima que aumenta los niveles de

AMPc en la células, es la responsable en gran medida de los cambios morfológicos que observamos en las CPNs de hipocampo humano tratadas durante 28 días.

Por otra parte, Tabata y colaboradores en el 2015, lograron clasificar 410 compuestos bioactivos de acuerdo a sus efectos en el destino celular de CPNs de hipocampo humano, evaluando los cambios morfológicos inducidos por dichos compuestos, utilizando un sistema de detección multiparamétrico, lo que valida el uso de análisis de cambios morfológicos y fenotípicos como una herramienta que permite hacer un tamizaje sobre el efecto de distintos compuestos en el destino celular.

Las CPNs son células que se encuentran en proliferación, por lo que pueden ser identificadas *in vitro*, utilizando marcadores endógenos del ciclo celular como es la proteína Ki67 y PCNA, o utilizando nucleótidos sintéticos como el análogo de la timidina BrdU (Kee et al., 2002); Sin embargo, uno de los pasos determinantes para que se lleve a cabo la diferenciación, es la salida del ciclo celular, por lo tanto evaluamos el efecto del tratamiento de los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog sobre los cambios en el porcentaje de células que incorporan BrdU.

Se observó que en la condición de proliferación, 20% (Figs. 15 A y B) del total de las células incorporaron BrdU, lo cual representa un número menor al 40% de células positivas para Ki67 en la caracterización (Fig. 13B), esto se puede explicar debido a que Ki67 se expresa en todas las fases del ciclo celular, mientras que BrdU, únicamente se incorpora en la fase de síntesis del ciclo celular.

En la condición de transición, las concentraciones de los factores bFGF y EGF fueron disminuidas de 20ng/ml a 5ng/ml y se eliminó el factor LIF, con esto se esperaba que disminuyera el porcentaje de células que incorporaran BrdU; Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a la condición de proliferación ya que un 17% de las células fueron positivas para este análogo (Figs. 15 A y B). Por lo anterior sugerimos que la condición de transición debería de ser reevaluada ampliamente y a diferentes tiempos, esto para corroborar si tiene un papel importante en el proceso de diferenciación como lo reporta Fukushima y col., (2014).

Cuando se determinó el número de células que incorporaron BrdU, después del tratamiento con los factores durante 28 días, momento en el que se espera que las células estén diferenciadas, se observó 2% de células positivas a éste análogo, lo que representó una disminución significativa con respecto a las condiciones de proliferación y transición (Figs. 15 A y B). Estos datos concuerdan con lo reportado por Zhang y col., (2006), en donde demuestran que el tratamiento con los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog disminuye el número de células que incorporan BrdU, de un 100 a un 80% en células precursoras de neuroepitelio olfatorio de adulto humano.

Se ha sugerido que el Ácido retinoico promueve la diferenciación neuronal de CPNs aisladas de hipocampo de ratas, favoreciendo la salida del ciclo celular, mediante el aumento de la expresión de p21, proteína que forma parte de los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), enzimas que regulan el correcto desarrollo del ciclo celular (Takahashi et al., 1999), por lo anterior sugerimos que el Ácido retinoico es en gran medida el responsable de disminuir el porcentaje de células que incorporaron BrdU, en las CPNs de hipocampo humano; sin embargo, es recomendable realizar ensayos con los factores por separado para evaluar si el fenómeno observado se debe únicamente al Ácido retinoico, o trabaja de forma sinérgica con los factores Forskolina y Sonic hedgehog.

Debido a que los datos del análisis morfológico y de incorporación de BrdU nos sugerían que el tratamiento con los factores estaba induciendo a diferenciación a las CPNs, nosotros esperábamos que las células tratadas perdieran los marcadores de células precursoras o células inmaduras como Nestina y PCNA, por lo cual evaluamos la expresión de estas proteínas mediante ensayos de Western Blot a los 7 y 28 días de tratamiento.

Se observó que a los 7 días, la expresión de Nestina y PCNA en las células tratadas disminuyó de manera significativa en comparación con la condición de proliferación y con el control tratado solo con vehículo durante 7 días, lo mismo se puede observar al analizar la expresión de éstas proteínas a los 28 días, en las células tratadas; sin

embargo, en las células control tratadas solo con vehículo a los 28 días, también se observó una disminución de la expresión de Nestina y PCNA (Figs.16 A y B).

Una hipótesis del trabajo, fue que al crecer a las CPNs únicamente en medio Neurobasal, retirando los factores LIF, bFGF y EGF, y sin adicionar algún otro factor que sirva como inductor de la diferenciación neuronal, como es el caso de nuestro grupo control, se disminuiría la expresión de marcadores de células precursoras a lo largo del tiempo y se favorecería la diferenciación astrocítica, y no la diferenciación neuronal.

Como lo reportado por Babu y col., (2007), quienes observaron que CPNs aisladas del giro dentado de hipocampo de ratón adulto, crecidas en medio agotado libre de los factores mitógenos EGF y FGF2 durante 14 días, se diferencian a neuronas en un porcentaje mínimo (0.8 a 1%); Sin embargo, cuando ellos crecen a las CPNs en medio libre de factores mitógenos pero adicionan al factor neurotrófico Neurotrofina 3 (NT3) el porcentaje de neuronas aumenta a 40%, y al adicionar el factor Sonic hedgehog el porcentaje de neuronas también se ve aumentado significativamente alrededor de 80%.

Sonic hedgehog es un factor que tiene múltiples funciones durante el desarrollo del SNC, está implicado en la proliferación, especificación y orientación axonal en diferentes regiones del SNC (Buylla & Ihrie 2014); sin embargo, el papel de Shh en el hipocampo aún sigue en estudio. Algunos trabajos apuntan a que Shh es un regulador importante en la neurogénesis de esta región (Lai et al., 2003). Por lo tanto creemos que el medio de diferenciación que contiene los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog, no solo se acelera la pérdida de marcadores de células precursoras, si no también se favorece la diferenciación neuronal.

Para corroborar si nuestra hipótesis era cierta evaluamos la expresión del marcador astrocítico GFAP y del marcador neuronal GAD67, proteína que se expresa en neuronas GABAérgicas, por lo tanto, nosotros esperábamos que la proteína GAD67 se expresara únicamente en las células tratadas con los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog, y que la proteína GFAP se expresara de forma enriquecida en las células control, nuestros resultados mostraron que la proteína

GFAP se expresó de forma enriquecida en las células control a los 7 y 28 días, a diferencia de las células tratadas con los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog, las cuales mostraron una expresión mínima de esta proteína (Figs. 17 A y B)

Estos datos concuerdan con lo reportado por Riaz y col., (2004), donde en CPNs aisladas de mesencéfalo fetal de humano, observaron, que el tratamiento con Ácido retinoico junto con BDNF, Forskolina y Dopamina, aumentó el número de neuronas y disminuyó el número de células positivas a GFAP.

Además de favorecer la salida del ciclo celular, se ha demostrado que el Ácido retinoico aumenta la expresión del factor de transcripción NeuroD y de los receptores de neurotrófinas trkA, trkB, trkC y p75NGFR, los cuales son importantes para la diferenciación, supervivencia y maduración neuronal (Takahashi et al., 1999), por lo que sugerimos, que éste podría ser el mecanismo por el cual se favorece el linaje neuronal y se reprime el linaje astrocítico en las CPNs de hipocampo humano tratadas con los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog.

Por su parte la expresión de GAD67 se vio enriquecida en el grupo control a los 7 días y en las células tratadas con los factores a los 28 días (Figs 17 A y B). GAD67 es la enzima encargada de sintetizar a GABA, el cual es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC; Sin embargo, durante el desarrollo parece tener un papel diferente ya que tiene acción excitatoria en neuronas inmaduras (Ben-Ari. 2002) y además, funciona como factor neurotrófico (Redburn & Schousboe 1987), lo que podría explicar la expresión de GAD67 a los 7 días en el grupo control, ya que cumple con su papel neurotrófico a falta de otros factores en el medio; sin embargo, la expresión de GAD67 solo se pudo observar a los 28 días en las células tratadas,

Con estas observaciones pudimos comprobar que solo las células tratadas con los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog, fueron capaces de diferenciarse hacia neuronas GABAérgicas, sin embargo es recomendable evaluar marcadores de otro linaje neuronal.

Cabe mencionar que se utilizó a las CPNs de hipocampo humano crecidas en el medio comercial de diferenciación, tal como el protocolo reportado por Fukushima y col. (2014) como control positivo de la diferenciación.

De acuerdo a nuestros resultados, esperábamos que estas células expresaran proteínas relacionadas con actividad neuronal como PSD-95, proteína importante para la plasticidad sináptica, que modula los receptores ionotrópicos de glutamato NMDA, los cuales tienen un papel central en la sinaptogénesis y en la potenciación a largo plazo, ya que se demostró que las células tratadas con los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog se diferenciaron (Lin et al., 2004).

Evaluamos la expresión de la proteína PSD-95 y de la subunidad NMDR2B del receptor de glutamato mediante Western Blot. Observamos, que únicamente las células tratadas a los 28 días expresaron PSD-95 y la subunidad del receptor a glutamato NMDR2B (Figs .18 A y B), lo que sugiere que las células son neuronas maduras y funcionales, que podrían tener la capacidad de disparar potenciales de acción y comunicarse entre ellas *in vitro*.

Para comprobar si efectivamente las neuronas habían madurado, se analizó mediante inmunofluorescencia, la expresión del marcador MAP2, proteína que se expresa en neuronas maduras, ya que es una proteína que se asocia a los microtubulos para darles movilidad y plasticidad a los axones y dendritas importantes para la comunicación neuronal (Kapitein & Hoogenraad 2011).

Los resultados mostraron, que las células tratadas con los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog durante 28 días, expresaron a la proteína MAP2, a diferencia de las células control que no expresaron ésta proteína (Fig. 19).

Finalmente, para corroborar que las células eran funcionales y que tenían la capacidad de comunicarse entre ellas, se realizaron ensayos electrofisiológicos, de patch-clamp en configuración de célula completa, en la modalidad de fijación de voltaje, a los 7 y 28 días de tratamiento.

Las células a los 7 días de tratamiento presentaron corrientes salientes que tuvieron una amplitud máxima de 300 pA, mientras que las células con 28 días de tratamiento,

tuvieron corrientes de salida entre 1 y 6 nA. Estos datos sugieren que la densidad de canales de potasio fue en aumento con forme al tiempo de tratamiento. (Figs. 20 A y B).

Cuando se adicionó 10 mM del fármaco 4- AP en la solución de registro extracelular se observó una disminución en la amplitud de las corrientes salientes, sugiriendo que una fracción de la corriente es sensible al bloqueo por 4-AP y que dicho efecto es reversible (Fig. 20C).

En algunas células diferenciadas durante 28 días de tratamiento, observamos potenciales postsinápticos espontáneos (Fig. 21). La mayoría fueron de tipo excitador (EPSPs) y ocasionalmente observamos de tipo inhibitor (IPSPs). Esta observación permite sugerir que algunas células establecieron contactos sinápticos funcionales posiblemente glutamatérgicos (EPSPs) y GABAérgicos (IPSPs).

En células tratadas durante 28 días se observó una disminución de la resistencia de entrada después de la perfusión de glutamato (50 μ M), lo que sugiere la presencia de receptores de glutamato funcionales (Fig. 22).

Estos datos en conjunto, concuerdan con lo reportado por Espositos y col. (2005), quienes evaluaron las características morfológicas y funcionales durante 4 semanas, de células progenitoras, transfectadas con la proteína verde fluorescente; Ellos observaron, que hasta los 28 días, después de ser inyectadas en el hipocampo de ratón, las células expresan marcadores de neuronas maduras como NeuN, tienen una morfología ramificada con proyecciones axonales, ramificaciones dendríticas y espinas dendríticas, además de exhibir sinápticos espontáneos GABAérgicos y sinápticos espontáneos Glutamatérgicos.

Estos datos en conjunto demuestran que las CPNs tratadas con los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog durante 28 días, son neuronas funcionales las cuales tienen la capacidad de comunicarse entre sí *in vitro*.

IX. CONCLUSIÓN

Los factores Ácido retinoico, Forskolina y Sonic hedgehog promueven la diferenciación y maduración de las células precursoras neurales de hipocampo humano hacia neuronas funcionales "*in vitro*"

X. PERSPECTIVAS

- Determinar el papel que tiene, por separado, cada uno de los factores en la diferenciación y maduración de las células precursoras neurales de hipocampo fetal humano por separado.
- Determinar que genes pueden estar encendiendo y apagando los factores de diferenciación en conjunto y por separado.
- Determinar si los factores de diferenciación actúan de forma sinérgica.
- Caracterizar el proceso de maduración de las células precursoras de hipocampo humano mediante respuestas electrofisiológicas.
- Determinar si las células precursoras de hipocampo humano pre-diferenciadas *in vitro* tienen la capacidad de integrarse a la circuitería neuronal en modelos murinos.
- Evaluar la capacidad de estas células como modelo de una enfermedad crónica degenerativa, como el Alzheimer y determinar el efecto citotóxico y las respuestas celulares del β -amiloide en las células precursoras de hipocampo humano diferenciadas.

XI. REFERENCIAS

1. Alvarez-Buylla, A., Ihrie, R. A. (2014). Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain. *Semin Cell Dev Biol.* 33:105-11. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.05.008.
2. Ahmed, S., Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1995). BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J Neurosci*, 15(8), 5765-5778.
3. Akimoto, J., Itoh, H., Miwa, T., & Ikeda, K. (1993). Immunohistochemical study of glutamine synthetase expression in early glial development. *Brain Res Dev Brain Res*, 72(1), 9-14.
4. Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G., & Heintz, N. (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*, 41(6), 881-890.
5. Babu, H., Cheung, G., Kettenmann, H., Palmen, T. D., Kempermann, G. (2007). Enriched Monolayer Precursor Cell Cultures from Micro- Dissected Adult Mouse Dentate Gyrus Yield Functional Granule Cell-Like Neurons. *PLoS One.* 2(4):e388.
6. Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 3(9):728-39.
7. Buytaert-Hoefen, K. A., Alvarez, E., & Freed, C. R. (2004). Generation of tyrosine hydroxylase positive neurons from human embryonic stem cells after coculture with cellular substrates and exposure to GDNF. *Stem Cells*, 22(5), 669-674. doi: 10.1634/stemcells.22-5-669
8. Canon, E., Cosgaya, J. M., Scsucova, S., & Aranda, A. (2004). Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell*, 15(12), 5583-5592. doi: 10.1091/mbc.E04-05-0439
9. Carpenter, M. K., Cui, X., Hu, Z. Y., Jackson, J., Sherman, S., Seiger, A., & Wahlberg, L. U. (1999). In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol*, 158(2), 265-278. doi: 10.1006/exnr.1999.7098
10. De Filippis, L., Lamorte, Giuseppe., Snyder, E. Y., Malgaroli, A., Vescovi, A. L., (2007). A Novel, Immortal, and Multipotent Human Neural Stem Cell Line Generating Functional Neurons and Oligodendrocytes. *Stem Cells.* 25(9):2312-21.
11. Egan, C. M., Nyman, U., Skotte, J., Streubel, G., Turner, S., O Conell, D. J., Rraklli, V., Dolan, M. J., Chadderton, N., Hansen, K., Farrar, G. J., Helin, K., Holmberg, J., Bracken, A. P., (2013). CHD5 is required for neurogenesis and has a dual role in facilitating gene expression and polycomb gene expression. *Dev Cell.* 12;26(3):223-36.
12. Eriksson, P. S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A.-M., Nordborg C., Peterson D. A., Gage F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313-1317
13. Esposito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern N. A., Ferrari C. C., Pitossi F. J., Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult

- hippocampus recapitulate embryonic development. *J Neurosci.* 2;25(44):10074-86.
14. Faure, A., Verret L., Bozon B., El Tannir El Tayara N., Ly M., Kober F., Tayara N., Ly M., Kober F., Dhenain M., Rampon C., Delatour B. (2011). Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 32 407-4018.
 15. Flanagan, L. A., Rebaza, L. M., Derzic, S., Schwartz, P. H., & Monuki, E. S. (2006). Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins. *J Neurosci Res,* 83(5), 845-856. doi: 10.1002/jnr.20778
 16. Fukushima, K., Tabata, Y., Imaizumi, Y., Kohmura, N., Sugawara, M., Sawada, K., Ito, M. (2014). Characterization of Human Hippocampal Neural Stem/Progenitor Cells and Their Application to Physiologically Relevant Assays for Multiple Ionotropic Glutamate Receptors. *J Biomol Screen,* 19(8), 1174-1184. doi: 10.1177/1087057114541149
 17. Gotz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 6(10), 777-788. doi: 10.1038/nrm1739
 18. Guo, H., Zhao, Z., Yang, Q., Wang, M., Bell, R. D., Wang, S., Chow, N., Davis, T. P., Griffin, J. H., Goldman, S. A., and Zlokovic B, V. (2013). An activated C analog stimulates neuronal production by human neural progenitor cell via PAR1-PAR-3-S1PR1-Akt pathway. *J Neurosci.* 3; 33(14): 6181–6190.
 19. Hagihara H., Takao K., Walton N. M., Matsumoto M., Miyakawa T. (2013). Immature dentate gyrus: an endophenotype of neuropsychiatric disorders. *Neural Plast* 318596.
 20. Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., & Gotz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol,* 229(1), 15-30. doi: 10.1006/dbio.2000.9962
 21. Hatten, M. E. (1990). Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci,* 13(5), 179-184.
 22. Higashi, M., Kolla, V., Iyer, R., Naraparaju, K., Zahuang, T., Kolla, S., & Brodeur, G. M. (2015). Retinoic acid-induced CHD5 upregulation and neuronal differentiation of neuroblastoma. *Molecular Cancer* 14:150
 23. Huttner, W. B., & Brand, M. (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr Opin Neurobiol,* 7(1), 29-39.
 24. Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., & Imayoshi, I. (2008). Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat Neurosci,* 11(11), 1247-1251. doi: 10.1038/nn.2208
 25. Kapitein, L. C., Hoogenraad, C. C. (2011). Which way to go ? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Mol Cell Neurosci.* 46(1):9-20. doi: 10.1016/j.mcn.2010.08.015.
 26. Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., Wojtowicz, J. M. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods.* 30;115(1):97-105.
 27. Kempermann, G. (2015). Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 18;8(2):a018986.

28. Lai K., Kaspar B. K., Gage F. H., Schaffer D. V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* **6**, 21-27
29. Lee, S. M., Tole. S., Grove, E., & McMahon, A. P. (2000). A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development*, **127**, 457-467
30. Levitt, P., & Rakic, P. (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol*, **193**(3), 815-840. doi: 10.1002/cne.901930316
31. Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**;8(5). pii: a018820. doi: 10.1101/cshperspect.a018820.
32. Lin, Y., Skeberdis, V. A., Francesconi, A., Bennett, M. V., Zukin, R. S. (2004). Postsynaptic density protein-95 regulates NMDA channel gating and surface expression. *J Neurosci.* **10**;24(45):10138-48.
33. Machold R., Hayashi S., Rutlin M., Muzumdar M. D., Nery S., Corbin J. G., Gritti-Linde A., Dellovade T., Porter J A., Rubin L. L., et al. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**, 937-950.
34. Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S. C., & Kriegstein, A. R. (2006). The role of intermediate progenitor cells in the evolutionary expansion of the cerebral cortex. *Cereb Cortex*, **16 Suppl 1**, i152-161. doi: 10.1093/cercor/bhk017
35. Nicol, J., & Gaspar, P. (2014). Routes to cAMP: shaping neuronal connectivity with distinct adenylate cyclases. *EJN*. **39**(11), 1742-1751
36. Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, **7**(2), 136-144. doi: 10.1038/nn1172
37. Owens, D. M., & Watt, F. M. (2003). Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer*, **3**(6), 444-451. doi: 10.1038/nrc1096
38. Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Ruiz i Altaba, A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*, **132**(2), 335-344. doi: 10.1242/dev.01567
39. Pan, X., Li, X. J., Liu, X. J., Yuan, H., Li, J. F., Duan, Y. L., Ye, H. Q., Fu, Y. R., Qiao, G. H., Wu, C. C., Yang B., Tian, X. H., Hu, K. H., Miao, L. F., Chen, X, L., Zheng, J., Rayner, S., Schwartz, P. H., Britt, W. J., Xu, J., Luo, M. H. (2013). Later Passages of Neural Progenitor Cells from Neonatal Brain Are More Permissive for Human Cytomegalovirus Infection. *J Virol.* **87**(20):10968-79. doi: 10.1128/JVI.01120-13.
40. Paridaen, J. T., & Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep*, **15**(4), 351-364. doi: 10.1002/embr.201438447
41. Patricio, P., Mateus-Pinheiro A., Sousa N., Pinto L. (2013). Re-cycling paradigms: cell cycle regulation in adult hippocampal neurogenesis and implications for depression. *Mol. Neurobiol.* **48**, 84-96.

42. Pevny, L. H., Sockanathan, S., Placzek, M., & Lovell-Badge, R. (1998). A role for SOX1 in neural determination. *Development*, 125(10), 1967-1978.
43. Pinto, L., & Gotz, M. (2007). Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol*, 83(1), 2-23. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.02.010
44. Podrygajlo, G., Wiegrefe, C., Scaal, M., and Bicker, G. (2010). Integration of Human Model Neurons (NT2) Into Embryonic Chick Nervous System. *Dev Dyn*. 239(2):496-504. doi: 10.1002/dvdy.22193.
45. Redburn, D.A., Schousboe, A. (1987). Neurotrophic Activity of GABA During Development. Eds.Liss, New York.
46. Riaz, S. S., Theofilopoulos, S., Jauniaux, E., Stern, G.M., Bradford, H.F. (2004). The differentiation potential of human foetal neuronal progenitor cells in vitro. *Brain Res Dev Brain Res*, 153(1), 39-51.
47. Roisen, F. J., Murphy, R. A., Pichichero, M. E., Braden W. G., (1972). Cyclic adenosine monophosphate stimulation of axonal elongation. *Science*. 1972 Jan 7;175(4017):73-4.
48. Schmid, R. S., Shelton, S., Stanco, A., Yokota, Y., Kreidberg, J. A., & Anton, E. S. (2004). alpha3beta1 integrin modulates neuronal migration and placement during early stages of cerebral cortical development. *Development*, 131(24), 6023-6031. doi: 10.1242/dev.01532
49. Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K., & Inoue, Y. (1997). Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J Neurosci*, 17(23), 9212-9219.
50. Singh, S., & Solecki, D. J. (2015). Polarity transitions during neurogenesis and germinal zone exit in the developing central nervous system. *Front Cell Neurosci*, 9, 62. doi: 10.3389/fncel.2015.00062
51. Smith, J. L., & Schoenwolf, G. C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci*, 20(11), 510-517.
52. Snell R. S. (2009). Clinical Neuroanatomy. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
53. Tabata, Y., Murai, N., Sasaki, T., Taniguchi, S., Suzuki, S., Yamazaki, K., and Ito, M. (2015). Multiparametric Phenotypic Screening System for Prolifering Bioactive Compounds Using Human Hippocampal Neural Stem/Progenitor Cells. *J Biomol Screen*. 20(9):1074-83. doi: 10.1177/1087057115598119.
54. Takahashi, J., Palmer, T. D., Gage, F. H.(1999). Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult- derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol*. 38(1):65-81.
55. Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859), 112-117. doi: 10.1038/35102174
56. Walton N. M., Zhou Y., Kogan J. H., Shin R., Webster M., Gross A. K., Heusner C. L., Chen Q., Miyake S., Tajinda K., et al. (2012). Detection of an immature dentate gyrus feature in human schizophrenia/bipolar patients. *Transl Psychiatry* 2, e135.
57. Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., & Huttner, W. B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of

- epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23), 12425-12430.
58. Wright, L. S., Li, J., Caldwell, M. A., Wallace, K., Johnson, J. A., & Svendsen, C. N. (2003). Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor. *J Neurochem*, 86(1), 179-195.
59. Yu, D. X., Di, Giorgio, F. P., Yao, J., Marchetto, M. C., Brennand, K., Wright, R. Mei, A., McHenry, L., Lisuk, D., Grasmick, J. M., (2014). Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* 2, 295-310.
60. Zhang, X., Klueber, K. M., Guo, Z., Cai, J., Lu, C., Winstead, W. I., Roisen, F. J. (2006). Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. *Brain Res*, 1073-1074, 109-119. doi: 10.1016/j.brainres.2005.12.059
61. Zhou, F. W., Fortin, J. M., Chen, H. X., Martinez-Diaz, H., Chang, L. J., Reynolds, B. A., Roper, S. N. (2015). Functional Integration of Human Neural Precursor Cells in Mouse Cortex. *PLoS One*. 12;10(3):e0120281. doi: 10.1371/journal.pone.0120281.

ANEXOS

I. Marcadores utilizados para evaluar el proceso de diferenciación neuronal
Nestina: Proteína de filamento intermedio Clase VI que se expresa en células neuroepiteliales y en células precursoras neurales. Anti-Nestina (Genetex GTX30671). Dilución usada para Inmunofluorescencia (1:500), para Citometría de flujo (1:300) y para Western Blot (1:1000).

Ki67: Proteína que se expresa en las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular y no se expresa en la fase G0. Anti-Ki67 (Abcam ab66155). Dilución usada para Inmunofluorescencia (1:500) y para Citometría de flujo (1:300).

B3 Tubulina: También llamada Tuj1, es una proteína que conforma a los microtubulos y se expresa predominantemente e las neuronas. Anti-B3 Tubulina (Promega G7121). Dilución usada para Inmunofluorescencia (1:500) y para Citometría de flujo (1:300) y para Western Blot (1:1000).

GFAP: (Glial Fibrillary Acidic Protein) proteína de citoesqueleto que se expresa en astrocitos y en células de la glia radial. Anti- GFAP (Dako Z03340). Dilución usada para Inmunofluorescencia (1:1500) y para Citometría de flujo (1:1000) y para Western Blot (1:1000).

PCNA: (Proliferating cell nuclear antigen) Cofactor de la DNA polimerasa Delta que se utiliza como marcador para células en proliferación. Anti-PCNA (Upstate biotechnology 05-347). Dilución usada para Western Blot (1:1000).

GAD67: (Glutamic acid Decarboxylase 67) Enzima responsable de catalizar la producción de ácido gamma-aminobutírico a partir de ácido L-glutámico, que se expresa en neuronas GABAérgicas. Anti-GAD67 (Genetex GTX101881). Dilución usada para Western Blot (1:1000).

PSD95: (Postsynaptic Density Protein 95) Proteína de andamiaje importante para la plasticidad sináptica. Anti-PSD95 (Abcam ab76115). Dilución usada para Western Blot (1:1000).

NMDAR2B: Subunidad del receptor ionotrópico de glutamato el cual está implicado en la potenciación a largo plazo. Anti-NMDAR2B (Millipore AB1557P). Dilución usada para Western Blot (1:1000).

MAP2: Proteína que se asocia a microtúbulos, se expresa en neuronas y se encuentra enriquecida en las dendritas. Anti-Map2 (Sigma M1406). Dilución usada para Inmunofluorescencia (1:500).

II. Buffer para ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA)

SDS	0.1%
NP40	1.0%
Deoxicolato de sodio	0.5%
AEBSF	0.24 ug/ml
Aprotinina	8 ug/ml
Leupeptina	10 ug/ml
Pepstatina	5 mM
Benzamidina	5mM
B-Glicerofosfato	20 mM
NaF	10 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
EDTA	1mM
EGTA	1Mm