

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Identificación de las proteínas secretadas por las células
troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano y la evaluación de
su efecto en el proceso neurogénico de las células precursoras de
hipocampo adulto**

T E S I S

Que presenta

M. en C. LAURA GÓMEZ VIRGILIO

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR

Codirectores de la Tesis:

DR. MARCO ANTONIO MERAZ RÍOS
DR. GERARDO B. RAMÍREZ-RODRÍGUEZ

Ciudad de México, México.

SEPTIEMBRE, 2017

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORES

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

**Profesor titular del departamento de Biomedicina Molecular
Cinvestav-IPN**

Dr. Gerardo Bernabé Ramírez-Rodríguez

Investigador en Ciencias Médicas “D”

Jefe del laboratorio de Neurogénesis

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

ASESORES

Dra. Isaura Meza Gómez Palacio

**Profesor titular del departamento de Biomedicina Molecular
Cinvestav-IPN**

Dra. Rosaura Hernández Rivas

**Profesor titular del departamento de Biomedicina Molecular
Cinvestav-IPN**

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

**Profesor titular del departamento de Biomedicina Molecular
Cinvestav-IPN**

Dra. Leticia Cedillo Barrón

**Profesor titular del departamento de Biomedicina Molecular
Cinvestav-IPN**

DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE CONTO CON EL APOYO DE UNA BECA DE DOCTORADO OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT), PERÍODO 2013-2017



INDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE DE FIGURAS	I
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1 Nicho neurogénico y neurogénesis	1
I.1.1 Nicho neurogénico: interacciones célula-célula	3
I.1.2 Nicho neurogénico: factores solubles	4
I.2 Células precursoras del epitelio olfatorio	6
I.2.1 El epitelio olfatorio	6
I.2.2 Neurogénesis en el epitelio olfatorio	9
I.3 Células troncales adultas y terapia celular	13
I.3.1 Potenciales aplicaciones de las células troncales adultas	13
II. ANTECEDENTES	16
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
V.1 GENERAL	21
V.2 PARTICULARES	21
VI. METODOLOGÍA	22
VI.1 Aislamiento y caracterización de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano	22
VI.2 Determinación de los factores solubles presentes en los medios condicionados de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano.	25

VI.2.1 Obtención de los medios condicionados de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano para el arreglo de anticuerpos	25
VI.2.2 Análisis de los factores solubles contenidos en los diferentes medios condicionados mediante el uso de un arreglo precargado con 507 anticuerpos (RayBio® Label-based (L-Series) Human Antibody Array L-507 (Cat# AAH-BLM-1A-4))	26
VI.2.3 Determinación de la cantidad de EGF presente en el medio condicionado mediante el estuche comercial Quantikine®ELISA de la casa comercial R&D systems (no. de catálogo DEG00)	27
VI.2.4 Determinación de la cantidad de IL-6 presente en el medio condicionado mediante el estuche comercial Human IL-6 Mini TMB ELISA Development de la casa comercial Peprotech (no. de catálogo 900-TM16)	28
VI.3 Determinación del efecto de los factores solubles liberados por las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano sobre el proceso neurogénico (proliferación y diferenciación) de las células precursoras de hipocampo adulto	30
VI.3.1 Obtención de los medios condicionados de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano para los ensayos de proliferación y diferenciación	30
VI.3.2 Ensayo de viabilidad (WST-1 (Roche, no. de catálogo: 11644807001)) de las células precursoras de hipocampo adulto cultivadas en medio condicionado obtenido a partir de células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano	32
VI.3.3 Ensayo de proliferación celular (incorporación de BrdU mediante el uso del estuche comercial Roche, no. de catálogo: 11 296 736 001) en células precursoras de hipocampo adulto cultivadas en medio condicionado obtenido de células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano	32
VI.3.4 Ensayo de diferenciación en células precursoras de hipocampo adulto cultivadas en medio condicionado obtenido de células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano	34
VI.4 Determinación de los fenotipos presentes en las células precursoras de hipocampo adulto después de someterse a diferentes tratamientos (EGF, IL-6, EGF/IL-6 y medio condicionado al 100%) durante 48 horas.	36
VI.5 Determinación de la viabilidad, proliferación y diferenciación de las células precursoras de hipocampo adulto a las 48 horas de iniciado el tratamiento con dos	

concentraciones de medio condicionado (15 y 100%) en presencia del anticuerpo neutralizante anti-hEGF	36
VI.6 Determinación de los mecanismos de señalización activados por el medio condicionado sobre las células precursoras del hipocampo adulto	37
VI.6.1 Determinación de los mecanismos de señalización activados por el medio condicionado mediante el uso de un arreglo precargado con anticuerpos que reconocen la forma fosforilada o procesada de proteínas pertenecientes a diversas vías de señalización intracelular (PathScan® Intracellular Signaling Array Kit, no. de catálogo: 7323S Cell Signaling)	37
VI.6.2 Análisis de la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB inducida por el medio condicionado a diferentes concentraciones	39
VI.6.3 Análisis de la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB después del uso del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en el medio condicionado	41
VI.6.4 Determinación del mecanismo de transactivación del receptor TrkB por medio del EGFR mediante el análisis del bloqueo de la fosforilación del receptor TrkB, pero no del EGFR después del uso de los inhibidores de la Src, PP1 y PP2	42
VI.7 Diagrama de flujo	43
VII. RESULTADOS	43
VII.1 Caracterización de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)	43
VII.2 Caracterización de los factores solubles liberados por las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)	48
VII.3 Determinación de la viabilidad de las células precursoras del hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)	50
VII.4 Determinación de la proliferación de las células precursoras del hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)	53

VII.5 Determinación de la diferenciación de las células precursoras del hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)	55
VII.6 Determinación de las vías de señalización activadas en las células precursoras del hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)	65
VII.7 Evaluación del efecto de la interleucina-6 (IL-6) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre la diferenciación de las AHPCs	69
VII.8 Evaluación de la viabilidad, proliferación y diferenciación de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE) en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-hEGF	73
VII.9 Evaluación de la fosforilación de los receptores al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y TrkB en las células precursoras del hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)	82
VIII. DISCUSIÓN	92
IX. CONCLUSIONES	101
X. PERSPECTIVAS	103
XI. REFERENCIAS	103

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Nichos neurogénicos en el cerebro adulto mamífero	2
Figura 2. Efectos biológicos que pueden ocasionar los factores solubles liberados por las células troncales.....	5
Figura 3. El epitelio olfatorio.....	9
Figura 4. Neurogénesis en el OE	11
Figura 5. Resumen de las células troncales adultas.....	14
Figura 6. Tratamientos realizados con las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia del medio condicionado de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE).	31
Figura 7. Caracterización de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio (hNS/PCs-OE).	45
Figura 8. Diferenciación de las	47
Figura 9. Determinación de los factores solubles secretados por las hNS/PCs-OE.....	50
Figura 10. Evaluación de la viabilidad de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 24 y 48 horas.	52
Figura 11. Evaluación de la proliferación (incorporación de BrdU) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 24 y 48 horas.	54
Figura 12. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio precursor y proliferativo (Nestina y pH3, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 48 horas.....	56
Figura 13. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio neuronal y astrocítico (MAP2 y GFAP, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 48 horas.....	58
Figura 14. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio precursor y proliferativo (Nestina y pH3, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 96 horas.....	59
Figura 15. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio neuronal y astrocítico (MAP2 y GFAP, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 96 horas.....	61
Figura 16. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio precursor y proliferativo (Nestina y pH3, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 7 días.	62
Figura 17. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio neuronal y astrocítico (MAP2 y GFAP, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo	

adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 7 días	64
Figura 18. Fosforilación de las proteínas Erk, Stat3, Akt, PRAS 40 y Gsk-3β en las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 5 minutos.	66
Figura 19. Fosforilación de las proteínas Erk, Stat3, Akt, PRAS 40 y Gsk-3β en las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 48 horas.....	68
Figura 20. Determinación de la cantidad de factor de crecimiento epidérmico (EGF) presente en el medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE.....	70
Figura 21. Determinación de la cantidad de interleucina 6 (IL-6) presente en el medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE.	71
Figura 22. Efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la interleucina-6 (IL-6) en la diferenciación de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) a las 48 horas de iniciado el tratamiento.....	72
Figura 23. Efecto del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en la viabilidad de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones (MC 15 y 100%) del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE.....	74
Figura 24. Efecto del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en la proliferación de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones (MC 15 y 100%) del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE.....	76
Figura 25. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio precursor y proliferativo (Nestina y pH3, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en las diferentes diluciones del medio condicionado (MC 15 y MC 100%) proveniente de las hNS/PCs-OE durante 48 horas.....	80
Figura 26. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio neuronal y astrocítico (MAP2 y GFAP, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en las diferentes diluciones del medio condicionado (MC 15 y MC 100%) proveniente de las hNS/PCs-OE durante 48 horas.....	82
Figura 27. Cinética de fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células precursoras de hipocampo de ratón adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones (MC 15, 50 y 100%) del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE.	83
Figura 28. Cinética de fosforilación del receptor cinasa asociado a tropomiosina b (TrkB) en las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones (MC 15, 50 y 100%) del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE.	85
Figura 29. El anticuerpo neutralizante anti-hEGF bloquea la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB inducidos por el medio condicionado.....	86
Figura 30. Efecto de los inhibidores de la Src, PP1 y PP2, en la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB en presencia del medio condicionado a los 5 minutos de iniciados los tratamientos.....	88
Figura 31. Efecto de los inhibidores de la Src, PP1 y PP2, en la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB en presencia del medio condicionado a los 45 minutos de iniciados los tratamientos.	90

ABREVIATURAS

AHPCs	Células precursoras de hipocampo adulto
BrdU	Bromodeoxiuridina
MC	Medio condicionado
DAPI	Dihidrocloreuro de 4',6-diamidino-2-fenilindol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
bFGF	Factor de crecimiento para fibroblastos básico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
hNS/PCs-OE	Células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano
IL-6	Interleucina - 6
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos tipo 2
NPCs	Células precursoras neurales
OE	Epitelio olfatorio
PP1/PP2	Inhibidores de la familia Src
OB	Bulbo olfatorio
H3S10P (pH3)	Fosfo histona 3
SGZ	Zona subgranular
Stat-3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
Src	Proteína no receptora con actividad de tirosina cinasa
SVZ	Zona subventricular
TrkB	Receptor de tirosina cinasa B
WST-1	Sales de tetrazolio solubles en agua

RESUMEN

El hipocampo es una región importante en el cerebro por dos razones: 1) su función relacionada con las actividades cognitivas y 2) por la presencia de células troncales neurales que, de manera habitual o estimulada, dan origen a nuevas neuronas las cuales son relevantes para el aprendizaje y la memoria. La manera de estimular la neurogénesis en el hipocampo incluye la estimulación eléctrica, el trasplante de células troncales de otro origen y recientemente con el medio condicionado obtenido de las células troncales. Se ha considerado al epitelio olfatorio como una fuente de células troncales/progenitores neurales, pueden aislarse con cierta facilidad y han sido propuestas como alternativa en las terapias de reemplazo autólogo, sin embargo; a la fecha, no existen evidencias claras que muestren la forma en la que las células del epitelio olfatorio pueden contribuir en el proceso neurogénico del hipocampo. De tal modo que, el objetivo de este proyecto fue identificar los factores solubles contenidos en el medio condicionado de las células troncales/progenitores neurales del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE) y su efecto sobre las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) *in vitro*. Los resultados obtenidos indicaron que el medio condicionado tuvo un efecto sobre la viabilidad, proliferación y diferenciación de las AHPCs. El medio condicionado favoreció la activación de vías de señalización relacionadas con la proliferación y el mantenimiento del estadio precursor, así como con la diferenciación astrocítica. Estos efectos fueron parcialmente generados por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y por la interleucina-6 (IL-6). Además, algunos de los receptores fosforilados involucrados en la activación de las vías de señalización fueron el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor de tirosina cinasa B (TrkB). Esta activación ocurrió a través de un mecanismo de transactivación causada por la fosforilación del EGFR por EGF y la subsecuente fosforilación de Src. El efecto sobre proliferación y mantenimiento del estadio precursor fue prevenido con el anticuerpo neutralizante anti-hEGF.

ABSTRACT

The hippocampus is an important region in the brain for two reasons: 1) its function related to cognitive activities and 2) the presence of neural stem cells that, in a habitual or stimulated way, give rise to new neurons that are relevant for the learning and memory. The way to stimulate neurogenesis in the hippocampus includes electrical stimulation, transplantation of stem cells from another source and recently with conditioned medium obtained from stem cells. Olfactory epithelium has been considered as a source of neural stem / progenitor cells that can be easily isolated and have been proposed as an alternative for autologous replacement therapies. However, to date there is no clear evidence to show how olfactory epithelial cells can contribute to the neurogenic process of the hippocampus. Thus, the objective of this project was to identify the soluble factors contained in the conditioned medium of the neural stem / progenitor cells of the human olfactory epithelium (hNS / PCs-OE) and its effect on adult hippocampal precursor cells (AHPCs) *in vitro*. The results indicated that the conditioned medium had an effect on the viability, proliferation and differentiation of AHPCs. The conditioned medium favored activation of signaling pathways related to proliferation and maintenance of the precursor stage, as well as to astrocytic differentiation. These effects were partially generated by epidermal growth factor (EGF) and interleukin-6 (IL-6). In addition, the phosphorylated receptors involved in the activation of signaling pathways were the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the receptor tyrosine kinase B (TrkB). This activation occurred through a transactivation mechanism caused by the phosphorylation of EGFR by EGF and the subsequent phosphorylation of Src. The effect on proliferation and maintenance of the precursor stage was prevented with anti-hEGF neutralizing antibody

I.- INTRODUCCIÓN

I.1 Nicho neurogénico y neurogénesis

Las células troncales tienen dos propiedades esenciales: auto-renovación y multipotencialidad. La autorrenovación es la habilidad de generar una célula hija idéntica y multipotencialidad es la capacidad de generar todos los tipos celulares de un tejido.

Los microambientes especializados o nichos permiten la autorrenovación permanente de las células troncales y la producción de células diferenciadas. Es importante destacar que las células troncales interactúan y participan en el nicho.

Las interacciones célula-célula y los factores solubles son elementos clave que permiten el control de la activación de las células troncales, así como la diferenciación de su progenie. Una característica de muchos nichos de células troncales es su íntima asociación con las células endoteliales, las cuales regulan la autorrenovación y diferenciación de las células troncales. Dentro del nicho, las células troncales frecuentemente se anclan a una lámina basal o células estromales que, a su vez, pueden proveer de un sustrato para la división celular orientada. La lámina basal también es un regulador importante de la accesibilidad de los factores de crecimiento y otras señales, tales como moléculas asociadas a la matriz extracelular y glicoproteínas, las cuales pueden concentrar y secuestrar factores en formas activas o inactivas [1]

Las células troncales neurales persisten en el cerebro adulto de los mamíferos y presentan las dos propiedades fundamentales de las células troncales; son capaces de autorrenovarse además de ser multipotentes, generando neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. A pesar de poder ser cultivadas *in vitro*, su biología se encuentra definida por su nicho *in vivo*.

La neurogénesis ocurre principalmente en dos regiones del cerebro de mamífero adulto: 1) el sistema formado por la zona subventricular (SVZ), adyacente a los ventrículos laterales y el bulbo olfatorio, así como 2) la zona subgranular (SGZ) de la formación hipocámpica. Dichas regiones o nichos neurogénicos tienen la misión de dirigir la producción neuronal y mantener la multipotencialidad de las células troncales para así proteger el curso de la neurogénesis de aquellas posibles señales inhibitoras externas. Aunque algunos de sus componentes están siendo determinados, es claro que ambos tipos celulares, tanto no neuronales como neuronales, son piezas clave de esta misión.

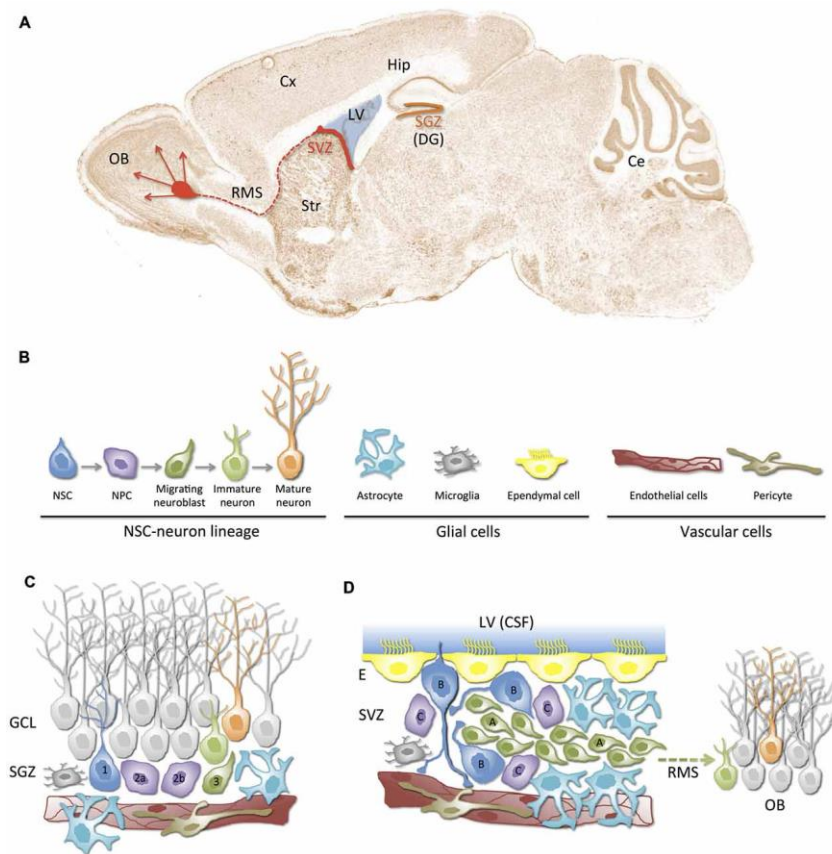


Figura 1. Nichos neurogénicos en el cerebro adulto mamífero. A) Representación esquemática de las regiones neurogénicas (nichos) en un corte sagital del cerebro adulto murino: La zona subgranular (SGZ, naranja) en el giro dentado del hipocampo, y en la zona subventricular (SVZ, rojo) en la pared lateral de los ventrículos laterales. Las nuevas neuronas derivadas de la SVZ migran hacia el bulbo olfatorio (OB) a

través de la vía migratoria rostral (RMS). B) Componentes celulares de los nichos neurogénicos. Además de los linajes neuronales originados a partir de las células troncales neurales (NSC), los nichos neurogénicos están conformados de células gliales (astrocitos, microglia y células endoteliales) y células vasculares (células endoteliales, pericitos). C, D) Ilustración de los nichos neurogénicos de la SGZ y SVZ. Se representa la citoarquitectura y las relaciones entre los componentes celulares del nicho. Los diferentes tipos celulares (color y forma) corresponden a los representados en B) Se observa la proximidad entre los vasos sanguíneos y las NSCs/NPCs en ambos nichos. C) El nicho neurogénico de la SGZ. Las células de la glía radial tipo 1 corresponden a las NSCs que dan lugar a las NPCs tipo 2a/b, las cuales se diferencian a los neuroblastos tipo 3. Los neuroblastos migran guiados por los astrocitos y llegan a ser neuronas maduras que finalmente se integran a la capa celular granular (GCL). D) El nicho neurogénico de la SVZ. Este nicho se encuentra debajo del revestimiento endotelial (E) del LV. Está compuesto de las células quiescentes tipo B (NSCs), las cuales pueden activar y generar las NPCs tipo C que proliferan rápidamente y generan neuroblastos tipo A. Los neuroblastos migran grandes distancias a lo largo de la RMS hacia el OB donde ellas maduran hacia interneuronas. Se observa que un túnel de astrocitos y un andamiaje de vasos sanguíneos guían la migración de neuroblastos. Ce, cerebelo; Cx, corteza; Str, estriado (*Tomado de Bátiz, LF. et.al. 2016*).

I.1.1 Nicho neurogénico: interacciones célula-célula

Los astrocitos han sido considerados como células de soporte dentro del cerebro. Sin embargo, en trabajos recientes, se ha mostrado que pueden ser reguladores dinámicos de muchos procesos, incluyendo sinaptogénesis y eficacia sináptica [2]; así como el mantenimiento de la neurogénesis adulta [3]. Dentro de los nichos neurogénicos adultos, los astrocitos se encuentran preparados para sentir y actuar como reguladores del ambiente. Tienen núcleo redondeado y cuerpo celular del cual parten prolongaciones llamadas "procesos pediculares o pies" que envuelven y contactan a todos los tipos celulares y estructuras del nicho [4], incluyendo vasos sanguíneos y la lámina basal [5], permitiéndoles integrar diversas señales de muchas fuentes. Los astrocitos también contribuyen al nicho a través de señales mediadas por contacto y por factores solubles secretados [6].

Un componente importante del nicho neurogénico adulto es la vasculatura. Dentro de la SGZ, la neurogénesis ocurre en proximidad a los vasos sanguíneos, con grupos proliferativos conteniendo progenitores neurales, células gliales, nuevas neuronas y células endoteliales [7], sugiriendo que la neurogénesis y la angiogénesis son procesos coordinados. En realidad, las señales comunes, las cuales son activas en los nichos neurogénicos adultos, regulan el desarrollo de la vasculatura y el sistema nervioso [8]. De esta manera, la angiogénesis y la neurogénesis se interconectan y probablemente se influyen mutuamente en las regiones neurogénicas adultas.

Un factor común que regula la angiogénesis y neurogénesis es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el cual está implicado en la neurogénesis de la SVZ y SGZ [9, 10]. Un grupo de factores activos en los nichos de las células troncales adultas también regula la angiogénesis, entre los cuales se encuentran sonic hedgehog (Shh), las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), efrinas, el factor de crecimiento para fibroblastos básico (bFGF), óxido nítrico y eritropoyetina [8].

I.1.2 Nicho neurogénico: factores solubles

Las proteínas secretadas son las principales moléculas para la comunicación intercelular. Estas proteínas participan en la mayoría de los procesos fisiológicos, tales como señalización celular, diferenciación, invasión, metástasis, adhesión celular, angiogénesis y apoptosis [11].

Dichas proteínas son secretadas constitutivamente o de manera regulada por las células [12]. En la secreción regulada, éstas son almacenadas dentro de vesículas y su liberación es estimulada por una señal específica [13].

Estas proteínas son transportadas a través de la vía de secreción retículo endoplásmico-aparato de Golgi. Tales proteínas contienen una secuencia señal que dirige a los ribosomas durante la síntesis de un polipéptido naciente hacia el retículo endoplásmico rugoso. La cadena polipeptídica

creciente es trasladada al lumen del retículo endoplásmico en donde es sometida a un procesamiento post-traducciona. Finalmente, las proteínas maduras y activas son liberadas de las células por exocitosis [14].

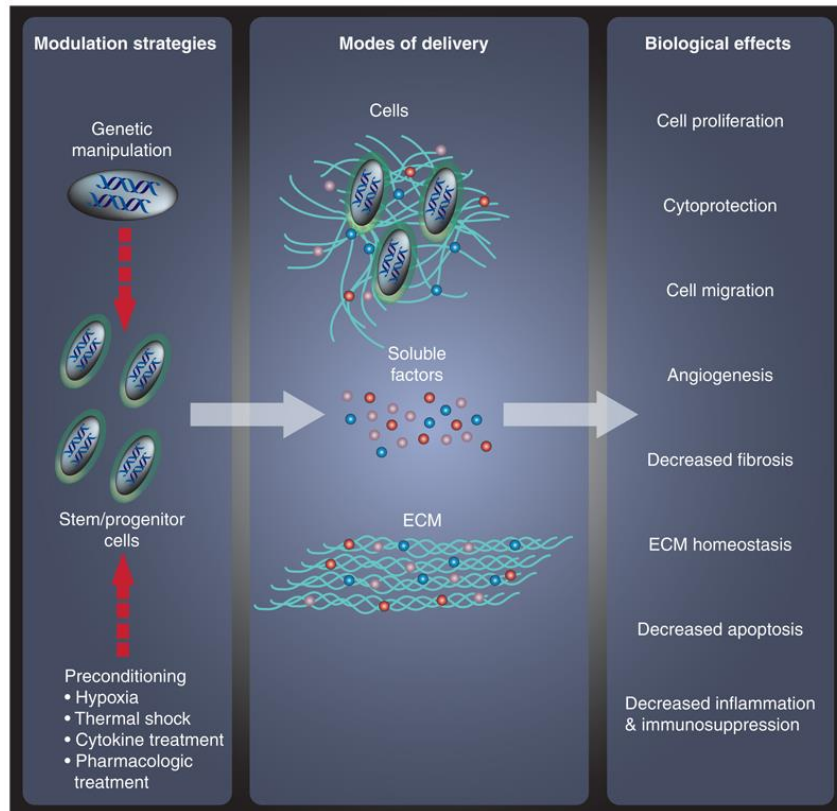


Figura 2. Efectos biológicos que pueden ocasionar los factores solubles liberados por las células troncales. Las acciones paracrinias de las células troncales pueden ser moduladas y administradas de diferentes maneras para evocar una variedad de respuestas biológicas (Tomado de Baraniak, PR, et al. 2010).

Ciertos reguladores de la respuesta inmune, crecimiento celular, diferenciación y angiogénesis que son secretados involucran a la interleucina 1 β , el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) o galectinas, éstas no tienen la secuencia señal por lo que no son secretados a través de la vía retículo endoplásmico-Golgi. Dichas proteínas son exportadas a través de una vía de secreción no convencional [15]. La secreción no convencional puede ser mediada por un traslado de proteínas con una conformación plegada, tal es el caso de bFGF [16], o pueden ser exportadas a través de

vesículas. La mayoría de las células secretan grandes cantidades de micro- y nano vesículas. Los exosomas se definen como vesículas membranosas con un diámetro de 30-100 nm. Se forman por la invaginación de vesículas endolisosomales para formar cuerpos multi-vesiculares. Se liberan al espacio extracelular cuando el cuerpo multi-vesicular se fusiona con la membrana plasmática. Todos los exosomas de los mamíferos comparten algunas características comunes tales como la estructura (capa bilipídica), el tamaño, la densidad y la composición global de la proteína. Los exosomas secretados son entidades biológicamente activas que son importantes para una variedad de vías, tales como Wnt y Shh [17]. Estas vesículas transfieren tanto proteínas como ARNs funcionales a otras células, mostrando un papel importante en la comunicación intercelular [18]. Los exosomas aislados de células troncales mesenquimales (MSCs) tienen aplicaciones prometedoras en la medicina regenerativa ya que podrían administrarse local o sistémicamente para mimetizar el efecto de las células parentales, o ser aplicados para la liberación de miRNAs terapéuticos u otras moléculas reguladoras [19].

Los factores neurotróficos mantienen la sobrevivencia neuronal y el crecimiento axonal. Un ejemplo serían los factores secretados por las OECs (células envoltantes olfatorias), tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), VEGF, y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), los cuales han sido extensamente estudiados para determinar algún potencial que pudieran tener en la promoción de la plasticidad cerebral y un aumento en la recuperación funcional en los modelos de accidente cerebrovascular en animales.

I.2 Células precursoras del epitelio olfatorio

I.2.1 El epitelio olfatorio

El epitelio olfatorio (OE) se encuentra en el septum nasal y en una serie de turbinados en la región posterior de la cavidad nasal. Se divide en tres capas: una capa apical, la cual contiene a las células de soporte, una capa media, la cual contiene neuronas sensoriales maduras e inmaduras, y una capa basal, la cual contiene células basales globosas y horizontales.

Las células de soporte son de tipo glial que extienden sus procesos de la superficie a la lámina basal del epitelio. Estas células fagocitan neuronas sensoriales olfatorias muertas.

Las neuronas sensoriales olfatorias (OSNs) son células bipolares que extienden una sola dendrita ciliada a la superficie epitelial y proyectan un solo axón no mielinizado al bulbo olfatorio. Las OSNs pueden identificarse por la expresión de diferentes proteínas. Por ejemplo, tanto las OSNs maduras como inmaduras expresan la molécula de adhesión celular neural (NCAM) pero sólo las OSNs maduras expresan a la proteína marcadora olfativa (OMP). Las OSNs inmaduras también expresan a la proteína asociada a crecimiento de 43 kDa (GAP-43). Los axones de las OSNs maduras y sus células envoltentes (gliales) forman haces que van de la zona anterior a la posterior en la lámina propia del epitelio y proyectan hacia el bulbo olfatorio, donde hacen sinapsis con las células mitrales, formando el glomérulo.

Las células basales del epitelio olfatorio se pueden subdividir en dos tipos celulares, lo anterior basándose en morfología celular y en la expresión de marcadores específicos [20]. Las células basales horizontales (HBC), las cuales son células lisas, con núcleo alargado, se tiñen oscuras con azul de toluidina y proliferan en una tasa baja. Se encuentran en lo más profundo del epitelio olfatorio, en una sola capa que está en contacto directo con la lámina basal. Las células horizontales son las únicas células en el epitelio olfatorio que expresan citoqueratina 5 y 14 (K5 y K14) [21]. Las otras células son las células basales globosas (GBC), tienen el núcleo redondo y se tiñen ligeramente con azul de toluidina [20]. Las GBCs no expresan citoqueratinas,

pero expresan NCAM. Dichas células se encuentran encima de las HBCs y son la principal población proliferativa en el epitelio olfatorio. Esta población contiene a las células progenitoras que se dividen y dan origen a las neuronas sensoriales olfatorias [20]. Estas progenitoras expresan secuencialmente a los genes proneuronales *Mash1* (denominadas células progenitoras GBC o GBCprog) y *Ngn1* (denominadas células precursoras neuronales inmediatas GBC o GBCinp) [22].

Las glándulas de Bowman se sitúan en la mucosa olfatoria, por debajo del epitelio olfatorio, en la lámina propia, un tejido conectivo que también contiene fibroblastos, vasos sanguíneos, y los haces de los axones de las neuronas olfatorias.

Las glándulas de Bowman consisten en ácinos y ductos que se extienden de la lámina propia a través del epitelio para liberar secreciones mucosas en la superficie apical. La capa mucosa cubre el epitelio olfatorio, la cual es producida por las glándulas de Bowman y por las células de soporte, y se piensa que crea un ambiente óptimo para la función de las OSNs [23].

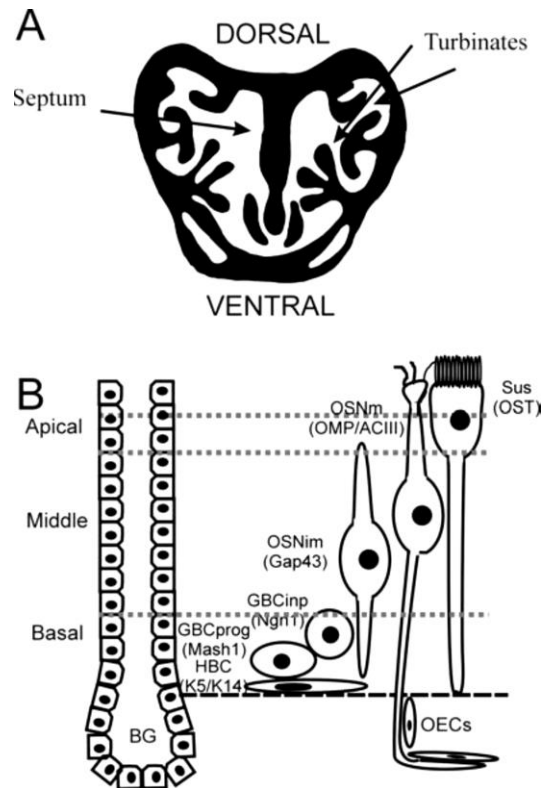


Figura 3. El epitelio olfatorio. (a) Diagrama de la sección coronal de la cavidad nasal del ratón en donde se indica tanto al septum como los turbinados. (b) Representación del epitelio olfatorio el cual se encuentra poblado por células de soporte (Sus), neuronas sensoriales olfatorias maduras e inmaduras (OSNm y OSNim, respectivamente), dos tipos de células basales globosas (GBC), las precursoras neuronales inmediatas y las células progenitoras (GBCinp y GBCprog, respectivamente), las células basales horizontales (HBC), las células envoltoras olfatorias [17] y las células de la glándula de Bowman (BG). Algunos de los marcadores celulares específicos se muestran entre paréntesis: OMP (proteína marcadora olfativa), OST (sulfotransferasa olfatoria), GAP-43 (proteína asociada a crecimiento de 43 kDa), *Ngn1* (neurogenina-1), *Mash1* (homólogo mamífero de achaete-scute 1), K5/K14 (queratina 5 y 14) (Tomado de Malnic, B. y Armelin-Correa, L. 2010).

I.2.2 Neurogénesis en el epitelio olfatorio

El epitelio olfatorio proporciona uno de los pocos lugares accesibles para el estudio de la neurogénesis en el sistema nervioso adulto. Las OSNs están expuestas a patógenos y sustancias tóxicas presentes en el ambiente por lo que tienen que ser frecuentemente reemplazadas. Estas neuronas son

reemplazadas por células troncales que se diferencian y cuya ubicación se encuentra en la región basal del epitelio [20].

Después del nacimiento y posteriormente en la etapa adulta, tres tipos celulares (HBCs, GBCs y OSNs) comprenden el linaje de las OSNs, dentro del epitelio olfatorio pseudoestratificado. Las HBCs y GBCs se localizan en la capa basal interna del OE, la cual es adyacente a la lámina basal [20].

Diversos grupos han identificado células en la región basal del OE que parecen dar origen a células neuronales y no neuronales. Se ha sugerido que las HBCs podrían ser las células progenitoras multipotentes del OE debido a que muestran características que son compartidas por células troncales de otras regiones del cuerpo.

En otros estudios también se ha identificado que las células de la región basal del OE que dan origen a neuronas parecen ser las GBCs, las cuales son una población heterogénea constituida por células de amplificación transitoria y precursoras neuronales inmediatas tardías (INPs). Las células de amplificación transitoria, las cuales se piensa que son la progeñe directa de las células troncales, abarcan una población intermedia de progenitoras comprometidas que tienen una capacidad de autorrenovación más baja que las células troncales; sin embargo, tienen una mayor probabilidad de iniciar una diferenciación terminal después de muchas divisiones celulares. Así, las células de amplificación transitoria cumplen la misión de incrementar el número de células diferenciadas producidas por cada ciclo de división de las células troncales.

Después de una o más divisiones, las INPs salen del ciclo celular y se diferencian a OSNs inmaduras, las cuales se localizan inmediatamente apicales a las GBCs, en la región intermedia del OE. Las OSNs inmaduras son células bipolares que expresan β III-tubulina, GAP43, proteína neuronal asociada al crecimiento (SCG10) y NCAM. El desarrollo de estas células a

OSNs implica la generación de una dendrita y un axón, los cuales proyectan a las superficies apical y basal, respectivamente.

Los axones de las OSNs al salir de la parte basal del OE forman fascículos y atraviesan la placa cribiforme para formar la capa exterior de los bulbos olfatorios [24]. Al llegar a los OBs, los axones dejan de formar parte de los fascículos y se dirigen a diferentes regiones terminando en estructuras llamadas glomérulos.

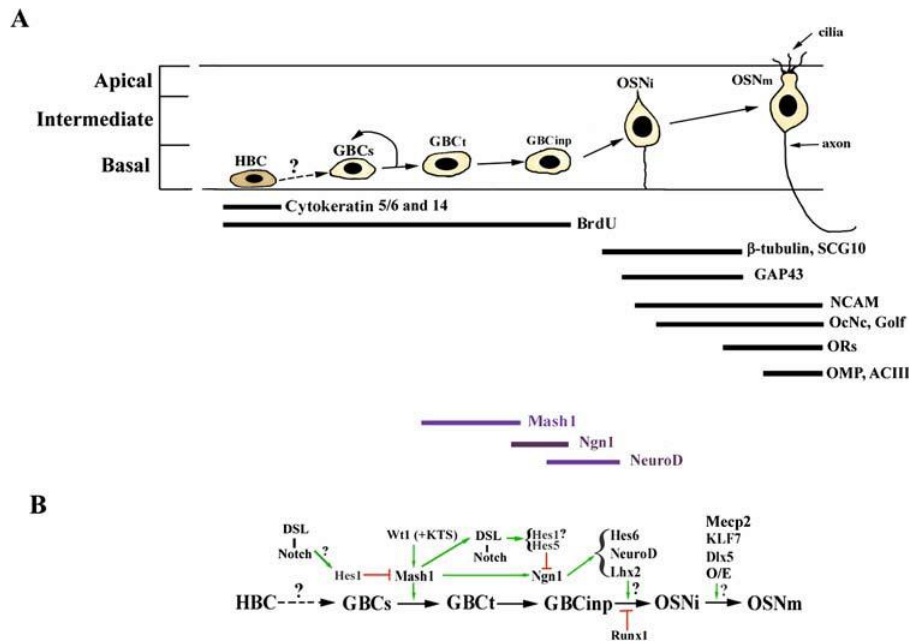


Figura 4. Neurogénesis en el OE. (A) Tres distintos tipos celulares (HBCs, GBCs y OSNs) comprenden el linaje celular de las OSNs. Dichos tipos celulares pueden distinguirse en base a fenotipos morfológicos y antigénicos, además de su localización en el epitelio olfatorio con respecto a la lámina basal. Actualmente se han estudiado sólo tres factores de transcripción (Mash1, Ngn1 y NeuroD) lo suficiente como para conocer el estadio en el cual las células del linaje de las OSNs expresan cada factor. (B) modelo de la regulación transcripcional de neurogénesis en el OE. →: incrementa/promueve; ⊥: reprime/inhibe; ?: incierto. *Abreviaturas:* ACIII – adenil ciclase tipo III; BrdU – bromodesoxiuridina; DSL – Delta, Serrate, y LAG-2 familia de ligandos de Notch; GAP43 – proteína asociada a crecimiento de 43 kDa; GBCs – células troncales basales globosas; GBCt – células basales globosas de amplificación transitoria; GBCinp – células basales globosas precursoras neuronales inmediatas; Golf – proteínas G olfatorias; HBC – células basales horizontales; NCAM – molécula de adhesión celular neural; OeNc – canal olfativo activado por nucleótido cíclico;

OE – epitelio olfatorio; OMP – proteína marcadora olfativa; ORs – receptores a odorantes; OSNi – neurona sensorial olfatoria inmadura (*Tomado de Nicolay, D.J., et.al. 2005*).

Los mecanismos de regeneración del epitelio olfatorio en humanos no están tan bien dilucidados como en el caso de roedores. Aunque el epitelio olfatorio humano es similar al del roedor con respecto a su composición celular y molecular, hay algunas diferencias, lo cual sugiere que la neurogénesis de las OSNs en humanos puede diferir de la de los roedores.

Primero, las diferencias moleculares y morfológicas que existen entre las GBCs y HBCs en roedores no se encuentran en los humanos. En humanos, las células adyacentes a la lámina basal no muestran diferencias morfológicas de las células localizadas encima de ellas. Todas las células de la capa basal son redondas y se parecen a las GBCs de los roedores, mientras que ninguna célula muestra características morfológicas de las HBCs de roedor. Además, a diferencia de lo observado en roedores, todas estas células tipo GBC expresan citoqueratina-5, el cual es un marcador de células epiteliales implicado en la actividad de células troncales y progenitoras.

Segundo, en humanos, la organización laminar de las neuronas inmaduras y maduras observada en roedores no existe. En roedores, las OSNs inmaduras y maduras existen en dos capas, con las OSNs inmaduras localizadas cerca de la lámina basal. En humanos, las OSNs inmaduras y maduras se encuentran dispersas a través del epitelio olfatorio.

El hecho de que las biopsias de OE humano puedan obtenerse de sujetos vivos debe contribuir al estudio de la diferenciación neuronal humana. Debido a su capacidad regenerativa y al hecho de que es fácilmente accesible por su ubicación en la cavidad nasal, el OE humano representa una fuente de progenitores neuronales mitóticamente activos, los cuales, al ser diferenciados a neuronas, podrían utilizarse en potenciales terapias de trasplante autólogo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas [25].

I.3 Células troncales adultas y terapia celular

Se ha considerado que la acción potencial de las células troncales adultas, cuando se han trasplantado al sistema nervioso humano, tiene los siguientes tres efectos relevantes:

Regeneración celular: Estudios previos han mostrado que las células troncales adultas pueden diferenciarse y migrar después del trasplante para posteriormente integrarse al tejido del huésped en modelos de lesión de médula espinal o accidente cerebrovascular. Lo anterior apoya el propósito de la terapia de reparación [26].

Neuroprotección: Una función adicional de las células troncales adultas es la propiedad neuroprotectora. Dichas células pueden liberar factores específicos, los cuales promueven la sobrevivencia y previenen la muerte celular en sitios en donde se han implantado. Algunos de los factores liberados que aumentan su biodisponibilidad son los factores neurotróficos [27].

Inmunomodulación: Hay una creciente evidencia acerca de la capacidad moduladora del sistema inmune de las células troncales adultas tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, en términos de regular la respuesta inflamatoria nociva y las condiciones inmunes fomentadas por la regeneración del tejido. Lo anterior se ha visto, por ejemplo, en una respuesta inflamatoria reducida en lesiones de médula espinal, lo cual abriría la posibilidad de una nueva modalidad en el mecanismo de acción de las células troncales adultas trasplantadas [28, 29].

I.3.1 Potenciales aplicaciones de las células troncales adultas

En algún momento se consideró que las células troncales embrionarias eran la clave para la creación de líneas celulares con propósitos terapéuticos,

debido a que fue evidente su disponibilidad en gran número, su fácil identificación además de su crecimiento en cultivo y su plasticidad.

Aun así, el uso de células troncales embrionarias presenta limitaciones legales y éticas, tales como la destrucción de embriones para obtenerlas. Aunado a lo anterior, limitaciones técnicas no previstas se han identificado: a) el rechazo hacia las células troncales embrionarias hace necesario un tratamiento inmunosupresor, b) la posibilidad que tienen estas células de inducir células de linaje tumoral. Ambas limitaciones han propiciado que varios investigadores busquen otras alternativas.

El descubrimiento de las células troncales adultas ha sido de los más importantes debido a que dichas células pueden diferenciarse en múltiples linajes, secretar factores vitales relacionados con la proliferación y la regulación inmune, así como migrar hacia sitios dañados, además de su disponibilidad y a los limitados conflictos éticos que implican su extracción y aislamiento, lo cual supone que las terapias basadas con estas células sean altamente prometedoras [30]

Las células troncales de adulto se encuentran en el cerebro, páncreas, hígado, médula espinal, sangre, músculo, piel y otros tejidos.

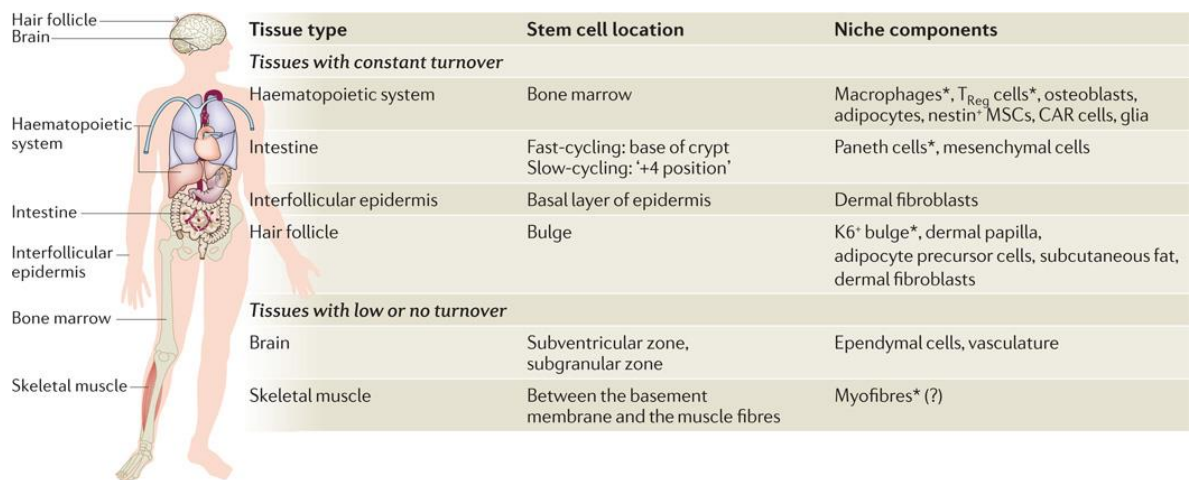


Figura 5. Resumen de las células troncales adultas. Las células troncales adultas son células no diferenciadas que se encuentran en muchos órganos en todo el

cuerpo humano. Son capaces tanto de auto-renovación como de la generación de las células diferenciadas del órgano al que pertenecen. Se dividen en dos grupos: aquellas que tienen una alta tasa de recambio y aquellas con una baja tasa. En los tejidos con alta tasa de recambio, tales como el sistema hematopoyético, intestino, epidermis interfolicular y folículo piloso, las células troncales son responsables del mantenimiento de la homeostasis y de la reparación de daño por lesión. Se han reportado también células troncales en tejidos con bajo o nulo recambio, tales como el cerebro y el tejido musculo esquelético. En músculo esquelético, las células troncales son utilizadas para la reparación después del daño. En el cerebro, las células troncales son requeridas para la generación de subtipos específicos de neuronas que migran al bulbo olfatorio (células troncales de la zona subventricular) y para la generación de nuevas neuronas bajo estímulos cognitivos (células troncales de la zona subgranular) (Tomado de Hsu, Y-C et.al. 2012).

Las células troncales del tejido olfatorio han sido propuestas como una alternativa para ser estudiadas y trasplantadas para reparar lesiones vasculares cerebrales, lesiones de la médula espinal y artritis autoinmune [31-33]

Actualmente, se ha planteado el uso de las células troncales adultas en Medicina Regenerativa por tres principales razones: a) para reorientar la estrategia y obtener un mayor éxito como resultado de considerar el linaje celular en el estado más diferenciado posible, a fin de tener mayor certeza acerca de las implicaciones funcionales de las células maduras en el tejido receptor; b) cuando el mismo origen del tejido es considerado, habría mayor probabilidad de alcanzar el objetivo terapéutico, con menor riesgo de variables involucrados con la migración y errores funcionales, una vez que la reacción de rechazo esté bajo control; c) las células troncales de adulto involucran menores objeciones éticas, comparadas con las embrionarias. [34, 35]

Considerando las posibles fuentes de células autólogas, la mucosa olfatoria es la única parte del sistema nervioso periférico que establece conexión con el sistema nervioso central y que es capaz de regenerarse permanentemente y que se encuentra fácilmente accesible con técnicas mínimamente invasivas. [36-40]

Hay muchas ventajas de los trasplantes de mucosa olfatoria. La mucosa olfatoria es una unidad estructural con características embrionarias que ofrece la posibilidad de promover tanto regeneración como reconstrucción. La remoción de parte de la mucosa olfatoria no daña permanentemente el olfato debido a que éste es un sistema de regeneración continua [41].

Aunque muchos componentes de la mucosa olfatoria pueden contribuir a su efectividad, los dos tipos celulares en la mucosa olfatoria conocidos por ser útiles en la reparación del sistema nervioso son las células progenitoras tipo troncal y las células envoltantes olfatorias (OECs). Las células progenitoras tipo troncal se dividen rápidamente y dan lugar a células de soporte o neuronas maduras. A diferencia del cerebro, las células troncales/progenitoras de la mucosa olfatoria provienen de un sistema en regeneración constante que no está expuesto a las señales inhibitorias del cerebro maduro. Por lo tanto, las células de la mucosa olfatoria pueden tener un mayor potencial para dividir y diferenciarse. El otro tipo celular importante en la mucosa olfatoria son las células troncales envoltantes. Las OECs, obtenidas del bulbo olfatorio o la mucosa olfatoria, tienen la capacidad de promover remielinización axonal y/o regeneración en la médula espinal dañada. [31, 42]

Un gran número de experimentos han mostrado una reparación parcial ya sea estructural y/o funcional de la médula espinal dañada utilizando células troncales u OECs [43] o su medio condicionado [44]

II. ANTECEDENTES

A partir del descubrimiento de la presencia de neurogénesis en el cerebro de mamíferos adultos [45, 46] y posteriormente en humanos [47], la mayoría de los estudios se han centrado en tratar de entender los mecanismos celulares y moleculares que hacen posible este fenómeno en sólo algunas regiones del cerebro.

Ahora se sabe que el proceso neurogénico endógeno tanto en el sistema zona subventricular - bulbo olfatorio, como en la zona subgranular dentro del giro dentado en el hipocampo, se debe a la presencia de ciertos elementos que hacen posible dicho proceso, dichos elementos conforman el denominado nicho o microambiente neurogénico. Los elementos van desde células, entre las que se encuentran las células endoteliales, microglia y astrocitos, además de toda la progenie generada a partir de las células troncales neurales, incluyendo a las células precursoras; proteínas de la matriz extracelular como son laminina o reelina y finalmente factores solubles liberados por los elementos celulares mencionados anteriormente.

De manera específica, el nicho neurogénico hipocámpico ha sido objeto de estudio, lo cual se debe al papel crucial que las nuevas neuronas generadas en esta región tienen en los procesos de memoria y aprendizaje además de la regulación del estado de ánimo [48, 49]. Tratando de entender la contribución de cada uno de los elementos del nicho al proceso de neurogénesis de las células troncales presentes en esta región del cerebro se ha encontrado que los astrocitos comprometen a estas células troncales a un linaje neuronal [6] además de liberar algunos factores como GDNF, NT-3, IL-1 e IL-6 que permiten la sobrevivencia de las células en diferenciación [50]. En un sistema de co-cultivo entre células progenitoras neurales y microglia se encontró que ambos tipos celulares fueron afectados, dando como resultado una regulación en la proliferación neural de las células precursoras por un lado, y por otro, una actividad fagocítica microglial, polarización fenotípica y producción de citocinas por parte de las células microgliales [51]. Sin embargo, en un análisis *in vivo*, se sugiere que la microglia inhibe la proliferación de células precursoras del hipocampo debido a la ausencia de un estímulo inflamatorio [52]. Por otro lado, se conoce que la comunicación entre células endoteliales y células progenitoras parece ser bidireccional, es decir, cada tipo celular regula la conducta del otro. Se ha mostrado que el óxido nítrico derivado de las células progenitoras induce la expresión endotelial de VEGF y BDNF. VEGF y BDNF a su vez activa la

angiogénesis de las células endoteliales cerebrales. El óxido nítrico también estimula la proliferación de las células progenitoras mediante la activación de la sintasa de óxido nítrico (NOS) endotelial. Lo anterior representaría un mecanismo de regulación recíproca entre neurogénesis y angiogénesis [53]. Finalmente, otro de los elementos del nicho neurogénico hipocámpico son las células precursoras. Reportes previos indican que estas células son capaces de liberar VEGF y activar a la microglia [54], además de liberar factor de crecimiento insulínico-2 (IGF2) para regular su propia proliferación [55].

Hasta ahora se ha buscado entender como la interacción del nicho neurogénico con las células precursoras hace permisiva la neurogénesis en el hipocampo; sin embargo, se sabe que bajo condiciones no homeostáticas hay una considerable disminución del fenómeno, por lo que se investiga si una modificación en el nicho permitiría un aumento en la neurogénesis endógena y así lograr un acercamiento al estado fisiológico. Una posible alternativa sería el uso de células precursoras exógenas para que estimulen o sean estimuladas por el microambiente hipocámpico y provoquen un mejoramiento del proceso neurogénico. Como se ha mencionado previamente, las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio provienen de un microambiente que permite su diferenciación hacia neuronas receptoras olfatorias y desde hace algunos años se demostró la presencia de neurogénesis en esta región externa del cerebro [20]. Diversos grupos han aislado células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio, las han caracterizado y utilizado con fines terapéuticos [37, 56-58]. Otra alternativa al uso de células exógenas sería el uso de los factores secretados por estas células. Diversos estudios, principalmente en células troncales mesenquimales, han mostrado, por ejemplo, la aplicación de dichas células como tratamiento potencial para el infarto de miocardio; estudios clínicos mostraron resultados prometedores a corto plazo, aunque las células troncales implantadas no migraron al miocardio infartado y se encontraron en el bazo y el hígado 72 horas después de la administración [30], lo anterior

plantea la hipótesis de que los efectos clínicos de las células troncales no se deben a la diferenciación celular sino a la liberación de los factores secretados por estas células, lo cual implicaría que el uso de tratamientos libres de células resultarían menos invasivos y con una mayor probabilidad de éxito en la terapia [59, 60]. Se ha descrito que el uso de medios condicionados provenientes de células troncales puede modificar fenómenos como angiogénesis [61], proliferación y migración de células como los fibroblastos y las células endoteliales [62] e incluso recuperar modelos como el de isquemia cerebral focal en ratas [63], además de modelos de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, en donde se utilizó medio condicionado obtenido a partir de células mesenquimales de médula ósea [64] o un modelo de la enfermedad de Alzheimer, cuya mejora cognitiva se debió a la aplicación del medio condicionado proveniente de células troncales mesenquimales de la pulpa dental [65]

III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se han aplicado clínicamente células troncales adultas obtenidas a partir de diferentes fuentes, [24, 66] la ventaja de utilizar estas células con respecto a las embrionarias radica en su poca probabilidad de causar teratomas o alguna reacción inmunológica [67], además del posible trasplante autólogo, en el cual estas células pueden ser cultivadas y aplicadas sobre el mismo paciente, lo que elude los problemas éticos que representan el uso de células troncales embrionarias [68].

Las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio tienen la cualidad de poder obtenerse de una manera poco invasiva [39]; además, si se piensa en un trasplante, éste sería autólogo, ya que fácilmente pueden obtenerse del donador y usarlas en sí mismo [32].

Varios reportes indican el uso de estas células como una alternativa en terapia celular para el tratamiento de alteraciones neurológicas [57, 58, 69], Nivet y colaboradores [58] mostraron una recuperación en el daño ocasionado al hipocampo con ácido ibuténico en un modelo murino al trasplantar células troncales obtenidas de epitelio olfatorio. Dicho efecto inicialmente se le atribuía a la diferenciación e integración de las células trasplantadas a la circuitería hipocámpica, aunque también se aprecia un efecto en el incremento de la neurogénesis endógena, por lo que este grupo no pudo determinar si la recuperación observada en su modelo provenía directamente de las células exógenas trasplantadas o de los factores que liberaron en el nicho hipocámpico.

Si bien se ha demostrado que las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano son capaces de diferenciarse e integrarse, además de estimular la neurogénesis endógena, en un modelo murino con lesión hipocámpica, poco o nada se sabe acerca de los factores que dichas células liberan y de los efectos que éstos pueden tener sobre las células precursoras de hipocampo de ratón. El determinar la naturaleza y función de los factores secretados, permitirá el desarrollo de estrategias terapéuticas para enfermedades neurodegenerativas.

IV. HIPÓTESIS

- Las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano secretan factores que son capaces de regular el proceso neurogénico de las células precursoras de hipocampo adulto

V. OBJETIVOS

V.1 GENERAL

- Determinar y caracterizar el efecto que tienen los factores secretados por las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano sobre la capacidad neurogénica de las células precursoras de hipocampo adulto

V.2 PARTICULARES

- Obtener y caracterizar a las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano.
- Determinar los factores solubles presentes en el medio condicionado de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano.
- Determinar el efecto de los factores solubles liberados por las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano sobre la capacidad neurogénica de las células precursoras de hipocampo adulto.
- Determinar los mecanismos de señalización activados por el medio condicionado sobre las células precursoras del hipocampo de adulto.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Aislamiento y caracterización de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano

- **Obtención de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano.** El protocolo de obtención de las células se basó en lo reportado por Benítez-King en 2011 y a continuación se describe: las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano se obtuvieron a partir de un exfoliado nasal, de la región del turbinado medio anterior y el septum. La muestra obtenida se disoció mecánicamente en medio de cultivo DMEM/F12, las células disociadas se cultivaron en el medio mencionado, el cual fue suplementado con suero bovino fetal a una concentración del 10%. El cultivo se monitoreó en el microscopio a partir de las dos horas de sembrada la muestra y se siguió hasta el día 14 en donde se realizó el pase correspondiente.

Se determinó la presencia de células troncales/progenitoras mediante la tinción con diversos marcadores propios de su estadio, es decir, Nestina, también de otros marcadores de células con un mayor compromiso neuronal como lo son β III tubulina y MAP2 (proteína asociada a microtúbulos tipo 2) además de un marcador de linaje astrocítico como GFAP (proteína ácida fibrilar glial) asimismo se realizó la búsqueda del marcador Ki67, como indicador del estadio proliferativo y un ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), con el mismo objetivo. A la par de lo anterior también se determinó el tiempo de duplicación de estas células.

Para demostrar la capacidad que tienen estas células de generar neuronas maduras, se siguió un protocolo de diferenciación [70], el cual implicó la aplicación de ácido retinoico, forskolina y Sonic Hedgehog (Shh) durante 7 días sin cambio de medio; posteriormente se hizo la búsqueda de las

siguientes proteínas: Nestina, Ki67, tubulina β III, GFAP y MAP2 tanto por inmunofluorescencia como por western blot.

- **Determinación del tiempo de duplicación de las células progenitoras de epitelio olfatorio humano.** El protocolo de tiempo de duplicación (TD) se basó en lo reportado en el manual de ATCC Animal Cell Culture Guide, sembrando en placas de 12 pozos 30,000 células/cm², por duplicado, levantando y contando las células con la cámara de Neubauer, como se especifica en el manual señalado previamente, cada 24hrs durante 4 días. Los números de células se graficaron contra el tiempo, obteniéndose una curva cuya regresión no lineal permitió determinar el TD experimental. El TD teórico se estableció con la siguiente fórmula:

$$TD = T \ln 2 / \ln (X_e / X_b)$$

TD: Tiempo de duplicación.

T: tiempo de duplicación.

X_b: número de células al comienzo de la incubación.

X_e: número de células al final del tiempo de incubación.

- **Ensayo de incorporación y detección de BrdU.** El ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo establecido en la hoja técnica de la casa comercial (Roche, no. de catálogo: 11 296 736 001); con las siguientes modificaciones: se cultivaron 60,000 células/cm² en una placa de 96 pozos y se dejaron creciendo durante 48 horas; la incubación con BrdU se realizó durante dos horas; se fijó con etanol acidificado a -20°C durante 20 minutos. La incubación con el anticuerpo primario (anti-BrdU, dilución 1:20) y el anticuerpo secundario (anti-ratón fluoresceinado, dilución 1:20) fue de 1 hora a 37°C para cada uno. El montaje se realizó con 10µL de medio de montaje fluorogel (Electron Microscopy Sciences, no. de catálogo: 17985-10).

- **Inmunofluorescencia.** El ensayo de inmunofluorescencia se llevó a cabo según el protocolo establecido por Kazim en 2015 [71], con las siguientes modificaciones: se sembraron 60,000 células/cm² en una placa de 96 pozos con cubreobjetos previamente colocados; se dejaron creciendo durante 48

horas, fijándolas ese mismo día. Para el ensayo de diferenciación se dejaron creciendo durante 48 horas, se realizó el tratamiento con ácido retinoico, forskolina y Shh, previamente mencionado, y las células se fijaron a los 7 días de iniciado el tratamiento. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con PBS 1X pH 7.4 – Tritón 0.2% por 30 minutos a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpo primario se realizó a 4°C durante toda la noche. Los núcleos se tiñeron con DAPI a una concentración final de 10µg/mL por 10 minutos.

Los anticuerpos primarios se utilizaron a las siguientes diluciones: anti-Nestina (Genetex, no. de catálogo GTX30671, 1:500), anti-Ki67 (abcam, no. de catálogo ab66155, 1:500), anti-GFAP (Dako, no de catálogo Z 0334, 1:1500), anti-βIII-tubulina (Promega, no. de catálogo G7121, 1:500) y anti-MAP2 (Sigma, no. de catálogo M-1406, 1:500). Los anticuerpos secundarios se utilizaron a las siguientes diluciones: anti-ratón Alexa 594 (Invitrogen, no. de catálogo A11032, 1:500) y anti-conejo Alexa 488 (Invitrogen, no. de catálogo A11034, 1:500).

- **Western blot.** Tanto para el ensayo de proliferación (48hrs) como para el de diferenciación (7 días) las células se sembraron a una densidad de 60,000 células/cm² en una placa de 6 pozos. La técnica de Western blot fue llevada a cabo según el protocolo establecido por Kazim en 2015, con las siguientes modificaciones: los lisados proteicos fueron separados en un gel de poliacrilamida al 15% y otro al 8% y transferidos a membranas de nitrocelulosa de 0.2µm (GE Healthcare, no. de catálogo: 10600006). Dichas membranas se bloquearon con leche (BioRad, no. de catálogo 170-6404) durante una hora y media a temperatura ambiente. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó toda la noche y la de los anticuerpos secundarios fue de una hora a temperatura ambiente. Para el análisis densitométrico se utilizó el software ImageLab 5.2.1.

Todos los anticuerpos primarios utilizados se diluyeron 1:1000 en leche a una concentración de 5% y 2µl de azida de sodio por ml de leche para conservarlos después de usarlos. Los anticuerpos primarios fueron los mismos que se utilizaron para la inmunocitoquímica; el anti-GAPDH (control de carga) (Genetex, no. de catálogo GTX100118, 1:2000) sólo se utilizó para esta técnica. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: anti ratón IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch, no. de catálogo 115-035-146, 1:5000) y anti-conejo IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch, no. de catálogo 111-035-144, 1:5000)

VI.2 Determinación de los factores solubles presentes en los medios condicionados de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano.

VI.2.1 Obtención de los medios condicionados de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano para el arreglo de anticuerpos

En una botella T-25 se sembraron las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano a una densidad inicial de 45 000 células/cm² y se dejaron crecer durante 4 días, los primeros 2 días fueron cultivados en medio de cultivo DMEM/F12 y suero bovino fetal al 10% después se les hizo un cambio de medio y se crecieron en medio Neurobasal + B27 + 20ng/ml de EGF + 20ng/ml de bFGF. Se incubaron durante dos días más para finalmente obtener 5ml de medio condicionado; el medio se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos, se hicieron alícuotas de 1ml y se almacenaron a -70°C.

VI.2.2 Análisis de los factores solubles contenidos en los diferentes medios condicionados mediante el uso de un arreglo precargado con 507 anticuerpos (RayBio® Label-based (L-Series) Human Antibody Array L-507 (Cat# AAH-BLM-1A-4))

Los arreglos de anticuerpos son una colección de anticuerpos de captura que se fijan sobre una superficie sólida tal como vidrio, plástico, membrana o chip de silicio en donde se detecta la interacción entre el anticuerpo y su antígeno diana presente en la muestra previamente marcada con biotina. Dicha interacción se detecta mediante quimioluminiscencia. Los arreglos de anticuerpos se usan a menudo para detectar la expresión de proteínas de diversos biofluidos incluyendo suero, plasma, lisados de células o tejidos y sobrenadantes.

La detección de factores solubles en el medio condicionado de las hNS/PCs-OE se realizó con los arreglos de anticuerpos de la casa comercial RayBiotech siguiendo el protocolo establecido en la hoja técnica de dicha casa comercial, el cual fue el siguiente: tres ml de cada medio condicionado se dializaron (membrana con un MWCO (corte de peso molecular) de 2 K que retiene más del 90% de proteínas con una masa molecular de 2 kDa o superior) con 2 litros de PBS 1X a 4°C durante 3 horas, los 2 litros de PBS 1X se retiraron y se colocaron otros 2 litros de solución amortiguadora para continuar dializando durante 3 horas adicionales. La diálisis de las muestras se hizo debido a que se eliminan sustancias de pequeño peso molecular tales como agentes reductores, reactivos de marcaje o conservadores que podrían interferir con alguna etapa posterior del presente procedimiento. Terminada la diálisis, 2ml de la muestra se transfirieron a un tubo nuevo y se les agregaron 40µl del control interno (proteína recombinante que puede ser introducida en las muestras como un control para la etapa de incubación de la muestra). Una vez realizada la mezcla se adicionó el reactivo de marcaje (biotina) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con

agitación suave. Finalizada la incubación, se agregaron 5µl de la solución de paro y los 2ml de la muestra se colocaron en una columna para remover la biotina libre. Posteriormente, a la membrana con los anticuerpos se le agregaron 8ml de la muestra, previamente diluida con solución amortiguadora de bloqueo (dilución 1:5), la cual fue previamente bloqueada durante una hora a temperatura ambiente con una solución amortiguadora de bloqueo. Ésta se incubó toda la noche a 4°C con agitación suave. Una vez concluida la incubación, la muestra se decantó y a la membrana se le hicieron tres lavados con 20ml de solución de lavado 1X a temperatura ambiente y agitación durante 5 minutos. Terminados estos lavados se volvió a lavar, pero ahora con la solución de lavado II. Una vez que se decantó esta solución, se agregaron 8 ml de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) diluida 500 veces. Se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 horas. Se volvió a lavar tanto con la solución de lavado I como con la II. Finalmente se agregó la solución de detección, se incubó durante 2 minutos en agitación y se expuso durante 50 segundos al ChemiDoc XRS de BioRad. Para el análisis de los resultados obtenidos a partir de la membrana, se procedió a normalizar la intensidad de todos los puntos con respecto al control positivo presente en el arreglo. Para la obtención de las intensidades de cada punto se utilizó el programa Imagelab (BioRad)

VI.2.3 Determinación de la cantidad de EGF presente en el medio condicionado mediante el estuche comercial Quantikine®ELISA de la casa comercial R&D systems (no. de catálogo DEG00)

La determinación de la cantidad de EGF se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en la hoja técnica de la casa comercial (R&D systems), como a continuación se describe: las muestras de al menos dos diferentes medios condicionados (se obtuvieron de células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano en pases 6 y 8) se diluyeron 1:100 y 1:250, además

de incluir el medio sin diluir. Las muestras fueron diluidas en el calibrador diluyente RD6N incluido en el estuche comercial. Se retiraron las tiras adhesivas de la microplaca y se agregaron 200µl tanto de cada punto de la curva del estándar como de las muestras. Se cubrió la placa y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados de 300µl cada uno con la solución amortiguadora de lavado incluida en el estuche comercial. Después del último lavado se agregaron 200µl del anti-hEGF conjugado a HRP por pozo. La placa se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación se retiró el anticuerpo conjugado y se procedió a realizar una serie de 3 lavados de 300µl cada uno con la solución amortiguadora de lavado. Una vez concluido el último lavado se agregaron 200µl de la solución sustrato por pozo. La placa fue protegida de la luz y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Al terminar la incubación se añadieron 50µl de la solución de paro a cada pozo. Se determinó la densidad óptica de cada pozo en un lector de placas (Tecan, Sunrise) dentro de la media hora estipulada por el fabricante. La longitud de onda a la que se leyó la placa fue a 450nm con una corrección a 560nm. Después de obtener la gráfica con la curva del estándar, se procedió a determinar la concentración de EGF en cada una de las muestras.

VI.2.4 Determinación de la cantidad de IL-6 presente en el medio condicionado mediante el estuche comercial Human IL-6 Mini TMB ELISA Development de la casa comercial Peptotech (no. de catálogo 900-TM16)

La determinación de la cantidad de IL-6 se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en la hoja técnica de la casa comercial (Peptotech), como a continuación se menciona: las muestras de al menos dos diferentes medios condicionados (se obtuvieron de células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano en pases 6 y 7) se diluyeron 1:100 y 1:500. Las muestras

se diluyeron en una solución amortiguadora de ensayo (PBS 1X + 10% de suero fetal bovino). La microplaca fue recubierta con 100µl por pozo con el anticuerpo de captura anti-IL-6 e incubada a 4°C toda la noche. Al día siguiente se retiró el anticuerpo de captura y se hicieron 3 lavados con 300µl de solución amortiguadora de lavado (PBS 1X + 0.05% de TBS-Tween-20) por cada pozo en cada lavado. Al terminar el último lavado, se retiró la solución y se aplicaron 100µl por pozo de la solución amortiguadora de ensayo. La microplaca se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después del bloqueo se realizaron 3 lavados con 300µl de solución amortiguadora de lavado por pozo en cada lavado. Finalizado el último lavado, se agregaron 100µl de cada estándar (IL-6 a diferentes concentraciones) y 100µl de cada una de las muestras. Se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se hicieron 5 lavados con 300µl de solución amortiguadora de lavado por pozo en cada lavado. Al retirar la solución del último lavado, se agregaron 100µl por pozo del anticuerpo de detección + HRP-estreptavidina. La microplaca se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Cuando el tiempo de incubación terminó, se realizaron 7 lavados con 300µl de solución amortiguadora de lavado por pozo en cada lavado. Al finalizar el último lavado se añadieron 100µl de la solución sustrato (TMB + peróxido de hidrógeno) por pozo, la placa se protegió de la luz y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 50µl de solución de paro (H₂SO₄ 2N) por pozo. Se determinó la densidad óptica de cada pozo en un lector de placas (Tecan, Sunrise) dentro de la media hora estipulada por el fabricante. La longitud de onda a la que se leyó la placa fue a 450nm con una corrección a 560nm. Después de obtener la gráfica con la curva del estándar, se procedió a determinar la concentración de IL-6 en cada una de las muestras.

VI.3 Determinación del efecto de los factores solubles liberados por las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano sobre el proceso neurogénico (proliferación y diferenciación) de las células precursoras de hipocampo adulto

VI.3.1 Obtención de los medios condicionados de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano para los ensayos de proliferación y diferenciación

El medio condicionado se obtuvo como se menciona en el apartado VI.2.1 pero en lugar de hacer alícuotas y almacenarlo fue aplicado en diferentes diluciones (5, 10, 15, 20, 25, 50 y 100%) a las células precursoras de hipocampo adulto. Las diluciones se realizaron en medio Neurobasal y diferentes diluciones fueron aplicadas de acuerdo con el ensayo y tratamiento realizados, como se menciona posteriormente.

Tratamientos	Ensayos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Control proliferación (Medio neurobasal suplementado con B27 + 20ng/ml bFGF + 20ng/ml EGF) ▪ Control sin factores (Medio neurobasal suplementado con B27) ▪ Medio condicionado al 5, 10, 15, 20, 25, 50 y 100% 	<p style="text-align: center;">Viabilidad celular</p>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Control proliferación (Medio neurobasal suplementado con B27 + 20ng/ml bFGF + 20ng/ml EGF) ▪ Control sin factores (Medio neurobasal suplementado con B27) ▪ Medio condicionado al 15, 50 y 100% 	<p style="text-align: center;">Proliferación y diferenciación celular.</p> <p style="text-align: center;">Activación de vías de señalización (arreglo precargado con fosforilaciones)</p>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Control sin tratamiento (Medio neurobasal) ▪ Control EGF (Medio neurobasal + 20ng/ml EGF) ▪ Control NT-4 (Medio neurobasal + 50ng/ml NT-4) ▪ Medio condicionado al 15, 50 y 100% 	<p style="text-align: center;">Cinética de activación de los receptores EGFR y TrkB</p>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Control sin tratamiento (Medio neurobasal) ▪ Control EGF (Medio neurobasal + 20ng/ml EGF) ▪ Control EGF (Medio neurobasal + 20ng/ml EGF) + 1ug/ml de anti-hEGF ▪ Medio condicionado al 15% ▪ Medio condicionado al 15% + 0.1ug/ml de anti-hEGF ▪ Medio condicionado al 50% ▪ Medio condicionado al 50% + 0.34ug/ml de anti-hEGF ▪ Medio condicionado al 100% 	<p style="text-align: center;">Uso del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en el bloqueo de la activación de los receptores EGFR y TrkB</p>

<ul style="list-style-type: none"> ▪ Medio condicionado al 100% + 0.68ug/ml de anti-hEGF 	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Control sin tratamiento (Medio neurobasal) ▪ Control inhibidor (Medio neurobasal + PP1 + PP2) ▪ Control EGF (Medio neurobasal + 20ng/ml EGF) ▪ Control EGF (Medio neurobasal + 20ng/ml EGF) + PP1 ▪ Control EGF (Medio neurobasal + 20ng/ml EGF) + PP2 ▪ Control EGF (Medio neurobasal + 20ng/ml EGF) + PP1 + PP2 ▪ Medio condicionado al 15% ▪ Medio condicionado al 15% + PP1 ▪ Medio condicionado al 15% + PP2 ▪ Medio condicionado al 15% + PP1 + PP2 ▪ Medio condicionado al 50% ▪ Medio condicionado al 50% + PP1 ▪ Medio condicionado al 50% + PP2 ▪ Medio condicionado al 50% + PP1 + PP2 ▪ Medio condicionado al 100% ▪ Medio condicionado al 100% + PP1 ▪ Medio condicionado al 100% + PP2 ▪ Medio condicionado al 100% + PP1 + PP2 	<p>Determinación del mecanismo de transactivación del receptor TrkB a través de la activación del receptor EGFR</p>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Control proliferación (Medio neurobasal suplementado con B27 + 20ng/ml bFGF + 20ng/ml EGF) ▪ Control proliferación (Medio neurobasal suplementado con B27 + 20ng/ml bFGF + 20ng/ml EGF) + 1ug/ml de anti-hEGF ▪ Control sin factores (Medio neurobasal suplementado con B27) ▪ Medio condicionado al 15% ▪ Medio condicionado al 15% + 0.1ug/ml de anti-hEGF ▪ Medio condicionado al 100% ▪ Medio condicionado al 100% + 0.68ug/ml de anti-hEGF 	<p>Viabilidad, proliferación y diferenciación en AHPCs tratadas con el anticuerpo neutralizante anti-hEGF</p>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Control proliferación (Medio neurobasal suplementado con B27 + 20ng/ml bFGF + 20ng/ml EGF) ▪ Control sin factores (Medio neurobasal suplementado con B27) ▪ Control EGF (Medio neurobasal suplementado con B27 + 13.6ng/ml EGF) ▪ Control IL-6 (Medio neurobasal suplementado con B27 + 11ng/ml IL-6) ▪ Mezcla EGF/IL-6 (Medio neurobasal suplementado con B27 + 13.6ng/ml EGF + 11ng/ml IL-6) ▪ Medio condicionado al 100% 	<p>Determinación de los fenotipos de las AHPCs presentes después del tratamiento con EGF e IL-6</p>

Figura 6. Tratamientos realizados con las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia del medio condicionado de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE). En la columna izquierda se describen los tratamientos realizados a lo largo del proyecto y en la columna derecha los ensayos para los cuales fueron requeridos.

VI.3.2 Ensayo de viabilidad (WST-1 (Roche, no. de catálogo: 11644807001)) de las células precursoras de hipocampo adulto cultivadas en medio condicionado obtenido a partir de células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano

En una placa de 96 pozos se sembraron 30 000 células/cm² y después de 48 horas de crecimiento se les retiró el medio, se hicieron dos lavados con medio Neurobasal sin suplementar y se aplicaron los respectivos tratamientos (figura 6). Los tratamientos fueron monitoreados a las 24 y 48 horas mediante un ensayo que mide la actividad mitocondrial (WST-1 (Roche, no. de catálogo: 11644807001)) y que nos indica la viabilidad de las células en respuesta a los diferentes tratamientos. El protocolo utilizado fue el reportado por la hoja técnica del estuche comercial como a continuación se describe: una hora previa a cumplirse el tiempo de tratamiento (24 y 48 horas) se agregaron 10µl del compuesto WST-1 (Water-soluble Tetrazolium salts) a cada pozo y se incubaron durante una hora a 37°C en la incubadora. Cumplido el tiempo se procedió a leer la placa en el lector a una longitud de onda de 450nm. Con la densidad óptica obtenida se determinó el porcentaje de células viables normalizadas con el control de proliferación en ambos tiempos (24 y 48 horas).

VI.3.3 Ensayo de proliferación celular (incorporación de BrdU mediante el uso del estuche comercial Roche, no. de catálogo: 11 296 736 001) en células precursoras de hipocampo adulto cultivadas en medio condicionado obtenido de células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano

En una placa de 96 pozos se sembraron 30 000 células/cm² y después de 48 horas de crecimiento se les retiró el medio, se les realizaron dos lavados con medio Neurobasal sin suplementar y se les aplicaron los respectivos tratamientos (figura 6); se les aplicó la bromodeoxiuridina (BrdU) y se les

realizó la tinción de la misma a las 24 y 48 horas de iniciados los tratamientos utilizando el protocolo establecido en la hoja técnica de la casa comercial (Roche) del estuche como a continuación se describe: para aplicar la BrdU se aspiró el medio y se le adicionaron 100µl del homólogo de timidina por pozo a una concentración de 20µM durante una hora a 37°C. Finalizada la incubación se retiró la BrdU y se realizaron tres lavados con 100µl de la solución amortiguadora de lavado para posteriormente fijar las células con 100µl de etanol acidificado durante 20 minutos a -20°C. Se retiró el fijador y se realizaron tres lavados con 100µl de la solución amortiguadora de lavado. Se aspiró la solución del último lavado y se adicionaron 50µl de anti-BrdU (dilución 1:20). Se incubó durante una hora a 37°C. Terminado el tiempo de incubación se hicieron tres lavados con 100µl de la solución amortiguadora de lavado, se adicionaron 50µl de anti-ratón-fluoresceína (dilución 1:20), se protegió de la luz con papel aluminio y se incubó durante una hora a 37°C. Una vez concluido el tiempo de incubación se hicieron tres lavados con 100µl de la solución amortiguadora de lavado; se adicionaron 100µl de la solución con DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) para teñir núcleos, durante 3 minutos; posteriormente se realizaron dos lavados con 100µl de la solución amortiguadora de lavado. Finalmente se hizo un último lavado con agua destilada y los cubreobjetos se montaron en la laminilla con aproximadamente 10µl de medio de montaje fluorogel (Electron Microscopy Sciences, no. de catálogo: 17985-10). Se tomaron entre 10 y 12 campos por cubreobjeto (se hicieron por triplicado) por cada tratamiento y se adquirieron las imágenes en un microscopio Leica DMIRE2. Los conteos se hicieron en el programa ImageJ (NIH). Se graficaron los porcentajes de células positivas a BrdU y DAPI y solamente a DAPI para cada tratamiento en ambos tiempos.

VI.3.4 Ensayo de diferenciación en células precursoras de hipocampo adulto cultivadas en medio condicionado obtenido de células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano

Para determinar el efecto del medio condicionado sobre los fenotipos obtenidos a través de un proceso de diferenciación de las células precursoras del hipocampo adulto durante 7 días se realizó lo siguiente: se sembraron tres placas de 96 pozos con 30 000 células/cm² en cada pozo y después de 48 horas de crecimiento se les retiró el medio, se les realizaron dos lavados con medio Neurobasal sin suplementar y se les aplicaron los respectivos tratamientos (figura 6). A las 48 horas de iniciados los tratamientos se recuperaron los cubreobjetos con las células tratadas de la placa 1, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se guardaron en PBS 1X a 4°C hasta su uso; se les cambió el medio a las células de las otras dos placas manteniendo los tratamientos establecidos desde el comienzo, a las 96 horas de iniciados los tratamientos se recuperó la placa 2 con las células tratadas en los cubreobjetos, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se guardaron en PBS 1X a 4°C hasta su uso, finalmente se le cambió el medio a la última placa (placa 3) manteniendo los mismos tratamientos y, al séptimo día, se recuperaron las células en los cubreobjetos fijando con 100µl paraformaldehído al 4% para cada pozo durante 20 minutos, realizando tres lavados con 100µl PBS 1X por cada pozo y juntando las dos placas previas para dar comienzo con la inmunofluorescencia. El protocolo utilizado fue el reportado por Kazim en 2015 como a continuación se describe: las células de las tres placas fueron permeabilizadas con PBS 1X pH 7.4 – Tritón 0.2% por 30 minutos a temperatura ambiente. Para el bloqueo se retiró el PBS 1X-Tritón 0.2% y se añadieron 100µl por pozo de una solución de albúmina sérica bovina fracción V libre de inmunoglobulinas (Igs) a una concentración de 10mg/ml en PBS 1X-Tritón 0.2%, y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Al terminar la hora de bloqueo, se retiró la albúmina y se agregaron al menos 60µl por pozo de la solución de anticuerpos primarios

preparados en PBS 1X-Tritón 0.2% y albúmina a las diluciones correspondientes (Tabla 1). La incubación con los anticuerpos primarios se realizó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con 100µl de PBS 1X por pozo. Finalizado el último lavado, se agregaron 100µl por pozo de una solución de anticuerpos secundarios preparados en PBS 1X-Tritón 0.2% (tabla 1), incubando durante una hora a temperatura ambiente y protegiendo de la luz con papel aluminio. Terminada la incubación, se retiraron los anticuerpos secundarios y se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con 100µl de PBS 1X por pozo. Después de terminar el último lavado, se retiró el PBS 1X y se agregaron 100µl por pozo de una solución con DAPI a una concentración de 10µg/ml diluido en agua destilada durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se hicieron dos lavados con agua destilada y se montaron los cubreobjetos en las laminillas correspondientes con aproximadamente 10µl de medio de montaje Fluorogel por cada cubreobjeto.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en los diferentes ensayos realizados a lo largo del proyecto.

Anticuerpos	Ensayos
<ul style="list-style-type: none"> • Anti-Nestina (Genetex, no. de catálogo GTX30671, 1:500) • Anti-pH3 (H3S10P) (Millipore, no. de catálogo 06-570, 1:500) • Anti-GFAP (Dako, no de catálogo Z 0334, 1:1500) • Anti-MAP2 (Sigma, no. de catálogo M-1406, 1:500) • Anti-ratón Alexa 594 (Invitrogen, no. de catálogo A11032, 1:500) • Anti-conejo Alexa 488 (Invitrogen, no. de catálogo A11034, 1:500) 	Diferenciación en AHPCs tratadas con: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Medios condicionados ▪ Medios condicionados + anticuerpo neutralizante anti-hEGF ▪ Tratamiento con EGF e IL-6
<ul style="list-style-type: none"> • Anti-pEGFR (Tyr1173) (Santa Cruz, no. de catálogo sc-101668, 1:500) • Anti-EGFR (Santa Cruz, no. de catálogo sc-03, 1:500) • Anti-pTrkB (Tyr 705) (Santa Cruz, no. de catálogo sc-135645, 1:80) • Anti-TrkB (Santa Cruz, no. de catálogo sc-8316, 1:600) • Anti-GAPDH (Genetex, no. de catálogo GTX100118, 1:2000) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cinética de activación de los receptores EGFR y TrkB ▪ Uso del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en el bloqueo de la activación de los receptores EGFR y TrkB ▪ Determinación del mecanismo de transactivación del receptor TrkB a través de la activación del receptor EGFR

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Anti-conejo IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch, no. de catálogo 111-035-144, 1:5000) | |
|--|--|

VI.4 Determinación de los fenotipos presentes en las células precursoras de hipocampo adulto después de someterse a diferentes tratamientos (EGF, IL-6, EGF/IL-6 y medio condicionado al 100%) durante 48 horas.

Se evaluó la presencia de los fenotipos favorecidos por el tratamiento con EGF, IL-6 y la combinación de ambos factores en una ventana de tiempo establecida (48 horas). La evaluación de fenotipos se hizo como se indica en el apartado **VI.3.4**. Los tratamientos fueron los señalados en la figura 6.

VI.5 Determinación de la viabilidad, proliferación y diferenciación de las células precursoras de hipocampo adulto a las 48 horas de iniciado el tratamiento con dos concentraciones de medio condicionado (15 y 100%) en presencia del anticuerpo neutralizante anti-hEGF

La determinación de la viabilidad de las células precursoras de hipocampo adulto se hizo como se indica en el apartado **VI.3.2** sólo que con los tratamientos indicados en la figura 6. Las evaluaciones se hicieron a las 24 y a las 48 horas.

La determinación de la proliferación de las células precursoras de hipocampo adulto se hizo como se indica en el apartado **VI.3.3** sólo que con los tratamientos mostrados en la figura 6. Las evaluaciones se hicieron a las 24 y a las 48 horas.

Las determinaciones de los fenotipos presentes en las células precursoras de hipocampo adulto después de ser sometidas a varios tratamientos se hicieron como se indica en el apartado **VI.3.4**. Los tratamientos fueron los

mismos que en los indicados previamente (figura 6). La evaluación se hizo solamente a las 48 horas de iniciado el tratamiento.

VI.6 Determinación de los mecanismos de señalización activados por el medio condicionado sobre las células precursoras del hipocampo adulto

VI.6.1 Determinación de los mecanismos de señalización activados por el medio condicionado mediante el uso de un arreglo precargado con anticuerpos que reconocen la forma fosforilada o procesada de proteínas pertenecientes a diversas vías de señalización intracelular (PathScan® Intracellular Signaling Array Kit, no. de catálogo: 7323S Cell Signaling)

El PathScan® Intracellular Signaling Array Kit es un arreglo de anticuerpos que se basa en el principio de inmunoensayo tipo sándwich. El arreglo permite la detección simultánea de 18 moléculas de señalización importantes y bien caracterizadas cuando se fosforilan o se escinden. Los anticuerpos de captura se fijan por duplicado sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con nitrocelulosa. Cada estuche comercial contiene dos portaobjetos de 16 mini arreglos, lo que permite al usuario probar hasta 32 muestras y generar 576 puntos de datos en un solo experimento. El lisado celular se incubaba en la laminilla seguido por un cóctel de anticuerpos de detección biotinilados. La HRP conjugada con estreptavidina y el reactivo LumiGLO® se utilizan a continuación para visualizar los anticuerpos de detección por quimioluminiscencia.

En una placa de 6 pozos se sembraron un millón de células precursoras de hipocampo adulto por pozo, se dejaron creciendo durante 48 horas, al finalizar este período se realizó el cambio de medio y se hicieron dos lavados con medio de cultivo neurobasal sin suplementar. Después del último lavado, se dejaron en 1ml de medio de cultivo neurobasal durante una hora en la

incubadora. Una vez transcurrida la hora de incubación, se aplicaron los respectivos tratamientos (figura 6) a los 5 minutos y a las 48 horas; cumplidos los respectivos tiempos se recuperaron los extractos proteicos y se realizó el ensayo siguiendo el protocolo descrito en la hoja técnica del estuche comercial (Cell Signaling) como a continuación se indica: el medio se removió de cada pozo y las células se lavaron con 1ml de PBS 1X frío por cada pozo; se removió el PBS y se le agregó a cada pozo 100µl de la solución amortiguadora de lisis indicada en el estuche comercial (PathScan® Sandwich ELISA Lysis buffer (1X) (no. de catálogo: 7018)), suplementada con PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) a 1mM. Los pozos se incubaron en hielo con la solución de lisis durante 2 minutos, posteriormente las células fueron removidas con ayuda de un gendarme y levantadas con la micropipeta para colocarlas en un microtubo previamente rotulado. Los microtubos con extractos proteicos fueron colocados en hielo para su cuantificación. La cantidad de proteína se determinó por el método de BCA (ácido bicinonínico) adaptado a microplaca. Las muestras se diluyeron en la solución amortiguadora diluyente para tener 0.23mg/ml en 75µl de volumen final. Antes de colocar las muestras en el arreglo, éste fue bloqueado durante 15 minutos con 100µl de solución amortiguadora de bloqueo por pozo en un agitador orbital. Una vez transcurridos los 15 minutos, se retiró la solución de bloqueo y se agregaron 75µl de lisado proteico de cada muestra por pozo, el arreglo se cubrió con una cinta selladora y se dejó incubando toda la noche a 4°C en un agitador orbital. Al día siguiente se decantó su contenido y se hicieron 4 lavados con 100ul por cada pozo en cada lavado de solución amortiguadora de lavado, los lavados fueron de 5 minutos cada uno. Al finalizar el último lavado, se retiró la solución y se agregaron 75µl del cóctel de anticuerpos de detección a cada pozo, cubriendo el arreglo con una cinta selladora. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente en un agitador orbital. Terminada la incubación, se decantó el contenido de los pozos y se procedió a hacer 4 lavados de 5 minutos cada uno con 100µl de solución amortiguadora de lavado por pozo. Después de retirar la solución de

lavado se agregaron 75µl de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP) a cada pozo, cubriendo el arreglo con una cinta selladora. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. Al terminar la incubación se decantó el contenido de los pozos y se procedió a hacer 4 lavados de 5 minutos cada uno con 100µl de solución amortiguadora de lavado por pozo. Una vez realizados los lavados, el arreglo se colocó en un recipiente con 10ml de solución amortiguadora de lavado. Se preparó el sustrato (Luminol/Peróxido), el arreglo se retiró de la solución de lavado y se colocó en el sustrato o solución reveladora. El arreglo se expuso durante 60 segundos al ChemiDoc XRS de BioRad. Para el análisis de los resultados obtenidos a partir del arreglo, se procedió a normalizar la intensidad de todos los puntos con respecto al control positivo presente en el mismo. Para la obtención de las intensidades de cada punto se utilizó el programa Imagelab (BioRad).

VI.6.2 Análisis de la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB inducida por el medio condicionado a diferentes concentraciones

Para probar que el medio condicionado favorece la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB se realizó el protocolo descrito por Kazim en 2015 con algunas modificaciones como a continuación se detalla: en una placa de 6 pozos se sembraron un millón de células precursoras de hipocampo de ratón adulto por pozo y se dejaron creciendo durante 48 horas, al finalizar este período se realizó el cambio de medio y se hicieron dos lavados con medio de cultivo neurobasal sin suplementar. Después del último lavado, se dejaron en 1ml de medio de cultivo neurobasal durante una hora en la incubadora. Terminada la hora de incubación, se aplicaron los respectivos tratamientos (figura 6) a diferentes tiempos (5, 15, 45, 90 y 180 minutos). Los lisados proteicos se obtuvieron de la siguiente manera: se retiró el medio de cada pozo, se lavó con 1ml de PBS 1X frío, se absorbió el PBS 1X y se agregaron 100µl por pozo de solución amortiguadora de lisis con los

inhibidores correspondientes (RIPA 1X (PBS 1X, SDS 0.1%, NP40 1% y Deoxicolato de sodio 0.5%) + inhibidores (AEBSF 0.24mg/ml, Aprotinina 8ug/ml, Leupeptina 10ug/ml, Pepstatina A 4ug/ml, Benzamidina 5mM, β -glicerofosfato 20mM, NaF 10mM, Na_3VO_4 1mM, EDTA (pH = 8) 1mM y EGTA (pH = 8) 1mM)) en frío, las células en los pozos se incubaron con el RIPA en hielo durante 5 minutos, posteriormente, con la ayuda de un gendarme, los lisados obtenidos se removieron del pozo y se levantaron con la micropipeta para colocarlos en un microtubo previamente rotulado. Los microtubos con los lisados proteicos fueron colocados en hielo y luego almacenadas en congelación (-20°C). Al día siguiente los lisados fueron descongelados, disociados mecánicamente con la micropipeta durante al menos 10 veces y centrifugados a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos para posteriormente ser cuantificados. La cantidad de proteína se determinó por el método de BCA (ácido bicinónico) adaptado a microplaca. La concentración final de cada lisado proteico utilizado fue de 1 μ g/ μ l preparado en una solución amortiguadora de muestra (Chyn's Protocol) con un exceso de 2-mercaptoetanol y hervido durante 5 minutos para poder usarse. Se corrieron 10 μ g de cada lisado celular en geles de acrilamida al 8% en una solución amortiguadora Tris-Glicina a 100V (voltaje constante) durante 2 horas. Finalizada la electroforesis se hizo la transferencia de las proteínas separadas a una membrana de nitrocelulosa durante 3 horas a 500mA (amperaje constante). Después de la transferencia se bloqueó la membrana durante una hora y media a temperatura ambiente con 5% de leche en TBST (TBS + 0.05% Tween20) en agitación. Terminado el bloqueo, se agregó el anticuerpo primario preparado en una solución de leche al 5% en TBST con azida de sodio al 0.02%. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los indicados en la tabla 1. La membrana se colocó en un agitador durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se hicieron tres lavados con TBST de 10 minutos cada uno. Terminados los lavados, se agregó a la membrana el anticuerpo secundario diluido en TBST y se incubó

durante una hora a temperatura ambiente en agitación. El anticuerpo secundario utilizado se muestra en la tabla 1. Se retiró el anticuerpo secundario y se hicieron tres lavados con TBST. Finalmente se reveló con el sustrato (Immobilon TMWestern, Millipore, no. de catálogo: WBKLS0500, 1:1) y se expuso durante 60 segundos al ChemiDoc XRS de BioRad. Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó el programa Imagelab (BioRad). Las bandas obtenidas de los anticuerpos fosforilados (pEGFR y pTrkB) se normalizaron contra las bandas obtenidas de los anticuerpos que reconocen a la forma total (EGFR y TrkB; respectivamente) y la banda del control de carga GAPDH.

VI.6.3 Análisis de la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB después del uso del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en el medio condicionado

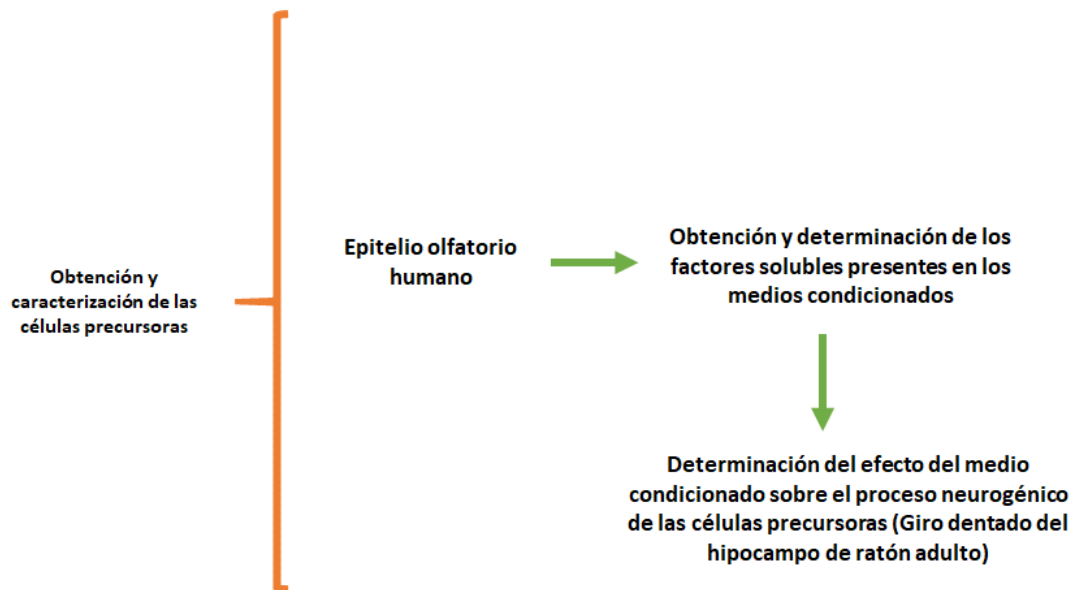
Una vez determinado el tiempo en donde se mostró el mayor grado de fosforilación en uno de los receptores (EGFR) se procedió a evaluar, en ese tiempo, la fosforilación de ambos receptores después de bloquear al ligando, presente en el medio condicionado, mediante el uso de un anticuerpo neutralizante (anti-hEGF). Para lo cual, en una placa de 6 pozos, se sembraron un millón de células precursoras de hipocampo de ratón adulto por pozo y se dejaron creciendo durante 48 horas, al finalizar este período se realizó el cambio de medio y se hicieron dos lavados con medio de cultivo neurobasal sin suplementar. Después del último lavado, se dejaron en 1ml de medio de cultivo neurobasal durante una hora en la incubadora. Además, se prepararon las diluciones del medio condicionado (15, 50 y 100%), el medio neurobasal con 20ng/ml de EGF (control positivo) y medio neurobasal sin suplementar (control negativo), a todas las diluciones y controles se les agregó el anticuerpo neutralizante anti-hEGF a la concentración indicada por la casa comercial (R&D Systems) (0.1ug/ml de anti-hEGF por cada 2ng/ml de EGF), dichas diluciones también se dejaron una hora en la incubadora.

Transcurrida la hora de incubación, se aplicaron los tratamientos (figura 6) a las células precursoras de hipocampo adulto y se dejaron el tiempo correspondiente al mayor pico de fosforilación para cada caso (5, 15 o 45 minutos) para posteriormente obtener los lisados proteicos, la cuantificación proteica y el western blot como se menciona en el apartado VI.6.2. Los anticuerpos primarios, secundarios y sus diluciones fueron los indicados en la tabla 1.

VI.6.4 Determinación del mecanismo de transactivación del receptor TrkB por medio del EGFR mediante el análisis del bloqueo de la fosforilación del receptor TrkB, pero no del EGFR después del uso de los inhibidores de la Src, PP1 y PP2

Para determinar el posible mecanismo por el cual el EGF, a través de su receptor (EGFR), transactiva al receptor TrkB se utilizaron dos inhibidores de la cinasa Src, cuya fosforilación por parte del EGFR se ha reportado que es la responsable de la fosforilación del receptor TrkB. Para probar lo anterior se realizó lo siguiente: en una placa de 6 pozos se sembraron un millón de células precursoras de hipocampo de ratón adulto por pozo y se dejaron creciendo durante 48 horas, al finalizar este período se realizó el cambio de medio y se hicieron dos lavados con medio de cultivo Neurobasal sin suplementar. Después del último lavado, algunos pozos se dejaron en 1ml de medio de cultivo neurobasal, otros con 1ml de medio de cultivo neurobasal + los inhibidores (PP1/PP2) y otros con 1ml de medio de cultivo neurobasal + un inhibidor (PP1 o PP2) durante una hora en la incubadora. Transcurrida la hora de incubación, se aplicaron los respectivos tratamientos (figura 6) Las concentraciones de los inhibidores fueron de 1 μ M para PP1 y 0.1 μ M para PP2, de acuerdo con lo reportado previamente en la bibliografía [72]. Los tiempos en los que se dejó el tratamiento fueron 5 y 45 minutos. Los extractos proteicos y los subsecuentes western blots se obtuvieron e hicieron como se indica en los dos apartados anteriores.

VI.7 Diagrama de flujo



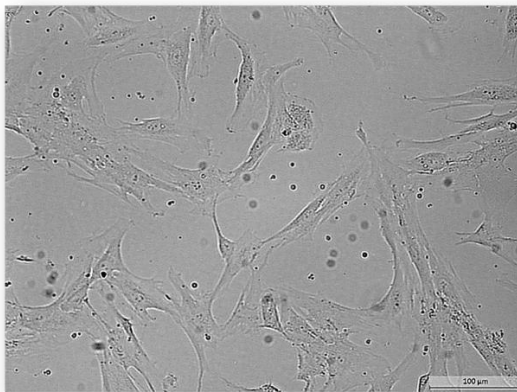
VII. RESULTADOS

VII.1 Caracterización de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)

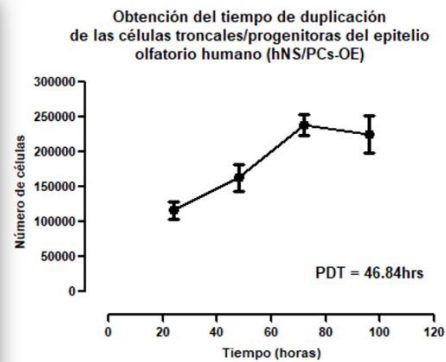
Las células troncales/progenitoras tienen por definición dos características que las determinan como tales: capacidad de autorrenovación y multipotencialidad, por lo cual nuestra primera tarea consistió en determinar si las células obtenidas a partir de un exfoliado nasal cumplían dichas características. Al observarlas en el microscopio mostraban una morfología fibroblastoide y se adhirieron a la botella de cultivo, tal y como se ha descrito en otro tipo de células troncales como lo son las mesenquimales [73], y su tiempo de duplicación experimental fue de 46 horas (figuras 7a y 7b). Posteriormente se hizo un ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina que al incorporarse al ADN permite determinar el porcentaje de células en proliferación, el método utilizado para

observar dicha incorporación fue mediante inmunofluorescencia como se muestra en la figura 7c; en esa misma figura se indica con flechas amarillas a las células que están incorporando el análogo (azul para DAPI, verde para BrdU y magenta para la presencia de ambos marcadores). En la figura 7d se muestra una gráfica en donde se indica que el porcentaje de células que se encuentran proliferando es de poco más del 10% en la ventana de tiempo en que fue determinada la incorporación de BrdU. Lo anterior nos indica que el cultivo es asincrónico, es decir, las células no se encuentran proliferando al mismo tiempo y que su porcentaje es menor en comparación con otras células precursoras como son las del hipocampo de ratón adulto, cuyo porcentaje es prácticamente del 50%. Aun así, las hNS/PCs-OE cumplen uno de los criterios para considerarlas troncales/progenitoras, es decir, la capacidad de autorrenovación.

a)



b)



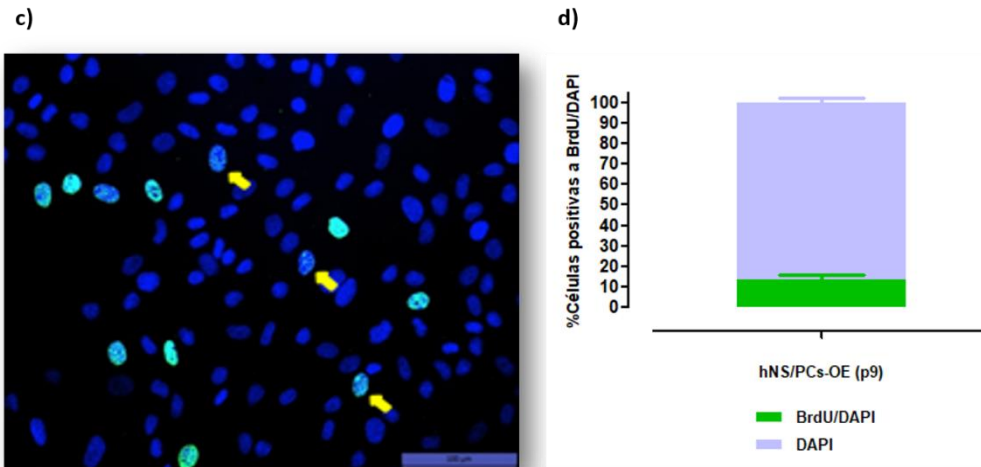


Figura 7. Caracterización de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio (hNS/PCs-OE). a) Imagen de un campo representativo de las células precursoras del epitelio olfatorio en condiciones proliferativas (campo claro). b) Gráfico obtenido a partir del número de células presentes en un tiempo determinado y de la cual se obtuvo el tiempo de duplicación de las hNS/PCs-OE. c) Imagen de un campo representativo de las hNS/PCs-OE que han incorporado BrdU (flechas amarillas). d) Representación gráfica del porcentaje de células que incorporaron BrdU con respecto al número total de células que fueron teñidas con DAPI. Las barras de escala representan 100 μ m.

El siguiente criterio para considerar a las hNS/PCs-OE precursoras es su capacidad de generar linajes o células maduras diferentes a las de su estadio, es decir su multipotencialidad. En la figura 8a se señala a las hNS/PCs-OE que muestran positividad a dos marcadores propios del estadio precursor: Nestina y Ki67, el primero es un marcador ampliamente descrito en células de estirpe neural, es decir, células precursoras neurales; el segundo, es un marcador de proliferación. En la figura 8d se muestra un cambio de morfología con respecto a la figura 8a, estas células fueron sometidas a un tratamiento de diferenciación cuyo resultado no fue la desaparición del marcador Nestina, sino el de proliferación Ki67. Al evaluar al marcador β III tubulina y GFAP en las condiciones de crecimiento (proliferación) y diferenciadas (figuras 8b y 8e, respectivamente), se observa que el primer marcador muestra una disminución en la expresión en la condición diferenciada y sobre todo un cambio morfológico y que el segundo

marcador no se encuentra en ambas condiciones, lo cual nos indica que el cultivo desde su obtención no se encuentra mezclado con otro tipo de células, específicamente astrocitos y que el estímulo para diferenciarlas no favorece este fenotipo. Finalmente, el tratamiento de diferenciación mostró que las hNS/PCs-OE pueden expresar marcadores de neuronas maduras como MAP2. Lo anterior se indica claramente en las figuras 8c y 8f, en donde se observa que bajo la condición de crecimiento (proliferación) no se expresa dicha proteína (figura 8c), y que después de someter las células al estímulo neuronal si la expresan (figura 8f). En la figura 8g se muestra un western blot con los marcadores Nestina, Ki67, β III tubulina, MAP2 y GFAP tanto en condiciones de proliferación como de diferenciación. En la figura 8h se muestra el análisis densitométrico en donde se aprecian diferencias significativas en cada una de las proteínas de acuerdo con los diferentes tratamientos a excepción de GFAP, el cual no se expresó en condición alguna. Finalmente, estos ensayos permiten afirmar que las células obtenidas a partir de un exfoliado nasal cumplen los criterios de autorrenovación y multipotencialidad, es decir proliferan y son capaces de generar al menos un linaje diferente al de su estadio inicial mediante un estímulo determinado, razón por la cual las denominamos células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano.

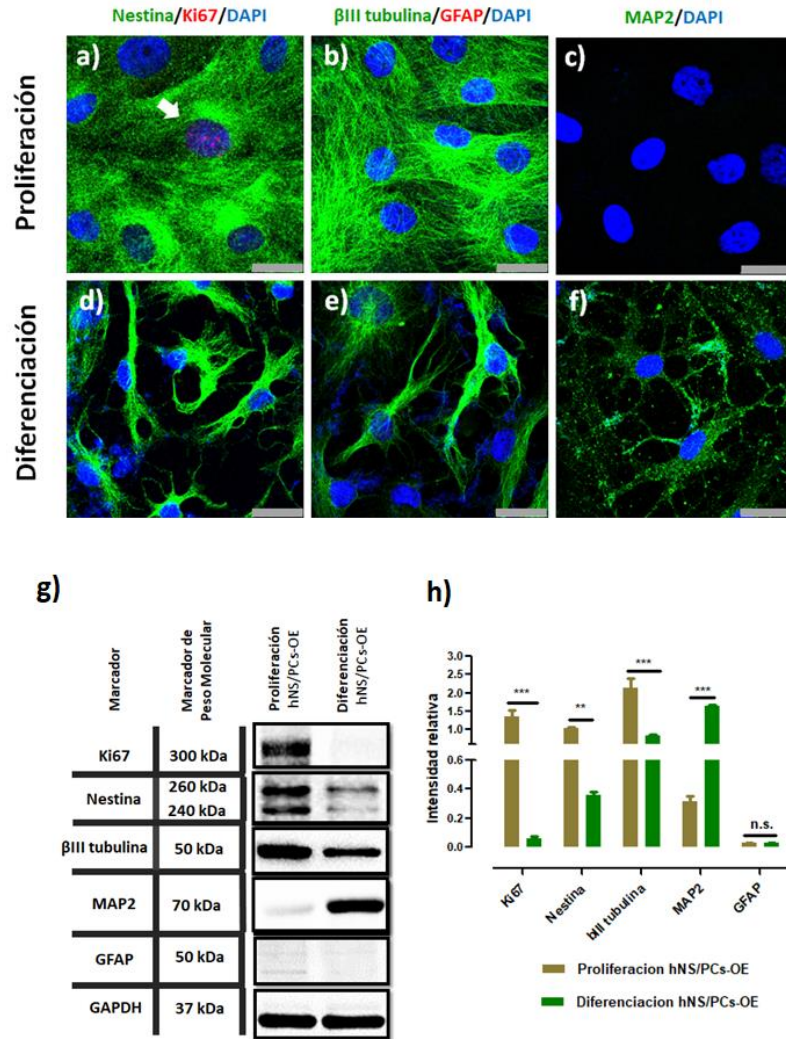


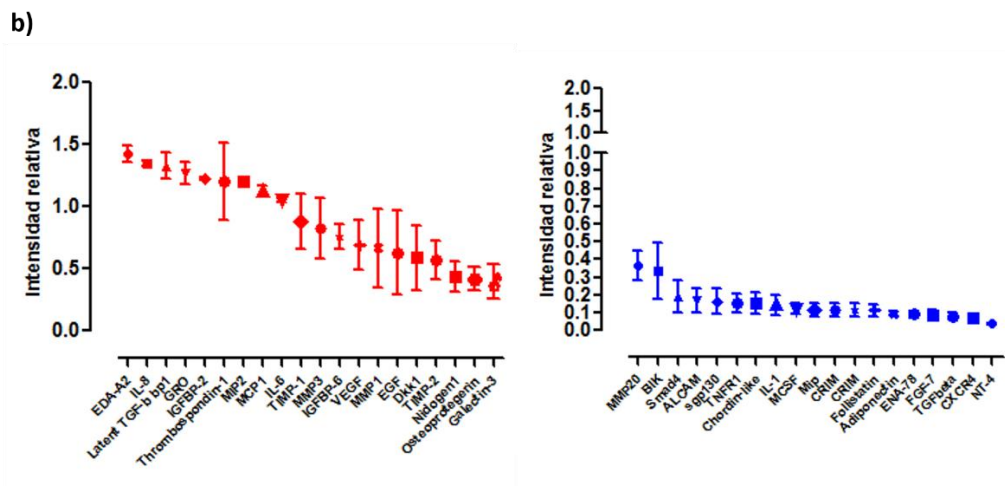
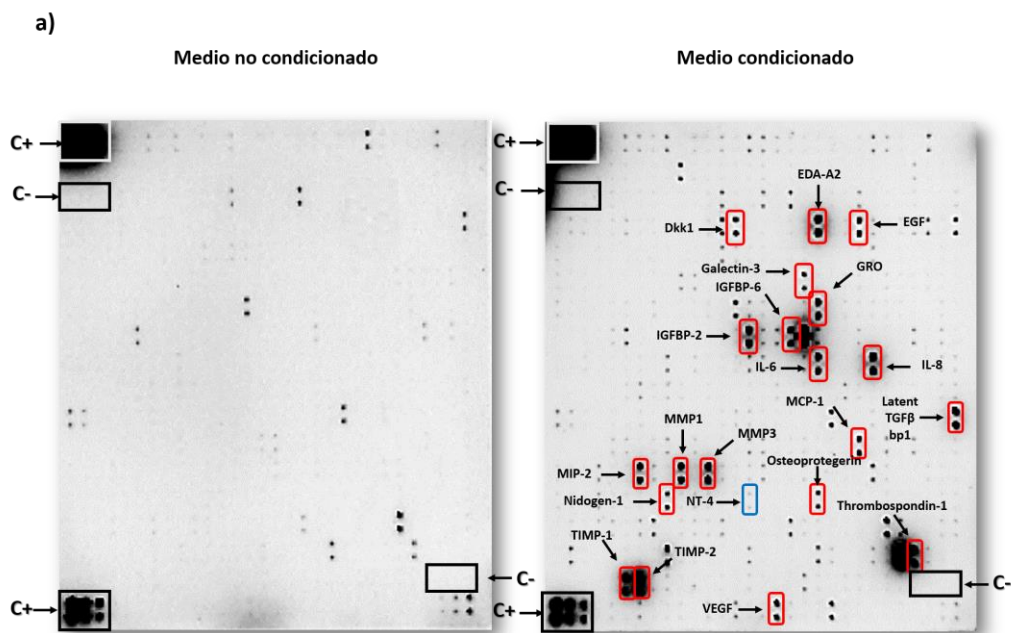
Figura 8. Diferenciación de las hNS/PCs-OE hacia un linaje neuronal. El protocolo de diferenciación de las hNS/PCs-OE consistió en la aplicación de ácido retinoico, forskolina y Shh durante 7 días. El término proliferación se refiere al crecimiento de estas células en condiciones enriquecidas, es decir, en presencia de suero durante un tiempo determinado (48 horas). a y d) Expresión tanto del marcador neural Nestina como del marcador proliferativo Ki67 en condición proliferativa y diferenciada, respectivamente. b y e) Expresión tanto del marcador de neuronas inmaduras βIII tubulina como del marcador astrocítico GFAP en condición proliferativa y diferenciada, respectivamente. c y f) Expresión del marcador de neuronas maduras MAP2 en condición proliferativa y diferenciada, respectivamente. g) Expresión de los marcadores Ki67, Nestina, βIII tubulina, MAP2 y GFAP en las células hNS/PCs-OE en condiciones de proliferación y diferenciación determinados por Western Blot y normalizados con el control de carga GAPDH. h) Densitometría del blot mostrado en g). Los datos se expresaron como la media ± SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Bonferroni (Para

Nestina, $F_{3,7} = 23110$; $p < 0.0001$. Para Ki67, $F_{3,7} = 64.55$; $p = 0.0008$. Para MAP2, $F_{3,7} = 680$; $p < 0.0001$. Para β III tubulin, $F_{3,7} = 27830$; $p < 0.0001$.). ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$

VII.2 Caracterización de los factores solubles liberados por las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)

Con el objetivo de determinar los factores solubles secretados por las hNS/PCs-OE ante un estímulo proliferativo se emplearon arreglos precargados con 507 anticuerpos, la razón de esta opción radicó en el hecho de que en el momento de su elección era el arreglo que mayor cantidad de proteínas contenía y nuestro interés era escanear lo más ampliamente posible lo liberado por las hNS/PCs-OE en el medio condicionado. En la figura 9a se muestran los arreglos de anticuerpos obtenidos de la interacción con los medios no condicionado (izquierda) y condicionado (derecha). Se indican con recuadros rojos la localización de las veinte proteínas más abundantes detectadas en el arreglo. En la figura 9b se observan las gráficas con el análisis densitométrico de cada una de las proteínas detectadas, en las cuales se muestran los valores obtenidos normalizados para cada proteína con respecto al promedio de los controles positivos. Todas las proteínas liberadas por las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano, detectadas en el arreglo, fueron agrupadas de acuerdo con la función celular reportada en células troncales o precursoras (figura 9c). En el gráfico se observa que el mayor porcentaje de factores liberados tienen una función en la diferenciación de células troncales, ya sea de estirpe neural e incluso embrionarias (29%), el siguiente grupo de proteínas tiene una función en migración (21%) y finalmente en la proliferación de células troncales (13%). Algunas de las proteínas de mayor abundancia fueron ectodisplasia-A2 (EDA-A2), interleucina-8 (IL-8), factor de crecimiento transformante beta latente (LTBP1), CXCL1 (GRO) y la proteína transportadora 2 del factor de crecimiento insulínico (IGFBP-2), la primera se ha asociado a procesos de diferenciación epidérmica [74], la segunda en la migración de células precursoras del hipocampo humano [75], la tercera promueve la

diferenciación de células troncales embrionarias a endotelio [76], la cuarta favorece la maduración oligodendrocítica de los precursores oligodendrocíticos [77] y finalmente la quinta se encuentra muy relacionada al crecimiento celular [78, 79]. De acuerdo con lo mostrado, este arreglo nos permitió determinar 40 proteínas liberadas por las hNS/PCs-OE ante un estímulo proliferativo además de que el perfil funcional de dichas proteínas se encuentra mayormente asociado a diferenciación, migración y proliferación de células troncales.



c)

Clasificación de los factores solubles liberados por las hNS/PCs-OE de acuerdo a su función en células troncales embrionarias, neurales y mesenquimales

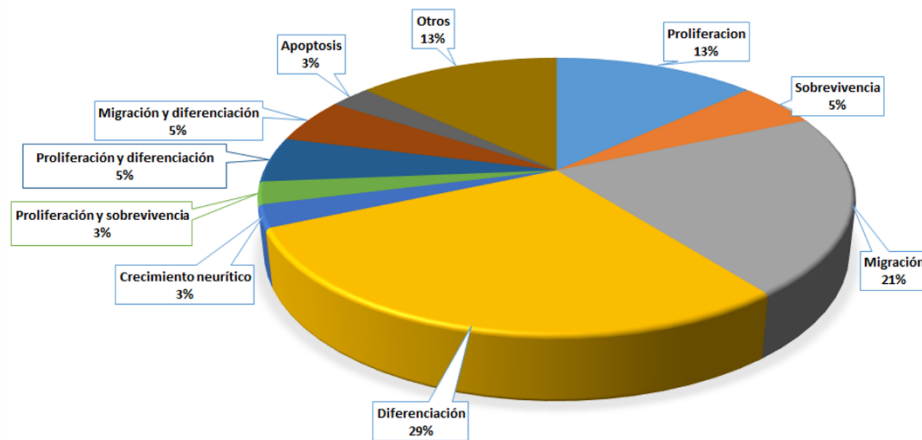


Figura 9. Determinación de los factores solubles secretados por las hNS/PCs-OE. a) Representación de los arreglos con anticuerpos utilizados para la determinación de factores solubles secretados por las hNS/PCs-OE, a la izquierda se muestra el resultado de la interacción del arreglo con el medio no condicionado, es decir, el medio de cultivo que no se ha expuesto a las células, a la derecha se muestra el resultado de la interacción del arreglo con el medio condicionado, es decir, el medio que ha sido expuesto a las células durante 48 horas. b) Análisis densitométrico de las proteínas detectadas en el arreglo con el tratamiento del medio condicionado. c) Agrupamiento de las proteínas detectadas en el arreglo de acuerdo con alguna función relacionada al mantenimiento o diferenciación de células troncales neurales.

VII.3 Determinación de la viabilidad de las células precursoras del hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)

Una vez caracterizadas las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE) y algunas de las moléculas que liberan al medio (medio condicionado), se procedió a evaluar el efecto de los factores presentes en el medio condicionado en un modelo celular perteneciente a una de las regiones neurogénicas en el cerebro adulto: el hipocampo. Para esto primero se determinó si el medio condicionado a diferentes diluciones

(5, 10, 15, 20, 25, 50 y 100%) podría mantener la viabilidad de las células precursoras del hipocampo adulto (AHPCs) a las 24 y a las 48 horas. En la figura 10a se muestran imágenes representativas de campo claro de algunos de los tratamientos realizados. Cuando se compara la morfología y la densidad celular del tratamiento control (20ng/ml de EGF + 20ng/ml bFGF) contra las diferentes diluciones de medio condicionado a las 24 horas se observa que es muy similar, es decir, que el medio condicionado mantiene la viabilidad de las AHPCs en el mismo porcentaje que el control con los factores de crecimiento conocidos (EGF y bFGF), como se indica en la primera gráfica de la figura 10b. Sin embargo, cuando se comparan esos mismos tratamientos a las 48 horas, se observa que hay una mayor densidad celular en el tratamiento control que con cualquiera de las diluciones de medio condicionado, lo cual se observa tanto en las imágenes como en la segunda gráfica de la figura 10b. También se observa que, en las diferentes diluciones no hay la misma densidad celular que en el control, la morfología se mantiene y la viabilidad de las AHPCs es mayor que el control que no tiene factores de crecimiento. Con todo lo anterior se concluye que el medio condicionado mantiene la viabilidad de las AHPCs al mismo porcentaje que el control con factores de crecimiento a las 24 horas, sugiriendo que también promueve la proliferación, ya que los factores utilizados son los que permiten la expansión de estas células. Lo anterior se corroboró con un ensayo de incorporación de BrdU, como se describe en el apartado VII.4. A las 48 horas el fenómeno es otro, las diluciones del medio condicionado no mantienen la misma densidad celular que el tratamiento control, pero siguen manteniendo la viabilidad por encima del tratamiento sin factores de crecimiento.

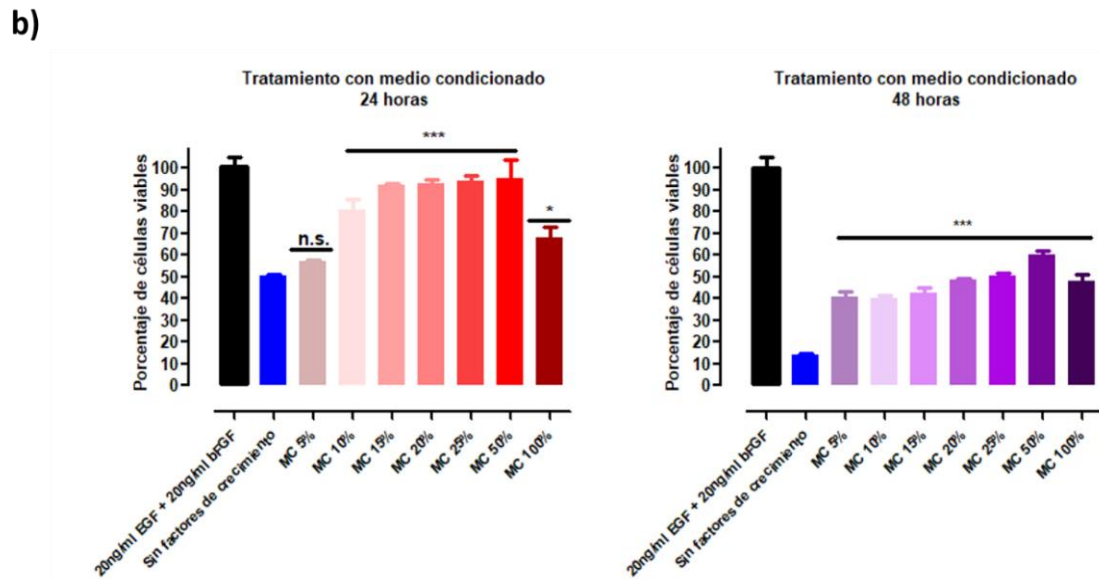
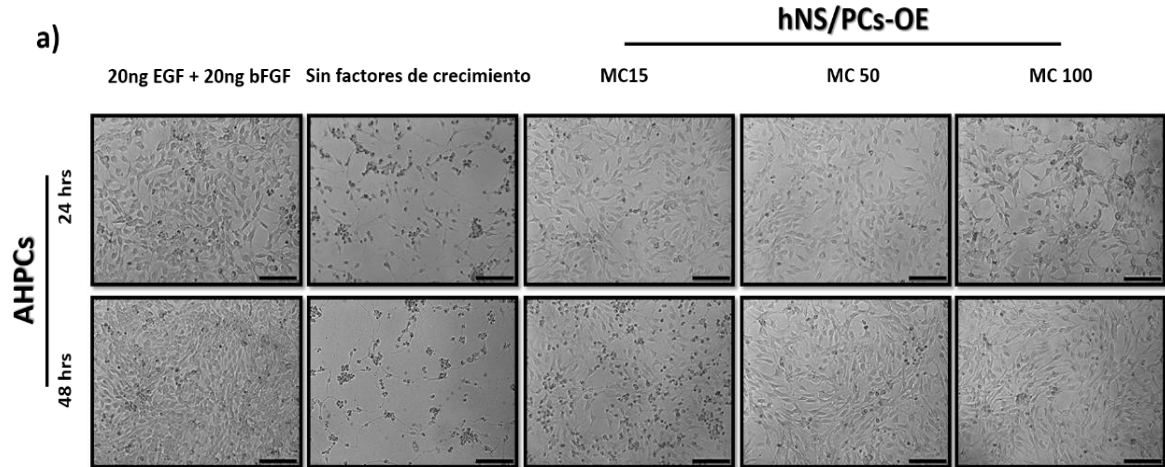


Figura 10. Evaluación de la viabilidad de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 24 y 48 horas.

a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha: 20ng EGF + 20ng bFGF, Sin factores de crecimiento, MC 15%, MC 50% y MC 100%. En la parte superior se muestra la densidad y morfología de las células AHPCs a las 24 horas de iniciados los diferentes estímulos. En la parte inferior se muestran los mismos tratamientos, pero a las 48 horas.

b) Representación gráfica del ensayo de viabilidad celular WST-1, a la izquierda se muestra el ensayo a las 24 horas y a la derecha a las 48 horas de iniciado el tratamiento. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett.

(Para 24 horas, $F_{8,26} = 9.011$; $p < 0.0001$. Para 48 horas, $F_{8,26} = 25.35$; $p < 0.0001$). Las comparaciones se hicieron con respecto al control sin factores de crecimiento y los porcentajes fueron normalizados con respecto al tratamiento control con 20ng/ml de EGF + 20ng/ml bFGF. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 100 μm .

VII.4 Determinación de la proliferación de las células precursoras del hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)

Para determinar el efecto proliferativo del medio condicionado sobre las AHPCs, sugerido por el ensayo de viabilidad WST1 mostrado en el apartado VII.3, se realizó el ensayo de incorporación de BrdU. En la figura 11a se muestran las imágenes representativas de cada uno de los tratamientos realizados. Con flechas amarillas se indican algunas de las células positivas a BrdU/DAPI. A las 24 horas se observa que algunas de las AHPCs continúan incorporando BrdU en presencia de las diferentes diluciones de medio condicionado, aunque no alcanzan el mismo porcentaje que el tratamiento con ambos factores de crecimiento, hay una diferencia significativa con respecto al tratamiento sin factores de crecimiento (figura 11b). A las 48 horas la diferencia entre el tratamiento con ambos factores de crecimiento y los medios condicionados es mayor y el efecto proliferativo discreto no se mantiene a las 48 horas (figuras 11a y 11b). Por lo tanto, el medio condicionado permite la proliferación de algunas de las AHPCs en un tiempo corto (24 horas).

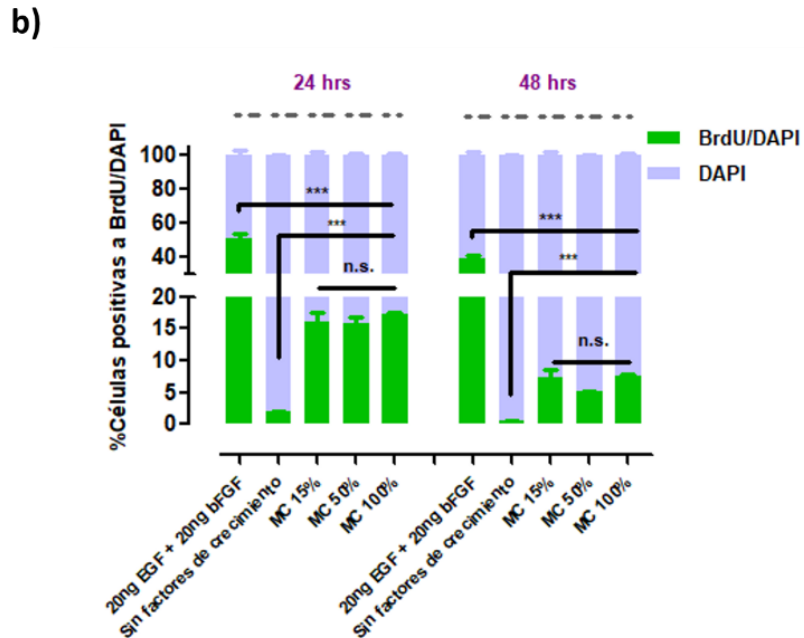
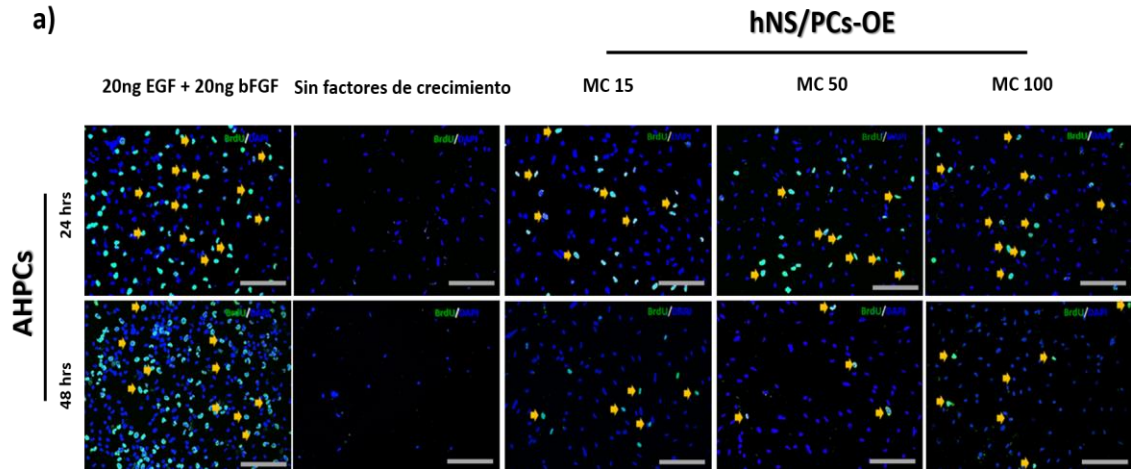


Figura 11. Evaluación de la proliferación (incorporación de BrdU) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 24 y 48 horas. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha: 20ng EGF + 20ng bFGF, Sin factores de crecimiento, MC 15%, MC 50% y MC 100%. En la parte superior se muestran las células AHPCs positivas a DAPI y BrdU/DAPI (flechas amarillas) a las 24 horas de iniciados los diferentes estímulos. En la parte inferior se muestran los mismos tratamientos, pero a las 48 horas. b) Representación gráfica de los porcentajes de células positivas tanto a BrdU/DAPI como DAPI en respuesta a los diferentes estímulos, a la izquierda se muestra la gráfica las

24 horas y a la derecha a las 48 horas de iniciado el tratamiento. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. Para 24 horas, $F_{5,17} = 214.8$; $p < 0.0001$. Para 48 horas, $F_{5,17} = 119.3$; $p < 0.0001$. *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 100 μm .

VII.5 Determinación de la diferenciación de las células precursoras del hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)

Una vez determinado el efecto de las diferentes diluciones del medio condicionado en la viabilidad y proliferación de las AHPCs, se procedió a determinar el efecto del medio condicionado en el proceso de diferenciación de las AHPCs. Se ha reportado que el proceso de diferenciación de las AHPCs toma un período de al menos 7 días *in vitro* [80, 81]. Lo que procedió a realizarse fue evaluar la expresión de diversos marcadores durante tres períodos incluyendo el último de 7 días. Los marcadores utilizados fueron Nestina (marcador de precursores neurales), fosfo-histona-3 (H3S10P, pH3) (marcador de células en mitosis), MAP2 (marcador de neuronas) y GFAP (marcador de astrocitos). La selección de marcadores se realizó en función de tratar de determinar la pérdida del estadio precursor y proliferativo de las AHPCs y el compromiso hacia un estadio definitivo como el neuronal o el glial. En la figura 12a se muestran las imágenes del primer tiempo (48 horas) que se tomó para evaluar el estadio en el que se encontraban las AHPCs después del tratamiento con las diferentes diluciones del medio condicionado. Los marcadores evaluados fueron Nestina y pH3 y como se observa en la figura 12b, hay una disminución en el porcentaje de células positivas a cada uno de los marcadores con respecto al control con ambos factores (20ng/ml EGF + 20ng/ml bFGF) pero la disminución es dependiente de la dilución de medio condicionado utilizada, es decir, el 100% del medio condicionado tiene mayor número de células positivas para cada marcador con respecto a las otras diluciones (Nestina: MC 15%; 5%, MC 50%; 30% y

MC 100%; 60%) (pH3: MC 15% y MC 50%; menores al 1% y MC 100%; aproximadamente el 3%).

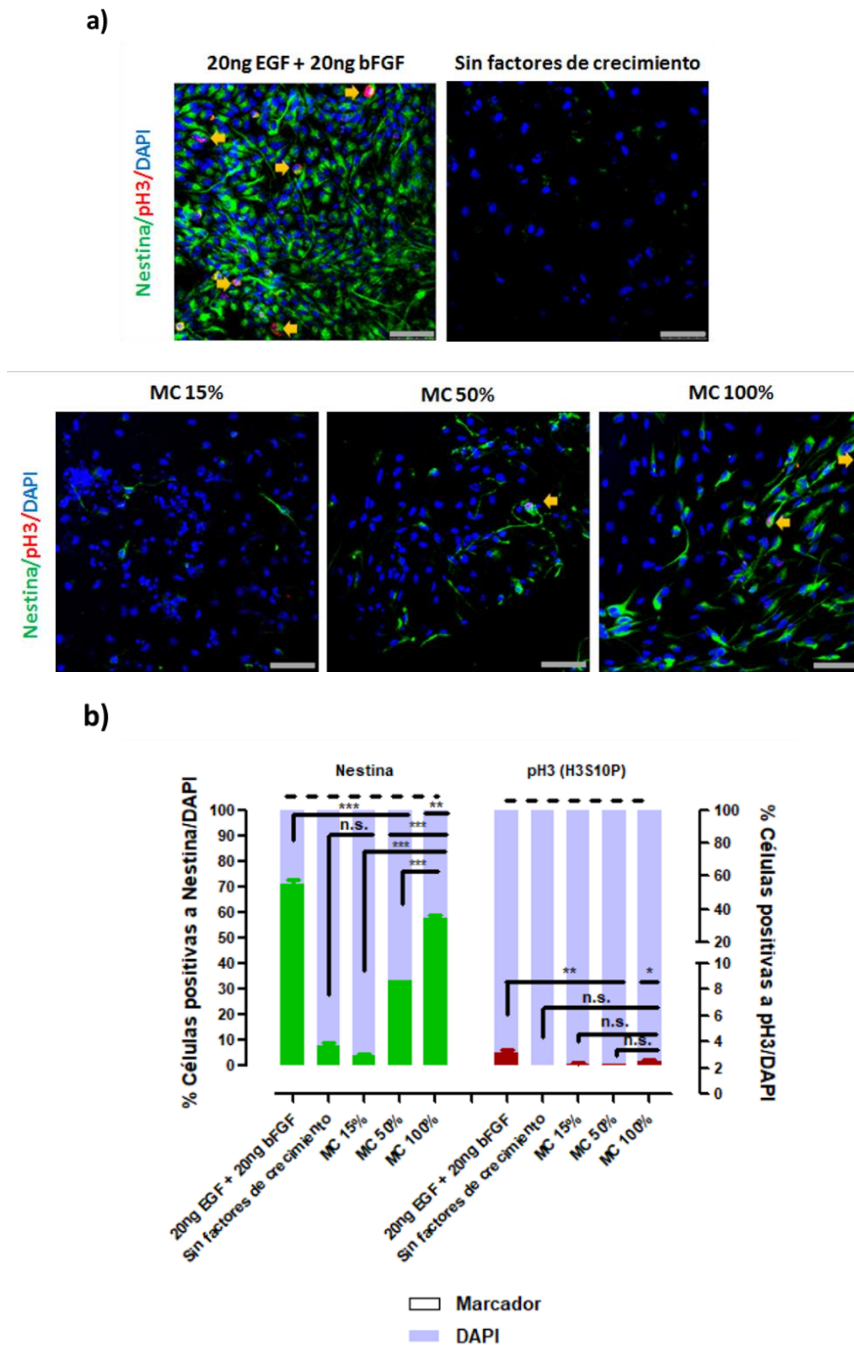
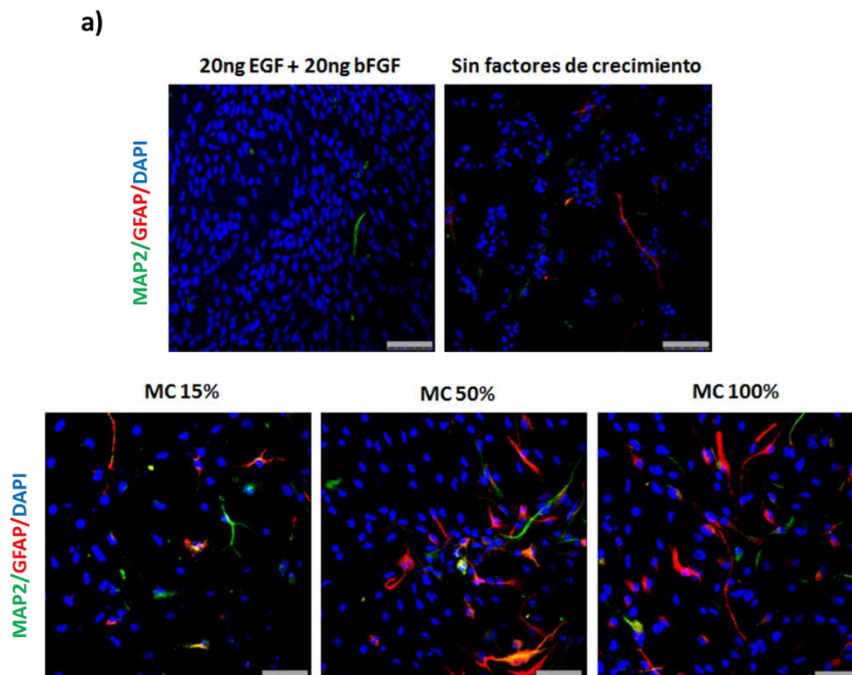


Figura 12. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio precursor y proliferativo (Nestina y pH3, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante

48 horas. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha, arriba: 20ng EGF + 20ng bFGF y sin factores de crecimiento, de izquierda a derecha, abajo, MC 15%, MC 50% y MC 100%. Con flechas amarillas se señalan las células positivas a la proteína pH3 (fosfo-histona 3). b) Representación gráfica de los porcentajes de células positivas tanto a Nestina como a pH3 en respuesta a los diferentes estímulos. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. Para Nestina, $F_{5,11} = 331.5$; $p < 0.0001$. Para pH3, $F_{5,11} = 11.12$; $p = 0.0054$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 50 μ m.

En la figura 13a se muestran las células que expresan a MAP2 y GFAP utilizados como marcadores para determinar si parte de las AHPCs se encontraban comprometidas hacia un linaje determinado. En la figura 13b se aprecia que ninguna de las condiciones favorece un fenotipo neuronal, situación muy diferente a la mostrada con el fenotipo astrocítico. La cantidad de células positivas a GFAP aumenta conforme se incrementa la concentración de medio condicionado (MC 15%; 15%, MC 50%; 10% y MC 100%; 25%); por lo que, a las 48 horas, se puede observar que el tratamiento con el medio condicionado favorece la presencia de dos estirpes: una precursora y otra astrocítica que está en concentración dependiente.



b)

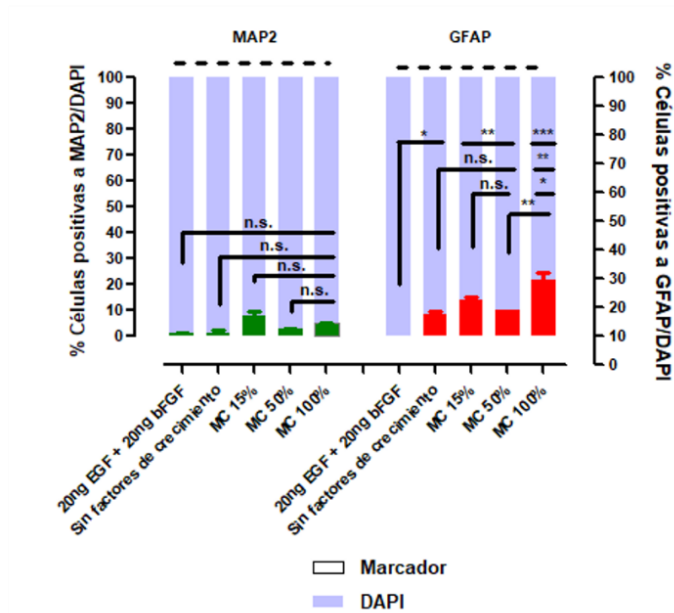


Figura 13. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio neuronal y astrocítico (MAP2 y GFAP, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 48 horas. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha, arriba: 20ng EGF + 20ng bFGF y sin factores de crecimiento, de izquierda a derecha, abajo, MC 15%, MC 50% y MC 100%. b) Representación gráfica de los porcentajes de células positivas tanto a MAP2 como a GFAP en respuesta a los diferentes estímulos. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. Para MAP2, $F_{5,11} = 115.1$; $p < 0.0001$. Para GFAP, $F_{5,11} = 40.13$; $p = 0.0002$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 50 μ m.

El seguimiento de la diferenciación de las AHPCs se llevó hasta las 96 horas, observando la misma tendencia que a las 48 horas tanto para Nestina/pH3 (figura 14) como para MAP2/GFAP (figura 15). La diferencia radicó en la disminución de los porcentajes de células positivas a Nestina (por ejemplo el porcentaje de células positivas a Nestina bajo el tratamiento con el medio condicionado al 100% disminuyó del 60 (figura 12b) al 40% (figura 14b)) o el aumento en el porcentaje de células positivas a GFAP (por ejemplo el

número de células positivas a GFAP con el tratamiento con el medio condicionado al 100% aumentó del 25 (figura 13b) al 40% (figura 15b)).

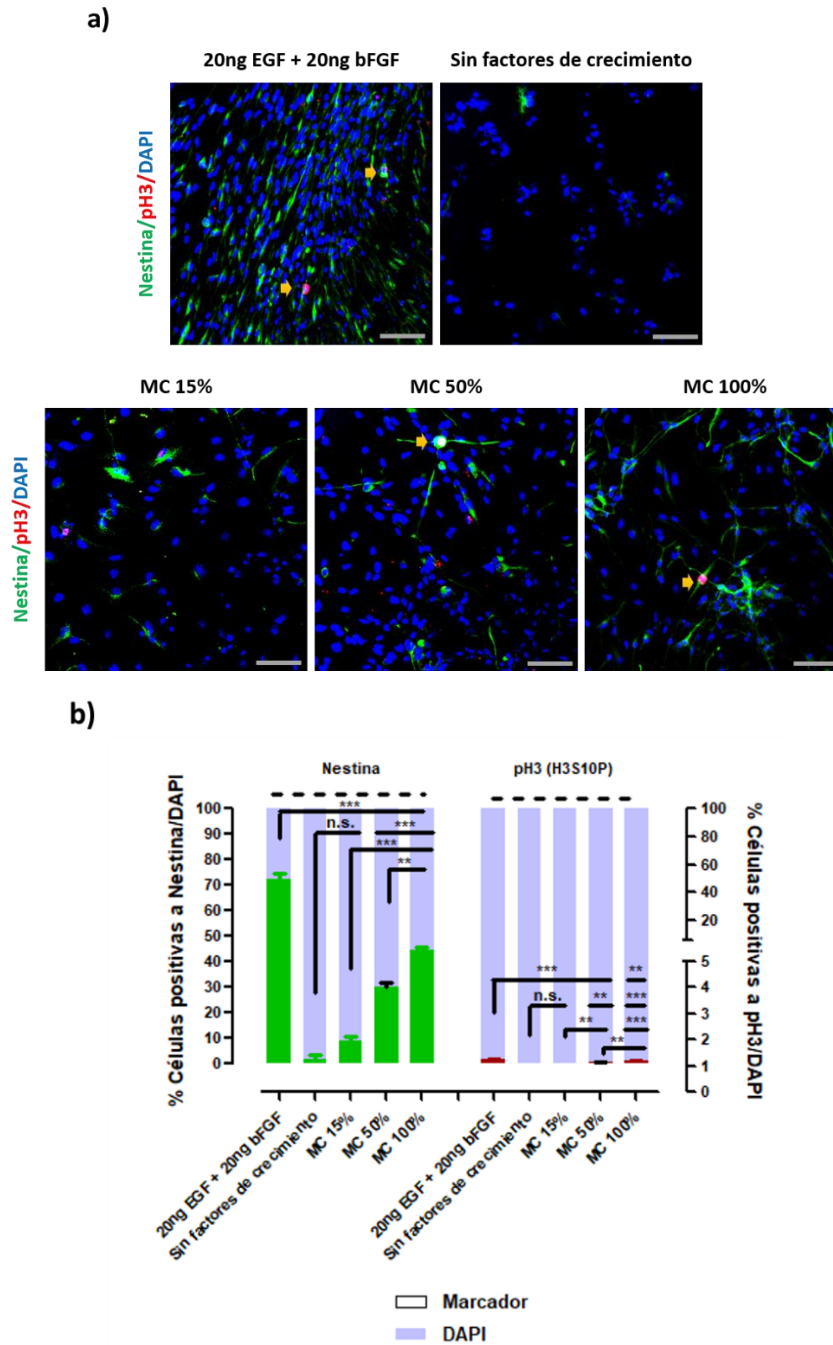
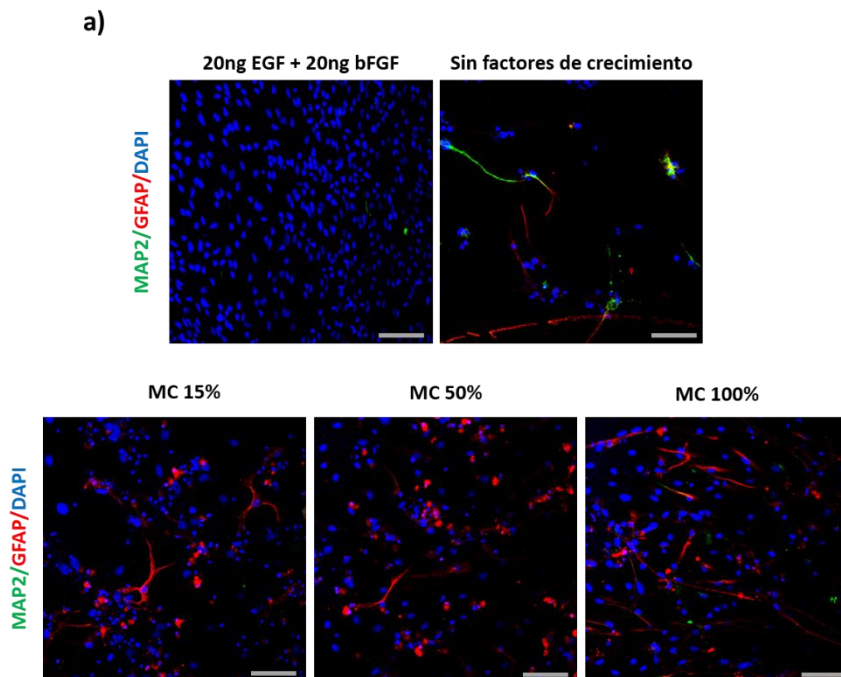


Figura 14. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio precursor y proliferativo (Nestina y pH3, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante

96 horas. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha, arriba: 20ng EGF + 20ng bFGF y sin factores de crecimiento, de izquierda a derecha, abajo, MC 15%, MC 50% y MC 100%. Con flechas amarillas se señalan las células positivas a la proteína pH3 (fosfo-histona 3). b) Representación gráfica de los porcentajes de células positivas tanto a Nestina como a pH3 en respuesta a los diferentes estímulos. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. Para Nestina, $F_{5,11} = 270.9$; $p < 0.0001$. Para pH3, $F_{5,11} = 122.6$; $p = 0.0054$. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 50 μ m



b)

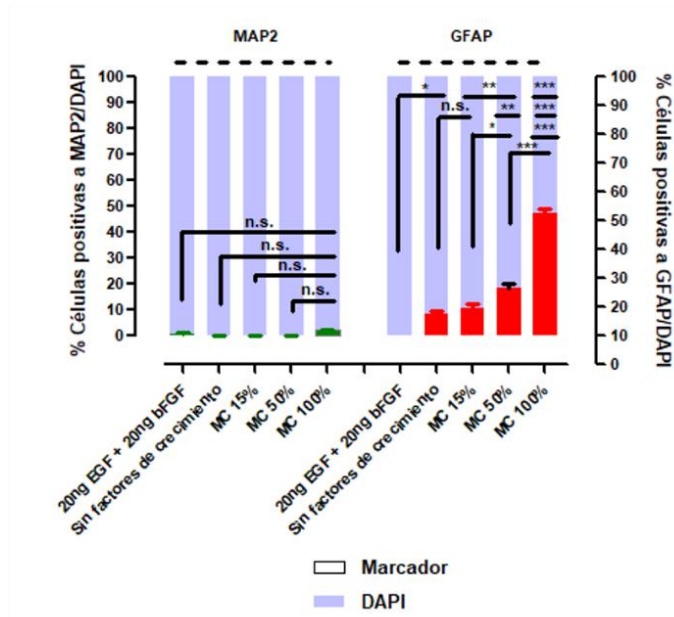


Figura 15. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estado neuronal y astrocítico (MAP2 y GFAP, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 96 horas. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha, arriba: 20ng EGF + 20ng bFGF y sin factores de crecimiento, de izquierda a derecha, abajo, MC 15%, MC 50% y MC 100%. b) Representación gráfica de los porcentajes de células positivas tanto a MAP2 como a GFAP en respuesta a los diferentes estímulos. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. Para MAP2, $F_{5,11} = 99.36$; $p < 0.0001$. Para GFAP, $F_{5,11} = 193.0$; $p < 0.0001$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 50 μ m.

Finalmente, a los 7 días, el porcentaje de las AHPCs que expresan Nestina tanto en el tratamiento con los dos factores (EGF y bFGF) como con el medio condicionado al 100% disminuyeron del 80 al 40% y del 60 al 20%, respectivamente (figuras 12b y 16b) y un muy bajo porcentaje fue positivo a PH3 (aproximadamente un 2% de las células en el tratamiento con ambos

factores y menos del 1% en el tratamiento con el medio condicionado al 100%).

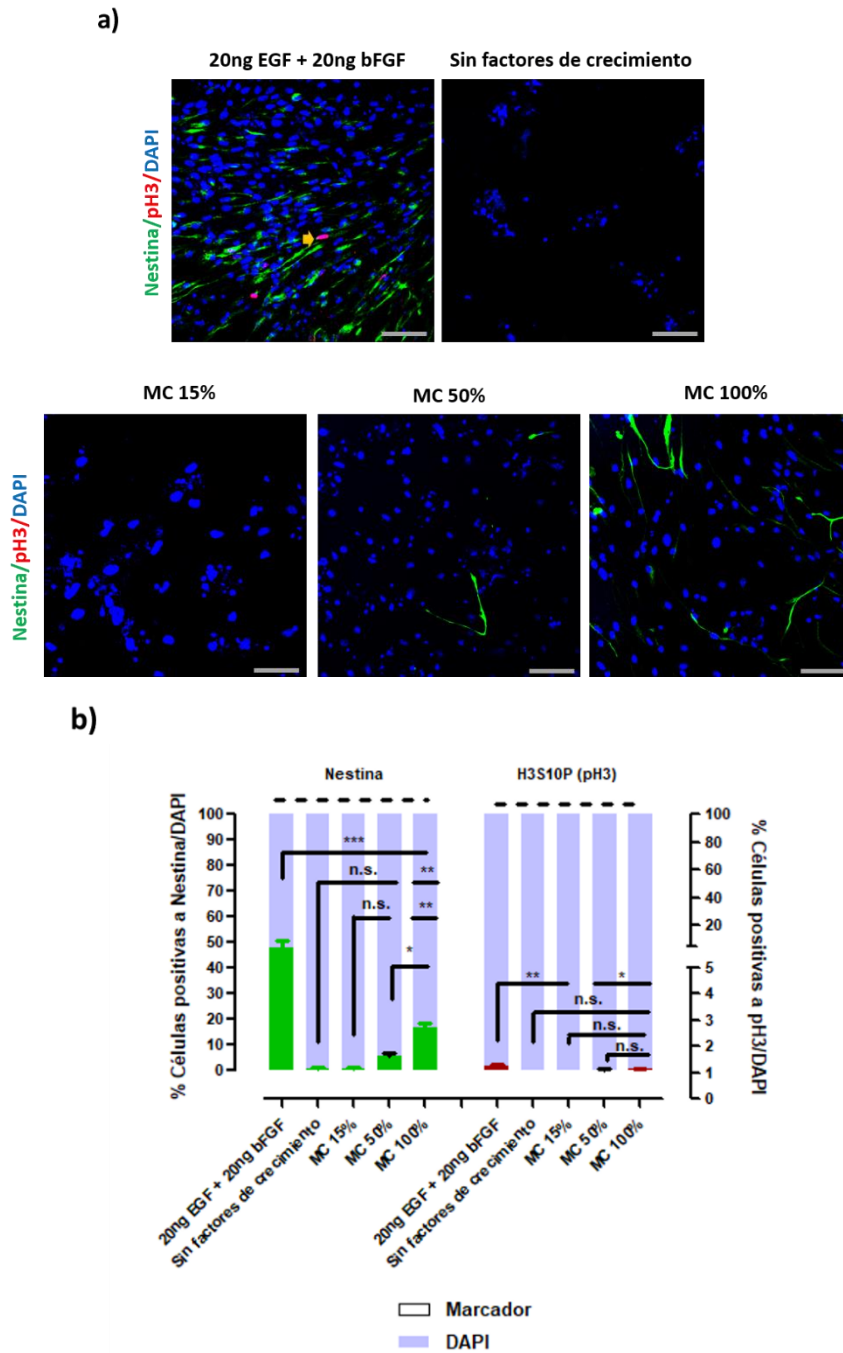


Figura 16. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio precursor y proliferativo (Nestina y pH3, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante

7 días. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha, arriba: 20ng EGF + 20ng bFGF y sin factores de crecimiento, de izquierda a derecha, abajo, MC 15%, MC 50% y MC 100%. Con flechas amarillas se señalan las células positivas a la proteína pH3 (fosfo-histona 3). b) Representación gráfica de los porcentajes de células positivas tanto a Nestina como a pH3 en respuesta a los diferentes estímulos. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. Para Nestina, $F_{5,11} = 75.62$; $p < 0.0001$. Para pH3, $F_{5,11} = 8.954$; $p = 0.0094$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 50 μ m.

Con respecto al porcentaje de AHPCs positivas a MAP2 no se encontró una gran variación (menor al 5%) en el caso de los medios condicionados, aunque si hubo un porcentaje mayor al 5% tanto en el control con ambos factores como en el tratamiento sin factores de crecimiento (figura 17). El porcentaje de AHPCs positivas a GFAP se mantuvo tanto a las 96 horas como a los 7 días con el tratamiento con el medio condicionado al 100% (figura 15b y 17b; 40%), mientras que con el tratamiento sin factores de crecimiento hubo un incremento del 10 al 15% con respecto a las 48 como a las 96 horas (figuras 13b, 15b y 17b). El retiro de factores de crecimiento durante 10 días es una forma de inducir la diferenciación de las AHPCs y se ha reportado que uno de los porcentajes de células favorecidos por el protocolo es el del fenotipo glial, como se muestra en nuestro caso. Con todo lo anterior el tratamiento con el medio condicionado al 100% favorece un fenotipo precursor y astrocítico, aunque después de 7 días solamente se mantiene la población astrocítica. Cabe señalar que las otras diluciones del medio condicionado (15 y 50%) también mostraron la misma tendencia, aunque en mucho menor medida (sobre todo el medio condicionado al 15%) (figuras 12-17).

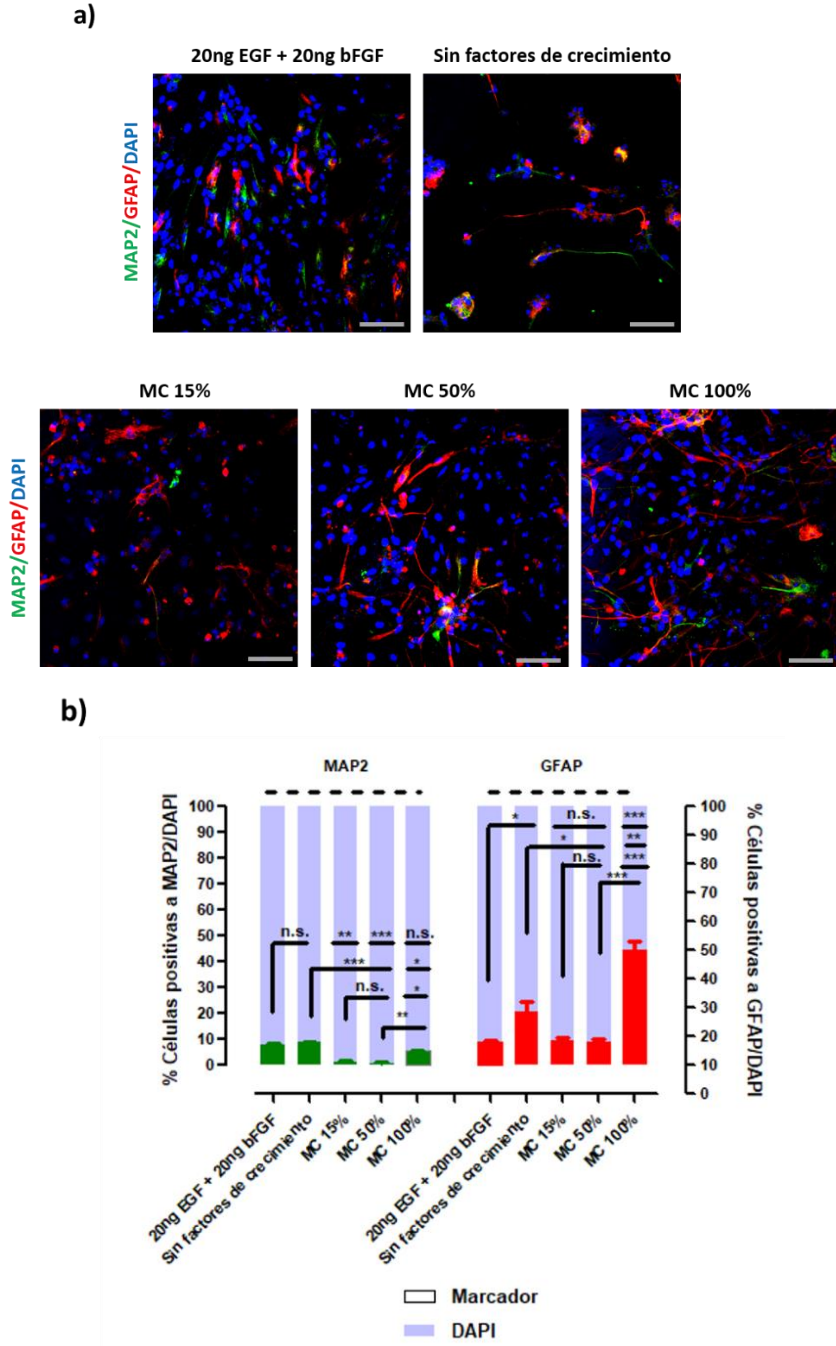
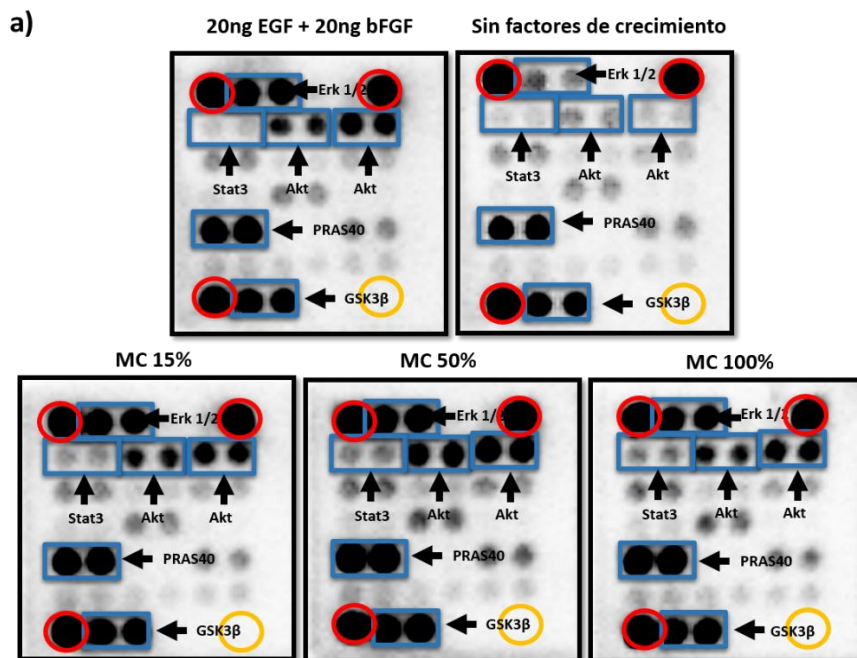


Figura 17. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio neuronal y astrocítico (MAP2 y GFAP, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia de diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 7 días. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha, arriba: 20ng EGF + 20ng bFGF y sin factores de crecimiento, de izquierda a derecha, abajo, MC 15%, MC 50% y MC 100%. b) Representación gráfica de los

porcentajes de células positivas tanto a MAP2 como a GFAP en respuesta a los diferentes estímulos. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. Para Map2, $F_{5,11} = 43.73$; $p = 0.0001$. Para GFAP, $F_{5,11} = 47.75$; $p < 0.0001$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 50 μm .

VII.6 Determinación de las vías de señalización activadas en las células precursoras del hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)



b)

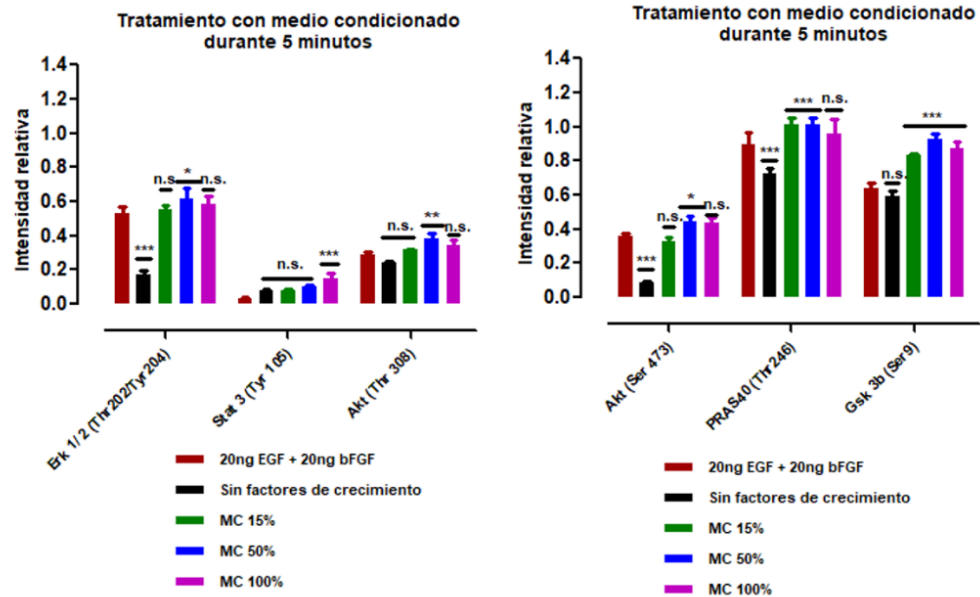
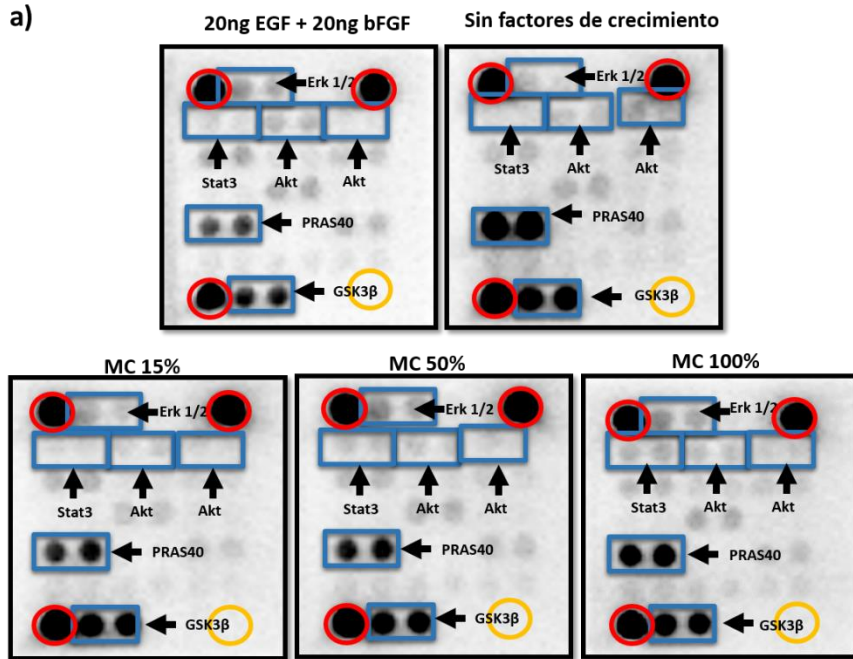


Figura 18. Fosforilación de las proteínas Erk, Stat3, Akt, PRAS 40 y Gsk-3β en las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 5 minutos. a) Imágenes representativas de los arreglos hibridados con lisados de proteínas de AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha, arriba: 20ng EGF + 20ng bFGF y sin factores de crecimiento, de izquierda a derecha, abajo, MC 15%, MC 50% y MC 100%. b) Análisis densitométrico de las proteínas Erk, Stat3, Akt, PRAS 40 y Gsk-3β. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de dos vías seguida de la prueba post-hoc Bonferroni. Factor A (tratamiento) $F_{4,255} = 9.732$, $p = 0.0004$; factor B (proteína fosforilada) $F_{17,255} = 1040$, $p < 0.0001$ y su interacción $F_{68,255} = 13.46$, $p < 0.0001$. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Determinado el efecto del medio condicionado sobre las AHPCs, se procedió a evaluar qué mecanismos de señalización se activaron en estas células ante el estímulo de los diferentes factores solubles presentes en el medio condicionado. Para lograr este objetivo se utilizó un arreglo precargado con 18 proteínas cuya fosforilación o corte enzimático se encuentra asociado a funciones celulares como proliferación, sobrevivencia, respuesta a estrés celular, apoptosis y genotoxicidad, entre otras. Esto nos dio una pauta para buscar posibles candidatos presentes en el medio condicionado que

explicaran en gran medida el efecto previamente analizado. En la figura 18a se muestran los arreglos hibridados con los diferentes tratamientos durante 5 minutos. Las proteínas que mostraron cambios con respecto tanto con el control con ambos factores como con el control sin factores de crecimiento fueron: Erk 1/2 (Thr 202/Tyr 204), Stat3 (Tyr 105), Akt (Thr 308), Akt (Ser 473), PRAS40 (Thr 246) y Gsk3 β (Ser 9). En la figura 18b se muestra el análisis densitométrico de las proteínas indicadas en cada uno de los arreglos, los datos fueron normalizados con respecto a los controles positivos. Las comparaciones se hicieron con los datos obtenidos del tratamiento con ambos factores de crecimiento (EGF y bFGF). Para el caso del medio condicionado al 15% las fosforilaciones en las proteínas PRAS40 y Gsk3 β mostraron un incremento con respecto al control del 13 y 30% respectivamente. El medio condicionado al 50% promovió un incremento en las fosforilaciones de las siguientes proteínas: Erk 1/2 (15%), Akt (Thr 308) (32%), Akt (Ser 473) (24%), PRAS40 (13%) y Gsk3 β (44%). El medio condicionado al 100% también promovió el aumento en las fosforilaciones de las siguientes proteínas: Stat3 (387%) y Gsk3 β (35%). Las fosforilaciones de las proteínas favorecidas con el medio condicionado se encuentran muy relacionadas con fenómenos de proliferación [82, 83], mantenimiento del estadio precursor [84, 85] y favorecimiento de un fenotipo astrocítico [86, 87]. Cabe señalar que el tratamiento con el medio condicionado al 50% favoreció la fosforilación de un número mayor de proteínas que de las otras diluciones del medio; aunque a nivel funcional la mayor diferencia se observó con la concentración más alta del medio condicionado (100%).



b)

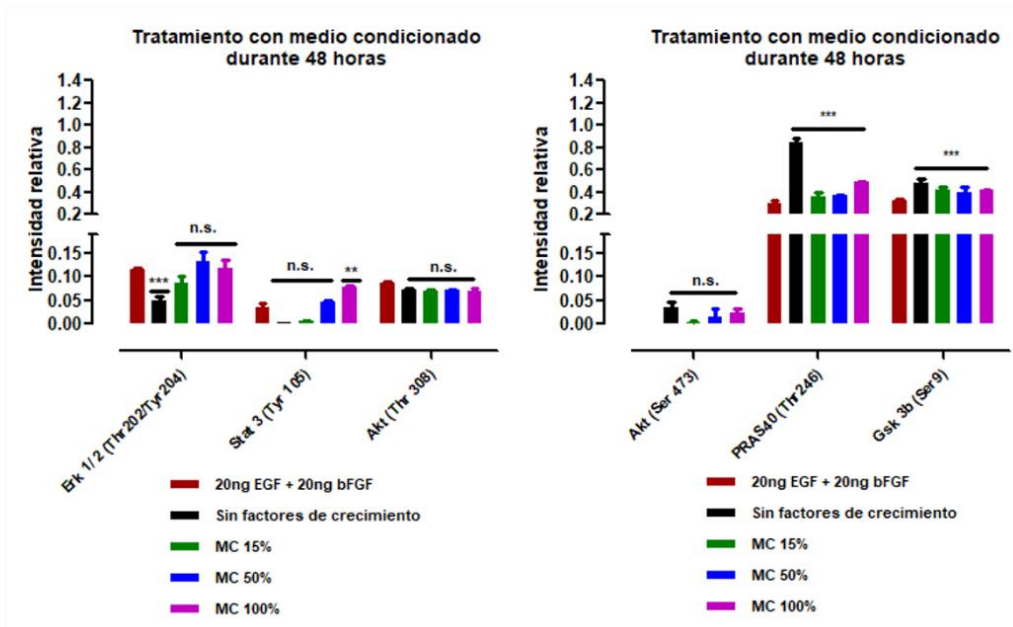


Figura 19. Fosforilación de las proteínas Erk, Stat3, Akt, PRAS 40 y Gsk-3 β en las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE durante 48 horas. a) Imágenes representativas de los arreglos hibridados con lisados de proteínas de AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha, arriba: 20ng EGF + 20ng bFGF y sin factores de crecimiento, de izquierda a derecha, abajo, MC 15%, MC 50% y MC 100%. b) Análisis densitométrico de las proteínas Erk, Stat3, Akt,

PRAS 40 y Gsk-3 β . Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de dos vías seguida de la prueba post-hoc Bonferroni. Factor A (tratamiento) $F_{4,72} = 40.36$, $p < 0.0001$; factor B (proteína fosforilada) $F_{17,72} = 309.6$, $p < 0.0001$ y su interacción $F_{68,72} = 45.99$, $p < 0.0001$. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

El siguiente objetivo consistió en evaluar la fosforilación o corte enzimático de las proteínas presentes en el arreglo después de aplicar los diferentes tratamientos mostrados en la figura 18b durante 48 horas. Como se esperaba, la señal de fosforilación se encontraba casi apagada o inactiva, aunque se encontraron diferencias significativas comparando el tratamiento control con ambos factores y los tratamientos con las diferentes diluciones de medio condicionado. Los datos indicaron que el medio condicionado al 15% tuvo un aumento de 20% para PRAS40 y 29% de Gsk3 β ; para el medio condicionado al 50% fue un aumento de 21% para PRAS40 y 23% de Gsk3 β y finalmente para el medio condicionado al 100% fue un aumento de 61% para PRAS40, 29% de Gsk3 β y 125% de Stat3. Con este ensayo podemos concluir que el medio condicionado de las hNS/PCs-OE favoreció la activación de vías de señalización relacionadas con la proliferación, sobrevivencia, mantenimiento y diferenciación de células troncales neurales [88-90].

El patrón de fosforilación y los ensayos funcionales previos (viabilidad, proliferación y diferenciación) nos llevaron a postular a dos factores solubles como candidatos parcialmente responsables de los efectos producidos por el medio condicionado sobre las AHPCs. Dichos factores fueron: el EGF y la IL-6, los cuales fueron valorados de manera independiente y conjunta en el siguiente apartado.

VII.7 Evaluación del efecto de la interleucina-6 (IL-6) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre la diferenciación de las AHPCs

Antes de hacer el ensayo de evaluación, se determinó mediante ELISA la cantidad de EGF el cual corresponde a 13.6ng/ml (figura 20) e IL-6 cuyo valor es de 11ng/ml (figura 21) presentes en el medio condicionado.

Determinados los valores basales, se procedió a utilizar las diferentes concentraciones ya cuantificadas y así evaluar su efecto sobre la expresión de los marcadores tanto de estadio precursor, como de estadio diferenciado (neuronal o astrocítico) de las AHPCs.

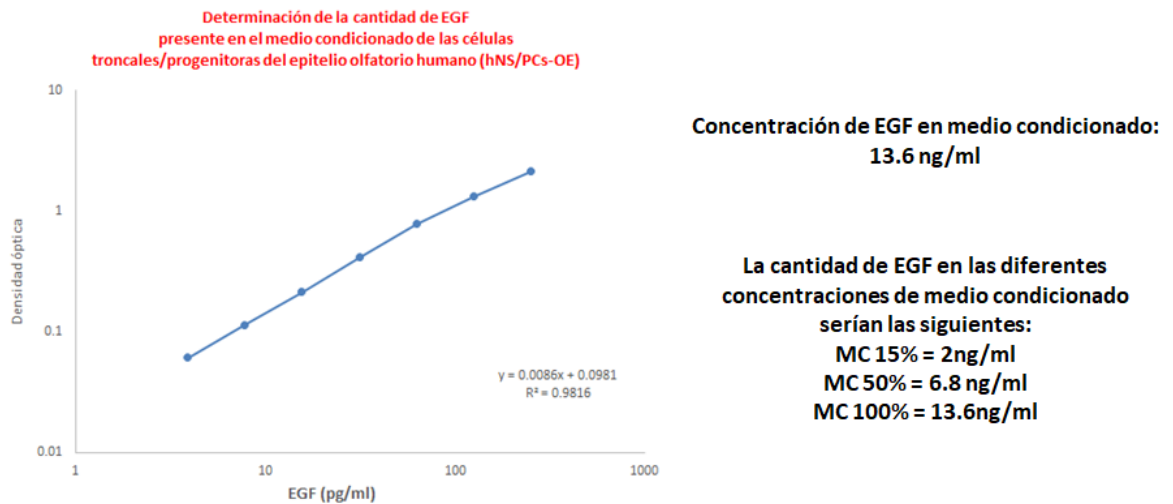


Figura 20. Determinación de la cantidad de factor de crecimiento epidérmico (EGF) presente en el medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE. Curva de concentración-densidad óptica con el EGF para la determinación de la concentración de dicho factor en el medio condicionado.

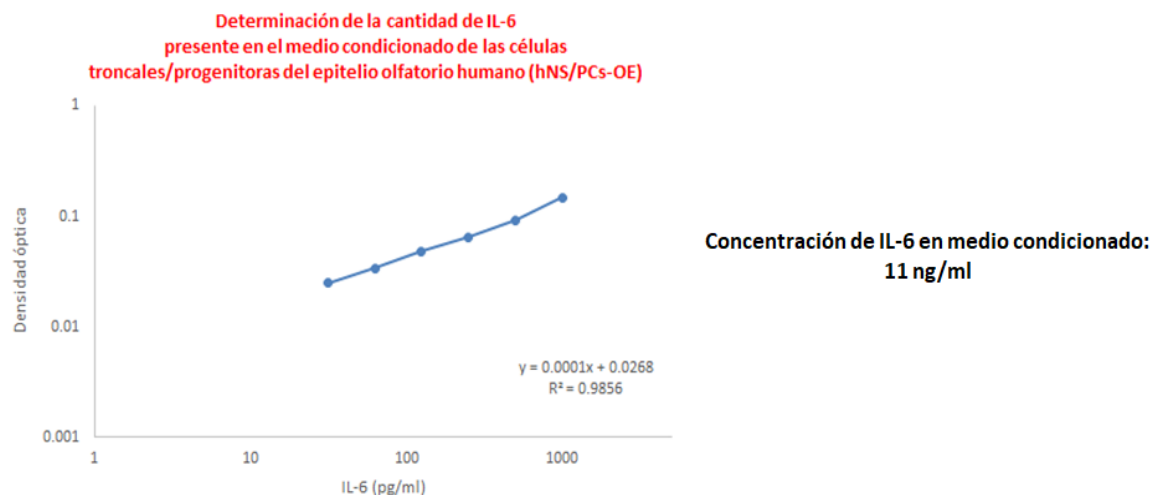


Figura 21. Determinación de la cantidad de interleucina 6 (IL-6) presente en el medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE. Curva de concentración-densidad óptica con la IL-6 para la determinación de la concentración de dicho factor en el medio condicionado.

La figura 22 muestra las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas para cuantificar el número de células que expresaban los marcadores Nestina/pH3 y MAP2/GFAP. Se aprecia que el EGF a la concentración detectada en el medio condicionado y en combinación con la IL-6, favorece la expresión de Nestina, el porcentaje de células positivas a la proteína es el mismo que el obtenido en el control de proliferación (más del 80%), en cambio, la IL-6 por sí sola, no favorece la expresión de este marcador, el porcentaje de células positivas es prácticamente el mismo que el tratamiento sin factores de crecimiento (10 y 15%, respectivamente). Para el caso del marcador pH3, ninguno de los factores, solos o en combinación, alcanzaron el 5% de células positivas mostradas por el control de proliferación. La expresión de MAP2 se mantuvo homogénea en todos los tratamientos, es decir, no se mostraron diferencias significativas cuando se comparó con respecto al control de proliferación (aproximadamente el 5% de las células fueron positivas al marcador en cada uno de los tratamientos). Finalmente, el mayor porcentaje de células positivas a GFAP resultó del tratamiento con IL-6 (casi el 40% de las células), seguido del tratamiento con el medio condicionado al 100% (aproximadamente el 15% de las células fueron positivas a GFAP). Ni el EGF, ni la mezcla de EGF/IL-6 favorecieron el fenotipo astrocítico (prácticamente GFAP negativos). Esto resulta importante, ya que si se compara la IL-6 con la mezcla de ambos factores (EGF/IL-6) los efectos son totalmente opuestos (figura 22b, derecha), indicándonos que, para determinar las mezclas de factores puros, falta probar otros factores detectados en el medio condicionado y comprobar si en su conjunto reproducen el efecto en la diferenciación astrocítica mostrada por el medio condicionado al 100%. La conclusión de este ensayo muestra dos cosas: primero, que la IL-6 generó astrocitos y segundo, que la mezcla de EGF/IL-6

no estimuló la diferenciación astrocítica como lo hizo el medio condicionado por lo que sería importante para continuar este trabajo probar otros factores detectados en el medio.

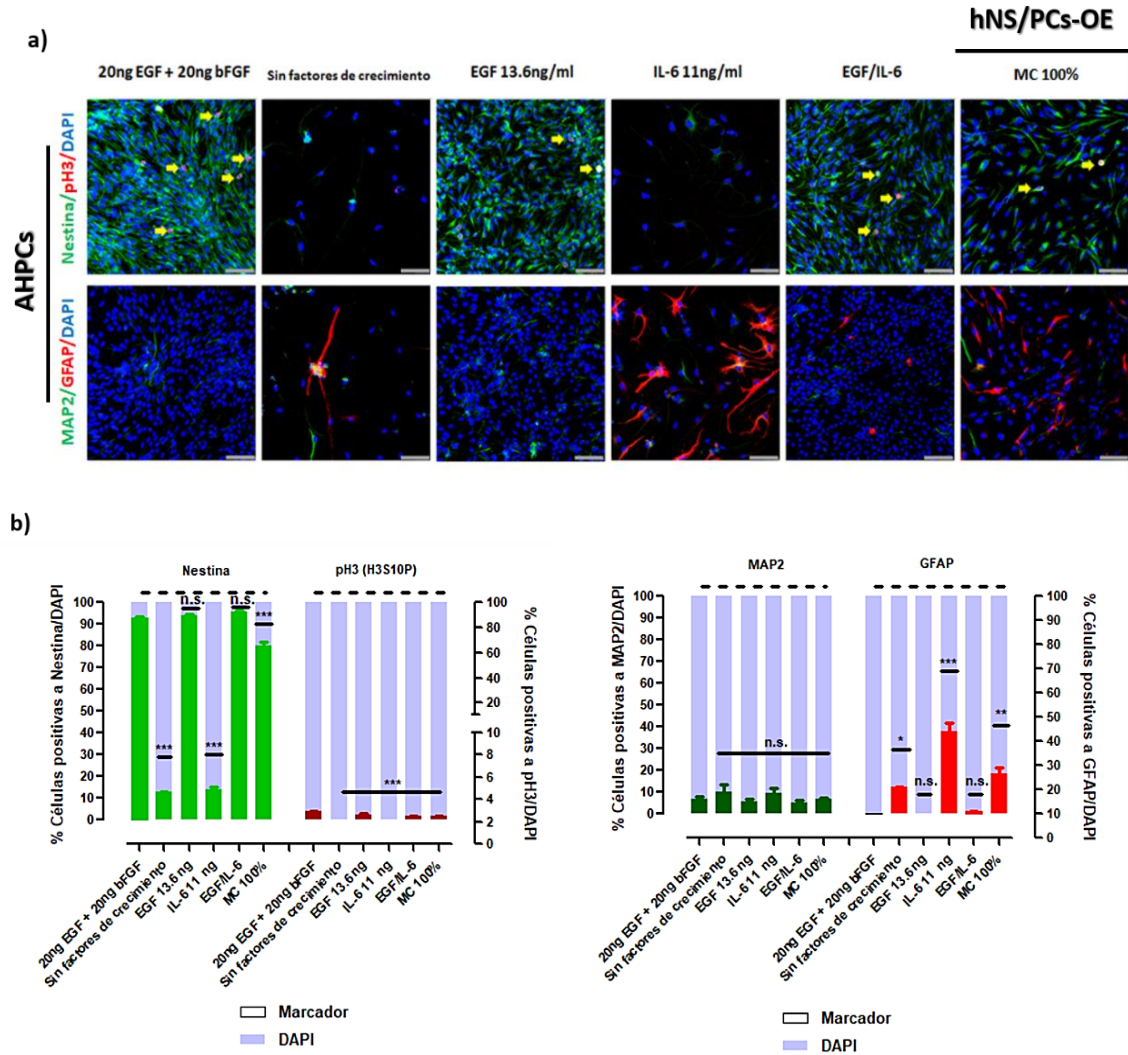


Figura 22. Efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la interleucina-6 (IL-6) en la diferenciación de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) a las 48 horas de iniciado el tratamiento. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha: 20ng EGF + 20ng bFGF, sin factores de crecimiento, EGF 13.6ng/ml, IL-6 11ng/ml, EGF/IL-6 y MC 100%; en la primera línea se muestran los marcadores de células precursoras: Nestina (células precursoras) y pH3 (estadio mitótico); en la segunda línea se muestran los marcadores de células comprometidas a un linaje: MAP2 (neuronas) y GFAP (astrocitos). b) Representación gráfica de los porcentajes de células positivas a Nestina,

pH3, MAP2 y GFAP en respuesta a los diferentes estímulos. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. Para Nestina, $F_{5,11} = 1437$; $p < 0.0001$. Para pH3, $F_{5,11} = 189.11$; $p < 0.0001$. Para MAP2, $F_{5,11} = 13.87$; $p = 0.0030$. Para GFAP, $F_{5,11} = 49.68$; $p < 0.0001$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 50 μm .

VII.8 Evaluación de la viabilidad, proliferación y diferenciación de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE) en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-hEGF

Una vez establecido el papel del EGF y la IL-6 en parte del proceso neurogénico de las AHPCs, se procedió a corroborar el rol del EGF presente en el medio condicionado; para lo cual se bloqueó su actividad en el medio a través del uso de un anticuerpo neutralizante (anti-hEGF).

Primeramente, se evaluó la viabilidad de las AHPCs en presencia del anticuerpo neutralizante durante 24 y 48 horas de iniciado el tratamiento. Como se aprecia en la figura 23, a las 24 horas la presencia del anti-hEGF en el tratamiento con EGF disminuyó cerca de un 20% el número de células viables, de igual manera el tratamiento con el medio condicionado al 15%. A las 48 horas la disminución en la viabilidad de las AHPCs fue más pronunciada en el ligando (mayores de 70%) en comparación con los medios condicionados, ya que los medios condicionados a las 48 horas no mostraron diferencia significativa entre el medio con y sin el anticuerpo neutralizante (figura 23b). De lo anterior se concluyó que el bloqueo del EGF en el medio condicionado afectó parcialmente la viabilidad de las AHPCs en un tiempo corto, es decir, sólo con el tratamiento con el medio condicionado al 15% a las 24 horas hay una disminución en la viabilidad celular, a diferencia del tratamiento con el medio condicionado al 100% en donde no se muestra diferencia significativa (figura 23b). El siguiente parámetro por evaluar fue proliferación celular.

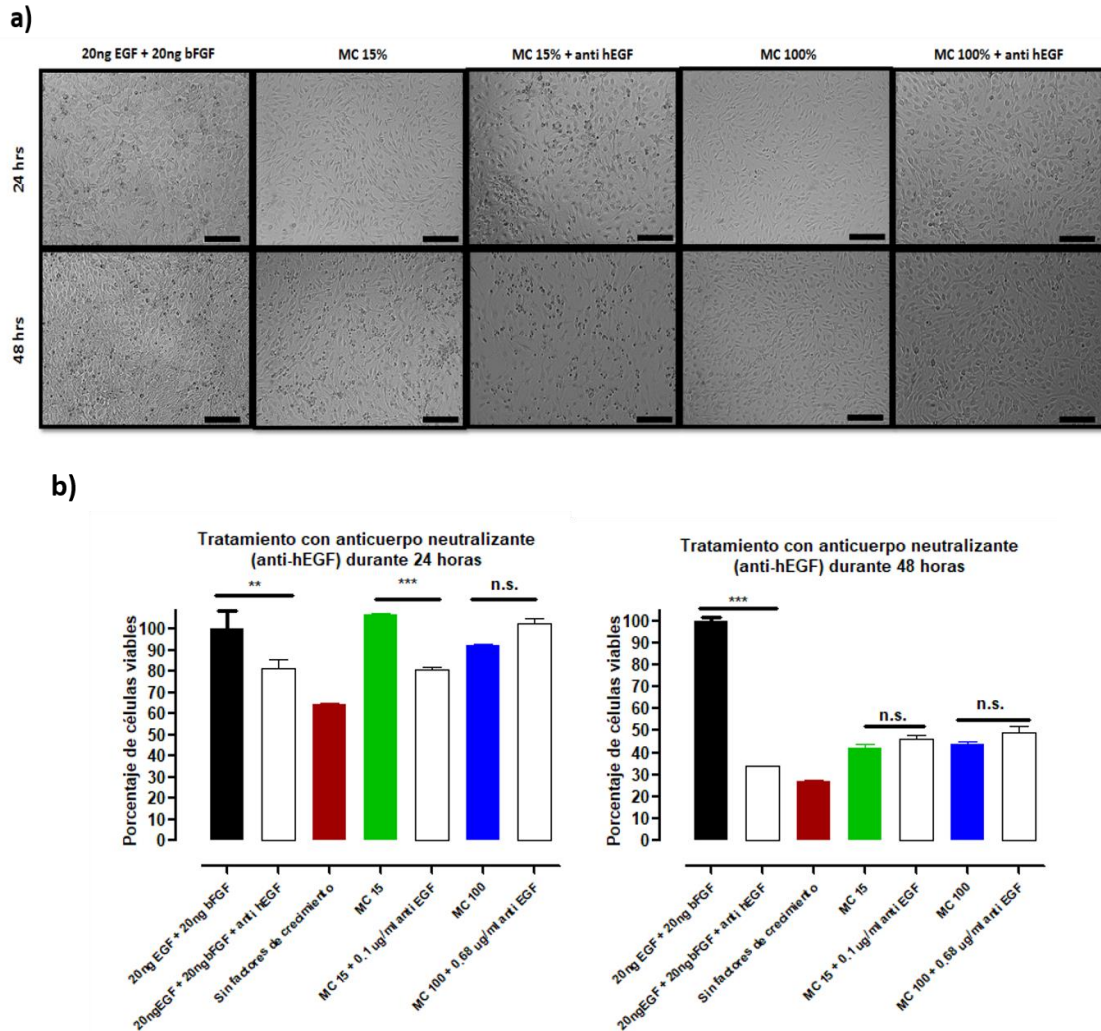
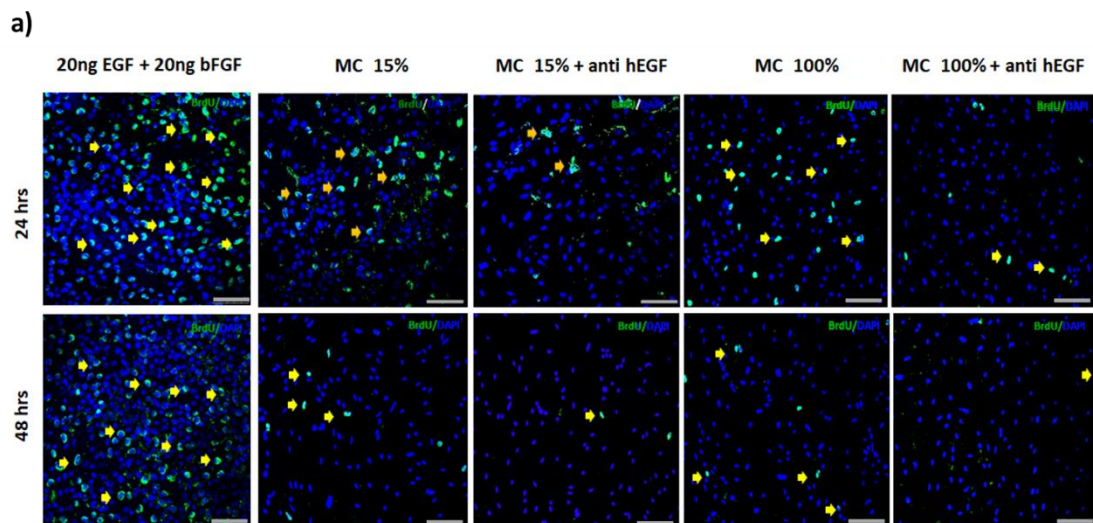


Figura 23. Efecto del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en la viabilidad de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones (MC 15 y 100%) del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha: 20ng EGF + 20ng bFGF, MC 15%, MC 15% + anti-hEGF, MC 100% y MC 100% + anti-hEGF. En la parte superior se muestra la densidad y morfología de las células AHPCs a las 24 horas de iniciados los diferentes estímulos. En la parte inferior se muestran los mismos tratamientos, pero a las 48 horas. b) Representación gráfica del ensayo de viabilidad celular WST-1, a la izquierda se muestra el ensayo a las 24 horas y a la derecha a las 48 horas de iniciado el tratamiento. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. (Para 24 horas, $F_{14,44} = 8.955$; $p < 0.0001$. Para 48 horas,

$F_{14,44} = 144$; $p < 0.0001$). ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 100 μm .

Se ha reportado que el EGF tiene un efecto primordialmente proliferativo [90, 91]. Nuestros resultados muestran que al bloquear el EGF del medio condicionado y cultivar con este medio a las AHPCs durante 24 y 48 horas, hubo una disminución aproximada del 40% en la incorporación de BrdU entre las AHPCs tratadas con EGF y su contraparte el EGF en presencia del anticuerpo neutralizante. Cuando se compararon los medios condicionados (15 y 100%) contra sus respectivos tratamientos en presencia del anticuerpo neutralizante del EGF se observó una disminución del 50% de células en proliferación. El efecto es mayormente marcado a las 48 horas para el caso del control (EGF vs EGF + anti-hEGF) con una disminución de casi el 90% de células que incorporaron BrdU, mientras que en los medios condicionados la disminución de células en proliferación se mantuvo al 50% en presencia del anti-hEGF (figura 24b). Por lo tanto, con este ensayo se corroboró que el efecto proliferativo discreto observado con el medio condicionado se debe esencialmente a la presencia del EGF.

Finalmente, el siguiente punto a evaluar, fueron los cambios en los fenotipos celulares ante la ausencia de este factor en el medio condicionado durante 48 horas (diferenciación).



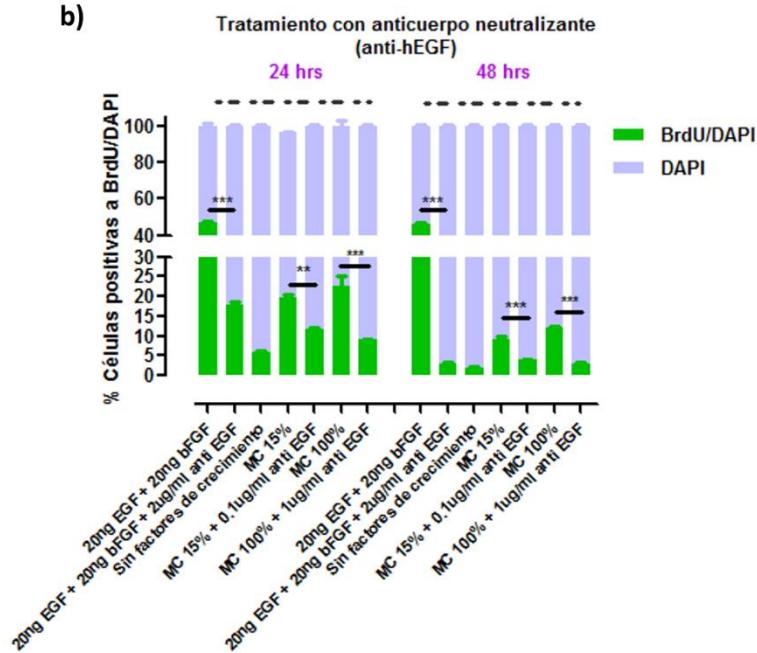


Figura 24. Efecto del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en la proliferación de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones (MC 15 y 100%) del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha: 20ng EGF + 20ng bFGF, MC 15%, MC 15% + anti-hEGF, MC 100% y MC 100% + anti-hEGF. En la parte superior se muestran las células AHPCs positivas a DAPI y BrdU/DAPI (flechas amarillas) a las 24 horas de iniciados los diferentes estímulos. En la parte inferior se muestran los mismos tratamientos, pero a las 48 horas. b) Representación gráfica de los porcentajes de células positivas tanto a BrdU/DAPI como DAPI en respuesta a los diferentes estímulos, a la izquierda se muestra la gráfica las 24 horas y a la derecha a las 48 horas de iniciado el tratamiento. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. Para 24 horas, $F_{6,20} = 137.4$; $p < 0.0001$. Para 48 horas, $F_{6,20} = 1161$; $p < 0.0001$. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 100 μ m.

En la figura 25 se muestra el análisis de los marcadores asociados al estadio precursor y proliferativo de las AHPCs. En la figura 25a se muestran las imágenes en donde se aprecia la disminución en la expresión del marcador Nestina y pH3 en presencia del anti-hEGF tanto en el tratamiento control como en el tratamiento con el medio condicionado al 100%. En los conteos

celulares mostrados en la figura 25b se aprecia en células tratadas con EGF una disminución aproximada del 80% de células positivas al marcador Nestina en presencia del anti-hEGF. De igual manera, también se muestra una disminución del 50% en células tratadas con medio condicionado al 100% y el anti-hEGF. Cuando se analiza al marcador pH3 también se observan disminuciones tanto en células tratadas con EGF como con células cultivadas en el medio condicionado al 100% en presencia del anticuerpo neutralizante (disminuciones cercanas al 100%). Esto corrobora lo determinado previamente con respecto al efecto proliferativo del EGF, y también muestra el efecto de este factor sobre la expresión del marcador neural Nestina, cuya presencia favorece su expresión y su ausencia la inhibe. La conclusión de este análisis indicó que el EGF no sólo favoreció la proliferación de las AHPCs, sino que también mantuvo su estadio precursor, corroborando lo observado en el apartado previo (figura 22b)

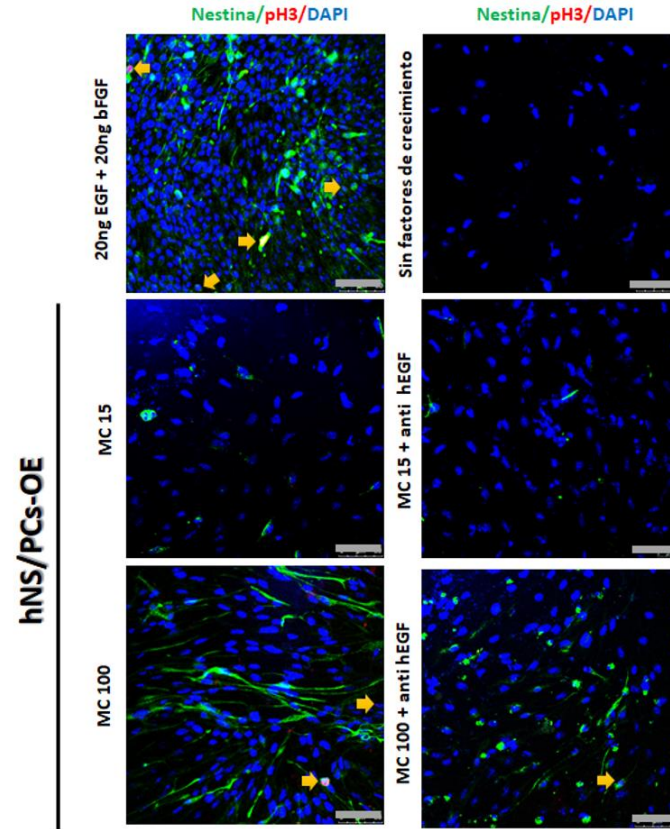
La figura 26 muestra el análisis de los marcadores MAP2 y GFAP, los cuales se expresan en neuronas y astrocitos, respectivamente. Las observaciones mostraron que el anticuerpo neutralizante en el control de proliferación (20ng/ml EGF + 20ng/ml bFGF) favorece el fenotipo neuronal (incremento del 200%) lo cual era de esperarse ya que al bloquear al EGF las células tienen al factor bFGF, el cual ha sido reportado como un factor promotor del estadio neuronal [92, 93]. En cambio, el bloqueo del EGF en el medio condicionado al 100% disminuyó la expresión de MAP2 aproximadamente un 80%, aunque la expresión del marcador no era tan abundante en el tratamiento con el medio condicionado sin el anti-hEGF (5% de las células positivas a MAP2). Con respecto a la expresión de GFAP la situación fue diferente, mientras que el tratamiento del control de proliferación con el anti-hEGF no mostró diferencia significativa con respecto al mismo tratamiento sin el anticuerpo neutralizante, el bloqueo del EGF en el medio condicionado al 100% favoreció aún más el fenotipo astrocítico (un incremento del 35% en el número de células positivas a GFAP). Esto sugiere que alguno o algunos de los factores presentes en el medio condicionado estarían favoreciendo el

fenotipo astrocítico, lo cual fue evidente al bloquear el EGF. Una de las proteínas candidato para explicar este fenómeno es la interleucina-6 (IL-6). De esta citocina se ha descrito su capacidad de inducir la diferenciación astrocítica en precursores neurales [94], y, como se observó en el apartado previo, en nuestro modelo la IL-6 puede inducir la diferenciación astrocítica (figura 22).

El bloqueo del EGF del medio condicionado de las hNS/PCs-OE permitió establecer dos cosas, primero: el efecto proliferativo y el mantenimiento del estadio precursor observado en las AHPCs tratadas con el medio condicionado esta dado por el factor de crecimiento epidérmico y segundo: el efecto en la sobrevivencia y el fenotipo astrocítico de las AHPCs en presencia del medio condicionado no es promovido por el EGF y se explica de manera parcial por la presencia de la IL-6 (fenotipo astrocítico) (figura 22b). Faltaría por explorar otros candidatos para determinar toda la fenomenología que puede ser inducida con el medio condicionado.

a)

AHPCs



b)

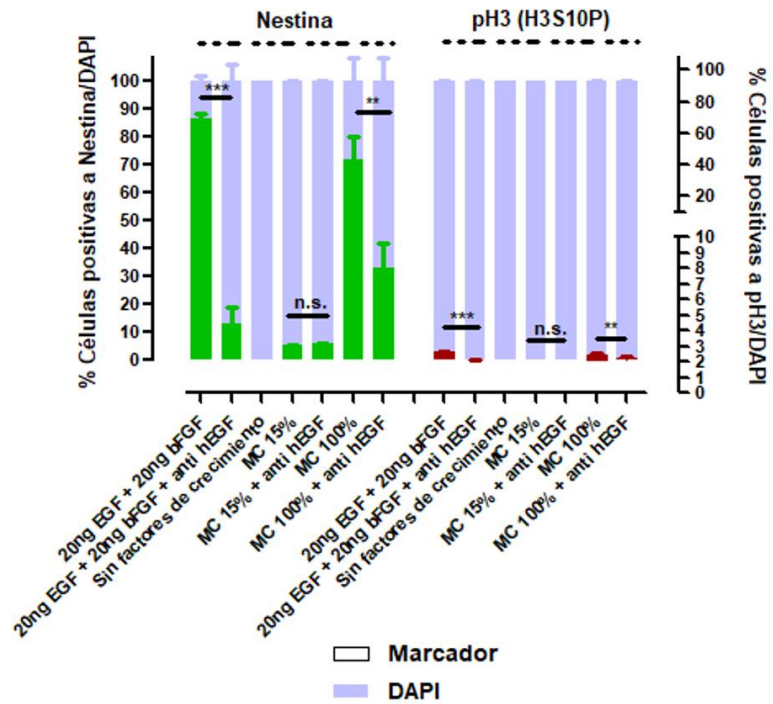
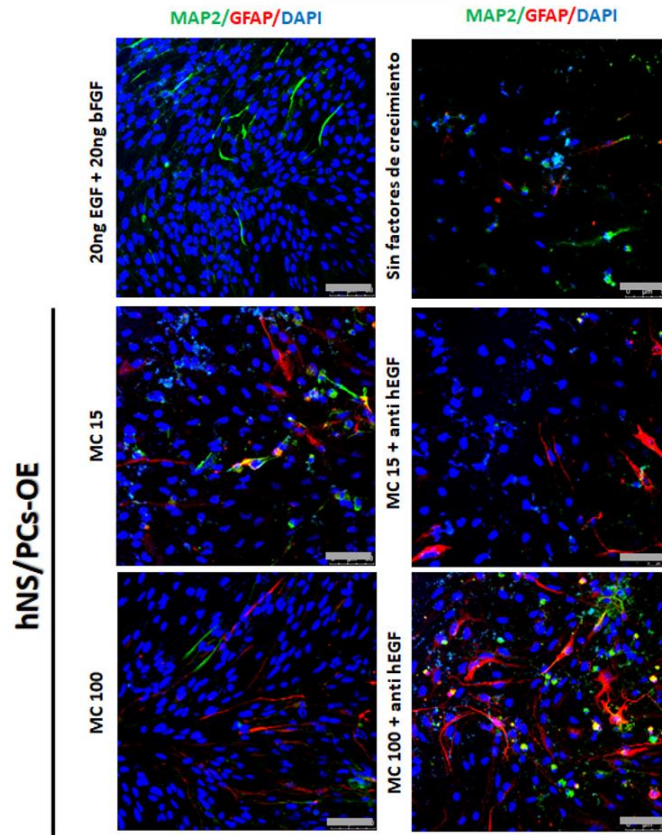


Figura 25. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio precursor y proliferativo (Nestina y pH3, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en las diferentes diluciones del medio condicionado (MC 15 y MC 100%) proveniente de las hNS/PCs-OE durante 48 horas. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha, primera línea: 20ng EGF + 20ng bFGF y sin factores de crecimiento, de izquierda a derecha, segunda línea, MC 15% y MC 15% + anti-hEGF, de izquierda a derecha, tercera línea, MC 100% y MC 100% + anti-hEGF. Con flechas amarillas se señalan las células positivas a la proteína pH3 (fosfo-histona 3). b) Representación gráfica de los porcentajes de células positivas tanto a Nestina como a pH3 en respuesta a los diferentes estímulos. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. 20ng EGF + 20ng bFGF versus 20ng EGF + 20ng bFGF + anti-hEGF, MC 15% versus MC 15% + anti-hEGF y MC 100% versus MC 100% + anti-hEGF. Para Nestina, $F_{6,13} = 46.20$; $p = 0.0001$. Para pH3, $F_{6,13} = 47.23$; $p = 0.0001$. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 50 μm .

a)

AHPCs



b)

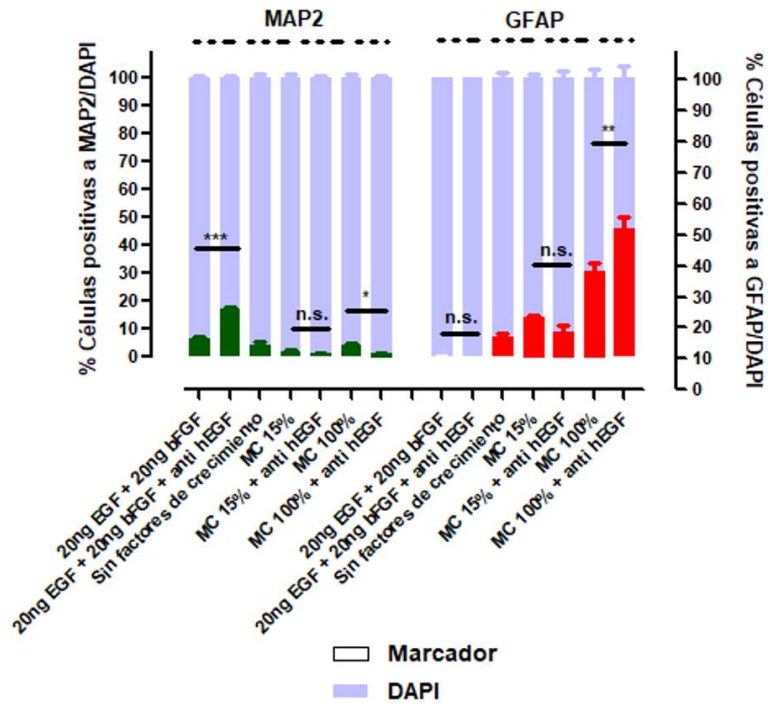
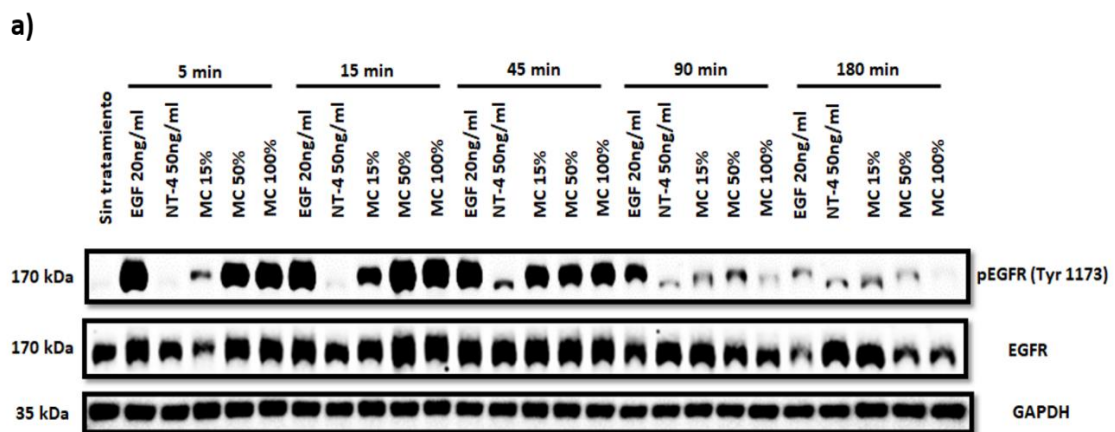


Figura 26. Evaluación de la expresión de marcadores asociados al estadio neuronal y astrocítico (MAP2 y GFAP, respectivamente) de las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) en presencia del anticuerpo neutralizante anti-hEGF en las diferentes diluciones del medio condicionado (MC 15 y MC 100%) proveniente de las hNS/PCs-OE durante 48 horas. a) Imágenes representativas de las AHPCs bajo los diferentes tratamientos; de izquierda a derecha, primera línea: 20ng EGF + 20ng bFGF y sin factores de crecimiento, de izquierda a derecha, segunda línea, MC 15% y MC 15% + anti-hEGF, de izquierda a derecha, tercera línea, MC 100% y MC 100% + anti-hEGF. b) Representación gráfica de los porcentajes de células positivas tanto a MAP2 como a GFAP en respuesta a los diferentes estímulos. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Dunnett. 20ng EGF + 20ng bFGF versus 20ng EGF + 20ng bFGF + anti-hEGF, MC 15% versus MC 15% + anti-hEGF y MC 100% versus MC 100% + anti-hEGF. Para MAP2, $F_{6,13} = 70.95$; $p < 0.0001$. Para GFAP, $F_{6,13} = 80.95$; $p < 0.0001$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las barras de escala representan 50 μ m.

VII.9 Evaluación de la fosforilación de los receptores al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y TrkB en las células precursoras del hipocampo adulto (AHPCs) bajo el tratamiento con el medio condicionado obtenido de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE)



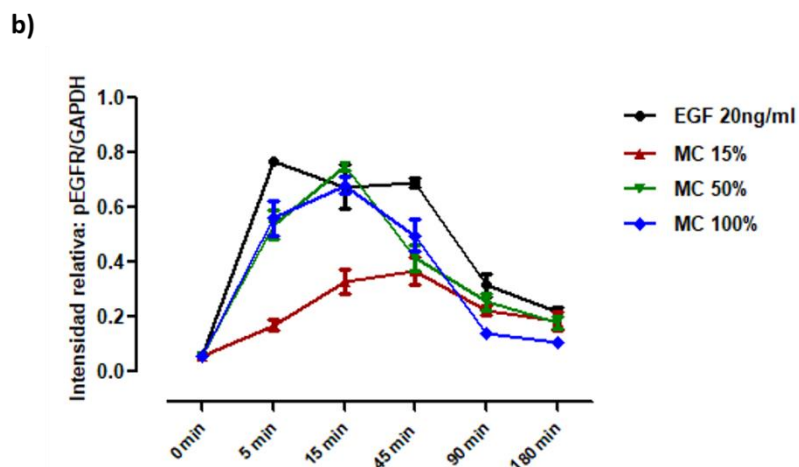
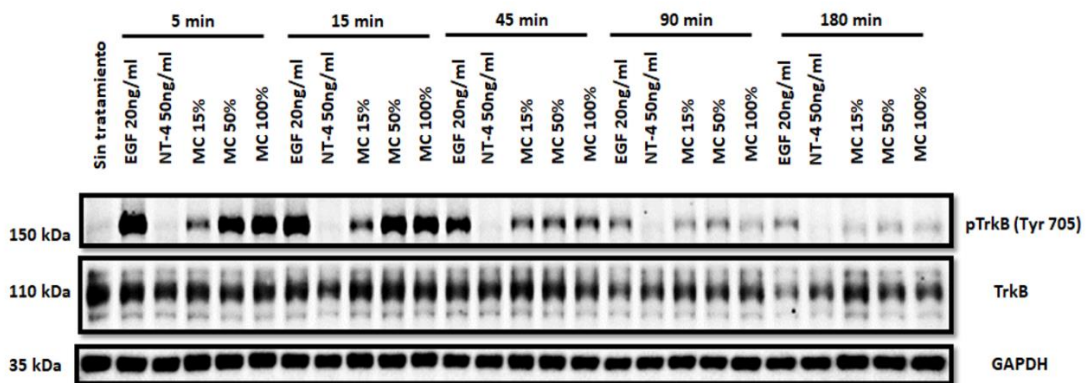


Figura 27. Cinética de fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células precursoras de hipocampo de ratón adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones (MC 15, 50 y 100%) del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE. a) Imagen representativa de las membranas tanto con el pEGFR (Tyr 1173) y el EGFR, así como el control de carga GAPDH cargadas con los diferentes lisados proteicos provenientes de las AHPCs bajo los siguientes tratamientos: Sin tratamiento, EGF 20ng/ml, NT-4 50ng/ml, MC15%, MC 50% y MC 100% a los 5 min, 15 min, 45 min, 90 min y 180 min. b) Análisis densitométrico de la fosforilación de pEGFR normalizado contra GAPDH (derecha).

En los ensayos previos, se mostró que el EGF presente en el medio condicionado de las hNS/PCs-OE es un factor importante en el efecto proliferativo y de mantenimiento del estadio precursor de las AHPCs. Se sabe que dicho factor señala a través de su receptor (EGFR) y que no sólo activa a éste, sino que también es capaz de transactivar a otro receptor como el TrkB [72], el cual también tiene efectos proliferativos en células troncales de estirpe neural [88] y que al menos uno de sus ligandos también es liberado (NT-4) por las hNS/PCs-OE. Por todo lo anterior, decidimos evaluar la activación de ambos receptores en nuestro modelo, para lo cual se procedió a hacer una cinética de fosforilación con las diferentes diluciones del medio condicionado, así como utilizar como controles la unión de los respectivos ligandos a su receptor. En la figura 27 se muestra la fosforilación del EGFR en lisados proteicos de AHPCs, dicha fosforilación se normalizó

con el receptor total y el control de carga GAPDH (figura 27b). En esta figura se observa que el EGF, ligando de EGFR, activa al receptor desde los 5 minutos, la fosforilación fue disminuyendo conforme transcurría el tiempo hasta llegar a un nivel casi imperceptible en el gel del WB que se muestra en la figura 27a en el tiempo más largo (180 minutos). Los medios condicionados al 50 y el 100% tuvieron un comportamiento muy parecido al ligando, sobre todo cuando se normalizó contra GAPDH, ya que el receptor total (EGFR) muestra variaciones en su expresión a lo largo del tiempo, lo cual puede deberse al recambio o degradación del receptor [95]. El tiempo en donde se muestra la mayor fosforilación en presencia del ligando fue a los 5 minutos. Con los medios condicionados al 50 y 100% fue a los 15 minutos, mientras que con el medio condicionado al 15% el tiempo de mayor fosforilación ocurrió hasta los 45 minutos, probablemente por la menor cantidad de ligando (EGF) presente en el medio.

a)



b)

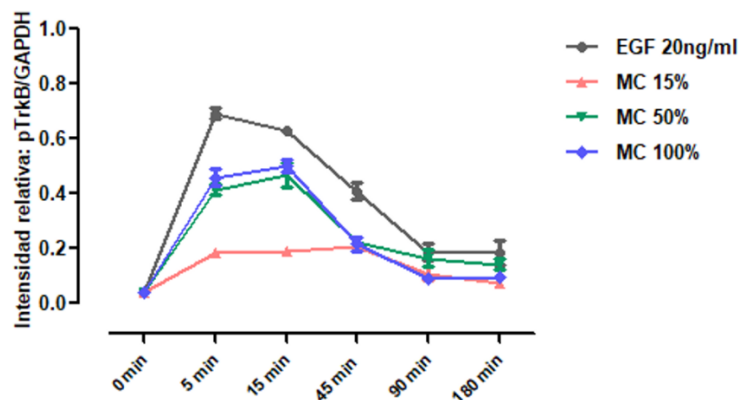


Figura 28. Cinética de fosforilación del receptor cinasa asociado a tropomiosina b (TrkB) en las células precursoras de hipocampo adulto (AHPCs) tratadas con diferentes diluciones (MC 15, 50 y 100%) del medio condicionado proveniente de las hNS/PCs-OE. a) Imagen representativa de las membranas tanto con el pTrkB (Tyr 705) y el TrkB, así como el control de carga GAPDH cargadas con los diferentes lisados proteicos provenientes de las AHPCs bajo los siguientes tratamientos: Sin tratamiento, EGF 20ng/ml, NT-4 50ng/ml, MC15%, MC 50% y MC 100% a los 5 min, 15 min, 45 min, 90 min y 180 min. b) Análisis densitométrico de la fosforilación de pTrkB normalizado contra GAPDH (derecha).

En la figura 28 se muestra la cinética de fosforilación del receptor cinasa asociado a tropomiosina b (TrkB) después de la estimulación con un ligando (NT-4), un no-ligando (EGF) y los medios condicionados a las tres diluciones analizadas (15, 50 y 100%). A diferencia de lo observado en la figura anterior, el ligando no fosforila al receptor, este fenómeno ya ha sido reportado previamente, sobre todo en células troncales de cerebro adulto [96]. La explicación se asocia a la necesidad del receptor de un estímulo además del ligando para iniciar su activación, probablemente un impulso eléctrico [97], lo interesante de esta figura es que el no-ligando (EGF) si favorece la fosforilación del receptor, situación que ha sido determinada como una transactivación previamente reportada para estos receptores (EGFR y TrkB) en otros modelos [72]. Los medios condicionados también fosforilan al receptor, debido a la presencia de EGF en el medio. El comportamiento de la activación tanto con el no-ligando y las diferentes diluciones de medio condicionado es el mismo, siendo el pico más alto de activación a los 5 minutos en todas las condiciones, aunque la intensidad no es la misma entre diluciones, siendo la más diluida (MC 15%) la de menor intensidad (figura 28b). La fosforilación de TrkB en cada condición se normalizó tanto con el receptor total como con GAPDH ya que se observó una variación en la expresión del receptor total.

Una manera de determinar el efecto del EGF presente en el medio condicionado sobre la activación de su propio receptor y sobre todo de la

transactivación con TrkB fue bloquear al factor dentro del medio condicionado, para lo cual se utilizó el anticuerpo neutralizante anti-hEGF.

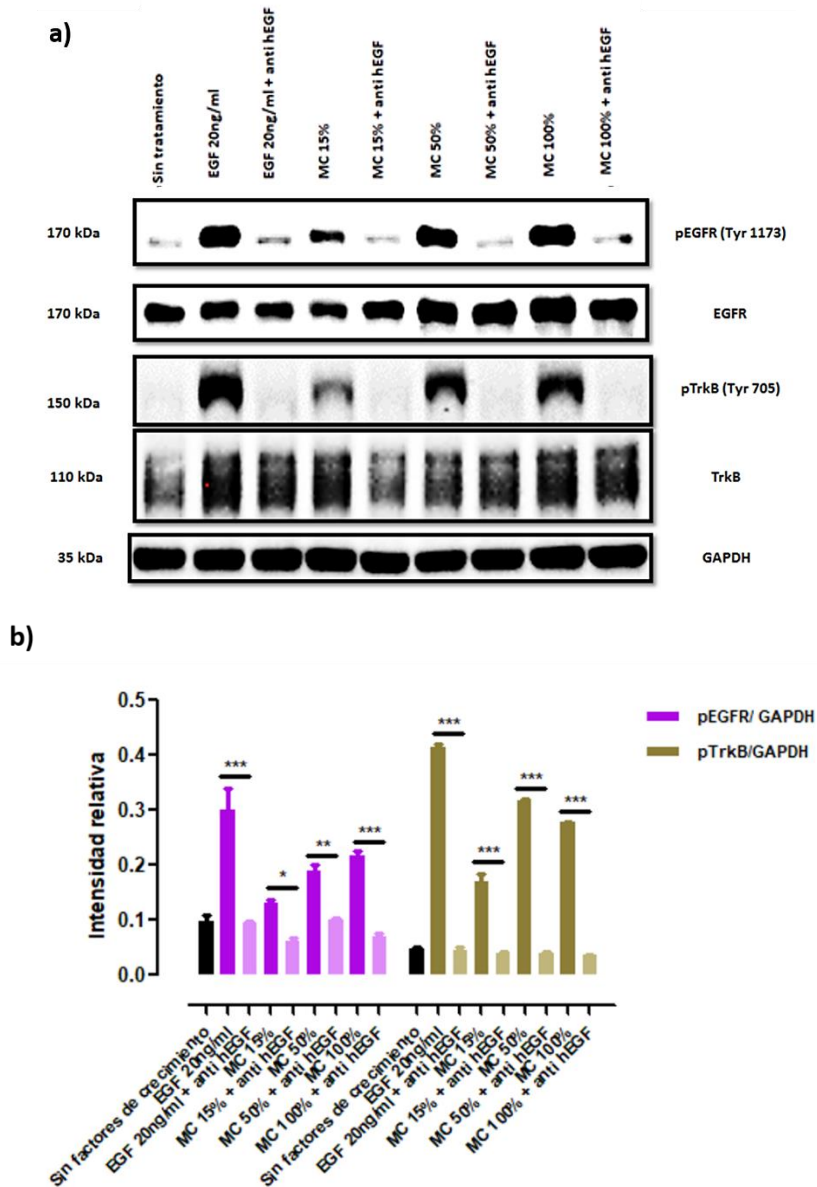
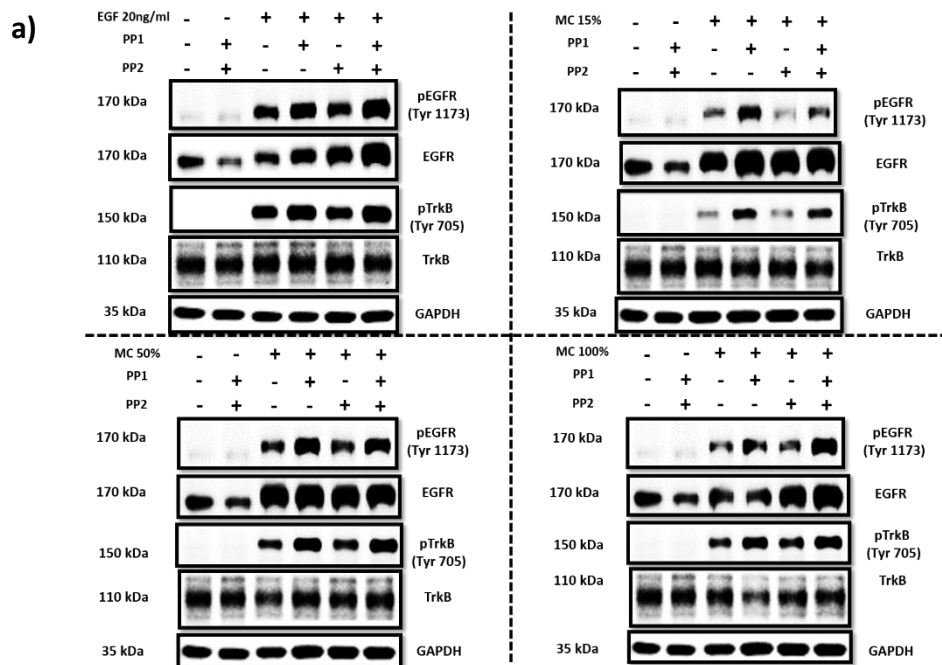


Figura 29. El anticuerpo neutralizante anti-hEGF bloquea la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB inducidos por el medio condicionado. a) En la parte superior se muestra la imagen representativa de las membranas tanto con el pEGFR (Tyr 1173) y el EGFR, así como el pTrkB (Tyr 705) y el TrkB y el control de carga GAPDH cargadas con los diferentes lisados proteicos provenientes de las AHPCs bajo los siguientes tratamientos: Sin tratamiento, EGF 20ng/ml, EGF 20ng/ml + anti-hEGF, MC 15%, MC 15% + anti-hEGF, MC 50%, MC 50% + anti-hEGF, MC 100% y MC 100% + anti-hEGF. b) En la

parte inferior se indica el análisis densitométrico de la fosforilación de pEGFR normalizada contra GAPDH y de la fosforilación de pTrkB contra GAPDH. Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Bonferroni. 20ng/ml EGF versus 20ng/ml EGF + anti-hEGF, MC 15% versus MC 15% + anti-hEGF, MC 50% versus MC 50% + anti-hEGF and MC 100% versus MC 100% + anti-hEGF. Para pEGFR/GAPDH, $F_{8,17} = 26.62$; $p < 0.0001$; $p < 0.0001$; para pTrkB/GAPDH, $F_{8,17} = 612.6$; $p < 0.0001$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

En la figura 29 se muestra el resultado del bloqueo del EGF en el medio condicionado. En la segunda y tercera columna se muestra un control con EGF (factor puro) y otro con el factor en presencia del anticuerpo neutralizante. Se observa una disminución de más del 60% en el caso de la fosforilación del EGFR y una de casi el 90% de la fosforilación de TrkB normalizadas con GAPDH (figura 29a y 29b). La situación con los medios condicionados fue la misma, una reducción en la fosforilación de EGFR de más del 60% y una de casi el 90% de TrkB. Con esto se comprueba que el efecto del medio condicionado en la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB se debe al EGF presente en el medio.

Finalmente, con esta serie de ensayos se determinó que el EGF es el factor que está promoviendo la activación de dos receptores íntimamente relacionados con proliferación y supervivencia celular (EGFR y TrkB).



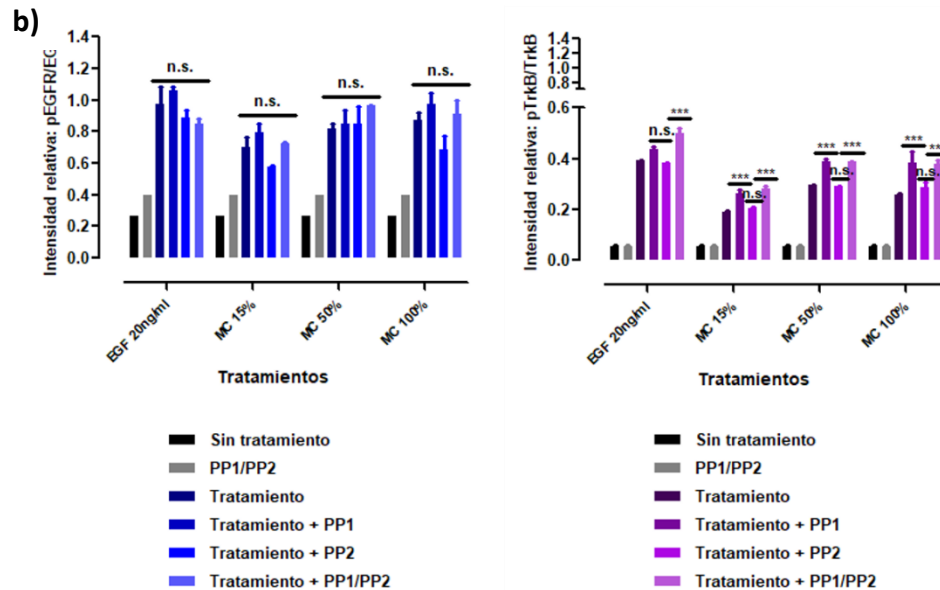


Figura 30. Efecto de los inhibidores de la Src, PP1 y PP2, en la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB en presencia del medio condicionado a los 5 minutos de iniciados los tratamientos. a) Imagen representativa de las membranas tanto con el pEGFR (Tyr 1173), el EGFR, el pTrkB (Tyr 705) y el TrkB así como el control de carga GAPDH cargadas con los diferentes lisados proteicos provenientes de las AHPCs bajo los siguientes tratamientos: esquina superior izquierda; sin tratamiento, solamente los inhibidores (PP1 y PP2), 20ng/ml de EGF (Tratamiento), 20ng/ml de EGF + PP1, 20ng/ml de EGF + PP2 y 20ng/ml de EGF + PP1/PP2; esquina superior derecha; sin tratamiento, solamente los inhibidores (PP1 y PP2), MC 15% (Tratamiento), MC 15% + PP1, MC 15%+ PP2 y MC 15% + PP1/PP2; esquina inferior izquierda; sin tratamiento, solamente los inhibidores (PP1 y PP2), MC 50% (Tratamiento), MC 50% + PP1, MC 50%+ PP2 y MC 50% + PP1/PP2; esquina inferior derecha; sin tratamiento, solamente los inhibidores (PP1 y PP2), MC 100% (Tratamiento), MC 100% + PP1, MC 100%+ PP2 y MC 100% + PP1/PP2. b) Análisis densitométrico de la fosforilación de EGFR normalizado contra EGFR (izquierda) y de la fosforilación de TrkB normalizado contra TrkB (derecha). Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de dos vías seguida de la prueba post-hoc Bonferroni. Para pEGFR/EGFR, factor A (tratamiento) $F_{3,18} = 11.57$, $p = 0.0002$; factor B (proteína fosforilada) $F_{5,18} = 85.37$, $p < 0.0001$ y su interacción $F_{15,18} = 2.553$, $p = 0.0304$. Para pTrkB/TrkB, factor A (tratamiento) $F_{3,18} = 125.2$, $p < 0.0001$; factor B (proteína fosforilada) $F_{5,18} = 423.4$, $p < 0.0001$ y su interacción $F_{15,18} = 13.77$, $p < 0.0001$. *** $p < 0.001$.

Una vez descrito el fenómeno de transactivación en las AHPCs entre los receptores EGFR y TrkB, lo siguiente fue determinar el mecanismo de acción. Se ha descrito ampliamente que la cinasa Src fosforila varios residuos tirosina de varias proteínas, entre ellas TrkB [72, 98]. Para probar que la fosforilación de esta cinasa regula la fosforilación del residuo tirosina de TrkB en nuestro modelo, se realizó la inhibición de la misma mediante el uso de dos inhibidores, PP1 y PP2. Estos inhibidores tienen una afinidad por esta cinasa y el bloqueo de ésta nos permitiría ver solamente la fosforilación de EGFR y no la de TrkB en presencia tanto del ligando como del medio condicionado. En la figura 30b se muestra el análisis densitométrico de los diferentes tratamientos (EGF y medios condicionados) en presencia o ausencia de los inhibidores. El análisis se realizó a los 5 minutos. La normalización de cada fosforilación se hizo con respecto a su total. Al revisar la fosforilación de EGFR se observó lo esperado, es decir, no hubo un cambio debido a la presencia de los inhibidores, sin embargo, TrkB en presencia del inhibidor PP1 incrementó su fosforilación. Lo anterior se puede explicar por el hecho de que el inhibidor también es afín a otras cinasas, como Csk [99, 100]. El bloqueo de esta cinasa inhibe la fosforilación inhibidora sobre Src, por lo que la Src queda en un estado de conformación favorable para su autofosforilación y por lo tanto permite una mayor activación del receptor como TrkB, de acuerdo con lo observado en la figura 30b.

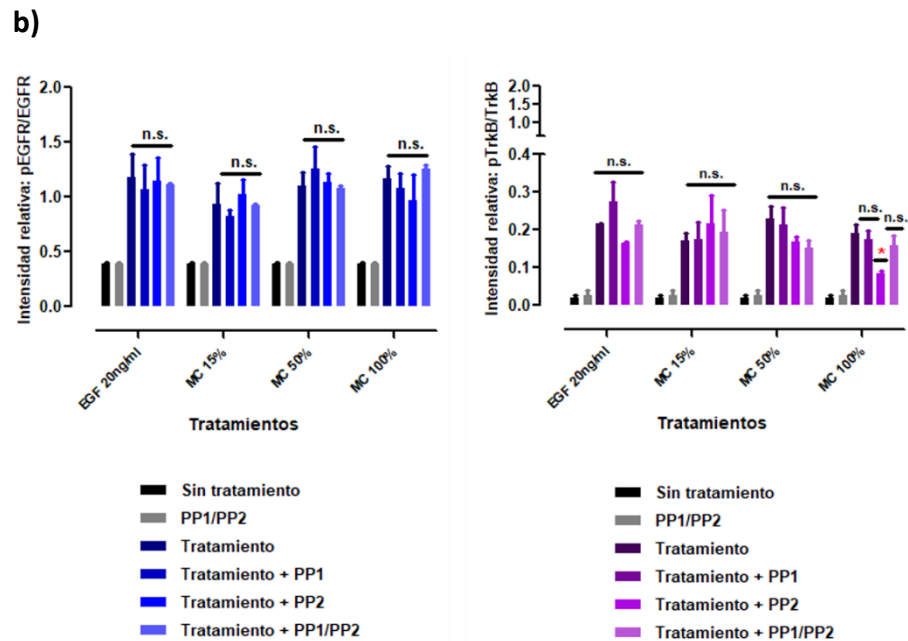
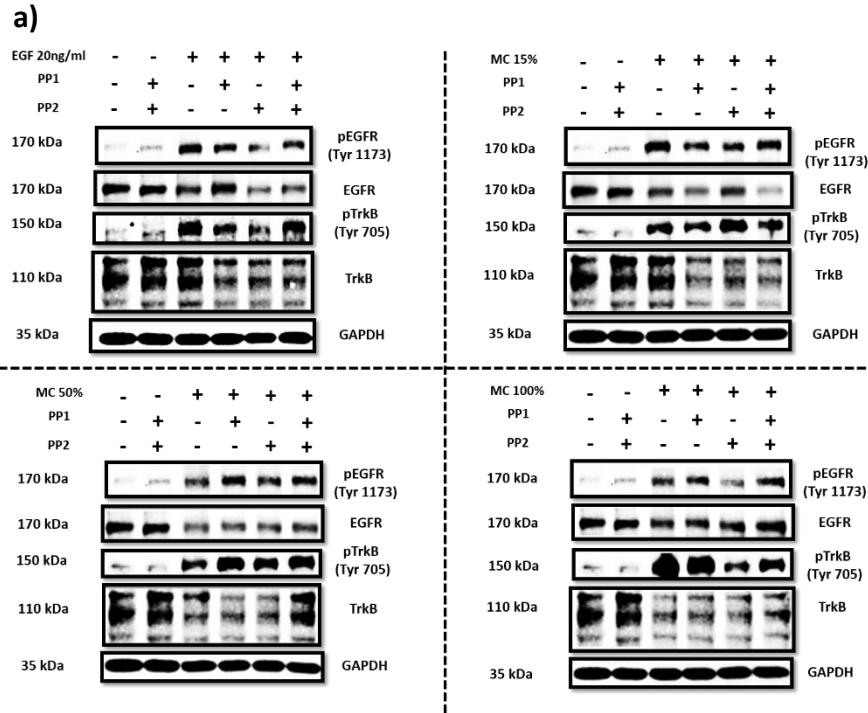


Figura 31. Efecto de los inhibidores de la Src, PP1 y PP2, en la fosforilación de los receptores EGFR y TrkB en presencia del medio condicionado a los 45 minutos de iniciados los tratamientos. a) Imagen

representativa de las membranas tanto con el pEGFR (Tyr 1173), el EGFR, el pTrkB (Tyr 705) y el TrkB así como el control de carga GAPDH cargadas con los diferentes lisados proteicos provenientes de las AHPCs bajo los siguientes tratamientos: esquina superior izquierda; sin tratamiento, solamente los inhibidores (PP1 y PP2), 20ng/ml de EGF (Tratamiento), 20ng/ml de EGF + PP1, 20ng/ml de EGF + PP2 y 20ng/ml de EGF + PP1/PP2; esquina superior derecha; sin tratamiento, solamente los inhibidores (PP1 y PP2), MC 15% (Tratamiento), MC 15% + PP1, MC 15%+ PP2 y MC 15% + PP1/PP2; esquina inferior izquierda; sin tratamiento, solamente los inhibidores (PP1 y PP2), MC 50% (Tratamiento), MC 50% + PP1, MC 50%+ PP2 y MC 50% + PP1/PP2; esquina inferior derecha; sin tratamiento, solamente los inhibidores (PP1 y PP2), MC 100% (Tratamiento), MC 100% + PP1, MC 100%+ PP2 y MC 100% + PP1/PP2. b) Análisis densitométrico de la fosforilación de EGFR normalizado contra EGFR (izquierda) y de la fosforilación de TrkB normalizado contra TrkB (derecha). Los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los resultados fueron analizados utilizando una ANOVA de dos vías seguida de la prueba post-hoc Bonferroni. Para pEGFR/EGFR, factor A (tratamiento) $F_{3,18} = 4.049$, $p = 0.0231$; factor B (proteína fosforilada) $F_{5,18} = 14.11$, $p = 0.0029$ y su interacción $F_{15,18} = 1.242$, $p = 0.3270$. Para pTrkB/TrkB, factor A (tratamiento) $F_{3,18} = 2.491$, $p = 0.0931$; factor B (proteína fosforilada) $F_{5,18} = 28.94$, $p = 0.0004$ y su interacción $F_{15,18} = 1.254$, $p = 0.3201$. * $p < 0.05$.

Después de lo obtenido en el experimento anterior, y tomando en cuenta lo reportado por otros autores [101-103], se repitieron las condiciones previas, pero a un mayor tiempo, esto es, 45 minutos. Todo esto para darle tiempo al inhibidor de unirse primordialmente a la proteína Src, más que a Csk y así determinar si efectivamente la transactivación se debía a la proteína Src. De acuerdo con lo observado en la figura 31b, al analizar la fosforilación del EGFR, no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo, al analizar la fosforilación de TrkB, el tratamiento con el medio condicionado al 100% mostró una diferencia significativa entre el tratamiento con el medio y el tratamiento en presencia del inhibidor PP2, con una disminución de la fosforilación en esta última condición. También el tratamiento con el ligando (EGF) y su inhibición con PP2 muestra una tendencia a disminuir la fosforilación del receptor, aunque no llega a ser significativa. Por lo tanto, a diferencia de lo observado en otros modelos [72], el inhibidor PP2 impidió la fosforilación de TrkB en presencia del medio condicionado al 100%, por lo que podemos pensar que inhibió a la proteína

Src, de tal manera que dicha inhibición comprueba que el fenómeno de transactivación al 100% del medio condicionado se encuentra mediada por la cinasa, tal y como se ha reportado en otros modelos [103, 104]. En conclusión, estos resultados mostraron que el medio condicionado utiliza para mantener a las AHPCs en estadio proliferativo y precursor la activación del EGFR y la transactivación de TrkB. Sería importante para continuar este trabajo determinar la activación de los demás receptores involucrados en los otros efectos de dicho medio sobre las AHPCs.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos cumplieron los objetivos propuestos; la caracterización de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano (hNS/PCs-OE), la caracterización de las proteínas solubles que secretaron y finalmente, el efecto de lo secretado por estas células en otras células (AHPCs) pertenecientes a uno de los nichos neurogénicos del cerebro adulto: el giro dentado del hipocampo.

Al analizar los resultados de la caracterización de las hNS/PCs-OE se observaron dos aspectos importantes; la expresión del marcador de células troncales neurales, Nestina, disminuyó cuando las hNS/PCs-OE fueron sometidas a un protocolo de diferenciación con ácido retinoico (RAFskShh) pero no dejó de expresarse, como ocurre en otros protocolos con células troncales neurales del sistema nervioso central (SNC) [105, 106]. De acuerdo a lo reportado en la literatura, este protocolo favorece el linaje colinérgico en las neuronas generadas [70], lo anterior correlacionaría con la expresión del marcador después del tratamiento, ya que también se ha reportado que, un tipo de linaje en donde se expresa esta proteína, es el colinérgico [107, 108] aunque faltaría confirmar si el linaje de las neuronas generadas es el reportado y una manera de hacerlo es mediante la búsqueda del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) [109]. Otro aspecto por

considerar es la expresión de la isoforma de bajo peso molecular de MAP2 (aproximadamente 70 kDa) y no la de alto peso molecular (entre 240 y 280 kDa), la cual ha sido ampliamente reportada en el sistema nervioso central y cuya expresión correlaciona con neuronas maduras. El hecho de no favorecer la expresión de la isoforma de alto peso molecular, pero si la de bajo peso molecular en las hNS/PCs-OE diferenciadas bajo este protocolo, probablemente se deba a dos fenómenos: el primero, a que estas células no se encontraban totalmente maduras y por ello solamente expresaron la isoforma pequeña. Cabe señalar que su expresión correlaciona con procesos como neuritogénesis, lo cual indicaría que ya son neuronas, pero que se encuentran en el proceso de maduración [110, 111] El segundo fenómeno se debe a la expresión de esta isoforma en neuronas de estadio prenatal y en el sistema olfatorio [112], región de la cual fueron extraídas las hNS/PCs-OE [39]. Otra proteína que disminuyó su expresión y en algunas células se dejó de expresar con el tratamiento de diferenciación (figura 7e) fue β III tubulina, una proteína de citoesqueleto presente en neuronas inmaduras [113] y cuya disminución en la expresión corroboraría la salida del estadio inmaduro de las hNS/PCs-OE debido al tratamiento. Finalmente, la nula expresión de la proteína Ki67 en las células tratadas con la mezcla (RAFskShh), indicó la ausencia de proliferación en estas células [114], hecho que sugiere que el tratamiento favoreció el paso de las células del estadio neuroblástico a uno más comprometido.

Con respecto al análisis de los factores solubles presentes en el medio condicionado se observó que uno de los factores detectados por el arreglo precargado con anticuerpos fue el EGF, factor agregado a las hNS/PCs-OE junto con el bFGF para promover su proliferación y óptimo crecimiento. La identificación del EGF en el medio condicionado fue algo sorprendente ya que se ha reportado que la vida media del factor va de 30 minutos a 4 horas [95]. Este hecho no nos permitió definir si las hNS/PCs-OE tienen la capacidad de producir y liberar éste factor al medio debido a una fosforilación de su receptor lo que podría tener como resultado final la síntesis de más ligando

[115, 116]. Lo anterior se podría demostrar realizando una cinética en donde se estimularía al receptor EGFR con el ligando EGF durante diferentes tiempos (minutos a horas) y recuperar a las células para determinar, ya sea por WB o ELISA si las células están sintetizando el ligando en respuesta a la fosforilación del receptor. Además ha sido ampliamente reportado que, de acuerdo con el estímulo la célula responde, es decir, si se cultiva a las células bajo condiciones estandarizadas de crecimiento o bajo otro estímulo, el perfil de secreción es diferente [117]. Utilizando esta premisa, varios grupos de trabajo han probado precondicionar sus medios, es decir, darle a la célula el estímulo necesario (ya sea con un factor o una condición determinada como hipoxia) para favorecer la secreción de algún o algunos factores de interés [118, 119]. Para este caso en particular, el estímulo con los factores de crecimiento favoreció la secreción de más de 40 proteínas implicadas en diversas funciones. Dichas funciones incluyen proliferación, migración y crecimiento neurítico (figura 9c).

Antes de evaluar algunos de los eventos involucrados en el proceso neurogénico, como son la proliferación y diferenciación neural, primero se establecieron las condiciones de aplicación del medio condicionado sobre las AHPCs. Es importante mencionar que el modelo es muy particular, ya que la modificación del medio de cultivo y sus suplementos provocan cambios que si no se controlan no hubieran permitido los análisis realizados en el proceso neurogénico. Por ello fue necesario adaptar a las hNS/PCs-OE al medio en el que crecen las AHPCs y así asegurar que el medio condicionado tuviera la misma base en donde se cultivan las AHPCs, además de que no se sabía si alguna o algunas de las moléculas liberadas tuvieran algún efecto tóxico en las AHPCs. Por todo lo anterior, el primer análisis fue un ensayo de viabilidad celular utilizando diferentes diluciones del medio condicionado durante 24 y 48 horas. Los resultados mostraron que una gran parte de las diluciones del medio condicionado fueron capaces de mantener la viabilidad de las AHPCs e incluso, a las 24 horas, no se encontraron diferencias significativas con

respecto al control de proliferación (figura 10b) lo cual sugería algún efecto proliferativo.

Al observar el porcentaje de células que incorporaron BrdU con los tratamientos a las diferentes diluciones de medio condicionado, comparados contra el control de proliferación, mostraron una disminución, pero siguieron siendo mayores que el medio sin factores de crecimiento (figura 11b), es decir, el medio condicionado permitió la proliferación de las células que todavía respondieron a los factores de crecimiento que estimulan esta condición. La razón de que no haya una respuesta concentración-respuesta, es decir, la tasa de proliferación sea prácticamente la misma entre las tres diluciones de medio condicionado analizadas, probablemente se deba a que las diferentes poblaciones favorecidas en cada dilución de medio condicionado expresan los receptores de los factores de crecimiento suficientes para generar el mismo efecto proliferativo [120], hecho apoyado por la identificación del receptor para el EGF en las células AHPCs (figura 27)

El proceso de diferenciación en modelo murino es muy rápido en el sentido de que los cambios en la expresión de marcadores y determinación de fenotipos se dan incluso a las 24 horas de iniciado el estímulo (datos no mostrados; Overall Ruppert y colaboradores; manuscrito en preparación), en comparación con el modelo humano, cuyos cambios se comienzan a observar hasta 21 o 28 días después de iniciado el tratamiento [121] *in vitro*. La importancia de que el modelo responda rápidamente a los estímulos radica en que se aplique el medio condicionado; es decir, un medio condicionado obtenido es un medio agotado, un medio que la célula ya usó y que se sabe contiene muchos factores solubles, pero también que ya no tiene muchos aminoácidos y en algunos casos el pH se encuentra ligeramente acidificado (lo cual debe evitarse). Por lo tanto, para realizar un ensayo de diferenciación hay que considerar los cambios de medio y por esa razón se tomaron los tres tiempos mostrados en los resultados y en cada

cambio se tomaban muestras y al final se analizaron los fenotipos celulares presentes en cada cambio. El resultado mostró que a las primeras 48 horas de tratamiento se favorecieron dos fenotipos, uno precursor y otro astrocítico, en esta ocasión si hubo un comportamiento concentración-dependiente (figura 12 y 13). El más notorio fue el medio condicionado al 15%, condición que no promovía la presencia de células precursoras, pero tampoco astrocitos o neuronas, probablemente el fenotipo de las células correspondía a neuronas o astrocitos inmaduros o incluso oligodendrocitos, ya que estos fenotipos no fueron determinados en el ensayo. En el siguiente tiempo (96 horas), los medios condicionados al 15 y 50% seguían sin favorecer algún fenotipo de los analizados, en cambio el medio condicionado al 100% favorecía aún más el fenotipo astrocítico, y seguía disminuyendo el precursor. En el último tiempo, el medio condicionado al 100% sólo mantuvo a la población favorecida (astrocitos) mientras que la población precursora se encontraba muy disminuida. Con respecto a las otras diluciones, las células se encontraban afectadas, y no se favoreció la presencia de los fenotipos analizados. El control sin factores de crecimiento también favoreció la diferenciación astrocítica, como se ha reportado previamente [81], dicho protocolo de diferenciación es muy agresivo ya que la cantidad de células que sobreviven es muy pequeña, en cambio con el medio condicionado las células se mantuvieron en buen número y aparentemente sanas (sobrevivencia).

Determinado el efecto del medio condicionado sobre las AHPCs, se analizaron los mecanismos de señalización que se activaron con dicho medio. Las vías de señalización involucradas con el proceso neurogénico (proliferación, migración y diferenciación) de las células troncales neurales son PI3K/Akt [122], mTOR [123], MAPK [83], Jak/STAT y Notch [124], entre otras. Utilizando un arreglo precargado con anticuerpos que permiten identificar proteínas fosforiladas o escindidas relacionadas a las vías de señalización antes mencionadas y otras más. Se determinó el perfil de activación de las AHPCs inducido por las diferentes diluciones de medio

condicionado. Cuando se compararon con respecto al control de proliferación, el nivel de activación fue muy similar, las diferencias se observaron en el tratamiento con el medio condicionado al 50% (figura 18), en donde la activación fue mayor que el control. Una de las vías favorecida por el tratamiento con el medio condicionado al 100% fue la de Jak/STAT, de la cual se ha reportado su activación durante la diferenciación astrocítica [87, 125]. Lo anterior correlacionaría con el fenotipo observado durante todo el proceso de diferenciación analizado *in vitro* con el medio condicionado al 100% (figuras 13,15 y 17). Al revisar las proteínas detectadas en el arreglo (figura 9b), se encontró que una de las citocinas detectadas, la interleucina-6 (IL-6), tiene un efecto sobre la diferenciación astrocítica en las células troncales neurales, cuya vía de señalización es activada a través de Stat3 [126], además de que el EGF presente en el medio condicionado señala a través de Erk 1/2 así como PI3K/Akt para ejercer su función proliferativa [127]. Por lo tanto, ambas proteínas fueron candidatas para evaluar su función en las AHPCs. Las concentraciones determinadas para ambos factores en el medio condicionado fueron las utilizadas para la realización del ensayo de diferenciación con los compuestos puros (figura 22), el resultado mostró que la IL-6 favorece el linaje astrocítico, aunque la mezcla de factores (EGF e IL-6) no reprodujo los fenotipos favorecidos por el medio condicionado, por lo tanto, aunque los dos factores analizados tienen un papel importante en el efecto global del medio condicionado, no explican en su totalidad dicho efecto (sobrevivencia y diferenciación astrocítica), por lo que existen otras proteínas candidato que necesitan ser validadas para explicar cuáles de los factores liberados por las hNS/PCs-OE, en su conjunto, mimetizan el efecto completo del medio condicionado sobre las AHPCs.

Una vez establecido el efecto del EGF en las AHPCs, se determinó el impacto funcional del bloqueo del EGF del medio condicionado en las AHPCs. Se observó que las células dejaron de proliferar (figura 24) pero, en general, no perdieron su viabilidad (figura 23), corroborando el efecto

proliferativo de EGF, previamente reportado [128] y observado en nuestro modelo (figura 22). Sin embargo, además de perder capacidad proliferativa, las AHPCs dejaron de expresar a la proteína Nestina, lo que indica la pérdida del estadio precursor, por lo tanto, el EGF presente en el medio condicionado, mantiene el estadio proliferativo y precursor de las AHPCs. El hecho de bloquear al EGF del medio condicionado, permitió definir cuáles de los efectos se debían al factor y cuáles no. En la figura 26 se aprecia que el uso del anticuerpo neutralizante favoreció aún más el fenotipo astrocítico, por lo que ese efecto es explicado en gran medida por la IL-6 (figura 22).

La interleucina-6 es una citocina cuya función ha sido ampliamente descrita en el sistema nervioso central [126], dicha función se encuentra asociada al proceso de gliogénesis a través de la fosforilación de Stat3, su dimerización y posterior translocación al núcleo, así como su unión al promotor del gen para GFAP, un filamento intermedio específico de astrocitos, utilizado como un marcador de astrocitos maduros [94, 129]. En la figura 9 se aprecia que dicha citocina se encuentra dentro del grupo de 10 proteínas con mayor abundancia detectadas en el arreglo. Al utilizarla sobre las AHPCs indujo la expresión de GFAP además de una morfología característica de los astrocitos (forma estrellada) (figura 22). El favorecimiento en la expresión de GFAP y el cambio morfológico de las AHPCs que expresaron este marcador en presencia del anticuerpo neutralizante anti-hEGF (figura 26), así como fosforilación de Stat3, inducida por medio condicionado, detectado en el arreglo (figura 18) nos llevó a proponerla como una protagonista de los principales efectos del medio condicionado obtenido a partir de las hNS/PCs-OE, es decir, en la formación de astrocitos. En los últimos años se ha descrito la importancia de los astrocitos en el sistema nervioso central, sus funciones incluyen el acoplamiento neurovascular, la estabilización de la barrera hematoencefálica, la regulación de la función sináptica, la homeostasis iónica, el aclaramiento del neurotransmisor, la regulación de las formas de onda del potencial de acción, la plasticidad sináptica y la regulación de comportamientos tales como el sueño [130]. Todo esto ha

permitido ver a los astrocitos como un componente celular con funciones más allá de las de soporte neuronal. Se ha reportado que en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington los cambios en la homeostasis de glutamato, GABA y K⁺ mediada por astrocitos, lo cual contribuiría a una disfunción neuronal [131]. Otra enfermedad en donde deficiencias en los astrocitos explican la muerte celular de neuronas motoras es la Esclerosis Lateral Amiotrófica, un estudio mostró que astrocitos derivados de células troncales pluripotentes inducidas (IPSCs) obtenidos de pacientes dañan el mecanismo de autofagia en las neuronas motoras obtenidas de las IPSCs de los mismos pacientes [132]. Por último, un reporte también con astrocitos derivados de IPSCs, pero de pacientes con enfermedad de Alzheimer, tanto esporádico como familiar, mostraron atrofia, lo cual explicaría la temprana disfunción sináptica debida a la inhibición de la interacción astrocito-sinapsis y la interrupción de las redes astrogiales funcionales [133]. Por lo tanto, los astrocitos se convierten en un blanco terapéutico para buscar otras opciones de tratamiento para este tipo de padecimientos. El medio condicionado obtenido de las hNS/PCs-OE favorece el fenotipo astrocítico, en gran parte por la presencia de IL-6, el siguiente paso es aplicarlos a modelos animales, por ejemplo, de enfermedades como las mencionadas anteriormente.

El EGF activa varios mecanismos de señalización a través de su receptor (EGFR) [134], se ha reportado que en el sistema nervioso central este factor puede transactivar al receptor TrkB [72]. En neuronas maduras la activación de este receptor ha sido ampliamente descrita en los procesos de sobrevivencia y maduración sináptica [135], sin embargo, en células troncales neurales se ha asociado mayoritariamente a la proliferación [88]. Una manera de abordar uno de los mecanismos de acción activados por el medio condicionado de las hNS/PCs-OE es a través de la activación de ambos receptores (EGFR y TrkB) dado que el EGF se encuentra en dicho medio. En las figuras 27 y 28 se observa el fenómeno de transactivación tanto con el EGF como con las diferentes diluciones del medio condicionado.

Un fenómeno que se observó en estos ensayos fue que el ligando de TrkB, NT-4, no fosforiló al receptor. Esto ya ha sido reportado por otros grupos de trabajo [96] y se le atribuye a la ausencia de estímulos adicionales, como pudiera ser la estimulación eléctrica que está presente en ambientes propiamente neuronales y no en células inmaduras como las AHPCs [97]. Una vez descrito el mecanismo de transactivación en nuestro modelo se corroboró que la activación de ambos receptores por el medio condicionado era por el EGF presente en dicho medio. Se evaluó la capacidad del medio condicionado de fosforilar a ambos receptores en presencia del anticuerpo neutralizante y se observó que el EGF presente en el medio condicionado era el responsable de ambas fosforilaciones (figura 29). Establecido el fenómeno de transactivación causado por el EGF presente en el medio condicionado lo siguiente fue evaluar el probable mecanismo de transactivación, para lo cual se utilizaron dos inhibidores de la cinasa Src, la cual se ha reportado como la responsable de la transactivación del receptor TrkB, que es fosforilada a su vez por la fosforilación de EGFR. Se observó que, en un tiempo corto, uno de los inhibidores, PP1, promovió la fosforilación de TrkB en lugar de disminuirla, como se hubiera esperado. Lo anterior se debió probablemente a que el inhibidor no es exclusivo de Src, aunque su constante de afinidad es de las más altas con respecto a otros miembros de la familia [101]. Este inhibidor también tiene como blanco a Csk, una cinasa que regula negativamente a Src, es decir, si Csk se encuentra fosforilada, no se fosforila Src. En cambio si se bloquea la fosforilación de Csk se lleva a cabo la fosforilación de Src, lo cual se ve reflejado en el incremento en la fosforilación de TrkB [136], lo anterior promueve a que sea un evento meramente competitivo en donde el inhibidor va a bloquear en primera instancia a Csk antes que Src y por ello se obtendría el fenómeno presentado en nuestro experimento (figura 30). Al dejar más tiempo el tratamiento en presencia del inhibidor, prácticamente ya no se encontró efecto alguno (figura 31), es decir, se asume que el inhibidor está actuando sobre las dos cinasas, dejando un efecto neutro. Sin embargo, el inhibidor

PP2 si mostró un efecto sobre Src y se observó una disminución en la fosforilación de TrkB más no en la de EGFR, que era lo esperado. Por lo tanto, se concluimos que la fosforilación de TrkB se debió a una fosforilación de Src que a su vez es activada por EGFR.

IX. CONCLUSIONES

El avance en el aislamiento, caracterización y expansión de las células troncales de tejido adulto ha permitido el uso de estas células en Medicina Regenerativa [137, 138]. Las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio obtenidas mediante un exfoliado nasal son muy atractivas debido a su fácil y rápida obtención [39, 139, 140]. El presente trabajo se encargó de caracterizar a las células troncales/progenitoras en dos niveles: 1) las proteínas expresadas por las células en condiciones proliferativas y diferenciadas (capacidad de autorrenovación y generación de neuronas a partir de un estímulo neurogénico) y 2) lo que son capaces de liberar al medio en respuesta a un estímulo proliferativo, es decir, una aproximación a su secretoma. Los resultados mostraron que las hNS/PCs-OE liberan factores de crecimiento y citocinas involucradas en la proliferación, migración y diferenciación de células troncales embrionarias, neurales y mesenquimales. Por otro lado, la terapia libre de células ha mostrado resultados positivos en algunos modelos [64]. Utilizando el medio enriquecido con factores solubles secretados por las hNS/PCs-OE se buscó probar su efecto sobre el potencial neurogénico de las AHPCs con la finalidad de caracterizar dicho efecto para posteriormente buscar la aplicación de ese medio en algún modelo murino y validar más adelante su uso en humanos. Los ensayos mostraron un moderado efecto proliferativo y el mantenimiento del estadio precursor, así como una diferenciación astrocítica en un tiempo corto (48 horas) y el mantenimiento de la diferenciación astrocítica en un tiempo largo (7 días). Se determinaron las vías de señalización activadas por

el estímulo del medio condicionado, dichas vías fueron: MAPK, PI3K/Akt, mTOR y Jak/STAT. Estos resultados permitieron proponer al EGF y la IL-6 como probables candidatos de los efectos realizados por el medio condicionado sobre las AHPCs. El bloqueo del EGF del medio condicionado inhibió la activación de los dos receptores (EGFR y TrkB), la proliferación y el mantenimiento del estadio precursor de las AHPCs, por lo tanto, se puede pensar que el EGF, a través de la activación de ambos receptores, controla la autorrenovación y el mantenimiento del estadio precursor de una parte de la población de las AHPCs. Por otro lado, una parte de la población respondió a otro u otros factores para comprometerse a un fenotipo astrocítico; una proteína candidato de este último fenómeno fue la interleucina-6, la cual fue probada y de la cual se corroboró su efecto en la diferenciación astrocítica de las AHPCs. Sin embargo, la combinación de ambos factores (EGF + IL-6) no reprodujo el efecto observado por el medio condicionado, lo que indicó que existen otros factores dentro del medio condicionado que están influyendo en el efecto sobre las AHPCs. Nuestros resultados indican que el medio condicionado obtenido a partir de las hNS/PCs-OE puede modificar el potencial neurogénico de las AHPCs favoreciendo la formación de astrocitos, los cuales han tomado una enorme importancia en los últimos años debido a sus funciones como son la regulación de la función sináptica, la homeostasis iónica, el aclaramiento del neurotransmisor, la regulación de las formas de onda del potencial de acción, entre otras. La aplicación de este medio condicionado en un modelo murino de alguna enfermedad neurodegenerativa en donde la función astrocítica esté comprometida sería el siguiente paso, aunque siempre existe el riesgo de que el fenómeno observado *in vitro* no se reproduzca *in vivo*, debido a las demás interacciones que se conocen del nicho neurogénico [141, 142] y que se encuentran en el modelo *in vivo*.

X. PERSPECTIVAS

- Probar otras proteínas candidato que permitan determinar y explicar el efecto global del medio condicionado, las primeras a considerar serían el factor de crecimiento fibroblástico-7 (FGF-7) (sobrevivencia celular) y Dkk1 (fenotipo astrocítico)
- Probar el efecto del medio condicionado *in vivo*, mediante aplicaciones del mismo ya sea de manera intracraneal o por vía nasal (menos invasivo) en un modelo neurodegenerativo como el modelo murino de Alzheimer (triple transgénico) y evaluar si hay recuperación en la memoria mediante pruebas de conducta, así como el análisis inmunohistoquímico de marcadores relacionados a proliferación diferenciación y maduración neural.
- Determinar el efecto del medio condicionado obtenido de las hNS/PCs-OE sobre un modelo de células troncales neurales humanas y corroborar que tan parecido o diferente es con respecto a lo observado en el modelo murino.

XI. REFERENCIAS

1. Riquelme, P.A., E. Drapeau, and F. Doetsch, *Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008. **363**(1489): p. 123-37.
2. Ullian, E.M., et al., *Control of synapse number by glia*. Science, 2001. **291**(5504): p. 657-61.
3. Kornyei, Z., et al., *Humoral and contact interactions in astroglia/stem cell co-cultures in the course of glia-induced neurogenesis*. Glia, 2005. **49**(3): p. 430-44.
4. Seri, B., et al., *Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus*. J Comp Neurol, 2004. **478**(4): p. 359-78.
5. Mercier, F., J.T. Kitasako, and G.I. Hatton, *Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network*. J Comp Neurol, 2002. **451**(2): p. 170-88.

6. Song, H., C.F. Stevens, and F.H. Gage, *Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells*. *Nature*, 2002. **417**(6884): p. 39-44.
7. Palmer, T.D., A.R. Willhoite, and F.H. Gage, *Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis*. *J Comp Neurol*, 2000. **425**(4): p. 479-94.
8. Carmeliet, P., *Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases*. *Nat Rev Genet*, 2003. **4**(9): p. 710-20.
9. Fabel, K., et al., *VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis*. *Eur J Neurosci*, 2003. **18**(10): p. 2803-12.
10. Cao, L., et al., *VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory*. *Nat Genet*, 2004. **36**(8): p. 827-35.
11. Mustafa, S.A., J.D. Hoheisel, and M.S. Alhamdani, *Secretome profiling with antibody microarrays*. *Mol Biosyst*, 2011. **7**(6): p. 1795-801.
12. Brion, C., S.G. Miller, and H.P. Moore, *Regulated and constitutive secretion. Differential effects of protein synthesis arrest on transport of glycosaminoglycan chains to the two secretory pathways*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(3): p. 1477-83.
13. Lee, M.J., et al., *Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha-induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(4): p. 1754-62.
14. van Vliet, C., et al., *Intracellular sorting and transport of proteins*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2003. **83**(1): p. 1-45.
15. Nickel, W., *Pathways of unconventional protein secretion*. *Curr Opin Biotechnol*, 2010. **21**(5): p. 621-6.
16. Backhaus, R., et al., *Unconventional protein secretion: membrane translocation of FGF-2 does not require protein unfolding*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 9): p. 1727-36.
17. Keller, S., et al., *Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function*. *Immunol Lett*, 2006. **107**(2): p. 102-8.
18. Baglio, S.R., D.M. Pegtel, and N. Baldini, *Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy*. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 359.
19. Lai, R.C., et al., *Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell*. *Biotechnol Adv*, 2013. **31**(5): p. 543-51.
20. Graziadei, P.P. and G.A. Graziadei, *Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons*. *J Neurocytol*, 1979. **8**(1): p. 1-18.
21. Holbrook, E.H., K.E. Szumowski, and J.E. Schwob, *An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium*. *J Comp Neurol*, 1995. **363**(1): p. 129-46.
22. Calof, A.L., et al., *Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage*. *Microsc Res Tech*, 2002. **58**(3): p. 176-88.
23. Getchell, M.L. and T.V. Getchell, *Fine structural aspects of secretion and extrinsic innervation in the olfactory mucosa*. *Microsc Res Tech*, 1992. **23**(2): p. 111-27.
24. Martens, W., et al., *Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update*. *Clin Oral Investig*, 2013.
25. Nicolay, D.J., J.R. Doucette, and A.J. Nazarali, *Transcriptional regulation of neurogenesis in the olfactory epithelium*. *Cell Mol Neurobiol*, 2006. **26**(4-6): p. 803-21.

26. Bonnamain, V., I. Neveu, and P. Naveilhan, *Neural stem/progenitor cells as a promising candidate for regenerative therapy of the central nervous system*. *Front Cell Neurosci*, 2012. **6**: p. 17.
27. Zhao, J. and Q. Xu, *Emerging restorative treatments for Parkinson's disease: manipulation and inducement of dopaminergic neurons from adult stem cells*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2011. **10**(4): p. 509-16.
28. Ramos-Zuniga, R., et al., *Ethical implications in the use of embryonic and adult neural stem cells*. *Stem Cells Int*, 2012. **2012**: p. 470949.
29. Cusimano, M., et al., *Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord*. *Brain*, 2012. **135**(Pt 2): p. 447-60.
30. Liu, S., et al., *Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(6).
31. Duan, D. and M. Lu, *Olfactory mucosa: a rich source of cell therapy for central nervous system repair*. *Rev Neurosci*, 2015. **26**(3): p. 281-93.
32. Ekberg, J.A. and J.A. St John, *Crucial roles for olfactory ensheathing cells and olfactory mucosal cells in the repair of damaged neural tracts*. *Anat Rec (Hoboken)*, 2014. **297**(1): p. 121-8.
33. Rui, K., et al., *Olfactory ecto-mesenchymal stem cells possess immunoregulatory function and suppress autoimmune arthritis*. *Cell Mol Immunol*, 2016. **13**(3): p. 401-8.
34. Ogawa, D., et al., *Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: properties and tumorigenicity after long-term in vitro maintenance*. *J Neurosci Res*, 2009. **87**(2): p. 307-17.
35. Binello, E. and I.M. Germano, *Stem cells as therapeutic vehicles for the treatment of high-grade gliomas*. *Neuro Oncol*, 2012. **14**(3): p. 256-65.
36. Murrell, W., et al., *Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa*. *Dev Dyn*, 2005. **233**(2): p. 496-515.
37. Roisen, F.J., et al., *Adult human olfactory stem cells*. *Brain Res*, 2001. **890**(1): p. 11-22.
38. Tajinda, K., et al., *Neuronal biomarkers from patients with mental illnesses: a novel method through nasal biopsy combined with laser-captured microdissection*. *Mol Psychiatry*, 2010. **15**(3): p. 231-2.
39. Benitez-King, G., et al., *A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases*. *J Neurosci Methods*, 2011. **201**(1): p. 35-45.
40. Horiuchi, Y., et al., *Olfactory cells via nasal biopsy reflect the developing brain in gene expression profiles: utility and limitation of the surrogate tissues in research for brain disorders*. *Neurosci Res*, 2013. **77**(4): p. 247-50.
41. Leung, C.T., P.A. Coulombe, and R.R. Reed, *Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration*. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(6): p. 720-6.
42. Borgmann-Winter, K., et al., *Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric illness*. *Transl Psychiatry*, 2015. **5**: p. e527.
43. Watzlawick, R., et al., *Olfactory Ensheathing Cell Transplantation in Experimental Spinal Cord Injury: Effect size and Reporting Bias of 62 Experimental Treatments: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *PLoS Biol*, 2016. **14**(5): p. e1002468.

44. Gu, M., et al., *Conditioned medium of olfactory ensheathing cells promotes the functional recovery and axonal regeneration after contusive spinal cord injury*. Brain Res, 2017. **1654**(Pt A): p. 43-54.
45. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. Science, 1992. **255**(5052): p. 1707-10.
46. Altman, J. and G.D. Das, *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol, 1965. **124**(3): p. 319-35.
47. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1313-7.
48. Marin-Burgin, A. and A.F. Schinder, *Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning*. Behav Brain Res, 2012. **227**(2): p. 391-9.
49. Deng, W., J.B. Aimone, and F.H. Gage, *New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?* Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(5): p. 339-50.
50. Barkho, B.Z., et al., *Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation*. Stem Cells Dev, 2006. **15**(3): p. 407-21.
51. Liu, J., et al., *Interplay between human microglia and neural stem/progenitor cells in an allogeneic co-culture model*. J Cell Mol Med, 2013.
52. Gebara, E., et al., *Adult hippocampal neurogenesis inversely correlates with microglia in conditions of voluntary running and aging*. Front Neurosci, 2013. **7**: p. 145.
53. Li, Q., et al., *Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study*. J Neurosci Res, 2006. **84**(8): p. 1656-68.
54. Mosher, K.I., et al., *Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity*. Nat Neurosci, 2012. **15**(11): p. 1485-7.
55. Bracko, O., et al., *Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis*. J Neurosci, 2012. **32**(10): p. 3376-87.
56. Feron, F., et al., *Isolation of adult stem cells from the human olfactory mucosa*. Methods Mol Biol, 2013. **1059**: p. 107-14.
57. Murrell, W., et al., *Olfactory mucosa is a potential source for autologous stem cell therapy for Parkinson's disease*. Stem Cells, 2008. **26**(8): p. 2183-92.
58. Nivet, E., et al., *Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions*. J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2808-20.
59. Madrigal, M., K.S. Rao, and N.H. Riordan, *A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods*. J Transl Med, 2014. **12**: p. 260.
60. Lee, C.Y., et al., *Hypoxic conditioned medium from mesenchymal stem cells promotes lymphangiogenesis by regulation of mitochondrial-related proteins*. Stem Cell Res Ther, 2016. **7**: p. 38.
61. Di Santo, S., et al., *Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5643.

62. Ngangan, A.V., et al., *Soluble factors secreted by differentiating embryonic stem cells stimulate exogenous cell proliferation and migration*. *Stem Cell Res Ther*, 2014. **5**(1): p. 26.
63. Inoue, T., et al., *Stem cells from human exfoliated deciduous tooth-derived conditioned medium enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats*. *Tissue Eng Part A*, 2013. **19**(1-2): p. 24-9.
64. Teixeira, F.G., et al., *Impact of the Secretome of Human Mesenchymal Stem Cells on Brain Structure and Animal Behavior in a Rat Model of Parkinson's Disease*. *Stem Cells Transl Med*, 2017. **6**(2): p. 634-646.
65. Mita, T., et al., *Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease*. *Behav Brain Res*, 2015. **293**: p. 189-97.
66. Yang, R. and X. Xu, *Isolation and culture of neural crest stem cells from human hair follicles*. *J Vis Exp*, 2013(74).
67. Bonnamain, V., I. Neveu, and P. Naveilhan, *In vitro analyses of the immunosuppressive properties of neural stem/progenitor cells using anti-CD3/CD28-activated T cells*. *Methods Mol Biol*, 2011. **677**: p. 233-43.
68. Nam, H., et al., *Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status and prospect*. *World J Stem Cells*, 2015. **7**(1): p. 126-36.
69. Mackay-Sim, A., et al., *Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial*. *Brain*, 2008. **131**(Pt 9): p. 2376-86.
70. Zhang, X., et al., *Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors*. *Brain Res*, 2006. **1073-1074**: p. 109-19.
71. Kazim, S.F., et al., *Sera from children with autism induce autistic features which can be rescued with a CNTF small peptide mimetic in rats*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0118627.
72. Puehringer, D., et al., *EGF transactivation of Trk receptors regulates the migration of newborn cortical neurons*. *Nat Neurosci*, 2013. **16**(4): p. 407-15.
73. Le Blanc, K. and O. Ringden, *Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation*. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(5): p. 586-91.
74. Yan, M., et al., *Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors*. *Science*, 2000. **290**(5491): p. 523-7.
75. Weiss, N., et al., *IL8 and CXCL13 are potent chemokines for the recruitment of human neural precursor cells across brain endothelial cells*. *J Neuroimmunol*, 2010. **223**(1-2): p. 131-4.
76. Gualandris, A., et al., *The latent transforming growth factor-beta-binding protein-1 promotes in vitro differentiation of embryonic stem cells into endothelium*. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(12): p. 4295-308.
77. Padovani-Claudio, D.A., et al., *Alterations in the oligodendrocyte lineage, myelin, and white matter in adult mice lacking the chemokine receptor CXCR2*. *Glia*, 2006. **54**(5): p. 471-83.
78. Robertson, I.B., et al., *Latent TGF-beta-binding proteins*. *Matrix Biol*, 2015. **47**: p. 44-53.
79. Clemmons, D.R., *Role of IGF Binding Proteins in Regulating Metabolism*. *Trends Endocrinol Metab*, 2016. **27**(6): p. 375-91.
80. Babu, H., et al., *Enriched monolayer precursor cell cultures from micro-dissected adult mouse dentate gyrus yield functional granule cell-like neurons*. *PLoS One*, 2007. **2**(4): p. e388.

81. Babu, H., et al., *A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus*. Front Neurosci, 2011. **5**: p. 89.
82. Hur, E.M. and F.Q. Zhou, *GSK3 signalling in neural development*. Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(8): p. 539-51.
83. Wang, B., et al., *Erk1/2 promotes proliferation and inhibits neuronal differentiation of neural stem cells*. Neurosci Lett, 2009. **461**(3): p. 252-7.
84. Faigle, R. and H. Song, *Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(2): p. 2435-48.
85. Ahn, J., et al., *GSK3beta, but not GSK3alpha, inhibits the neuronal differentiation of neural progenitor cells as a downstream target of mammalian target of rapamycin complex1*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(10): p. 1121-33.
86. Fukuda, S., et al., *Potentialiation of astroglialogenesis by STAT3-mediated activation of bone morphogenetic protein-Smad signaling in neural stem cells*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(13): p. 4931-7.
87. Namihira, M. and K. Nakashima, *Mechanisms of astrocytogenesis in the mammalian brain*. Curr Opin Neurobiol, 2013. **23**(6): p. 921-7.
88. Li, Y., et al., *TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment*. Neuron, 2008. **59**(3): p. 399-412.
89. Islam, O., T.X. Loo, and K. Heese, *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT-3 signaling pathways*. Curr Neurovasc Res, 2009. **6**(1): p. 42-53.
90. Ayuso-Sacido, A., et al., *Activated EGFR signaling increases proliferation, survival, and migration and blocks neuronal differentiation in post-natal neural stem cells*. J Neurooncol, 2010. **97**(3): p. 323-37.
91. Alexander, P.B., et al., *EGF promotes mammalian cell growth by suppressing cellular senescence*. Cell Res, 2015. **25**(1): p. 135-8.
92. Tarasenko, Y.I., et al., *Effect of growth factors on proliferation and phenotypic differentiation of human fetal neural stem cells*. J Neurosci Res, 2004. **78**(5): p. 625-36.
93. Kang, M.L., J.S. Kwon, and M.S. Kim, *Induction of neuronal differentiation of rat muscle-derived stem cells in vitro using basic fibroblast growth factor and ethosuximide*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(4): p. 6614-23.
94. Nakanishi, M., et al., *Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(3): p. 649-58.
95. Sorkin, A. and J.E. Duex, *Quantitative analysis of endocytosis and turnover of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor*. Curr Protoc Cell Biol, 2010. **Chapter 15**: p. Unit 15 14.
96. Di Lieto, A., et al., *The responsiveness of TrkB to BDNF and antidepressant drugs is differentially regulated during mouse development*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32869.
97. Meyer-Franke, A., et al., *Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons*. Neuron, 1998. **21**(4): p. 681-93.
98. Shi, G.X., L. Jin, and D.A. Andres, *Src-dependent TrkA transactivation is required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38-mediated Rit activation and neuronal differentiation*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(9): p. 1597-608.

99. Tan, Y.X., et al., *Inhibition of the kinase Csk in thymocytes reveals a requirement for actin remodeling in the initiation of full TCR signaling*. Nat Immunol, 2014. **15**(2): p. 186-94.
100. Superti-Furga, G., et al., *Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src*. EMBO J, 1993. **12**(7): p. 2625-34.
101. Bain, J., et al., *The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update*. Biochem J, 2007. **408**(3): p. 297-315.
102. Lee, F.S., et al., *Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9096-102.
103. Huang, Y.Z. and J.O. McNamara, *Mutual regulation of Src family kinases and the neurotrophin receptor TrkB*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8207-17.
104. El Zein, N., S. D'Hondt, and E. Sariban, *Crosstalks between the receptors tyrosine kinase EGFR and TrkA and the GPCR, FPR, in human monocytes are essential for receptors-mediated cell activation*. Cell Signal, 2010. **22**(10): p. 1437-47.
105. Mignone, J.L., et al., *Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice*. J Comp Neurol, 2004. **469**(3): p. 311-24.
106. Podrygajlo, G., et al., *Cellular phenotypes of human model neurons (NT2) after differentiation in aggregate culture*. Cell Tissue Res, 2009. **336**(3): p. 439-52.
107. Guo, K.H., et al., *Chemical identification of nestin-immunoreactive neurons in the rat basal forebrain: a re-examination*. Neurochem Int, 2010. **56**(5): p. 694-702.
108. Zhu, J., et al., *The nestin-expressing and non-expressing neurons in rat basal forebrain display different electrophysiological properties and project to hippocampus*. BMC Neurosci, 2011. **12**: p. 129.
109. Ichikawa, T., et al., *Localization of two cholinergic markers, choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in the central nervous system of the rat: in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry*. J Chem Neuroanat, 1997. **13**(1): p. 23-39.
110. Dehmelt, L., et al., *The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation*. J Neurosci, 2003. **23**(29): p. 9479-90.
111. Huang, Y.A., et al., *Microtubule-associated type II protein kinase A is important for neurite elongation*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e73890.
112. Viereck, C., R.P. Tucker, and A. Matus, *The adult rat olfactory system expresses microtubule-associated proteins found in the developing brain*. J Neurosci, 1989. **9**(10): p. 3547-57.
113. Menezes, J.R. and M.B. Luskin, *Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon*. J Neurosci, 1994. **14**(9): p. 5399-416.
114. Barazzuol, L., L. Ju, and P.A. Jeggo, *A coordinated DNA damage response promotes adult quiescent neural stem cell activation*. PLoS Biol, 2017. **15**(5): p. e2001264.
115. Ramnarain, D.B., et al., *Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 867-74.
116. Schrevel, M., et al., *Autocrine expression of the epidermal growth factor receptor ligand heparin-binding EGF-like growth factor in cervical cancer*. Int J Oncol, 2017. **50**(6): p. 1947-1954.

117. Haynesworth, S.E., M.A. Baber, and A.I. Caplan, *Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha*. J Cell Physiol, 1996. **166**(3): p. 585-92.
118. Saparov, A., et al., *Preconditioning of Human Mesenchymal Stem Cells to Enhance Their Regulation of the Immune Response*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 3924858.
119. Chen, H., et al., *Pre-activation of mesenchymal stem cells with TNF-alpha, IL-1beta and nitric oxide enhances its paracrine effects on radiation-induced intestinal injury*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8718.
120. Schuldiner, M., et al., *Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11307-12.
121. Fukushima, K., et al., *Establishment of a Human Neuronal Network Assessment System by Using a Human Neuron/Astrocyte Co-Culture Derived from Fetal Neural Stem/Progenitor Cells*. J Biomol Screen, 2016. **21**(1): p. 54-64.
122. Lopez-Carballo, G., et al., *Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25297-304.
123. Tee, A.R., et al., *The role of mTOR signalling in neurogenesis, insights from tuberous sclerosis complex*. Semin Cell Dev Biol, 2016. **52**: p. 12-20.
124. Nagao, M., M. Sugimori, and M. Nakafuku, *Cross talk between notch and growth factor/cytokine signaling pathways in neural stem cells*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(11): p. 3982-94.
125. Bonni, A., et al., *Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway*. Science, 1997. **278**(5337): p. 477-83.
126. Taga, T. and S. Fukuda, *Role of IL-6 in the neural stem cell differentiation*. Clin Rev Allergy Immunol, 2005. **28**(3): p. 249-56.
127. Howard, B.M., et al., *EGFR signaling is differentially activated in patient-derived glioblastoma stem cells*. J Exp Ther Oncol, 2010. **8**(3): p. 247-60.
128. O'Keeffe, G.C., et al., *Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(21): p. 8754-9.
129. Yanagisawa, M., et al., *Signaling crosstalk underlying synergistic induction of astrocyte differentiation by BMPs and IL-6 family of cytokines*. FEBS Lett, 2001. **489**(2-3): p. 139-43.
130. Khakh, B.S., et al., *Unravelling and Exploiting Astrocyte Dysfunction in Huntington's Disease*. Trends Neurosci, 2017. **40**(7): p. 422-437.
131. Benraiss, A., et al., *Human glia can both induce and rescue aspects of disease phenotype in Huntington disease*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11758.
132. Madill, M., et al., *Amyotrophic lateral sclerosis patient iPSC-derived astrocytes impair autophagy via non-cell autonomous mechanisms*. Mol Brain, 2017. **10**(1): p. 22.
133. Jones, V.C., et al., *Aberrant iPSC-derived human astrocytes in Alzheimer's disease*. Cell Death Dis, 2017. **8**(3): p. e2696.
134. Xian, C.J. and X.F. Zhou, *EGF family of growth factors: essential roles and functional redundancy in the nerve system*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 85-92.
135. Kellner, Y., et al., *The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity*. Front Synaptic Neurosci, 2014. **6**: p. 5.

136. Okada, M., *Regulation of the SRC family kinases by Csk*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(10): p. 1385-97.
137. Zweigerdt, R., *Large scale production of stem cells and their derivatives*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. **114**: p. 201-35.
138. Martinez-Sarra, E., et al., *Human dental pulp pluripotent-like stem cells promote wound healing and muscle regeneration*. Stem Cell Res Ther, 2017. **8**(1): p. 175.
139. Franco, I., et al., *Pharmacological inhibition of DNA methyltransferase 1 promotes neuronal differentiation from rodent and human nasal olfactory stem/progenitor cell cultures*. Int J Dev Neurosci, 2017. **58**: p. 65-73.
140. Jimenez-Vaca, A.L., et al., *Exfoliated Human Olfactory Neuroepithelium: A Source of Neural Progenitor Cells*. Mol Neurobiol, 2017.
141. Stolp, H.B. and Z. Molnar, *Neurogenic niches in the brain: help and hindrance of the barrier systems*. Front Neurosci, 2015. **9**: p. 20.
142. Regalado-Santiago, C., et al., *Mimicking Neural Stem Cell Niche by Biocompatible Substrates*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 1513285.