



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

Departamento de Farmacobiología

**Efecto de la inhibición de la ADN metiltransferasa 1 en el proceso de
diferenciación neuronal en células del epitelio olfatorio de ratón y humano**

Tesis que presenta

M. en C. Ileri Betsabe Franco Estrada

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directores de tesis:

Dra. Mónica Lamas Gregori

Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez

Ciudad de México.

Mayo, 2017

Este trabajo se realizó en el laboratorio 13 del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-SEDE SUR) bajo la dirección de la Dra. Mónica Lamas Gregori y con el apoyo del Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez, del laboratorio de Neurogénesis del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”.

Para el desarrollo de este proyecto se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de doctorado número 243297. Además, parte de esta tesis de financió a través de los proyectos CONACyT 160614 y 219847.

*“Somos lo que hacemos repetidamente.
La excelencia entonces, no es un acto, sino un hábito.”
Aristóteles.*

A la memoria de mi abuelita Trini.

A mis padres,

Eli y Carmen, siempre me apoyaron en este camino, que en ocasiones se complicó, pero nunca perdieron la confianza en mí y me dieron su amor incondicional. Ustedes son mi más grande inspiración.

A mis hermanos,

Linda, Emily y Eli, por demostrarme que el coraje, nos hace más fuertes.

A mi hermana Monserrat, por todas las veces que estuviste para mí, por escucharme, aconsejarme y siempre decirme lo valiosa que soy.

A Jasón, simplemente gracias por estar siempre cuidándonos.

A mi esposo,

César Santana, por enseñarme que la vida no es fácil y tenemos que luchar por lo que se ama.

A la familia Santana Gómez, por aceptarme en su vida.

A Ileri Franco, estoy orgullosa de lo que hemos logrado. Sin miedos, sin remordimientos, sin complicaciones.

A Dios.

A la **Dra. Mónica Lamas Gregori**. Usted me enseñó que la vida es simple y que hay que luchar por lo que uno quiere. Gracias por permitirme estar en su laboratorio, por sus regaños y palabras de aliento. Gracias por su confianza. Gracias por enseñarme el significado de la disciplina y puntualidad. Usted ha hecho de mí una mejor persona.

Al **Dr. Gerardo Ramírez Rodríguez** por su paciencia, amabilidad, apoyo y asesoría en el proyecto. Gracias por permitirme utilizar las instalaciones de su laboratorio para poder lograr este trabajo.

A la **Dra. Luisa Rocha** por sus consejos, su disposición y entrega en este trabajo. Gracias por sus comentarios y preguntas tan acertadas que hicieron mejor mi proyecto.

A la **Dra. Anayansi Molina** por su infinita paciencia y hacer que cada día me esforzaré en mejorar mi trabajo. Por contagiarme un poco de su sabiduría infinita.

A la **Dra. Claudia Gonzáles** gracias por permitirme ser parte indirecta de su laboratorio y por su apoyo al final del camino.

Al **Dr. Emilio Galván Espinosa** gracias por las buenas pláticas y consejos de vida. Por apoyarme en la escritura de la tesis.

Al **Dr. Rodolfo Lezama** por confiar en un proyecto nuevo, por su amabilidad y disposición a lo largo del trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, **Mónica R., Luis R., Lizbeth S., Prisca B., Silene F., Bladimir R., Helena P., Mariana V., Ana Gómez** y **Ale Bray**. Gracias por compartir sus conocimientos conmigo y alguna que otra risa.

A mis compañeros del laboratorio 11, **Karlita, Alfredo, Faby, Zyanya, Marbella, Itzel, Eduardo** y **Jorge**. Gracias por las pláticas, las risas y apoyo en todo momento.

A mis amigos, **Melissa, Eduardo, Franco, Monse**. Gracias por brindarme su amistad.

A mi gran amiga **Ivette Bañuelos**, eres de las mejores personas que he conocido, gracias por tu apoyo y cariño incondicional. Nos volveremos a juntar en el camino.

A **Leonardo Lara**, gracias por todo, por tus palabra y sensatez, por brindarme un buen consejo cada que lo necesite. Casi hermano.

A **Leopoldo Alfredo**, gracias por las pláticas de campana, por tu cariño, por tu amistad incondicional.

A **Heberto Quintero**, no sé que hubiera hecho sin ti en este camino, gracias por las tardes de música, cigarrros y café. Gracias por dedicarme tiempo para plantear mis experimentos, por escucharme, por tu amistad desinteresada y apoyo incondicional.

A **Brenda Estrada**, la vida nos juntó en momentos y circunstancias raras. Pero le estoy agradecida de haberlo hecho. Me enseñaste que la vida es alegría y tienes que luchar por ella.

Al señor **Antonio Huerta**, gracias por su ayuda técnica en los experimentos. Por siempre tener en orden el laboratorio. Gracias por brindarme siempre una sonrisa y una palabra de aliento.

A **Alfredo Ibarra**, gracias por compartir tus conocimientos científicos, fuiste parte esencial en mi proyecto. Eres una gran persona.

A mis dos mejores amigas **Yuri y Gaby**, no tengo palabras para ustedes porque no alcanzarían para agradecerles todo lo que han hecho por mí.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
I. ÍNDICE DE FIGURAS	V
II. ÍNDICE DE TABLAS	VII
III. LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
IV. RESUMEN	X
V. ABSTRACT	XI
1. Introducción	1
1.1 Neurogénesis	1
1.1.1 Generalidades	1
1.1.1.1 Fase de proliferación de progenitores	1
1.1.1.2 Fase temprana de supervivencia	2
1.1.1.3 Fase de maduración	2
1.1.1.4 Fase tardía de supervivencia y maduración.....	2
1.2 El epitelio olfatorio	3
1.2.1 Células basales globosas y horizontales	4
1.2.2 Neuronas sensoriales olfatorias	6
1.2.3 Células de soporte.....	7
1.2.4 Glía envolvente olfatoria	7
1.3 Vía olfativa	8
1.4 El epitelio olfatorio en el humano	10
1.5 Neurogénesis en el epitelio olfatorio	11
1.6 Mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica	13
1.6.1 Generalidades	13
1.6.2 Metilación de ADN.....	13
1.6.2.1 DNMT1.....	15
1.6.2.2 DNMT3.....	16
1.6.3 Desmetilación del ADN.....	17
1.6.4 Inhibidores de la metilación de ADN.....	19
1.6.5 Regulación Epigenética en la neurogénesis del Epitelio olfatorio	20
2. Justificación	22

3. Hipótesis.....	22
4. Objetivos	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos particulares	23
5. Materiales y métodos	24
5.1 Sujetos experimentales	24
5.1.1 Animales.....	24
5.1.2 Participantes.....	24
5.2 Aislamiento y obtención de cultivos de células del epitelio olfatorio de ratón.....	24
5.3 Aislamiento y obtención de cultivos de células del epitelio olfatorio de humano.....	25
5.4 Formación de neuroesferas.....	27
5.5 Protocolo de diferenciación neuronal.....	28
5.6 Ensayo de proliferación celular.....	29
5.7 Ensayo de Anexina V.....	30
5.8 Obtención de ADN genómico.....	31
5.9 Ensayo para la cuantificación del ADN Metilado	31
5.10 Inmunofluorescencia	32
5.10.1 Preparación de cristales para inmunofluorescencia	32
5.11 Extracción de ARN total con Trizol	35
5.12 Reacción en cadena de la polimerasa en punto final (RT-PCR)	35
5.13 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). ...	36
5.14 Análisis estadístico.....	36
6. Resultados	39
6.1 Obtención de cultivos primarios y pasajes de células del epitelio olfatorio de ratón.....	39
6.2 Análisis de la proliferación y viabilidad celular de las células del epitelio olfatorio de ratón	40
6.3 Análisis de la expresión génica en células del epitelio olfatorio de ratón	41

6.3.1	Marcadores tempranos de linaje neural	41
6.3.2	Expresión de marcadores asociados a pluripotencia	43
6.4	Formación de neuroesferas en cultivos de células del epitelio olfatorio de ratón.....	44
6.5	Diferenciación de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón hacia neuronas maduras	45
6.6	Análisis de los patrones de metilación/desmetilación del ADN en las células del epitelio olfatorio de ratón.....	47
6.6.1	Evaluación de los patrones metilación (5mC y MeCP2) mediante inmunofluorescencia.....	47
6.6.2	Análisis de la expresión del ARN mensajero para las ADN metiltransferasas (DNMTs) y Gadd45s mediante RT-PCR.....	48
6.7	Evaluación del tratamiento farmacológico con procainamida como inhibidor de la ADN metiltransferasa 1 en la capacidad de diferenciación neuronal de las células del epitelio olfatorio de ratón.....	49
6.7.1	Análisis de la viabilidad celular en cultivos del epitelio olfatorio con procainamida	49
6.7.2	Efecto de la inhibición de la metilación del ADN con procainamida en cultivos del epitelio olfatorio de ratón	50
6.7.3	Análisis de la procainamida en el proceso de diferenciación neuronal en las células el epitelio olfatorio de ratón	52
6.8	Análisis de la persistencia de mecanismos moleculares en las células troncales derivadas del epitelio olfatorio de ratón y humano en el proceso de diferenciación neuronal	55
6.8.1	Obtención de cultivos de células del epitelio olfatorio de humano	55
6.8.2	Análisis de la proliferación y viabilidad celular.....	56
6.8.3	Análisis de la expresión de marcadores asociados a pluripotencia.....	56
6.8.4	Formación de neuroesferas.....	58
6.8.5	Diferenciación de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano hacia neuronas maduras.	59

6.9	Análisis de los patrones de metilación/desmetilación del ADN en las células del epitelio olfatorio de humano.....	61
6.10	Evaluación del tratamiento farmacológico con la procainamida como inhibidor de la ADN metiltransferasa1 en la capacidad de diferenciación neuronal de las células del epitelio olfatorio de humano.....	62
6.10.1	Análisis de la viabilidad celular con procainamida.....	62
6.10.2	Efecto de la inhibición de la metilación de la procainamida en las células del epitelio olfatorio de humano.....	64
6.10.3	Análisis de la procainamida en el proceso de diferenciación neuronal en las células el epitelio olfatorio de humano	65
7.	Discusión.....	68
7.1	Células troncales del epitelio olfatorio: Ratón Vs Humano	68
7.2	El linaje neural de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio.....	70
7.3	Expresión de marcadores asociados a pluripotencia	71
7.4	Evaluación del tratamiento farmacológico con la procainamida como inhibidor de la ADN metiltransferasa 1 en la capacidad de diferenciación neuronal de las células del epitelio olfatorio.....	74
8.	Conclusión	82
9.	Perspectivas.....	83
10.	Referencias	84
11.	Anexos.....	100

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura células del epitelio olfatorio en mamíferos	4
Figura 2. Vía olfativa.....	9
Figura 3. Establecimiento y mantenimiento de la metilación	15
Figura 4. Mecanismos de metilación y desmetilación del ADN	18
Figura 5. Mecanismo de inhibición de la procainamida	20
Figura 6. Regulación epigenética en el epitelio olfatorio	21
Figura 7. Esquema representativo de la extracción de células del epitelio olfatorio de humanos.....	27
Figura 8. Protocolo de diferenciación neuronal	28
Figura 9. Protocolo de diferenciación neuronal con procainamida	29
Figura 10. Cultivo primario del células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón	39
Figura 11. Cultivo de células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón, pasaje 2.....	40
Figura 12. Análisis de la proliferación y viabilidad en células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón	41
Figura 13. Análisis de marcadores de linajes neurales tempranos en células del epitelio olfatorio de ratón	42
Figura 14. Análisis de la expresión de marcadores asociados a pluripotencia en las células del epitelio olfatorio de ratón	43
Figura 15. Formación de neuroesferas de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón	44
Figura 16. Morfología celular antes y después de la inducción neuronal	45
Figura 17. Efecto de la inducción neuronal con ácido retinoico y forskolina.....	46
Figura 18. Patrón de metilación en células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón	47
Figura 19. Análisis de la expresión del ARN mensajero para las ADN metiltransferasas (DNMTs) y Gadd45s mediante RT-PCR	48
Figura 20. Análisis de la viabilidad celular con procainamida (PCA)	50

Figura 21. Análisis del efecto inhibitorio de la procainamida en las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón	51
Figura 22. Análisis del efecto de la procainamida en la diferenciación neuronal de las células del epitelio olfatorio de ratón.....	53
Figura 23. La procainamida promueve la formación de neuritas en las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón	54
Figura 24. Análisis de marcadores de linajes neurales tempranos en células del epitelio olfatorio de humano	55
Figura 25. Análisis de la proliferación y viabilidad en células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano.....	56
Figura 26. Análisis de la expresión de marcadores asociados a pluripotencia en las células del epitelio olfatorio de humano	57
Figura 27. Formación de neuroesferas de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano	58
Figura 28. Morfología de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano una semana después del tratamiento con ácido retinoico y forskolina....	59
Figura 29. Diferenciación de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano hacia neuronas maduras.....	61
Figura 30. Esquema representativo de la expresión de marcadores asociados a metilación (DNMTs) y desmetilación (Gadd45) en el ARN mensajero en células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano mediante RT-PCR	62
Figura 31. Análisis de la viabilidad células en células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano tratadas con procainamida (PCA)	63
Figura 32. Análisis del efecto inhibitorio de la procainamida en las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio humano	65
Figura 33. Efecto del a procainamida en el proceso de diferenciación neuronal y el crecimiento neurítico de células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano	67

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios para las inmunofluorescencias.	34
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos específicos de ratón para PCR en punto final y tiempo real.....	37
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos específicos de humano para PCR en punto final y tiempo real.....	38

III. LISTA DE ABREVIATURAS

5-AZA	5-azacitidina
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5mC	5-metilcitosina
7-AAD	7 aminoactinomicina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Ácido retinoico
ARN	Ácido ribonucleico
Ascl1/ Mash1	Factor de transcripción bHLH 1 de la familia <i>achaete-scute</i>
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BER	Reparación por escisión de bases
CBG	Células basales globosas
CBH	Células basales horizontales
Crmp	Proteína mediadora de respuesta a colapsinas
DABCO	1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano.
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DCX	Doblecortina
DMEM-F12	Medio de cultivo Eagle F12, modificado por Dulbecco
DNMT	ADN metiltransferasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento endotelial
EO	Epitelio olfatorio
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FSK	Forskolina
GADD	Proteína inducible por daño al ADN y detención del crecimiento
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
HCL	Ácido clorhídrico
HDAC	Histona deacetilasas
ICAM1	Molécula de adhesión intracelular 1
IGF	Factor de crecimiento insulínico
LIF	Factor inhibidor de la leucemia

LSH1	Helicasa específica linfoide
MAP1B	Proteína asociada a microtubulos 1B
MAP2	Proteína asociada a microtubulos 2
MBD2	Proteína 2 con dominio de unión a CpG metilados
MBP	Proteína básica de mielina
MECP2	Proteína de unión al AND metilado
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NeuN	Proteína nuclear neuronal
NeuroD	Factor de diferenciación neurogénica
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NSE	Enolasa específica neuronal
NSO	Neurona sensorial olfatoria
OEC	Célula glial envolvente olfatoria
OMP	Proteína marcadora olfativa
PCA	Procainamida
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PDFG	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PSA-NCAM	Molécula de adhesión celular neural
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosil metionina
SNC	Sistema nervioso central
SUS	Células de soporte
TET	Proteína de translocación diez-once
TGFα	Factor de crecimiento transformante alfa
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
Tuj1	Beta tubulina III
WST-1	2-(4-yodofenil)-3-(4-Nitrofenil)-5-(2,4-Disulfofenil)-2HTetrazolio
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

IV. RESUMEN

La neurogénesis es el proceso de formación de neuronas nuevas funcionales en el sistema nervioso. Es un fenómeno complejo regulado por señales extrínsecas e intrínsecas que incluyen, por ejemplo, la metilación del ADN y modificaciones de la cromatina, las cuales pueden ser manipuladas experimentalmente, en orden de favorecer la diferenciación neuronal. Hasta el momento no existe una caracterización adecuada de las células del epitelio olfatorio *in vitro* y se desconoce el papel de la metilación del ADN durante el proceso de diferenciación neuronal. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de cultivos primarios y pasajes (P) consecutivos (del 2 al 10) de las células troncales/progenitores neurales del epitelio olfatorio de ratón y humano, por medio de la evaluación y comparación de la morfología celular, tasas de proliferación, patrones de la expresión de genes asociados a pluripotencia y genes asociados a la metilación del ADN. Los resultados mediante inmunofluorescencia mostraron que los cultivos de ambas especies en los diferentes pasajes presentaron: la expresión de nestina (marcador de linaje neural) y beta tubulina III (marcador neuronal temprano), se observó un patrón constante en la expresión del ARN mensajero de las ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) y la expresión de Gadd45 a y b. Por otra parte, se evaluó la morfología celular antes y después del proceso de diferenciación neuronal inducido por el tratamiento con 10 μ M o 20 μ M de ácido retinoico (AR) y 5 μ M de forskolina (FSK) durante una semana. En respuesta a las señales de inducción de diferenciación, las células del epitelio olfatorio mostraron un incremento para marcadores neuronales maduros: 75.67% para NSE; 35.34% para MAP2 en el ratón y un 69.66% para MAPB1 en las células del epitelio olfatorio de humano. Finalmente, se evaluó el efecto de la procainamida como inhibidor de la ADN metiltransferasa 1 en el proceso de diferenciación neuronal. El tratamiento con procainamida, ácido retinoico y forskolina, incrementó el número de células positivas de MAP2 en un 50% en ratón y en un 20% para MAP1B en células de humano. Además, el tratamiento con procainamida, AR y FSK favoreció el desarrollo neurítico en las células diferenciadas del epitelio olfatorio de ratón y humano. Las características de las células troncales/progenitores neurales del epitelio olfatorio evaluadas en este trabajo, fortalecen la idea de que los inhibidores de la metilación del DNA puedan ser herramientas eficientes para mejorar la diferenciación neuronal, esto amplía el panorama para que estas células sean utilizadas como una alternativa terapéutica para la regeneración celular en enfermedades neurodegenerativas.

V. ABSTRACT

Neurogenesis is the process of forming new functional neurons in the nervous system. It is a complex phenomenon widely regulated by extrinsic and intrinsic signals that include DNA-methylation and other chromatin modifications that could be experimentally manipulated in order to increase neuronal differentiation. The role of DNA methylation during nasal olfactory stem and progenitor cells (NOS/PCs) neuronal differentiation is still unknown. The aim of the present study was the characterization of primary cultures and consecutive passages (P2-P10) of NOS/PCs isolated from male Swiss-Webster mice (mNOS/PCs) or healthy humans (hNOS/PCs), through of the evaluation and comparison of cellular morphology, proliferation rates and the expression pattern of pluripotency-associated markers and DNA methylation-associated gene expression. The results through immunofluorescence showed that the cultures of both species in the different passages presented: the expression of nestin (marker of neural lineage) and β III tubulin (early neuronal marker), a constant pattern was observed in the expression of mRNA for DNA methyltransferases (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) and the levels of Gadd45 a and b. On the other hand, cell morphology was evaluated before and after the neuronal differentiation process induced by exposure to 10 and 20 μ M all-trans retinoic acid and 5 μ M forskolin for one week. In response to the inductive cues we found that mNOS/PCs expressed NSE (75.67%) and MAP2 (35.34%); whereas most of the hNOS/PCs were immunopositive to MAP1B (69.66%). Finally, we found that the treatment with procainamide (a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1), retinoic acid and forskolin, enhances neurite development and increased the number of mature neuronal markers in mNOS/PCs in a 50% of MAP2 and a 20% in hNOS/PCs of MAP1B. Nasal olfactory stem and neural progenitor cells (NOS/PCs) properties evaluated in this work strengthen the idea that DNA methylation inhibitors could be efficient tools to enhance neuronal differentiation, this broadens the outlook for these cells to be used as a therapeutic alternative for cellular regeneration in neurodegenerative diseases.

1. Introducción

1.1 Neurogénesis

1.1.1 Generalidades

La neurogénesis es el proceso de formación de neuronas nuevas funcionales en el SNC a partir de células progenitoras (Altman J, 1965). El término de *neurogénesis adulta* hace referencia a neuronas que “nacen” a partir de progenitores que residen en lugares discretos llamados *nichos* y una vez especificada la diferenciación, los neuroblastos inician su proceso de migración y maduran hasta integrarse como células funcionales (Kempermann et al., 2004).

En general, el proceso de neurogénesis puede ser dividido en cuatro etapas: 1) fase de proliferación de progenitores, la cual sirve para la expansión de aquellas células que se diferenciarán en neuronas; 2) una fase temprana de supervivencia, marca la salida de los progenitores del ciclo celular. En esta etapa muchas de las células nuevas son eliminadas pocos días después de su nacimiento; 3) fase de maduración, esta etapa está asociada con el establecimiento funcional de conexiones, el crecimiento axonal, dendrítico y sinaptogénesis. Finalmente, 4) fase tardía de supervivencia y maduración, que representa un periodo de sincronización precisa entre las neuronas nuevas (Praag van et al., 2002).

1.1.1.1 Fase de proliferación de progenitores

Esta etapa involucra diversos tipos de progenitores con características semejantes en donde células “tipo 1”, dan lugar a progenitores neurales inmediatos “tipo 2” que muestran una alta actividad proliferativa, esta población recibe el nombre de progenitor de amplificación transitoria. Estas células generalmente expresan proteínas de filamentos intermedios como nestina, apareciendo así los primeros indicios de elección al linaje neural. A medida que las células avanzan en el proceso de diferenciación, inicia la expresión de proteínas como doblecortina (DCX) o PSA-NCAM (células “tipo 3” conocidos como neuroblastos). DCX y/o PSA-NCAM se expresan aun en la fase proliferativa, incluso después de que la expresión de nestina ha sido regulada a la baja. Sin embargo, las células tipo 3 muestran poca

actividad proliferativa y mayor diferenciación hacia el linaje neuronal (Kempermann et al., 2004).

1.1.1.2 Fase temprana de supervivencia

Posterior a la salida del ciclo celular, las neuronas nuevas comienzan a expresar marcadores neuronales como NeuN o calretinina. En un inicio, el número de células NeuN positivas es alto. Sin embargo, disminuyen rápidamente con los días a través de un proceso apoptótico y serán muy pocas las que lleguen a realizar conexiones funcionales (Kempermann et al., 2004).

1.1.1.3 Fase de maduración

La regulación neurogénica ocurre principalmente en esta etapa. Debido a que solo muy pocas células neuronales sobreviven y maduran. Se ha descrito que las células neuronales que sobreviven las primeras 2 semanas inician el desarrollo de dendritas y comienzan a enviar sus axones entre las células ya existentes del circuito neuronal. La maduración de estas células se ha identificado mediante la expresión de varias proteínas como Crmp (conocidas como TOAD-64 o TUC4), Neun, MAP2 o sinaptofisina (Kempermann et al., 2004).

1.1.1.4 Fase tardía de supervivencia y maduración

Después del establecimiento de conexiones sinápticas y tras un periodo de 3 a 4 semanas, las neuronas maduras son capaces de producir potenciales de acción (Kempermann et al., 2004).

En la mayoría de los mamíferos adultos, el proceso de la neurogénesis se presenta de manera constitutiva en dos zonas principalmente: la zona subventricular del ventrículo lateral (ZSV) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo. Fuera de estas dos regiones, la neurogénesis parecía ser un fenómeno limitado o inexistente. Sin embargo, en la última década se ha acumulado evidencia que ha demostrado la formación de nuevas neuronas en zonas que se consideraban como no neurogénicas como la neocorteza, hipotálamo y el estriado (Bless et al., 2016; Luo et al., 2017; Magavi et al., 2000; Zhang et al., 2001).

Una estructura que conserva su capacidad neurogénica después del desarrollo es el epitelio olfatorio (EO) cuya función es la percepción de olores permitiendo el continuo establecimiento de nuevas conexiones en el bulbo olfatorio (Shetty et al., 2005). A diferencia de otras partes del sistema nervioso, el epitelio olfativo conserva la capacidad regenerativa toda la vida y existe una recuperación anatómica y funcional después de la lesión (Cheung et al., 2013; Costanzo, 2000; Graziadei et al., 1978, 1979; Holbrook et al., 2014; Iwema et al., 2004; Morrison y Costanzo, 1989; Schwob, 2002; Schwob et al., 1999, 1995; Wuarin y Sidell, 1991)

1.2 El epitelio olfatorio

La mucosa olfatoria de los mamíferos está compuesta de dos estructuras: la lámina propia y el epitelio olfatorio; y con base en criterios anatómicos e inmunohistoquímicos, por lo menos 6 clases de células principales pueden ser identificadas en la mucosa olfatoria: células basales globosas (*Globose Basal Cells: GBC*), células basales horizontales (*Horizontal Basal Cells: HBC*) neuronas sensoriales olfatorias (*Olfactory Sensory Neurons: OSN*), células de soporte (*Sustentacular Cells: SUS*) que son semejantes a células gliales en el cerebro; la glía envolvente olfatoria (*Olfactory Ensheathing Cells: OEC*) y células de los ductos de las glándulas submucosas o de Bowman (Beites et al., 2005).

El epitelio olfatorio se encuentra ubicado en la parte superior de las fosas nasales. Es una estructura pseudoestratificada, pigmentada de color amarillento y cubre un área aproximada de 1 cm². A su vez, se divide en tres capas: a) la capa apical, donde se encuentran las células de sostén; b) la capa intermedia, la cual es atravesada por las neuronas sensoriales olfatorias y glándulas de Bowman y c) la capa basal, que resguarda a las células basales globosas y horizontales. La glía envolvente olfativa se encuentra formando parte de la lámina propia (figura 1).

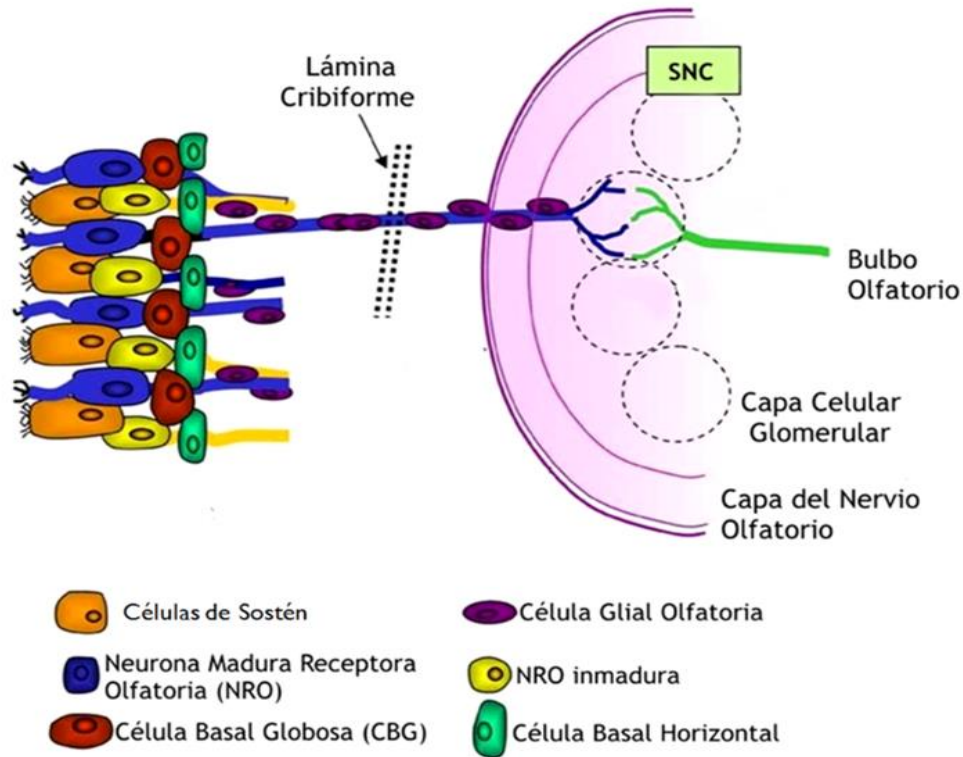


Figura 1. Estructura células del epitelio olfatorio en mamíferos. Al menos 6 tipos celulares conforman estructuralmente al EO: células basales globosas (rojo), células basales horizontales (verde), neuronas sensoriales olfatorias maduras e inmaduras (en azul y amarillo), células de sostén/soporte (en naranja), célula glial olfatoria (morado), glándulas de Bowman. En el bulbo olfatorio, los glomérulos son invadidos por los axones de las neuronas sensoriales olfatorias y por dendritas de las células mitrales y de penacho para transmitir la información al SNC.

1.2.1 Células basales globosas y horizontales

Las neuronas nuevas generadas en el epitelio olfatorio de roedores adultos, son el resultado de diversas mitosis que ocurren en la capa basal del epitelio, aparentemente en dos fases: una fase lenta y una fase rápida. Se cree que en el EO, las células troncales presentan una división “asimétrica” cuyo proceso es lento, en donde una célula hija entra de nuevo al ciclo celular (contribuyendo al mantenimiento de la población de células troncales), mientras que la otra célula hija genera progenitores amplificadores o células transitorias amplificantes, comprometidas a un destino neuronal (MacKay-Sim, 2010).

Como células progenitoras del epitelio olfatorio se han considerado a dos tipos celulares distintos: las células basales globosas (CBG) y las células basales horizontales (CBH). Las células basales horizontales están situadas directamente en la lámina basal del epitelio olfatorio, mientras que las células globosas se encuentran inmediatamente arriba de la capa de las células basales horizontales (Beites et al., 2005).

En el EO las células basales globosas están agrupadas estructuralmente como una cuenca de perlas con espacios entre ellas (Huard y Schwob, 1995; Jang et al., 2014, 2003; Loo et al., 1996). Morfológicamente las CBG son redondas con escaso citoplasma y presentan una mayor actividad proliferativa a diferencia de las horizontales. Actualmente, las CBG se consideran una población heterogénea por expresar una amplia mezcla de factores de transcripción que incluyen a Sox2, Pax6, Six1, Ascl1, Neurogenina 1 y NeuroD1 (Guillemot et al., 1993; Guo et al., 2010; Manglapus et al., 2004). La expresión de patrones de los factores de transcripción ha sido utilizada para construir una jerarquía de los subtipos de CBG que se encuentran en el epitelio olfatorio (Schwob et al., 2016).

Existe una primera población de CBG que únicamente expresa Sox2, Pax6 y son mitóticamente activas. Estas células son consideradas como las células troncales del EO. Durante la diferenciación hacia neuronas sensoriales olfatorias, las CBG comienzan a expresar el gen proneural Ascl1 (Mash1), presentan una disminución de Sox2 y Pax6 conformando la población de células transitorias amplificantes. Esta población de células amplificantes origina los precursores neuronales inmediatos de las NSO que, a diferencia de las primeras, expresan genes como neurogenina 1 y neuroD1 (Schwob et al., 2016).

Por otro lado, las células basales horizontales son más complejas, comparten muchas características tanto morfológicas como moleculares con las células basales de otros epitelios, incluyendo el epitelio respiratorio. Estas similitudes incluyen la formación de hemi-desmosomas (estructuras proteicas de unión, responsables de la fijación de las células epiteliales con el tejido conectivo subyacente). En particular, estas células expresan citoqueratina 5 y 14 (K5 y K14),

la molécula de adhesión intracelular (*intercellular adhesion molecule 1: ICAM1*) y algunas integrinas como $\beta 1$, $\beta 4$, $\alpha 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 6$ que actúan como receptores para el colágeno, la fibronectina y la laminina en la membrana basal, además de receptores al factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor: EGF*) y la proteína p63 (Calof y Chikaraishi, 1989; Carter et al., 2004; Holbrook et al., 1995; Miragall et al., 1988).

Las CBH parecen ser una población de células quiescentes, pero esto podría indicar un alto nivel de diferenciación en lugar de mostrar propiedades de células troncales. Se ha considerado que las CBH podrían ser análogas a las células endodimales que se encuentran en el nicho celular de la zona subventricular en el cerebro de mamíferos, ya que secretan diversos factores para favorecer la neurogénesis. A pesar de que las células endodimales y las CBH son morfológicamente distintas, comparten características comunes, por ejemplo; los dos tipos celulares se dividen rara vez, se pueden encontrar en la misma capa basal que las células progenitoras neuronales y son capaces de generar neuroesferas en cultivo (Beites et al., 2005).

1.2.2 Neuronas sensoriales olfatorias

El epitelio olfatorio típico posee alrededor de 10^7 neuronas sensoriales olfatorias (NSO) en la parte superior de la cavidad nasal, las cuales son neuronas bipolares con una dendrita simple. En un estadio inmaduro expresan altos niveles de la forma polisializada de la molécula de adhesión celular neural (*Polysialylated-neural Cell Adhesion Molecule: PSA-NCAM*) y la proteína globular beta tubulina III (la cual se expresa únicamente en los microtúbulos de las neuronas de tejido nervioso), mientras que las neuronas sensoriales maduras expresan la proteína marcadora olfativa (*Olfactory Marker Protein; OMP*) (Calof et al., 1996; Kawauchi et al., 2004).

Las neuronas olfatorias dirigen su única dendrita a la superficie del epitelio olfatorio, y posee una terminación engrosada llamada vesícula olfatoria, que proyecta cilios inmóviles, donde se encuentran los receptores olfatorios. Por otro lado su axón deja el epitelio olfatorio y atraviesa la lámina propia hasta llegar a los glomérulos en el bulbo olfatorio donde hacen sinapsis con las células mitrales e interneuronas,

muchas de ellas originadas en la zona subventricular (Mombaerts, 2006). El uso de marcadores moleculares como las proteínas PSA-NCAM, beta tubulina III y OMP ha permitido la identificación tanto *in vivo* como *in vitro* de este tipo neuronal (Holbrook et al., 2012).

1.2.3 Células de soporte

Las células de soporte rodean a las neuronas olfatorias, regulando y manteniendo el medio iónico apropiado para que los procesos de transducción se lleven a cabo y, junto con el mucus, contribuyen en la remoción de moléculas odorantes y de sustancias tóxicas. Las células de soporte contienen enzimas como el citocromo p450, glutatión S transferasa 2 y carbonil reductasa 2, que les permiten metabolizar compuestos extraños o nocivos que entran al EO a través de aire. Además, cumplen la función de fagocitar a las neuronas sensoriales olfatorias y glía envolvente olfatoria en las que se activa proceso de muerte celular (Suzuki et al., 1996; Yu et al., 2005).

1.2.4 Glía envolvente olfatoria

Las células de la glía envolvente, son una población única de macroglia que se encuentra en la lámina propia de la mucosa olfativa, alrededor de los fascículos del nervio olfatorio. Por su naturaleza, estas células presentan inmunoreactividad a la proteína fibrilar ácida glial (*Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP*), la proteína de unión a calcio S100b, el factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor Receptor: NGFR*), la proteína básica de la mielina (*Myelin Basic Protein: MBP*) y presentan una alta cantidad de glicoproteínas de matriz extracelular como la laminina y fibronectina (Ramón-Cueto y Nieto-Sampedro, 1992). La glía envolvente olfatoria tiene la capacidad natural para estimular el crecimiento y mielinización axonal. Además, proporcionan las condiciones necesarias para el crecimiento, desarrollo, diferenciación y maduración de las neuronas sensoriales olfatorias (Tabakow et al., 2013).

1.3 Vía olfativa

La percepción olfatoria es el proceso por el cual los estímulos olfatorios son reconocidos e interpretados por el cerebro (Firestein, 2013). Este proceso involucra una compleja y extensa red neuronal; una vez que la información es recibida y procesada en las neuronas sensoriales olfatorias, los axones de estas neuronas dejan el epitelio olfatorio y atraviesan la base del cráneo a través de múltiples aberturas de la lámina cribiforme para entrar al bulbo olfatorio. Estos axones se agrupan en estructuras esféricas llamadas glomérulos (Zou et al., 2009).

En los glomérulos olfatorios se produce la sinapsis entre los axones de las neuronas sensoriales olfatorias con las dendritas de las células mitrales y de penacho. Posteriormente los axones de las células mitrales y de penacho llevan la información de manera ipsilateral a un amplio número de áreas cerebrales (Asaba et al., 2014; Fuentes et al., 2011). Existen dos entradas principales de la información al cerebro: regiones cerebrales que reciben información directa desde los bulbos olfatorios, que se define como corteza olfatoria primaria; y regiones que reciben proyecciones desde estructuras primarias o corteza olfatoria secundaria (figura 2) (Gottfried et al., 1982).

La corteza olfatoria primaria está compuesta por: la corteza piriforme (involucrada en la memoria y reconocimiento de olores), la corteza entorrinal (ayuda a la codificación del odorante), tubérculo olfatorio y el núcleo anterior olfatorio (modula bilateralmente la transmisión de información). La corteza secundaria, comprende la corteza orbitofrontal que es el principal receptor de las proyecciones procedentes de la corteza primaria y participa en la percepción hedónica del olor. El hipotálamo, la ínsula, el tálamo, el hipocampo y la amígdala son activados para la discriminación, identificación y memoria de olores (Gottfried et al., 1982; Kivity et al., 2009; Kringelbach, 2005; Zelano y Sobel, 2005).

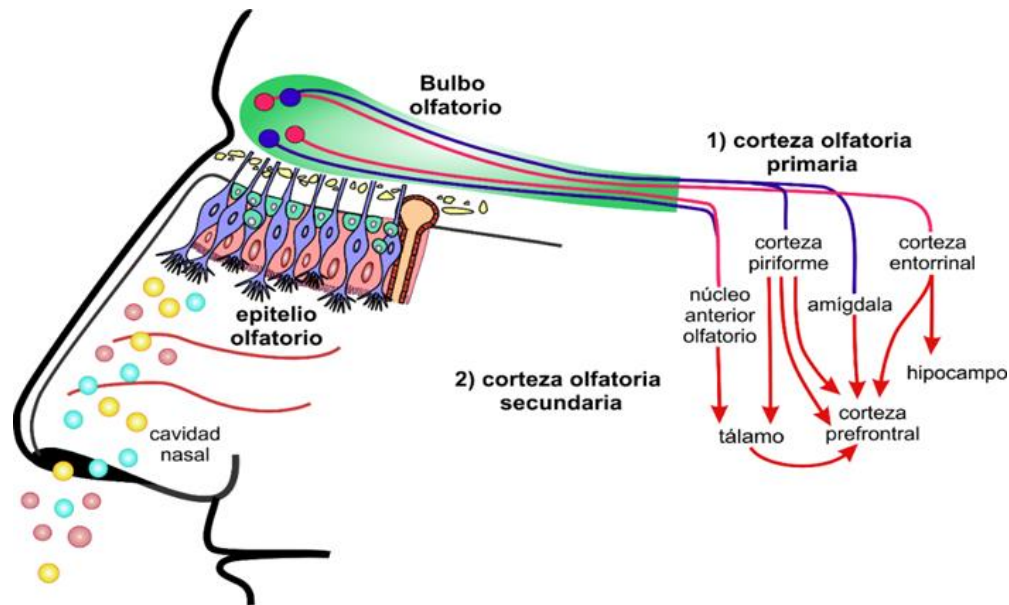


Figura 2. Vía olfativa. Los estímulos provenientes del medio ambiente (olor en forma de vapores) llegan a las fosas nasales y se disuelven en las mucosidades, donde las neuronas sensoriales olfatorias del epitelio los detectan. Estas neuronas sensoriales transmiten la información a los bulbos olfatorios, los cuales a su vez transfieren la información al SNC mediante dos vías principales: vía de la corteza olfatoria (primaria corteza piriforme, corteza entorrinal y núcleo anterior olfatorio: líneas azul y rosa) y vía de la corteza secundaria (tálamo, amígdala, hipocampo y corteza prefrontal: líneas rojas).

La función olfativa consta de varias habilidades tales como, detectar, discriminar, e identificar olores (Eibenstein et al., 2005). Estas habilidades están estrechamente asociadas con funciones cognitivas superiores como: percepción, atención, memoria, función del lenguaje, pensamientos conscientes, juicio, sentimientos e inteligencia (Schubert et al., 2008; Sohrabi et al., 2009)

Aunque el sistema olfativo ejerce una función importante en nuestras vidas, su función disminuye con la edad (Jimbo et al., 2011; Mobley et al., 2014). Además, la función olfativa se encuentra alterada en individuos con deterioro cognitivo leve, pacientes con demencia frontotemporal (Orasji et al., 2016), la enfermedad de Alzheimer (Hori et al., 2015; Jimbo et al., 2011; Seligman et al., 2013) y la enfermedad de Parkinson (Li et al., 2016; Morley y Duda, 2011) Asimismo, se han descrito alteraciones de las funciones olfativas en diversos trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia (Brewer et al., 1996; Zou et al., 2015),

depresión (Kohli et al., 2016; Sivam et al., 2016), trastorno de pánico (Burón et al., 2015) y trastorno bipolar (Benítez-King et al., 2016, 2011).

1.4 El epitelio olfatorio en el humano

En humanos se ha descrito que el epitelio olfatorio conserva su capacidad neurogénica por lo menos hasta los 72 años de edad en sujetos sanos (Beites et al., 2005; Calof et al., 1996). Morfológicamente, la mucosa olfatoria de humanos está compuesta por el epitelio olfatorio y la lámina propia. Sin embargo, a diferencia de algunos mamíferos, la mucosa olfatoria en humanos cubre un área mucho más pequeña del total de la cavidad nasal (3%), cuando se compara con otras especies (p.ej., en rata es el 50%); probablemente debido al hecho de que el olfato está menos desarrollado en humanos (Gross et al., 1982). Además el EO en humanos es mucho más delgado que en el roedor (Choi et al., 2008) mientras que la lámina propia es más gruesa y compacta donde el número de neuronas sensoriales olfatorias es menor (aproximadamente 10^5 neuronas por mm^2) y poseen un rango de vida entre 30 y 120 días (Astic y Saucier, 2001).

El epitelio olfatorio en humanos está formado por los mismos tipos celulares que se han descrito en el roedor: células basales, células de sostén y neuronas sensoriales olfatorias. Sin embargo, a pesar de la controversia que existe entre cuáles son realmente las células troncales del epitelio olfatorio en roedores, en humanos no existe una distinción morfológica entre las células basales globosas y horizontales, ya que ambas células se encuentran inmediatamente en la lámina basal y expresan citoqueratinas, proteínas que normalmente se encuentran en las células basales horizontales del epitelio olfatorio de los roedores (Hahn et al., 2005).

La mucosa olfatoria en humanos está localizada en la cavidad nasal, esto lo hace un tejido muy accesible que se puede aislar por medio de un exfoliado o una biopsia sin provocar pérdida en el sentido del olfato (Benítez-King et al., 2011; Girard et al., 2011). En los últimos años, se han desarrollado protocolos *in vitro* para aislar y purificar “células troncales” de la mucosa olfatoria. Estas células troncales presentan una elevada tasa de proliferación y gran inclinación para diferenciarse hacia

diferentes linajes neurales (Murrell et al., 2008, 2005; X Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2005, 2004).

Recientemente Emmanuel Nivet y colaboradores, demostraron que el hipocampo puede proporcionar un ambiente adecuado para la diferenciación neuronal de las células troncales del epitelio olfatorio. En ese estudio las células troncales de la mucosa olfatoria de humanos fueron aisladas y posteriormente las trasplantaron en el área de CA1 y giro dentado del hipocampo en ratones con daño neuronal. Las células del EO de humanos sobrevivieron en el hipocampo, donde la mayoría fueron inmunopositivas a un marcador de neuronas inmaduras (beta tubulina III), sin embargo, solo un mínimo número (0.9%) de las células trasplantadas alcanzaron un estadio de maduración evaluado por la expresión de MAP2 (Nivet et al., 2011).

1.5 Neurogénesis en el epitelio olfatorio

El proceso normal de neurogénesis en el EO está estrechamente relacionado con el mantenimiento de la población neuronal olfatoria, es decir, la neurogénesis está siendo estimulada a partir de la muerte celular (apoptótica) de las neuronas sensoriales olfatorias (Deckner et al., 1997; Holcomb et al., 1995; Mackay-Sim y Kittel, 1991; Michel et al., 1994). En este sentido, la pérdida de NSO aumenta la actividad mitótica de las células basales, con la finalidad de recuperar la población y la función neuronal en el tejido olfatorio como un proceso de regeneración (Leung et al., 2007).

Se han descrito diversos factores que regulan y mantienen el nicho del EO, mismos que se encargan de mantener la población de células progenitoras en el epitelio olfatorio. Mash1 es uno de los factores de transcripción necesario para este proceso. Se expresa en células progenitoras del epitelio olfatorio antes de convertirse en una población amplificante. Se ha visto que la falta de Mash1 en embriones de ratón Mash1+/-, causa una deficiencia en el número de neuronas olfatorias y que, en su ausencia, la mayoría de las células progenitoras no expresan neurogeninas y neuro D. Este fenómeno es responsable de que permanezcan en un estado indiferenciado en el epitelio olfatorio hasta su muerte. Esto ha demostrado

que Mash1 es requerido en estadios tempranos durante la diferenciación de neuronas olfatorias y que contribuye en la supervivencia de los progenitores de las neuronas olfatorias. En ratones adultos Mash1 promueve la diferenciación neuronal y regula muchas características de las células progenitoras como la dependencia trófica o su proliferación (Cau et al., 1997).

En particular, la proliferación de las células basales globosas es estimulada por el factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor: FGF 1 y 2*) mientras que, la proliferación de las células basales horizontales, está regulada por componentes como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (*Transforming Growth Factor alfa: TGF α*) (Hsu, 2001; Newman et al., 2000). En el mantenimiento homeostático del EO también participan otros componentes como el factor inhibidor de la leucemia (*Leukemia Inhibitory Factor: LIF*) y el óxido nítrico, los cuales son liberados por las neuronas sensoriales olfatorias durante el proceso de apoptosis, estimulando no sólo la proliferación sino también de manera muy importante la supervivencia de las nuevas células basales (Bauer et al., 2003; Carter et al., 2004)

Estudios *in vitro* han demostrado que elementos como el factor neurotrópico derivado del cerebro (*Brain Derived Neurotrophic Factor: BDNF*) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor: PDFG*) estimulan la supervivencia y crecimiento de las neuronas sensoriales que se encuentran en un estadio inmaduro (Newman et al., 2000). Además, el BDNF promueve la migración de las células progenitoras (Ortiz-López et al., 2016). Por otra parte, el factor de crecimiento insulínico (*Insulin-like Growth Factor 1: IGF1*), el factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor : TGF β*) y la dopamina, además de favorecer la proliferación de las células basales, previenen procesos de apoptosis, promoviendo la diferenciación y maduración de las neuronas sensoriales olfatorias (Ennis et al., 2001; Federico et al., 1999; McCurdy et al., 2005).

1.6 Mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica

1.6.1 Generalidades

Todas las células somáticas del organismo tienen, en principio, el mismo contenido genético. Por lo que, el verdadero factor que distingue a las diferentes estirpes celulares es la expresión diferencial de genes. Además, diversos factores externos al genoma serán determinantes para la expresión celular. Por ejemplo, el microambiente celular que contiene gran cantidad y diversidad de señales que le indican y les ordenan a las células cuál debe ser su patrón de comportamiento.

Por lo tanto, el genoma dejó de ser considerado un depósito de almacenamiento estático, y actualmente se considera una estructura dinámica que experimenta profundos cambios estructurales y funcionales en respuesta a señales externas. Estas señales se denominan globalmente factores epigenéticos.

El término de “epigenética” fue descrito por primera vez por el biólogo Conrad H. Waddington en 1939 quien lo definió como “las interacciones *casuales* entre los genes y sus productos” (Waddington, 1939). Hoy en día, la epigenética se refiere a los mecanismos que tienen efecto a largo plazo en los procesos de expresión génica, que no involucran alteraciones en la secuencia del ADN pero sí pueden generar modificaciones en el fenotipo (Landgrave-Gómez et al., 2015). Las modificaciones epigenéticas ocurren por tres mecanismos principales: la metilación del ADN, modificaciones de las histonas y la regulación post-transcripcional por RNAs no codificantes. En conjunto, estas modificaciones epigenéticas controlan la estructura de la cromatina y la expresión de genes (Garzon et al., 2009).

1.6.2 Metilación de ADN

La metilación de ADN se refiere al acoplamiento covalente de un grupo metil (CH₃) en el residuo de citosina en la posición C5 en los dinucleótidos CpG. Este mecanismo se encuentra implicado en diversas funciones biológicas como el silenciamiento genético, proliferación y diferenciación celular, la impronta genética, y la inactivación del cromosoma X (Li, 2002; Li et al., 1993; Sasaki et al., 2000).

En mamíferos aproximadamente el 70% del genoma se encuentra metilado. Sin embargo, hay ciertas zonas llamadas “islas GpC” que constituyen la fracción no metilada (aproximadamente el 1% del genoma). Las islas CpG o GGIs tienen un tamaño promedio de 1kb, poseen un elevado contenido de nucleótidos de guanina (G) y citosina (C). Estas características convierten a las islas CpG en regiones muy accesibles del genoma ya que se encuentran próximos a los promotores y funcionan frecuentemente como orígenes de la replicación (Antequera, 2004).

La metilación de ADN puede modular la transcripción de genes a través de dos mecanismos: el impedimento físico de la unión de factores de transcripción (FT) al promotor y, la unión al ADN metilado por proteínas que a su vez reclutaran otras enzimas remodeladoras de la cromatina. La metilación del ADN es catalizada por una familia de enzimas llamadas ADN metiltransferasas (DNMTs), que incluye tres tipos principales DNMT3a, DNMT3b y DNMT1. La metilación *de novo* del ADN se basa en las DNMT3a y 3b, mientras que el mantenimiento de esta metilación depende de la DNMT1 ya que tiene una alta especificidad por las citosinas ya metiladas (figura 3). Esta última enzima puede formar un complejo con las HDAC (histonas deacetilasas) y actuar como un factor represor de la transcripción, sugiriendo así que las DNMTs pueden tener más funciones que solo la metilación del ADN.

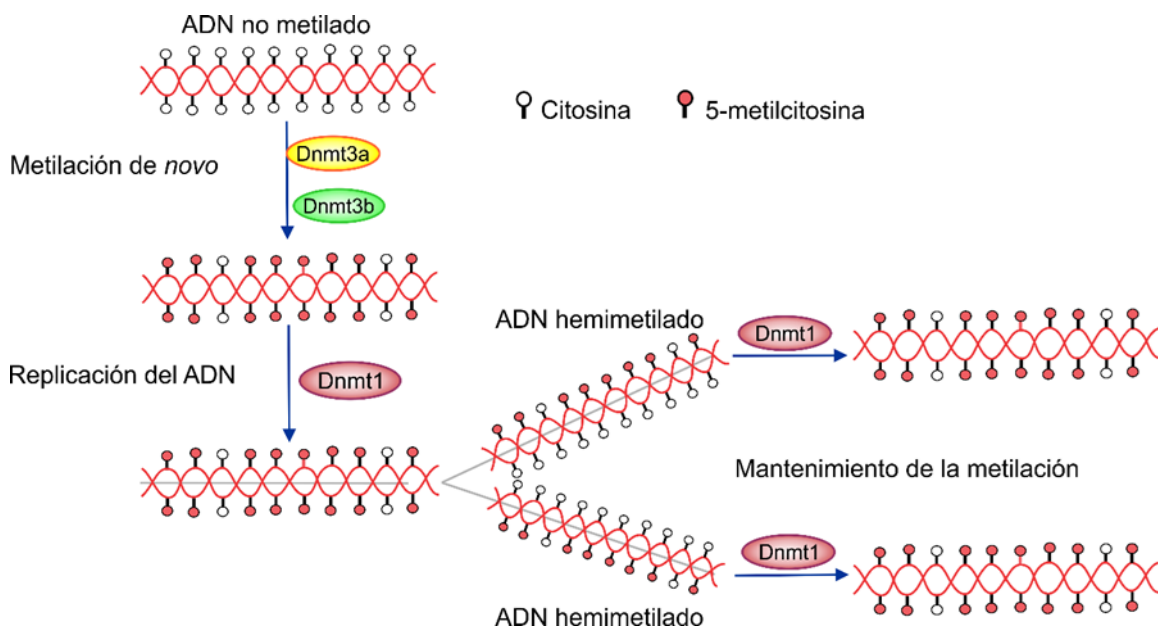


Figura 3. Establecimiento y mantenimiento de la metilación. Los patrones de metilación de novo se instituyen por la actividad enzimática de las ADN metiltransferasas Dnmt3a y Dnmt3b, las cuales actúan sobre el ADN no metilado. Una vez metilado el ADN, el patrón se mantiene al ser “heredado” en las subsecuentes rondas de replicación. Esta actividad esta mediada por la ADN metiltransferasa 1 o Dnmt1 que actúa sobre el ADN hemimetilado.

1.6.2.1 DNMT1

La ADN metiltransferasa 1 (DNA methyltransferase 1: DNMT1, por sus siglas en inglés) fue la primera metiltransferasa en ser purificada y clonada en ratón. DNMT1 contiene 1616 amino ácidos, un peso molecular de 190kDa (Bestor et al., 1988; Chen et al., 2000) y su extremo n-terminal es la región reguladora, que media su interacción con otras proteínas y el ADN (Jurkowska et al., 2011; Pósfai et al., 1989). DNMT1 es responsable del “re-establecimiento” de la metilación ADN después de la replicación ya que rápidamente metila los dinucleótidos CpG hemimetilados, restaurando así el patrón de metilación de ADN original (Goyal et al., 2006; Hermann et al., 2004; Jeltsch, 2006).

Además, DNMT1 es la ADN metiltransferasa más abundante en células proliferantes mientras que en células más diferenciadas o que no se encuentran en procesos mitóticos los niveles de DNMT1 son bajos (Robertson et al., 1999).

Recientemente se ha demostrado que la interacción de DNMT1 con UHRF1 (ubiquitin-like protein homeodomain and RING finger domain 1), una proteína con afinidad por el ADN hemimetilado, es necesaria para su asociación con la cromatina y que mutaciones en la proteína UHRF1 causan una importante disminución en los niveles de metilación (Bostick et al., 2007). Por otra parte, el mantenimiento de los patrones de metilación también requiere de factores remodeladores de la cromatina como LSH1 (lymphoid-specific helicase 1) aunque su función no se conoce con exactitud (Dennis et al., 2001).

Estudios *in silico* han demostrado la existencia de tres isoformas para DNMT1 en el ratón: DNMT1b, DNMT0 y DNMT1p que difieren tanto estructuralmente como funcionalmente. Por otro lado, en humanos solo una variante para DNMT1 ha sido identificada en células somáticas llamada DNMT1B. Estudios con ARNm han

demostrado que DNMT1B se expresa ubicuamente en todas las células de mamíferos pero es menos abundante que DNMT1 (Hsu et al., 1999).

A pesar de que DNMT1B y DNMT1 presentan actividad enzimática similar *in vitro*, aún se desconoce cuál es su papel biológico (Bonfils et al., 2000). La isoforma DNMT1o se encuentra altamente expresada en ovocitos y en embriones en donde su función es mantener los patrones de metilación del ADN durante la impronta genómica (proceso biológico por el cual un gen se encuentra “marcado” bioquímicamente indicando su origen parental) (Cirio et al., 2008).

Algunos experimentos con ratones que expresan DNMT1o en lugar de DNMT1 en sus células somáticas, han demostrado que DNMT1o puede sustituir funcionalmente a DNMT1, ya que las células son viables, fenotípicamente normales y muestran niveles normales de metilación del ADN (Ding y Chaillet, 2002).

DNMT1p ha sido detectado principalmente en espermatocitos de ratón y a través de estudios con ARN mensajero se ha logrado demostrar que esta isoforma se encuentra presente en el músculo esquelético y miotubos diferenciados, sugiriendo su participación como regulador de la metilación durante el proceso de miogénesis (Aguirre-Arteta et al., 2000)

1.6.2.2 DNMT3

La familia de DNMT3 comprende tres miembros: DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L, las cuales son esenciales para el desarrollo embrionario y la metilación de *nov*o del ADN durante el proceso de gametogénesis y la embriogénesis en etapas tempranas. Se conocen tradicionalmente como ADN metiltransferasas de *nov*o, ya que no muestran ninguna preferencia significativa por el ADN hemimetilado. En comparación con DNMT3A, DNMT3B está presente en cantidades bajas en la mayoría de los tejidos, pero altamente expresado en los testículos, la tiroides y la médula ósea (Xie et al., 1999).

En el sistema nervioso central, DNMT3a se encuentra expresada tanto en desarrollo como maduro (adulto). En este aspecto, se ha descrito que ratones deficientes a DNMT3a, nacen aparentemente bien, sin embargo, iniciando la etapa adulta mueren. Esta mutación en DNMT3a, provoca la pérdida de neuronas motoras, lo cual lleva a una muerte temprana (Nguyen et al., 2007).

Por otra parte, la mutación en DNMT3b se ha asociado con el síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad de la región centromérica y anomalías faciales. Esta mutación da como resultado un estado de hipometilación que impide la activación y maduración de células del sistema inmune, principalmente los linfocitos (Ehrlich, 2003).

1.6.3 Desmetilación del ADN

Los patrones de metilación del ADN se “heredan” tras la división celular gracias a la continua metilación de mantenimiento. Sin embargo, se ha descrito que al igual que otras marcas epigenéticas como la acetilación o metilación de histonas, la metilación es un proceso reversible, por lo que, aunque los patrones de metilación se mantienen estables durante sucesivas divisiones, también puede haber una desmetilación global o local. Existen dos tipos de procesos de desmetilación del ADN: pasiva y activa. La desmetilación pasiva se refiere a la pérdida de la citosina metilada (5mC) durante la replicación en ausencia de DNMT1, mientras que la metilación activa actúa en ausencia de replicación y requiere la presencia de una o más enzimas conocidas como desmetilasas. Se han propuesto varios mecanismos por los que la desmetilación activa del ADN se puede llevar a cabo. El primer mecanismo implica la oxidación de la 5 metilcitosina a 5 hidroximetilcitosina (5hmC) mediada por enzimas TET (proteínas de translocación diez-once) (Kohli y Zhang, 2013).

Además de la desmetilación activa por procesos oxidativos, esta puede darse durante mecanismos de reparación de ADN que consisten en la remoción del dinucleótido CG metilado por escisión de nucleótidos (*Nucleotide Excision Repair: NER*). Otro mecanismo propuesto para la desmetilación del ADN es la escisión de

la 5mC catalizada por ADN glicosilasas. Una vez que las ADN glicosilasas eliminan la base alterada, el daño puede repararse mediante el mecanismo conocido como escisión de bases o BER (*Base Excision Repair*) donde el resultado final es la sustitución de la 5mC por una citosina no metilada.

Recientemente, se ha propuesto que la familia de proteínas Gadd45 (*Growth Arrest and DNA Damange-inducible protein 45*) tienen un papel en la desmetilación activa de mamíferos. Estas proteínas reaccionan ante el estrés, además regulan el ciclo celular, la senescencia, apoptosis y participan en procesos de reparación del ADN promoviendo la eliminación de la forma metilada del ADN (Barreto et al., 2007).

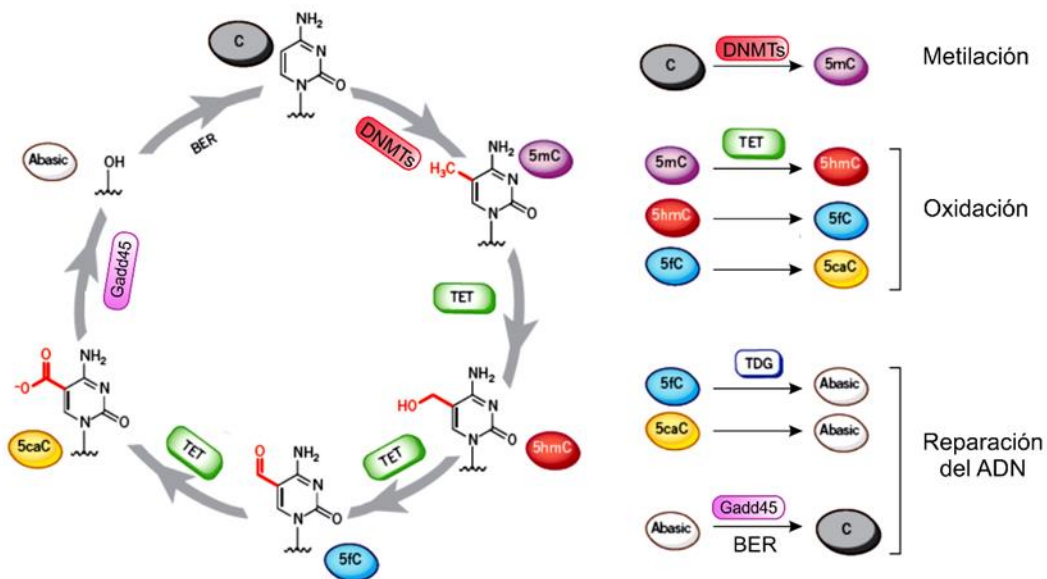


Figura 4. Mecanismos de metilación y desmetilación del ADN. La metilación esta mediada por las ADN metiltransferasas (DNMTs) generando 5-metilcitosina (5mC). Los mecanismos de desmetilación del ADN pueden ser de forma pasiva y activa, esta última involucra procesos de oxidación y reparación del ADN. C, citosina; 5hmC, 5-hidroximetilcitosina; 5fC, 5-formilcitosina; 5caC, 5-carboxilcitosina; TET, proteína de translocación diez-once; TGD, timina ADN glicosilasa; BER, reparación por escisión de bases; NER, reparación por escisión de nucleótidos; Gadd45, proteína inducible por daño a ADN y detención del crecimiento 45.

1.6.4 Inhibidores de la metilación de ADN

La manipulación farmacológica con inhibidores de la metilación de ADN y la acetilación de histonas podría ser útil para tratar algunas enfermedades tales como cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades neurodegenerativas (Singh et al., 2013; Swaminathan et al., 2014). Además, se ha demostrado que la inhibición de la metilación del ADN, podría mejorar los procesos de diferenciación celular posiblemente reactivando genes que se encuentran en un estado silenciado (Kohli and Zhang 2013). Por ejemplo, la 5 azacitidina (AZA) tiene un gran potencial como inhibidor de las DNMTs causando una hipometilación del ADN durante la replicación, reduciendo así los niveles de las metiltransferasas, por ello ha sido utilizado como un agente anti-proliferativo en el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Por otra parte, se ha descrito que la inhibición de la metilación por 5 azacitidina promueve la diferenciación celular (Király et al., 2009; Majumder et al., 2013; Yan et al., 2014). En cambio, la procainamida reduce la afinidad de la enzima metiltransferasa 1 con su sustrato S-Adenosil metionina y con el ADN hemimetilado, lo que la convierte en un inhibidor específico de las DNMT1. Estudios in vitro han demostrado que la procainamida revierte la hipermetilación en células de cáncer de pulmón y próstata (Gao et al., 2009; Lin et al., 2001). Por otra parte, se ha observado que la inhibición con procainamida protege los cultivos neuronales de una metilación excesiva y de la apoptosis (Chestnut et al., 2011).

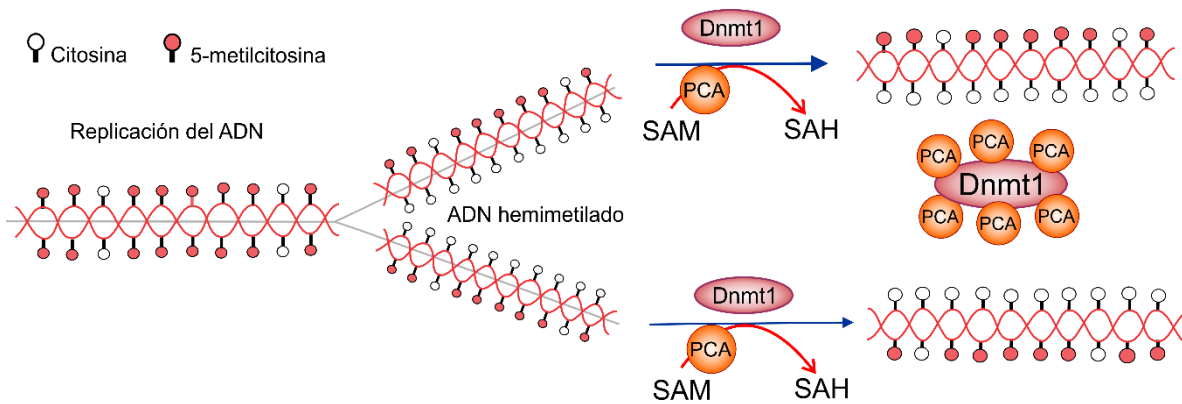


Figura 5. Mecanismo de inhibición de la procainamida. La procainamida es clasificada como un inhibidor no nucleósido. Presenta dos mecanismos: 1) reduce la afinidad de del grupo donador del metilo o SAM y, 2) impide la actividad de la DNMT1 para metilar el ADN hemimetilado durante la replicación del ADN. SAM: S-adenosil metionina. SAH: S-adenosil-homocisteína.

1.6.5 Regulación Epigenética en la neurogénesis del Epitelio olfatorio

La neurogénesis es el resultado de un balance de genes a favor o en contra de la diferenciación neuronal. Hasta la fecha se sabe muy poco de los genes que controlan el desarrollo del linaje de las neuronas sensoriales olfatorias. En un estudio realizado por Jessica MacDonald y colaboradores en el 2005, reportaron que existen diferentes puntos de control epigenético para las células del epitelio olfatorio. En este estudio se analizaron diferentes patrones de metilación y acetilación en los diferentes estadios celulares durante el desarrollo de neuronas olfatorias durante la etapa embrionaria (E17), postnatal (P5) y adulta en ratones. De manera relevante se encontró que DNMT3b se expresaba solo en células PCNA positivas, es decir, en células basales globosas, lo que indica que es probablemente que DNMT3b se active solo después de la síntesis de ADN para establecer nuevas marcas de metilación en los progenitores neurales del sistema olfatorio que se encuentran preparados para diferenciarse.

Además, un subconjunto celular de la población DNMT3b positivas, expresaron la histona deacetilasa 2 (*histone deacetylase 2; HDAC2*), lo cual indica que las histonas desacetilasas son capaces de responder a las marcas de metilación. Por otra parte, DNMT3a únicamente se expresa en neuronas inmaduras (positivas a

P43 y beta tubulina III) y este patrón de metilación disminuye en las neuronas olfatorias maduras (MacDonald et al., 2005).

En estudios adicionales, se demostró que, otras proteínas de unión al ADN metilado como el dominio de unión a secuencias CpG metiladas MBD2 (*Methyl-CpG Binding Domain Protein 2*) y MeCP2 (*Methyl-CpG Binding Protein 2*) regulan el proceso neurogénico del EO. MBD2 se expresa a la alta durante proceso mitótico, favoreciendo la salida del ciclo celular de los progenitores del EO. Por otro lado, MeCP2 se expresa altamente en la fase terminal de diferenciación, es decir, permite la maduración de las neuronas sensoriales olfatorias (MacDonald et al., 2010).

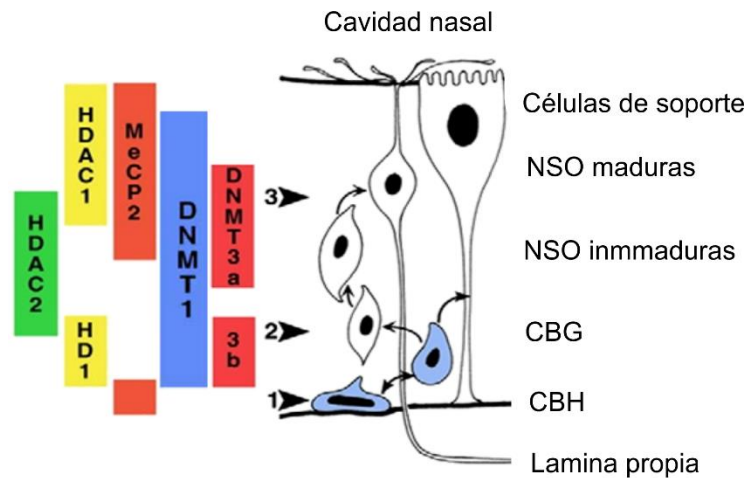


Figura 6. Regulación epigenética en el epitelio olfatorio. La expresión de *Dnmt3b* se presenta en progenitores en proliferación, así como la histona deacetilasa 1 (*HDC1*). *Dnmt3a* es inducida en neuronas post-mitoicas, lo que coincide con la transición de una neurona sensorial olfatoria inmadura a una madura, esta transición también coincidió con la expresión de la histona deacetilasa 2 (efector de la metilación). Por otra parte, la expresión de *DNMT1* se mantiene en todos los estadios de diferenciación, mientras que *MeCP2* se expresa altamente en la terminación neuronal, es decir, en neuronas sensoriales olfatorias. NSO: neuronas sensoriales olfatorias; CBG: células basales globosas; CBH: células basales horizontales. (Modificado de MacDonald et al., 2005).

2. Justificación

El epitelio olfatorio es una fuente de células troncales y progenitores neurales tanto en ratón como en humano; por esta razón, en los últimos años se ha explorado la capacidad de estas células en protocolos de regeneración neuronal. Sin embargo, su tasa de diferenciación hacia neuronas maduras en protocolos de trasplante con fines regenerativos no supera el 0.9% (Nivet et al., 2011).

Esto ha motivado que diversas investigaciones se enfoquen en determinar mecanismos que permitan mejorar procesos de diferenciación neuronal. Sin embargo, a pesar de los avances en esta área, la inducción de la diferenciación es un proceso complicado, difícil de lograr y muy poco eficiente. En este trabajo nos interesa descifrar si la metilación del ADN, como un mecanismo epigenético, puede controlar los procesos de diferenciación en las células del epitelio olfatorio de ratón y humano. Además, nos interesa determinar si la manipulación experimental de la metilación del ADN permitirá aumentar la tasa de diferenciación neuronal.

3. Hipótesis

Los mecanismos de metilación del ADN regulan e inciden en el potencial de diferenciación neuronal de las células troncales/progenitoras. Por tal razón, la manipulación farmacológica de estos procesos epigenéticos permitirá aumentar la tasa de diferenciación neuronal de las células troncales/progenitores neurales del epitelio olfatorio *in vitro*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Analizar los patrones globales de metilación del ADN en las células del epitelio olfatorio (ratón y humano) y manipular farmacológicamente su actividad enzimática ADN metiltransferasa *in vitro* para aumentar su tasa de diferenciación neuronal.

4.2 Objetivos particulares

1. Obtención de cultivos primarios y pasajes de células del epitelio olfatorio de ratón.
2. Analizar los patrones globales de metilación/desmetilación del ADN en las células troncales derivadas del epitelio olfatorio de ratón.
3. Evaluar si la administración farmacológica de inhibidores de la metilación del ADN favorece la capacidad de diferenciación neuronal de las células del epitelio olfatorio de ratón.
4. Analizar la persistencia de mecanismos moleculares en las células derivadas del epitelio olfatorio de ratón y humano en el proceso de diferenciación neuronal.

5. Materiales y métodos

5.1 Sujetos experimentales

5.1.1 Animales

Se usaron ratones machos de la cepa Swiss Webster (SW) de 5 semanas de edad (25 a 30 gramos). Los animales estuvieron en condiciones controladas en el Bioterio del Cinvestav Sede Sur, en un cuarto con temperatura controlada (22 a 24°C) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. El agua y comida estuvieron disponibles *ad libitum*. El protocolo para este estudio fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del CINVESTAV (proyecto 0221-16 CICUAL-CINVESTAV).

5.1.2 Participantes

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Psiquiatría (CEI/C/084/2015). Los participantes fueron donadores sanos de 20 a 40 años, a quienes se les aplicó una mini entrevista internacional neuropsiquiátrica mediante la lista de verificación de síntomas-90-R, en busca de signos de antecedentes psicopatológicos.

5.2 Aislamiento y obtención de cultivos de células del epitelio olfatorio de ratón

El protocolo para la obtención de cultivos primarios y pasajes del epitelio olfatorio de ratón fue adaptado del protocolo previamente descrito por Girard, 2001 (Girard et al., 2011). Los animales fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico (30 mg/kg). Una vez anestesiados, se decapitaron rápidamente. Se retiró el pelo y piel de la cabeza, seguida de la remoción de la mandíbula inferior, así como los músculos faciales. Posteriormente se removió el hueso de la cavidad nasal, hasta llegar a los cornetes olfatorios para retirarlos cuidadosamente. La disección de la mucosa olfatoria se llevó a cabo en un microscopio estereoscópico y con ayuda de una aguja calibre 26 se realizó un corte a lo largo de tres líneas: el arco de la lámina perpendicular, la lámina cribiforme y la pared superior de la cavidad nasal.

El tejido disectado se transfirió a una caja Petri, con medio DMEM-F12 sin suero (se repitió el proceso dos veces más para eliminar el exceso de sangre y moco). Una vez realizados los lavados con DMEM-F12 (Gibco), las muestras fueron incubadas con 1 ml de solución de dispasa (2.4 IU/ml; Sigma) durante 1 hora a 37° C, posteriormente se colocó el tejido en una solución con 1ml de colagenasa 1A (Gibco) y con ayuda de una pipeta estéril el tejido se disoció mecánicamente y se incubó durante 10 minutos a 37° C. Finalmente se agregaron 9 ml de PBS estéril (libre de Mg⁺² y Ca⁺²), se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio de cultivo DMEM-F12 + 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco). Las muestras se transfirieron en una placa de 6 pozos equitativamente (2 ml de medio por pozo) sin cambio de medio y se incubaron en condiciones estándar de cultivo: 37° C y 5% CO₂.

Aproximadamente una semana después, las células alcanzaron la confluencia necesaria para realizar los pasajes. Para este proceso, se retiró por completo el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS estéril y se utilizó tripsina/EDTA al 0.25% (Gibco) para despegar las células. Finalmente, las células se colocaron en un tubo de 15 ml y fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet celular se resuspendió en DMEM-F12 con 10% SFB y colocado en una botella de 75 cm², se incubaron a 37° C hasta su confluencia.

5.3 Aislamiento y obtención de cultivos de células del epitelio olfatorio de humano

El aislamiento de las células del epitelio olfatorio de humanos se realizó como se ha descrito anteriormente en Benítez-King (Benítez-King et al., 2011) con ligeras modificaciones. Los criterios de inclusión que se tomaron en cuenta para el estudio fueron los siguientes:

- Sujetos entre 20-40 años.
- Sexo: indistinto.
- Sujetos que no tuvieran alguna enfermedad de vías respiratorias: catarro, bronquitis, sinusitis, asma, entre otras.
- Evaluación mediante la prueba de Hamilton (depresión o ansiedad).

Además, los participantes firmaron la carta de consentimiento informado que contenía los siguientes datos:

- ✓ Título del proyecto.
- ✓ Responsable del proyecto.
- ✓ Datos personales del participante y 2 testigos.
- ✓ Explicación de la técnica y posibles molestias.
- ✓ Se solicitó al participante su autorización para poder almacenar sus células a -180 grados.
- ✓ Firma del participante, testigos y responsables del proyecto.
- ✓ Lugar, fecha y hora de la prueba.

Una vez realizadas las pruebas, se procedió a una limpieza nasal del participante con Afrin Pure Sea (Schering Plough S.A de C.V). Las células se exfoliaron de la región anterior del cornete lateral medial utilizando un cepillo especial (2,4 cm de longitud y 3 mm de diámetro) mediante movimientos circulares, después se colocó el cepillo en un tubo con DMEM-F12 + 10% SFB, 100 UI/ml estreptomicina y 100 UI/penicilina (Sigma). Posteriormente las células se disociaron mecánicamente, se centrifugaron por 5 minutos a 1200 rpm y se resuspendieron en DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB y antibióticos. Las células se colocaron en una botella de 25 cm² y se incubaron a 37° C con 5% CO₂. Al término de 2 semanas los cultivos primarios alcanzaron la confluencia. Para realizar los pasajes, se retiró por completo el medio de cultivo, posteriormente se realizó un lavado con PBS estéril, se agregó tripsina/EDTA al 0.25% (Gibco) a la botella por unos minutos a temperatura ambiente o hasta observar las células despegarse del plástico. Finalmente, las células se colocaron en un tubo de 15 ml y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet celular se resuspendido en DMEM-F12 con 10% SFB en una botella de 25 cm² y se incubaron a 37° C hasta su confluencia.

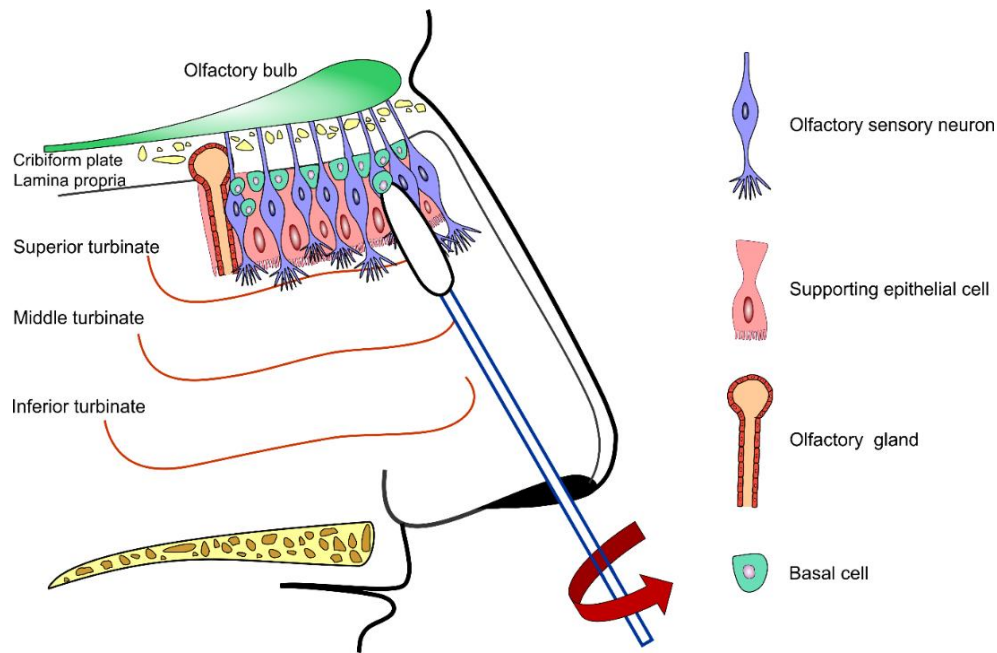


Figura 7. Esquema representativo de la extracción de células del epitelio olfatorio de humanos. Las células se exfoliaron de la región anterior del cornete lateral medial utilizando un cepillo especial (2,4 cm de longitud y 3 mm de diámetro) mediante movimientos circulares.

5.4 Formación de neuroesferas.

La caracterización *in vitro* de las células troncales neurales se ha favorecido por sistemas de cultivo que permiten la propagación de las células indiferenciadas (Rietze y Reynolds, 2006). Uno de estos sistemas es la formación de neuroesferas que se definen como agregados celulares esféricos heterogéneos no adherentes de las células troncales (Ray y Gage, 2006). Para la formación de las neuroesferas del epitelio olfatorio, una vez que las células alcanzaron confluencia (alrededor de un 80%) fueron tripsinizadas y sembradas en botellas de 25 cm² o sobre cristales previamente tratados con poli-L-lisina a una densidad de 16,000 células/cm² en medio DMEM-F12 sin suero fetal bovino, suplementado con insulina, transferrina y selenito de sodio (ITS 1%). Además, se adicionó el factor de crecimiento epidermal (EGF, 50 ng/ml) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF, 50 ng/ml). Cada 2 días se realizó cambio de medio y las neuroesferas se obtuvieron al término de una semana.

5.5 Protocolo de diferenciación neuronal

Para inducir el fenotipo neuronal maduro de las células del epitelio olfatorio de ratón y humano, se utilizaron células del pasaje 2 al 10. La monocapa de células fue tripsinizada y sembrada en una placa de 6 pozos en una densidad de 150,000 células por pozo para la extracción de RNA o sobre cristales previamente tratados con poli-L-lisina y laminina para inmunofluorescencia en una densidad de 16,000 células/cm² en DMEM-F12 con 10% de SFB y antibióticos por hasta su adhesión. Después de 24 horas, el medio con DMEM-F12 + 10% SFB fue retirado y se adicionó medio neurobasal (Gibco) suplementado con B27 al 1% durante 2 días. Posteriormente el medio con B27 se retiró y las células se trataron con medio neurobasal, suplementado con 5 μ M de forskolina (FSK, Sigma) y 10 ó 20 μ M de ácido retinoico (AR, Sigma) para las células del epitelio olfatorio de humano y ratón respectivamente durante 7 días, sin cambio de medio y protegidos de la luz (figura 4). Para inhibir la metilación del ADN, las células se trataron con 1.0 mM, 1.5 mM y 2.0 mM de procainamida en DMEM-F12 + 3% SFB por 48 horas antes de inducir la diferenciación neuronal con ácido retinoico y forskolina (figura 5) (Király et al., 2009).

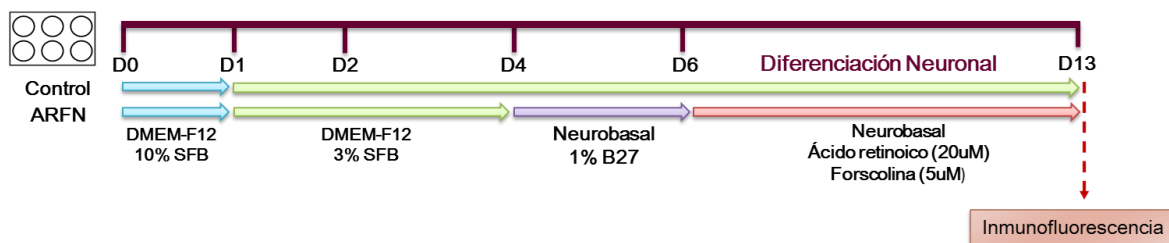


Figura 8. Protocolo de diferenciación neuronal. El protocolo experimental consistió en tratar las células con ácido retinoico (10 μ M para las células de humano y 20 μ M para las de ratón) y forskolina (5 μ M) en neurobasal por una semana. Al término de los 7 días se evaluó el proceso de diferenciación mediante inmunofluorescencia para NSE, MAP2 y MAP1B. El grupo control únicamente fue tratado con DMEM-F12 + 3% SFB (n=3).

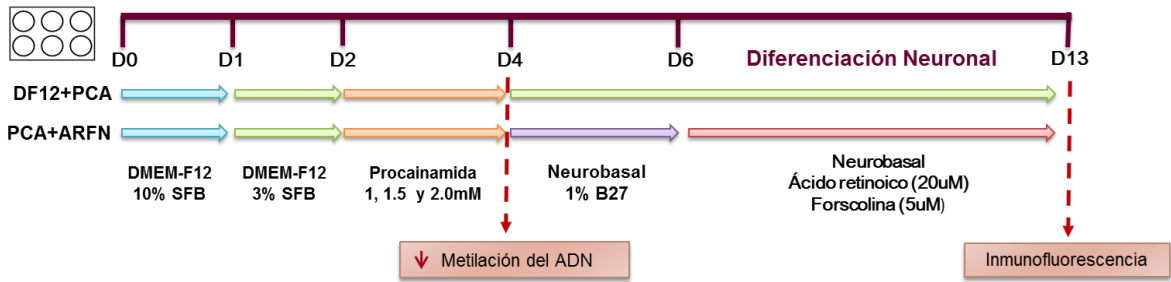


Figura 9. Protocolo de diferenciación neuronal con procainamida. Las células del epitelio olfatorio fueron pre-tratadas con el inhibidor de la metilación: procainamida (PCA) en concentraciones de 1.0, 1.5 y 2.0 mM por 48 horas. Posteriormente, las células se trataron con ácido retinoico y forskolina en neurobasal. Al término del tratamiento se realizó la inmunofluorescencia para MAP2 (ratón) y MAP1B (humano). Los grupos controles fueron tratados únicamente con PCA (1.0, 1.5 y 2.0 mM) por dos días y posteriormente con DMEM-F12 + 3% SFB por una semana.

5.6 Ensayo de proliferación celular

Una vez que las células del cultivo primario estuvieron confluentes se realizó un curso temporal de proliferación para las células del epitelio olfatorio de ratón y humano. Para ello se utilizó el reactivo WST-1 o 2-(4-yodofenil)-3-(4-Nitrofenil)-5-(2,4-Disulfofenil)-2H-Tetrazolio. Esta técnica permite analizar de una forma directa la viabilidad celular y de una manera indirecta, la proliferación celular. Se trata de un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium para formar el compuesto formazán, mediante la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables. El procedimiento se realizó en campana de flujo laminar en condiciones estériles, para ello se sembraron aproximadamente 150 células del epitelio olfatorio de ratón y humano en cajas de cultivo planas de 96 pozos con 100 µl de medio DMEM-F12 con 10% SFB y antibiótico-antimicótico. Al día siguiente de su adhesión se inició el tratamiento con el reactivo WST-1. Se retiró el medio y colocó 90µl de medio nuevo DMEM-F12 y 10 µl del reactivo WST1 (Roche). Las células se incubaron por 4 horas a 37° C y 5% CO₂. Al término de las 4 horas de incubación se retiró el medio de cultivo con un pipeteo constante, se homogeneizó la muestra, y posteriormente las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro UV (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific)

a una longitud de onda de 440 nm. El curso temporal se realizó a los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11. Cada experimento se realizó por triplicado de manera independiente.

5.7 Ensayo de Anexina V

La evaluación de la viabilidad y muerte celular, se realizó con el ensayo de Anexina V (Muse AnnexinV and Dead Cell Kit: MHC100105). Este método es ampliamente utilizado para determinar si las células son viables o se encuentran en un proceso apoptótico a través de la evaluación de la integridad y permeabilidad de la membrana. En los procesos de apoptosis en estadios tempranos, la Anexina V es detectada fácilmente una vez que se une a la fosfatidilserina. En estadios tardíos de apoptosis, es decir, cuando la membrana plasmática ha perdido su integridad y el ADN se hace accesible, se emplean moléculas fluorescentes que actúan como agentes intercalantes de los ácidos nucleicos en este caso se utilizó la 7 aminoactinomicina D (7-AAD).

Para el ensayo, se sembraron células del epitelio olfatorio de ratón y humano en placas de 6 pozos, alrededor de 200,000 en DMEM-F12 con 10% SFB hasta su adherencia. Posteriormente, las células se trataron con el inhibidor de la metilación (procaïn amida) en concentraciones de 1.0, 1,5 y 2.0 mM, durante 48 horas. Una vez transcurridas las 48 horas con el inhibidor, se retiró el medio y las células se tripsinizaron y se centrifugaron por unos minutos o hasta la obtención del pellet. A continuación, las células se resuspendieron con vortex en 1 ml de OPTIMEM-F12 con 3% SFB. En un tubo nuevo se colocaron 100 µl de las soluciones problema, así como el control y se agregó 100 µl del reactivo “Muse Annexin V and Dead Cell”, finalmente las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminados los 20 minutos de incubación las muestras se analizaron en un minicitómetro de flujo Muse Cell Analyzer (Merck-Millipore).

Los resultados se analizaron respecto a los siguientes parámetros:

Células no apoptóticas: Anexina V (-) y 7-AAD (-)

Células en apoptosis temprana: Anexina V (+) y 7-AAD (-)

Células en apoptosis tardía y/o muertas: Anexina V (+) y 7-AAD (+)

Fragmentos celulares: Anexina V (-) y 7-AAD (+)

5.8 Obtención de ADN genómico

Para la obtención de ADN genómico se utilizaron alrededor de 6×10^5 células del epitelio olfatorio de ratón y/o humano, las células se sembraron en placas de 6 pozos (200,000 células por pocillo) en condiciones control (DMEM-F12 + 3% SFB) o tratadas con procainamida (1.0 mM, 1.5 mM y/o 2.0 mM en DMEM-F12 + 3% SFB) durante 48 horas. Una vez terminado el tratamiento con el inhibidor las células se lavaron con PBS estéril y despegadas con tripsina al 0.25%+EDTA. Nuevamente las células se lavaron con PBS y se centrifugaron durante 5 minutos a 190 rpm y se resuspendieron en 200 μ l de PBS, 200 μ l de solución AL y 20 μ l de proteasa K. Las muestras se agitaron en el vórtex y se incubaron a 56°C durante 10 minutos. Una vez finalizados los 10 minutos se agregó 200 μ l de etanol y nuevamente las muestras se agitaron en el vórtex. Las muestras se colocaron en una columna DNeasy Mini spin y se centrifugaron a 8000 rpm durante 1 minuto, descartando el sobrenadante. El ADN se concentró en la columna la cual se lavó con 500 μ l de solución AW2 y se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos. Para la recuperación del ADN se colocó la columna en un tubo de 1.5 ml, se agregaron 200 μ l de solución AE en el centro de la columna, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente se centrifugaron a 8000 rpm durante 1 minuto. El ADN de las muestras se cuantificó en el NanoDrop 2000c (260 nm). La pureza del ADN obtenido, se comprobó corriendo las muestras en un gel de agarosa al 2% con un volumen de 100 ng de muestra. Los productos se observaron en un transiluminador UV.

5.9 Ensayo para la cuantificación del ADN Metilado

Para este ensayo se utilizó una prueba colorimétrica, mediante un kit de cuantificación de ADN (Abcam: Ab117128). Esta prueba permite la cuantificación global del ADN metilado, donde la fracción del ADN es detectable mediante la unión específica a anticuerpos para 5mC. Se utilizó 50 ng de DNA purificado por reacción, en una placa de 48 pozos. Las muestras se incubaron con solución BS durante 90 minutos a 37° C. Después de hora y media, se retiró la solución BS y se realizaron tres lavados con solución de lavado. Posteriormente, a cada muestra se le agregó 50 μ l de anticuerpo de captura (5mC) en una solución 1:1000 y se incubaron durante

60 minutos a temperatura ambiente. Transcurrida la hora, se realizó un lavado con solución de lavado, se agregó 50 µl de anticuerpo secundario durante 30 minutos en una solución 1:2000 y se lavó tres veces con buffer de lavado. Para la detección de la señal, las muestras se incubaron con una solución reveladora durante 1 a 10 minutos protegidas de la luz. Una vez que se observó el cambio de coloración de amarillo a azul, la reacción se detuvo con 50 µl de solución *stop*, esto indicó la presencia de ADN metilado.

El ADN metilado de las muestras fue cuantificado en un lector de ELISA a 450 nm. La concentración final del ADN metilado de cada muestra se representó en porcentaje de 5mC usando la siguiente fórmula:

$$\frac{(DO \text{ muestra} - DO \text{ control negativo})/S}{(DO \text{ control positivo} - DO \text{ control negativo}) \times 2/P} \times 100\%$$

Dónde:

DO= Densidad Óptica

S= Nanogramos de ADN de la muestra (50 ng)

P= Nanogramos de ADN control positivo (100 ng)

5.10 Inmunofluorescencia

5.10.1 Preparación de cristales para inmunofluorescencia

Para la preparación de cristales se utilizaron placas de 24 pocillos, en las cuales se colocó un cristal de 22 mm de grosor por pozo. Posteriormente en la campana de flujo, los cristales se cubrieron con alcohol al 70% y se expusieron a la luz UV durante 30 minutos, una vez transcurrida la media hora se retiró el alcohol, los cristales se lavaron con agua estéril por 30 minutos. Posteriormente se cubrieron con 300 µl de poli-l-lisina estéril durante 30 minutos más. Se recuperó la poli-l-lisina y se realizaron tres lavados de 10 minutos con agua estéril. Se permitió el secado de los cristales durante una hora (dentro de la incubadora a 37° C). Finalmente se añadieron 300 µl de laminina disuelta en DMEM-F12 sobre los cristales y se mantuvieron a 37° C durante toda la noche o hasta su uso.

Se sembró una densidad de 16,000 células/cm² sobre los cristales previamente tratados con poli-L- lisina y laminina. Al término del tratamiento correspondiente las células se fijaron con para-formaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS 1x (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂PO₄, 1.47 mM, KH₂PO₄) tres veces por 5 minutos. El pegado inespecífico de los anticuerpos fue bloqueado con una solución de suero normal de cabra al 5%, BSA 3%, TritonX-100 al 0.1% en PBS 1X durante 2 horas a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios (tabla 1) se incubaron toda la noche a 4° C. Al día siguiente se retiró el anticuerpo y se realizaron 3 lavados con PBS durante 10 minutos con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo primario. Posteriormente las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario el cual se encuentra acoplado a un fluoróforo (Alexa 488 y/o Alexa 568) durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurridas las 2 horas, se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 4 lavados con PBS 1x durante 10 minutos. Los núcleos fueron teñidos con 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI: 3 µl/ml) durante 5 minutos en agitación constante. Se retiró el DAPI y se realizaron 3 lavados más con PBS durante 10 minutos y 2 lavados más con agua bidestilada para eliminar el exceso de sales. Finalmente, se agregó 5 µl de medio de montaje DABCO en cada cristal y se colocaron inversamente en un portaobjetos limpio. Una vez que la laminilla se secó, se selló con barniz transparente para su análisis en el microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert40 CFL, el cual se encuentra acoplado a una cámara digital que utiliza el programa AxioVision Rel. 4.8 software.

Para la inmunofluorescencia de la marca de metilación 5mC, previo al bloqueo y a la adición del anticuerpo primario, se desnaturalizó el ADN, para lo cual, las muestras se incubaron durante una hora a 37° C en una solución de HCl 2 N. Después del tiempo de incubación, las muestras se neutralizaron con solución de boratos 0.1 M durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1x durante 5 minutos. Los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche a 4° C en solución de bloqueo (10% SNC, 3% BSA y 0.1% TritónX-100 en PBS). Al día siguiente, las muestras se dejaron a temperatura

ambiente durante una hora, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Las muestras se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario (ver tabla 1). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS y 2 con agua destilada para eliminar los excesos de anticuerpo secundario. Como medio de montaje se usó DABCO y finalmente se sellaron para ser observadas en el microscopio de epifluorescencia.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios para las inmunofluorescencias.

Anticuerpo Primario	Dilución	Fuente	Anticuerpo Secundario	Dilución	Fuente
Nestina	1:200	Millipore, MAB353	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse	1:500	Invitrogen, A11001
β III-tubulina	1:1000	Millipore, AB9354	Alexa Fluor 546 goat anti-pollo	1:500	Invitrogen, A11040
Enolasa Neuronal Especifica (NSE)	1:100	Chemicon, AB951	Alexa Fluor goat 568 anti-conejo	1:500	Invitrogen, A11036
Proteína Asociada a Microtúbulos 1B (MAP1B)	1:200	Abcam, ab3095	Alexa Fluor 488 goat anti-ratón	1:500	Invitrogen, A11001
Proteína Asociada a Microtúbulos 2 (MAP2)	1:100	Sigma, M3696	Alexa Fluor 568 goat anti-conejo	1:500	Invitrogen, A11036
Proteína de union a CpG metilados (MeCP2)	1:100	Abcam, AB50005	Alexa Fluor 568 goat anti-ratón	1:500	Invitrogen, A11031
5-metilcitosina (5mC)	1:200	Diagenode, C15200081	Alexa Fluor 568 goat anti-ratón	1:500	Invitrogen, A11031
5-hidroximetilcitosina (5hmC)	1:200	Abcam, ab106918	Alexa Fluor goat anti-rata	1:500	Invitrogen, A11006

5.11 Extracción de ARN total con Trizol

Para la extracción de ARN total de las células troncales del epitelio olfatorio de ratón y humano, se retiró el medio de cultivo y se agregó 1 ml de Trizol de manera uniforme sobre la monocapa celular, posteriormente con una espátula de plástico mecánicamente se homogenizaron las muestras, con cuidado se pasaron a un tubo de 1.5 ml. Luego de 5 minutos a temperatura ambiente se añadieron 0.2 ml de cloroformo y se agitaron en vortex durante 15 segundos, las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Consecutivamente las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4° C, con la finalidad de separar la fase acuosa. A continuación, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 0.5 ml de isopropanol al 100%, durante 10 minutos a temperatura ambiente las muestras se centrifugaron nuevamente a 12000 rpm durante 10 minutos a 4° C hasta la aparición de un pequeño pellet. El pellet fue lavado con 1 ml de etanol al 75%, se agitaron en el vortex y se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4° C. Se decantó el etanol y el pellet se resuspendió en 20 µl de agua libre de RNasas. Finalmente se evaporó el resto de etanol en campana de flujo laminar. La cuantificación de ARN se llevó a cabo en el nanodrop 2000c. Las muestras se almacenaron a -70° C para conservar la integridad del ARN.

5.12 Reacción en cadena de la polimerasa en punto final (RT-PCR)

Una vez que obtuvimos el ARN de las muestras, se realizó la síntesis del ADN complementario, para lo cual se utilizó el kit “Revert Aid First Strand cDNA” (Thermo Scientific) y el kit “DreamTaq Green DNA Polymerase” (Thermo Scientific) para la PCR de punto final, cada reacción tuvo un volumen final de 20 µl y se prepararon de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La reacción se comenzó con una desnaturalización inicial de 95° C; 3 minutos, en un rango de 35-40 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización 95° C; 30s, alienación 50-65° C; 30s (dependiendo del oligonucleótido), elongación 72° C; 1 minuto y una temperatura final de 72° C durante 5 minutos. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 2%, con Bromuro de Etidio a 80 Volteos por 80 minutos en una cámara de electroforesis en una solución de TBS 1x. Los geles se observaron en un

transiluminador UV. Las imágenes se capturaron usando el software LabWorks 4.5 (BioImaging Systems, UVP, Upland, CA, USA).

5.13 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).

Este procedimiento se realizó utilizando el Kit KAPA SYBR® FAST Master Mix (KAPABIOSYSTEMS) para RT-PCR en tiempo real, cada reacción tuvo un volumen final de 10 μ l y se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó en tres pasos principales: activación de la enzima 95° C; 3 minutos, desnaturalización 95° C; 1-3 minutos, alineación 50-60° C; 20 segundos durante 35-40 ciclos. La PCR cuantitativa se realizó en el equipo Pikoreal 96 (Thermo Scientific). Los resultados RT-qPCR se analizaron por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Wong y Medrano, 2005), donde los valores delta se obtuvieron normalizando los valores de ciclo umbral (Ct) respecto al valor Ct del gen endógeno (GAPDH) utilizado. El segundo delta se calculó al restar el primer valor delta de cada muestra problema respecto al valor de la muestra o grupo control (Livak y Schmittgen, 2001).

5.14 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron, al menos por triplicado utilizando diferentes cultivos celulares del P2 al P10 de las células del epitelio olfatorio. Los datos se reportaron como la media \pm el error estándar (SEM). Para el análisis estadístico se utilizaron distintas pruebas de acuerdo con los resultados. Para analizar la proliferación celular se utilizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Dunnet, así como para los análisis de las RT-qPCR. Se empleó una prueba *t* de Student para la evaluación de las diferencias entre las células inmunopositivas a nestina y β III tubulina del cultivo primario y el pasaje 2 de células del epitelio olfatorio de ratón. Para el análisis de la densidad óptica de la metilación (5mC y 5hmC) y para el análisis de diferenciación neuronal (MAP1B y MAP2) se utilizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Tukey. Finalmente, para el análisis de la metilación global se utilizó una prueba de suma de rangos o Mann-Whitney- Wilcoxon. Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa Graph Pad Prism 5 y Sigma Plot 12.0. La prueba utilizada se especifica en cada pie de figura.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos específicos de ratón para PCR en punto final y tiempo real.

<i>Gen</i>	Secuencia de oligos para ratón	Producto (pb)	Función
<i>Sox2</i>	F:TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA R:TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA;	297	Pluripotencia/ autorenovación
<i>Oct4</i>	F:TCTTTCCACCAGGCCCCCGGCTC R:TGCGGGCGGACATGGGGGAGATCC	224	Pluripotencia
<i>Klf4</i>	F:GGCGAGTCTGACATGGCTG R:GCTGGACGCAGTGTCTTCTC	714	Pluripotencia
<i>Nanog</i>	F:GACTGAGATATGGCTTGCTC R:CTTTCTGAGGGATAGGGTCT	449	Pluripotencia
<i>Lin28</i>	F:AGGCGGTGGAGTTCACCTTTAAGA R:AGCTTGCATTCTTGCCATGATGG	206	Pluripotencia
<i>Dnmt1</i>	F:AGCTTGCATTCTTGCCATGATGG R:GGCTTGGTCACAAAACAAC	435	Mantenimiento de la metilación del ADN
<i>Dnmt3a</i>	F:CCAACATCGAATCCATGAAAATGGAGG R:CTGGTGAATGCACTGCAGAAGGAG	600	Metilación de <i>nov</i> del ADN
<i>Dnmt3b</i>	F:TGGGTACAGTGGTTTGGTGA R:GCCCTTGTTGTTGGTACTT	504	Metilación de <i>nov</i> del ADN
<i>Gadd45a</i>	F:GCGAGAACGACATCAACATCCTGC R:GCGAGAACGACATCAACATCCTGC	374	Desmetilación del ADN
<i>Gadd45a</i>	F:TCGGCCCCTGACATCAGTTTCTG R:TCGGCCCCTGACATCAGTTTCTG	400	Desmetilación del ADN
<i>Gadph</i>	F:ACTGGCATGGCCTTCCGTGTTCTTA R:TCAGTGTAGCCCAAGATGCCCTTC	149	Gen constitutivo

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos específicos de humano para PCR en punto final y tiempo real.

Gen	Secuencia de oligos para humano	Producto (pb)	Función
<i>Sox2</i>	F:CTCCGGGACATGATCAGC R:CTGGGACATGTGAAGTCTGC	81	Pluripotencia/ autorenovación
<i>Oct4</i>	F:AGCAAAACCCGGAGGAGT R:CCACATCGGCCTGTCTATATC	114	Pluripotencia
<i>Klf4</i>	F:GATGGGGTCTGTGACTGGAT R:CCCCAACTCACGGATATAA	134	Pluripotencia
<i>Nanog</i>	F:CAGCTGTGTGACTCAATGATAGATTT R:CAACTGGCCGAAGAATAGCAATGGTGT	286	Pluripotencia
<i>Lin28</i>	F:CTGTCCAAATGCAAGTGAGG R:GCAGGTTGTAGGGTGATTCC	63	Pluripotencia
<i>Dnmt1</i>	F:CGGCTCAAAGATTTGGAAAG R:AGGTAGCCCTCCTCGGATAA	158	Mantenimiento de la metilación del ADN
<i>Dnmt3a</i>	F:ACCCGACTTCATAATGGTGCTTTC R:CGCCATCTGCAAGCTGCTCT	139	Metilación de <i>ново</i> del ADN
<i>Dnmt3b</i>	F:CCCAATCCTGGAGGCTATC R:CGCCTGTCAAGTCTGTGT	113	Metilación de <i>ново</i> del ADN
<i>Gadd45a</i>	F:TGAGTGAGTGCAGAAAGCAG R:TTTGCTGAGCACTTCTCCA	181	Desmetilación del ADN
<i>Gadd45a</i>	F:AACATGACGCTGGAAGAGCT R:AGAAGGACTGGATGAGCGTG	247	Desmetilación del ADN
<i>Gadph</i>	F:AGCCACATCGCTCAGACAC R:GCCCAATACGACCAAATCC	66 (qPCR) 127	Gen constitutivo

6. Resultados

6.1 Obtención de cultivos primarios y pasajes de células del epitelio olfatorio de ratón

Como primer objetivo se estandarizó la obtención del tejido y cultivo de las células troncales/progenitores derivadas de la mucosa olfatoria de ratón. Aproximadamente 4-5 días después de la incubación, se observó células de diferentes morfologías, es decir, inicialmente tuvimos un cultivo heterogéneo. Entre las primeras características que observamos del cultivo primario, fue el crecimiento de células esféricas alrededor del explante (*) durante los primeros días, donde sólo algunas células se adhirieron a la superficie del plástico, formando islas pequeñas (figura 10A). En el transcurso de la primera semana, las células mostraron una morfología alargada (fusiforme) que se agruparon hasta formar una pequeña monocapa (figura 10B). Por otra parte, en diferentes campos del cultivo observamos conjuntos de células con morfología plana, redondas y núcleos grandes, muy similares a las células epiteliales (figura 10C).

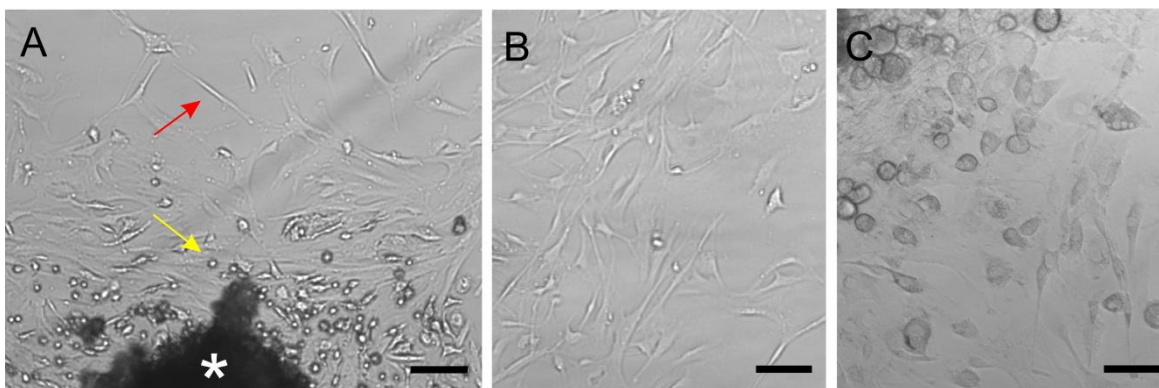


Figura 10. Cultivo primario de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón. A) Las células comienzan a crecer alrededor del explante (*), dos tipos celulares son evidentes: células esféricas (flecha amarilla) y células fusiformes/alargadas (flecha roja). Barra de calibración 100 μ m. B) Agrupaciones de células fusiformes una semana en cultivo. C) Conjunto de células con morfología aplanada y núcleos ovalados. Barra de calibración 50 μ m.

Después de una semana, los cultivos solo alcanzaron de un 50 a un 60% de confluencia y se realizaron diversos pasajes. Las células que se utilizaron para los diferentes experimentos fueron cultivos del pasaje 2 (P2) al pasaje 10 (P10). Como

se observa en la figura 11, a partir de los primeros pasajes el número de células esféricas disminuyó, hubo un incremento de células, la mayoría de ellas de morfología fusiforme, las cuales formaron una monocapa más homogénea a diferencia de los cultivos primarios. A partir del segundo pasaje las células alcanzaron una mayor confluencia. De acuerdo con la morfología, en estos cultivos no hubo presencia de células del tipo epitelial (figura 11C).

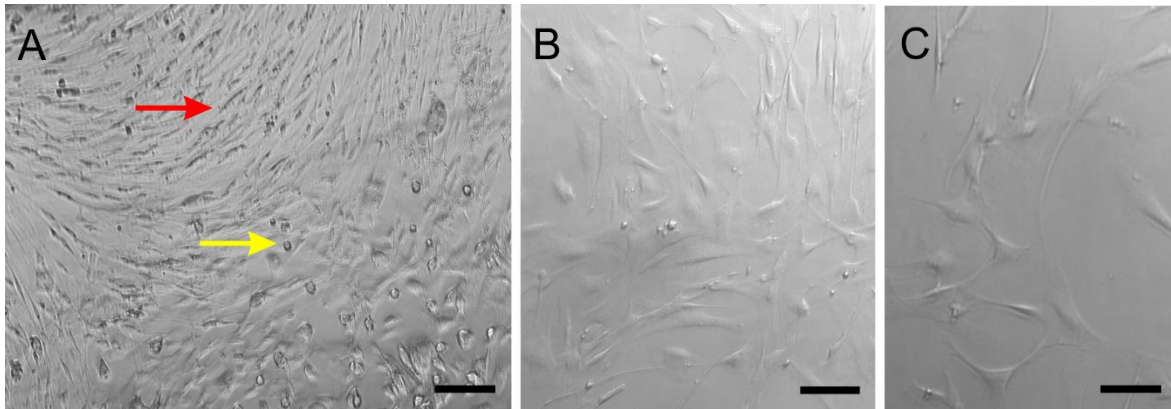


Figura 11. Cultivo de células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón, pasaje 2. A) Monocapa de células troncales/progenitores del epitelio olfatorio. La población celular es más homogénea con forma alargada, con extremidades más estrechas en el centro (flecha roja). Las células en forma de esfera (flecha amarilla) disminuyen. Barra de calibración 100 μm (A) y 50 μm (B y C).

6.2 Análisis de la proliferación y viabilidad celular de las células del epitelio olfatorio de ratón

Mediante un análisis temporal realizado a los días 1, 3, 5, 7 y 9, se determinó la proliferación celular utilizando el reactivo WST-1 (ver figura 12A). El punto máximo de crecimiento de las células fue al día 7 y posteriormente su actividad metabólica disminuyó. Determinada la máxima proliferación, se realizó un ensayo de viabilidad celular. El porcentaje de viabilidad celular en nuestros cultivos al día 7 correspondió a un 85.4% (figura 12B). Esto nos permitió conocer el comportamiento de crecimiento y condiciones de nuestro cultivo, además las células llegaron a su confluencia al día 7, por lo que se decidió realizar los pasajes cada semana (P0 al P10). Por otro lado, parte de las células del P2 al P10 fueron criopreservadas en DMEM-F12, 40 % SFB y 10% de DMSO a una temperatura de -75°C o conservadas en nitrógeno líquido a -180°C .

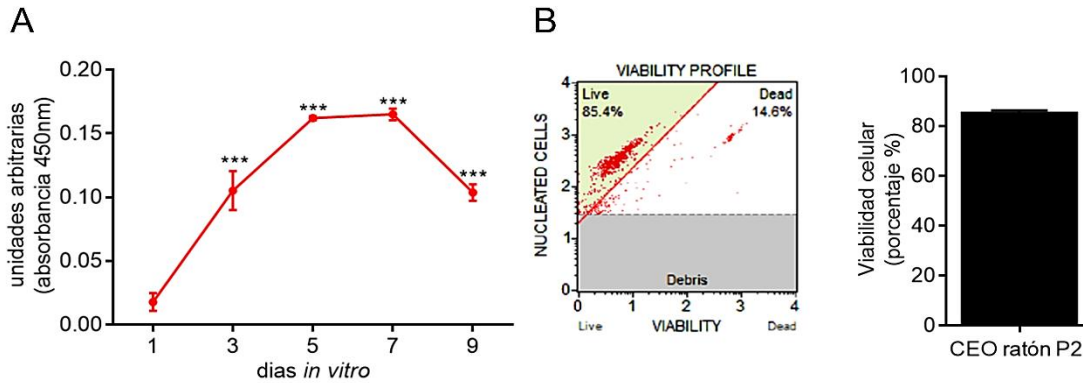


Figura 12. Análisis de la proliferación y viabilidad en células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón. A) Curso temporal del crecimiento celular *in vitro* para las células del epitelio olfatorio, el máximo crecimiento se registró al día 7. B) Diagrama y gráfico representativo de la cuantificación de la viabilidad en células del epitelio olfatorio en el pasaje 2 al séptimo día de crecimiento en condiciones control ($n=3$).

6.3 Análisis de la expresión génica en células del epitelio olfatorio de ratón

6.3.1 Marcadores tempranos de linaje neural

La detección de células comprometidas con el desarrollo neuronal, se ha convertido en un indicador muy importante de la neurogénesis adulta; y el estudio de eventos tempranos tales como la auto-renovación y el compromiso de linaje neural, requiere la capacidad de detectar células troncales/progenitores con marcadores adecuados como nestina y beta tubulina III.

Nestina es una proteína de filamentos intermedios, su expresión está restringida a células precursoras neuroepiteliales en el tubo neural y, por lo tanto, se ha utilizado como un marcador específico de tipo celular para células troncales y células precursoras (Dahlstrand et al., 1992; Lendahl et al., 1990).

Por otra parte, beta tubulina III (otra proteína del citoesqueleto), también conocida como Tuj1, se expresa relativamente temprano después del compromiso neuronal, por lo que es considerada como un marcador de linaje neuronal temprano.

En este trabajo analizamos la expresión nestina y beta tubulina III como marcadores neurales tempranos, en los cultivos primarios y células del epitelio olfatorio del pasaje 2. En las condiciones usadas, es decir, DMEM-F12 + 10%SFB, el 82.33%

de las células en el cultivo primario fueron inmunopositivas a nestina y 76.33% en el cultivo del pasaje 2. Por otro parte, también se realizó la inmunofluorescencia para beta tubulina III. En los cultivos primarios el 92% fue inmunopositivo para beta tubulina III y el 82% para las células del pasaje 2. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba *t-student* y los resultados no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el número de células inmunopositivas a nestina y beta tubulina III entre los cultivos primarios y cultivos del pasaje 2 (figura 13). En todos los experimentos se verificó la especificidad de la marca con controles negativos en los que no fue incluido el anticuerpo primario.

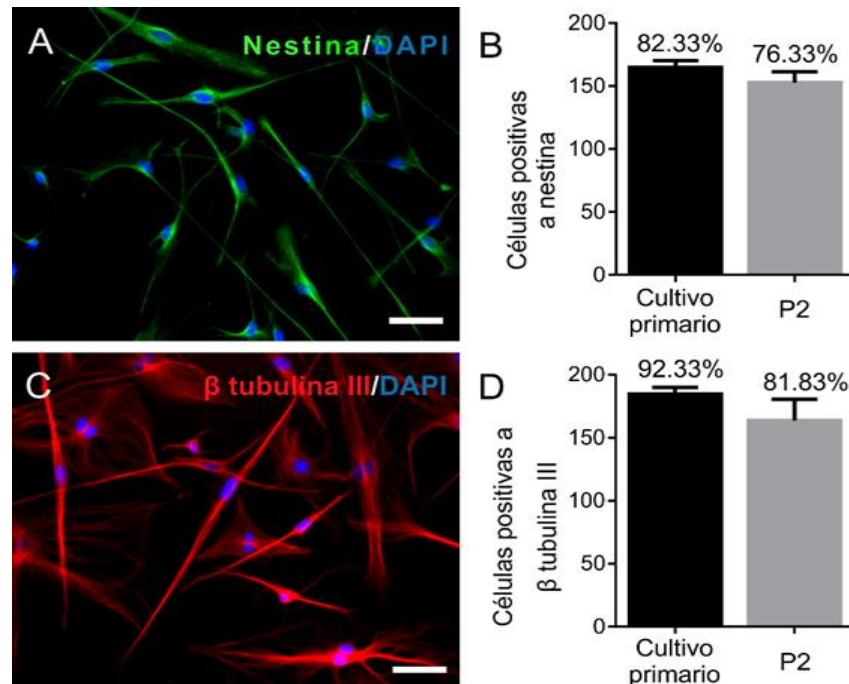


Figura 13. Análisis de marcadores de linajes neurales tempranos en células del EO de ratón.

A y C) Fotomicrografías representativas de la inmunofluorescencia a nestina (verde) y β tubulina III (rojo). Ambas marcas son de citoesqueleto. B y D) Análisis estadístico en porcentaje de las células positivas a nestina (B) y β tubulina III en el cultivo primario y células del P2. No existen diferencias significativas en ambas condiciones ($n=3$, $p < 0.05$ en una prueba *t-student*). Barras de calibración 50 μ m.

6.3.2 Expresión de marcadores asociados a pluripotencia

Para determinar la troncalidad de las células del epitelio olfatorio en ratón *in vitro*, evaluamos por RT-PCR la expresión de factores relacionados con la pluripotencialidad de una célula troncal (Sox2, Oct 4, Klf4, Nanog y Lin28) en los pasajes 2 y 10 (figura 14A). Se ha descrito que el factor de transcripción Sox2, se encuentra altamente expresado en células troncales neurales adultas y se encarga del mantenimiento de la proliferación de las mismas además de mantenerlas en un estado indiferenciado (Graham et al., 2003). Con la finalidad de analizar el patrón de expresión de este factor de transcripción se realizó una RT-QPCR específica a lo largo de 5 pasajes (P2, P4, P6, P8 y p10). En la gráfica de barras (figura 14B) se observa que la expresión de Sox2 disminuye a partir del P4. Sin embargo, los niveles en la expresión del factor de transcripción se mantienen constantes en los pasajes 4, 6, 8 y 10 (** $p < 0.001$ respecto al P2). Además, se analizó la presencia de Sox2 en las células mediante inmunofluorescencia en el P2 (figura 14C). El número de células inmunopositivas para Sox2 fue del 75.8%.

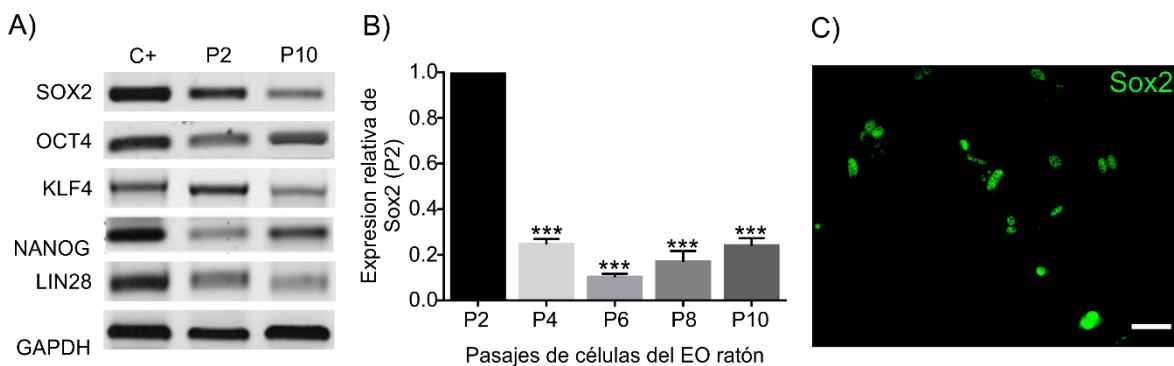


Figura 14. Análisis de la expresión de marcadores asociados a pluripotencia en las células del epitelio olfatorio de ratón. A) Esquema representativo de la amplificación de genes asociados a la pluripotencia de células troncales (Sox2, Oct4, Klf4, Nanog y lin28). De derecha a izquierda: Control positivo (embrión de ratón 10 días); células del epitelio olfatorio del pasaje 2 y 10. B) Perfil de expresión de Sox2 en los pasajes 2, 4, 6, 8 y 10 de células del epitelio olfatorio de ratón. Los datos fueron normalizados respecto al gen endógeno GAPDH y los valores son representativos del promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes (** $p < 0.001$ versus P2; ANOVA una vía seguida de una prueba post-hoc de Dunnet). C) Fotomicrografía representativa de la inmunofluorescencia para el factor de transcripción Sox2 (verde) en células del epitelio olfatorio de ratón en el pasaje 2 (P2). La marca se delimita al núcleo. Barra de calibración 50 μ m.

6.4 Formación de neuroesferas en cultivos de células del epitelio olfatorio de ratón

Para comprobar la capacidad de formación de neuroesferas de las células del epitelio olfatorio para formar estos agregados, las células fueron tratadas en condiciones no adherentes. Los agregados celulares comenzaron a formarse a partir del día 2 y fueron esféricos totalmente al día 7. Las neuroesferas de las células del epitelio olfatorio de ratón fueron positivas para la proteína nestina y beta tubulina III (figura 15).

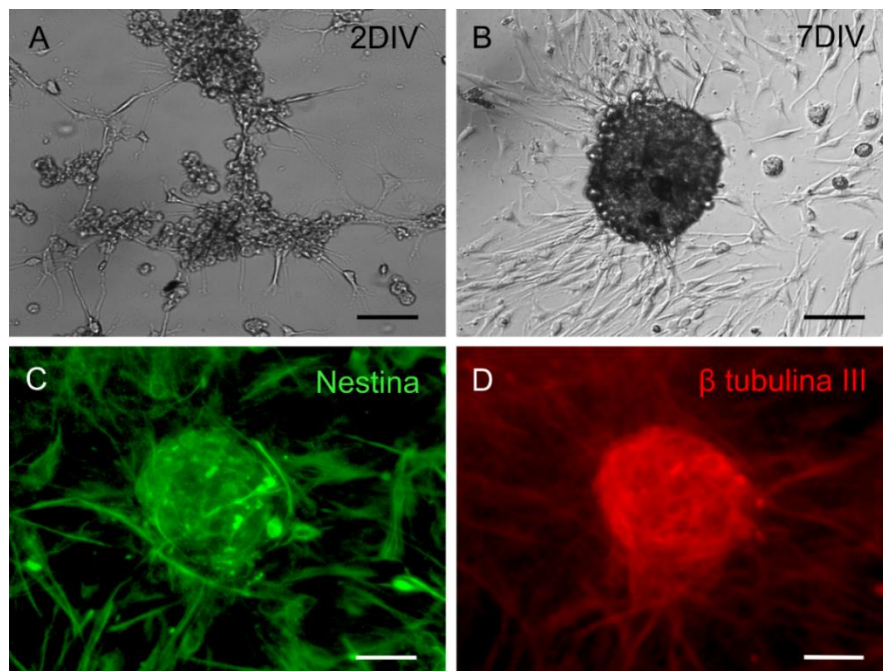


Figura 15. Formación de neuroesferas de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón. A) Las células comenzaron a formar agregados celulares en medio sin suero y en factores de crecimiento *in vitro* desde el día 2. B) Formación total del agregado esférico (neuroesfera). C y D) Fotomicrografías representativas de la inmunofluorescencia para nestina (verde) y β tubulina III en neuroesferas sin disociar. Barras de calibración 50 μ m.

6.5 Diferenciación de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón hacia neuronas maduras

Con base en la literatura, se estandarizó un protocolo con ácido retinoico y forskolina para la inducción de la diferenciación neuronal en las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón. Los cultivos se trataron con 20 μM de ácido retinoico (AR) y 5 μM de forskolina (FSK) en neurobasal durante 7 días.

Durante el tratamiento el número de células que sobrevivieron fue menor al número inicial de células sembradas. Con la finalidad de realizar una caracterización más detallada del protocolo de diferenciación neuronal, se analizaron los cambios morfológicos con el tratamiento de inducción. En condiciones control (DMEM-F12 + 10% SFB) las células son planas, alargada, en forma de huso similar a la de los fibroblastos (figura 16A). Una semana post-inducción con AR y FSK, las células comenzaron a tener una estructura neuronal más evidente, es decir, presentaron proyecciones más finas y alargadas, además los núcleos fueron de menor diámetro que las células control (figura 16B).

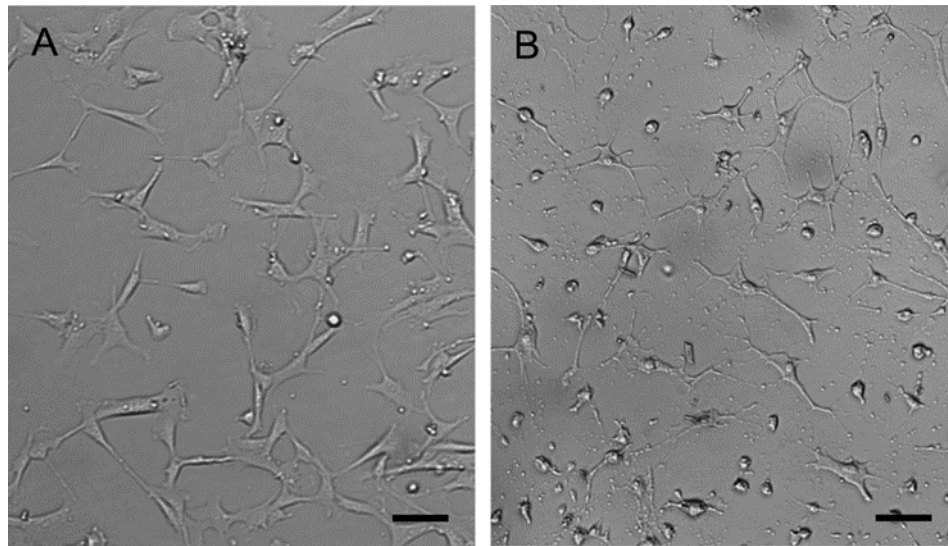


Figura 16. Morfología celular antes y después de la inducción neuronal. A) Fotomicrografía en campo claro del cultivo de células troncales/progenitores del epitelio olfatorio en condiciones control, las células presentaron una forma fusiforme. B) Células del epitelio olfatorio de ratón después del tratamiento con ácido retinoico y forskolina. Se puede observar el crecimiento de neuritas. Barras de calibración 50 μm .

Para el análisis de la diferenciación neuronal con AR y FSK, se realizó la inmunofluorescencia para NSE-2 o enolasa neuronal específica tipo 2 (*neuronal specific enolase*) la cual se considera un marcador de maduración neuronal intermedio y MAP2 o proteína asociada a microtúbulos (*microtubule-associated protein 2*) (figura 17 A y B). Previo al tratamiento con AR y FSK, el número de células positivas para NSE fue de 20.67 ± 0.8819 (10.33%) y para MAP2 15.33 ± 2.728 (7.666%). Después de la inducción de la diferenciación neuronal el número de células inmunopositivas para NSE fue del 151.3 ± 2.728 (75.67%), bajo estas condiciones hubo un incremento significativo del 65.32% ($p < 0.01$) respecto al control. Por otra parte, el número de células MAP2 positivas fue del 70.67 ± 4.631 (35.34%), lo que equivale a un incremento significativo del 27.68% ($p < 0.001$) respecto al control (figura 17C).

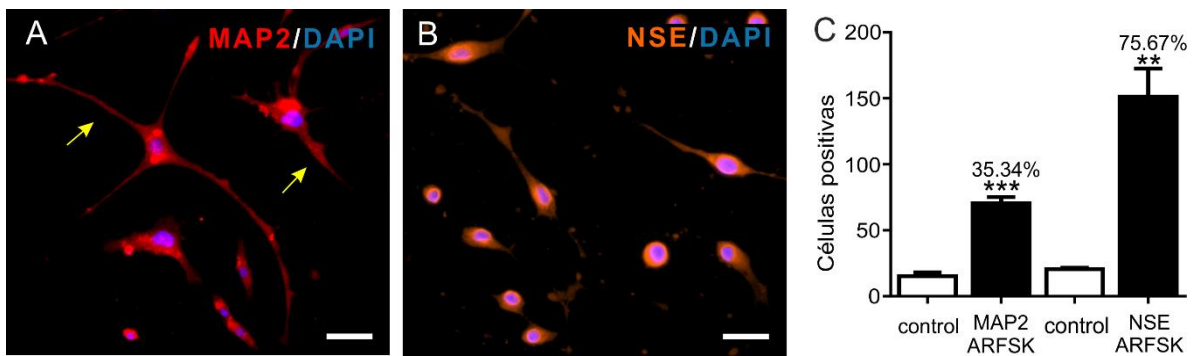


Figura 17. Efecto de la inducción neuronal con ácido retinoico y forskolina. A y B) Fotomicrografías representativas para las inmunofluorescencias a MAP2 (rojo) y NSE (naranja). Las flechas amarillas indican posibles neuritas, las cuales fueron consideradas para la cuantificación de la proteína MAP2. Los núcleos fueron marcados con DAPI. Barra de calibración 50 μ m. C) La grafica representa el número de células positivas a MAP2 y NSE en células del EO de ratón después del tratamiento con ácido retinoico y forskolina (AR/FSK). Los valores representan el promedio \pm SEM del número de células: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control, t de Student ($n=3$).

6.6 Análisis de los patrones de metilación/desmetilación del ADN en las células del epitelio olfatorio de ratón

6.6.1 Evaluación de los patrones metilación (5mC y MeCP2) mediante inmunofluorescencia

Como una primera aproximación, se analizó el patrón global de metilación de las células el epitelio olfatorio de ratón en condiciones control (DMEM-F12+10%SFB) mediante la estandarización de la inmunofluorescencia para la 5 metilcitosina (5mC) (figura 18A). La cuantificación de este parámetro se graficó como la densidad óptica (D.O). Esta medición correspondiente a la cantidad de fluorescencia emitida sobre el área de cada célula analizada. Para el análisis se utilizó el programa "Image J." También se analizó la presencia de la proteína de unión al ADN metilado o MeCP2, (figura 18B), donde el 73.29% fueron inmunopositivas para esta proteína (225.7 ± 6.36 de un total de 300 células).

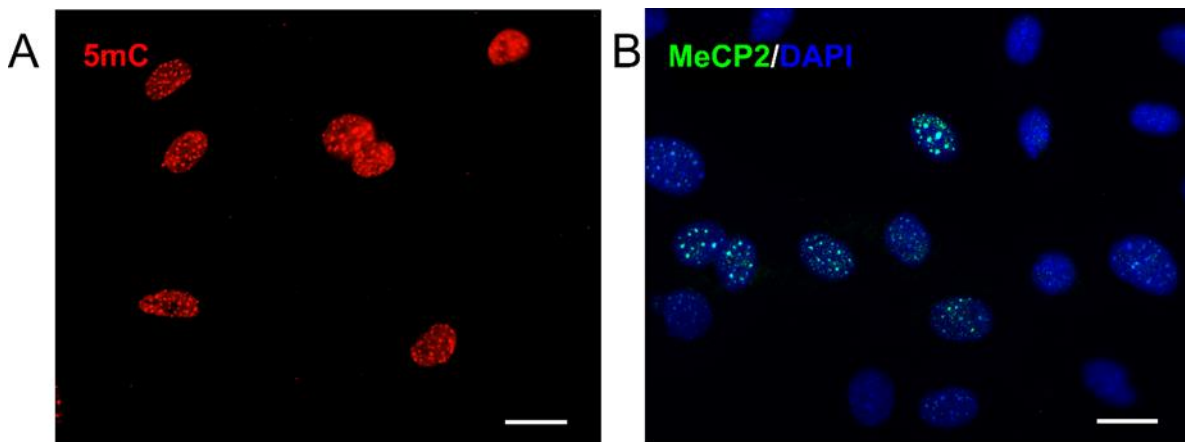


Figura 18. Patrón de metilación en células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón. A y B) Inmunofluorescencia para 5-metilcitosina (rojo) y la proteína de unión al ADN metilado (MeCP2, en verde) en células del epitelio olfatorio en condiciones control (DMEM-F12 + 10% SFB). Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Barra de calibración: 50 μ m.

6.6.2 Análisis de la expresión del ARN mensajero para las ADN metiltransferasas (DNMTs) y Gadd45s mediante RT-PCR

Para determinar la expresión de enzimas involucradas en el proceso de metilación y desmetilación del ADN en las células del EO de ratón *in vitro*, se realizó un análisis mediante RT-PCR para la detección de ARN mensajero de las ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT3a y DNMT3Bb) involucradas en el proceso de metilación, así como las proteínas asociadas a procesos de desmetilación (Gadd45a y Gadd45b) durante los pasajes 2, 4, 6, 8 y 10 (ver figura 19). Las células se mantuvieron en condiciones control durante los pasajes y se encontró que la expresión del ARN mensajero para DNMT1, DNMT3a y DNMT3b se mantiene constante a lo largo de los pases. De manera muy similar el ARN mensajero para las proteínas Gadd45a y Gadd46b presentan niveles de expresión similar en los pasajes (P2 al P10).

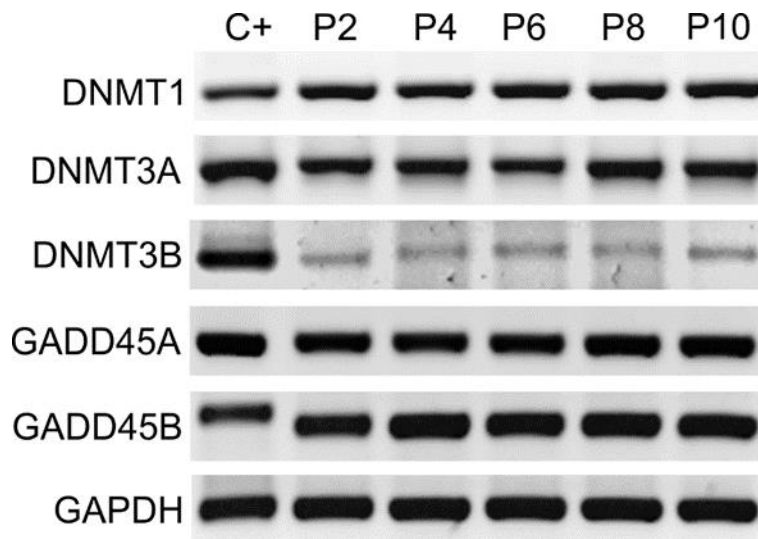
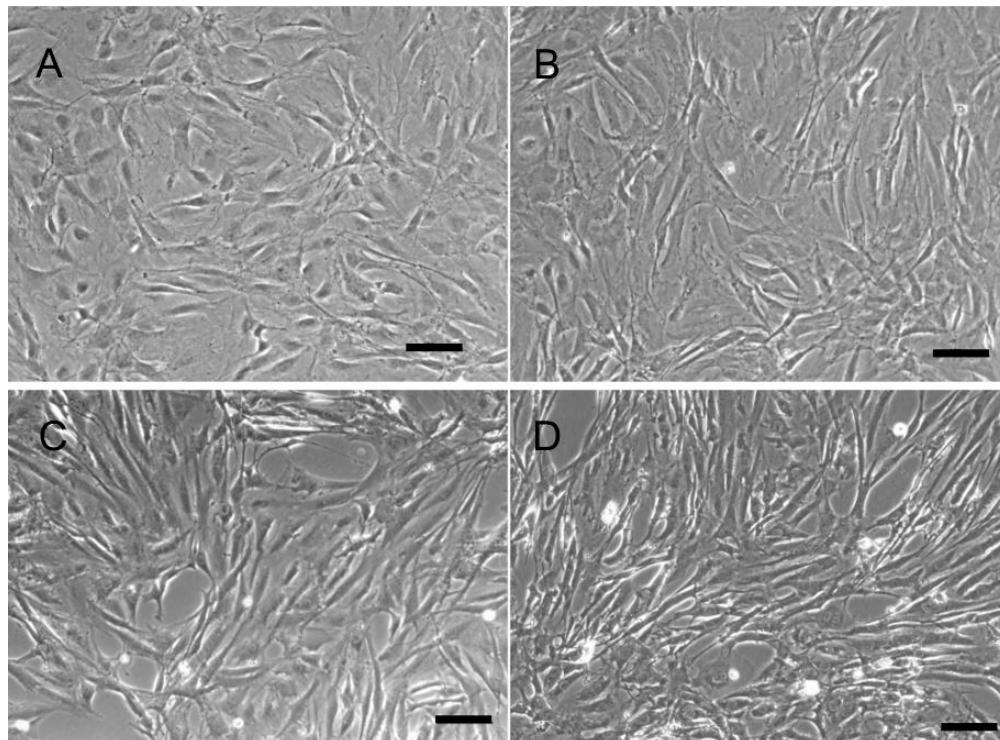


Figura 19. Análisis de la expresión del ARN mensajero para las ADN metiltransferasas (DNMTs) y Gadd45s mediante RT-PCR. El esquema representa el ARN mensajero para DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, Gadd45 a y b durante los pases 2, 4, 6, 8 y 10 de las células del epitelio olfatorio de ratón. De izquierda a derecha: C+: control positivo (embrión de ratón al día 10); Pasajes celulares del 2 al 10 de las células del epitelio olfatorio. Se muestra GAPDH como gen de referencia.

6.7 Evaluación del tratamiento farmacológico con procainamida como inhibidor de la ADN metiltransferasa 1 en la capacidad de diferenciación neuronal de las células del epitelio olfatorio de ratón

6.7.1 Análisis de la viabilidad celular en cultivos del epitelio olfatorio con procainamida

Se utilizó procainamida (un inhibidor específico de DNMT1, (Lee et al., 2005) en concentraciones milimolares de 1.0, 1.5 y 2.0 mM. Para determinar si las concentraciones usadas del inhibidor afectaron la viabilidad de las células del EO, se realizó un ensayo con anexina V 48 horas después de haber iniciado el tratamiento con la PCA. Se analizó la morfología de las células del epitelio olfatorio mantenidas en condiciones control (vehículo) y con el inhibidor. En el análisis no se observaron cambios en la morfología de las células tratadas con PCA a concentraciones de 1.0 y 1.5 mM donde la viabilidad fue aproximadamente del 91.3%. Por otra parte, las células tratadas con PCA 2.0 mM sufrieron un ligero cambio en su morfología, ya que se observaron ligeramente vesiculadas en el citoplasma y los núcleos presentan un aspecto irregular, sin embargo, estos cambios morfológicos no afectaron la viabilidad de las células 92% (figura 20).



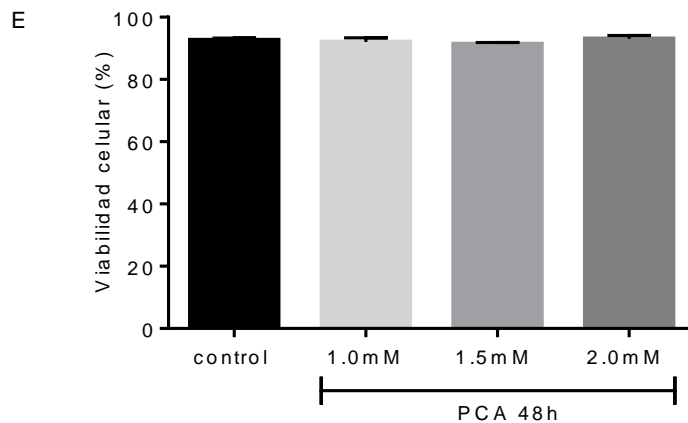


Figura 20. Análisis de la viabilidad celular con procainamida (PCA). Fotomicrografías en campo claro representativas de la morfología celular en cultivos del epitelio olfatorio: A) Condiciones control (DMEM-F12 + 3% SFB); B) PCA 1.0 mM; C) PCA 1.5 mM; D) PCA 2.0 mM, 48 horas después del tratamiento. Barras de calibración 100 μ m. E) Representación gráfica en porcentaje de las células viables con la prueba de anexina V. No existen diferencias significativas de los grupos tratados con el inhibidor y las células control (ANOVA 1 vía, $n=3$).

6.7.2 Efecto de la inhibición de la metilación del ADN con procainamida en cultivos del epitelio olfatorio de ratón

Para analizar el efecto de la procainamida sobre la metilación del ADN en las células del EO de ratón, se cuantificó la densidad óptica derivada del marcaje realizado para la 5-metilcitosina (5mC) en las células control y las tratadas con el inhibidor. Nuestros resultados mostraron una disminución significativa de la cantidad de fluorescencia para la 5mC en las células tratadas con PCA 1.0, 1.5 y 2.0 mM (ver figura 21A). La inhibición de la metilación para la concentración de 1.0 mM fue del 41% ($p<0.01$), para la concentración 1.5 mM la metilación mediante la densidad óptica disminuyó un 72% y finalmente para 2.0 mM un 73% ($p<0.001$) respecto al control (100%). El análisis se realizó con una ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey al menos en tres experimentos independientes.

Por otra parte, también se realizó la cuantificación total de las células inmunopositivas a MeCP2, la proteína de unión al ADN metilado, los resultados de la cuantificación mostraron una disminución del 39% en el número de células

positivas para esta proteína en concentración de 1.0 mM y del 45.5% para la concentración 1.5 mM. La disminución de MeCP2 fue más evidente en la concentración de 2.0 mM, donde el decremento fue del 59% respecto al grupo control (100%). Los experimentos se hicieron por triplicado (ver figura 21B).

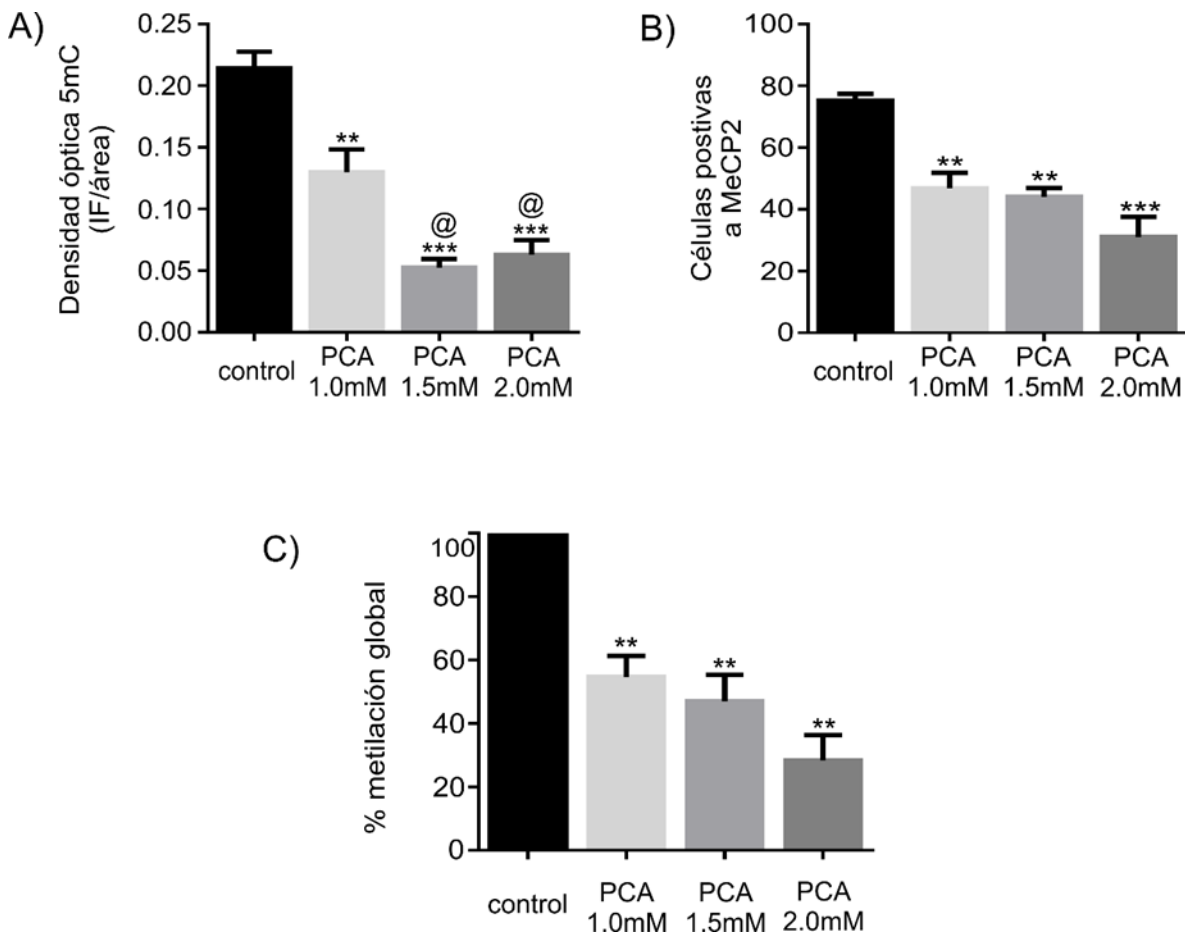


Figura 21. Análisis del efecto inhibitorio de la procainamida en las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio de ratón. A) Representación gráfica de la densidad óptica para la 5mC del grupo control (barra negra) y grupos tratados con PCA 1.0 mM, 1.5 mM y 2.0 mM (barras grises), después de 28 horas. B) Cuantificación de las células positivas a la proteína MeCP2 del tratamiento con el inhibidor. C) Porcentaje de la metilación global de las células control (representa el 100% de metilación) y los grupos tratados con procainamida. En las tres pruebas existe una disminución significativa de la metilación. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey para A y B: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control; @ ** $p < 0.05$ vs PCA 1.0 mM. Los datos para el porcentaje de metilación global (C) se analizaron mediante una prueba de Mann-Whitney: ** $p < 0.01$ contra el control. ($n = 3$).

Para obtener datos más detallados del efecto de la inhibición de la procainamida en las células del epitelio de ratón, se analizó el patrón global de metilación (5mC) mediante una prueba colorimétrica, para lo cual fue necesario la extracción de ADN genómico. Con este análisis se comprobó el efecto de la inhibición en la metilación con procainamida en nuestras muestras. Tomando en cuenta que las células control están 100% metiladas, los resultados muestran una disminución significativa con concentraciones crecientes de procainamida. El tratamiento disminuye el porcentaje global de metilación un 45.27% en las células tratadas con procainamida con 1.0 mM y un 52.93% en la concentración de 1.5 mM, mientras que la mayor inhibición de metilación global fue en la concentración 2.0 mM la disminución fue del 71.54% (ver figura 21C).

6.7.3 Análisis de la procainamida en el proceso de diferenciación neuronal en las células el epitelio olfatorio de ratón

Una vez que se comprobó que la procainamida inhibe la metilación del ADN en las células de epitelio olfatorio de ratón, se analizó si esta disminución en la metilación favorecía el proceso de diferenciación neuronal. Para ello las células del epitelio olfatorio del pasaje 2 al 10 fueron pre-tratadas con procainamida (1.0, 1.5 y 2.0 mM) durante 48 horas, posteriormente se indujo la diferenciación con ácido retinoico (20 μ M) y forskolina (5 μ M). Al finalizar los 7 días de tratamiento se realizó la inmunofluorescencia para MAP2, así como la cuantificación del ARN mensajero para MAP2 por RT-qPCR en células control o vehículo (DMEM-F12), tratadas con AR/FSK, con procainamida y procainamida + AR/FSK.

Los resultados mediante inmunofluorescencia mostraron que, tras inducir la diferenciación neuronal con PCA + AR/FSK, hay un incremento en el número de células inmunopositivas a MAP2 (control, 73.5 ± 3.954 ; PCA 1.0 mM+ARFSK, 152.7 ± 3.528 ; PCA1.5 mM+AR/FSK, 133.7 ± 4.631 y PCA + AR/FSK $118.7+ 4.33$). El tratamiento con 1.0 mM de PCA incremento significativamente en un 39.58% el número de células MAP2 respecto al grupo con ácido retinoico y forskolina. Además, existe un incremento significativo del 30.08% en las células tratadas con PCA 1.5 mM+ AR/FSK y un 22.58% en la concentración de 2.0 mM de procainamida y

AR/FSK respecto al grupo control. Es importante señalar que el tratamiento con procainamida por sí sola, no incrementa el número de células positivas a MAP2 (figura 22A).

Los resultados se validaron mediante un análisis de PCR en tiempo real, en el cual se determinaron los niveles relativos de expresión de MAP2. Se encontró que el tratamiento con ácido retinoico y forskolina produce un aumento significativo en la expresión de MAP2 en las células pre-tratadas con las concentraciones de 1.0, 1.5 y 2.0 mM de procainamida (figura 22B). $&&p < 0.01$ comparado con los grupos tratados solo con PCA 1.0 mM y 1.5 mM; $&p < 0.05$ comparado con la concentración de 2.0 mM de PCA).

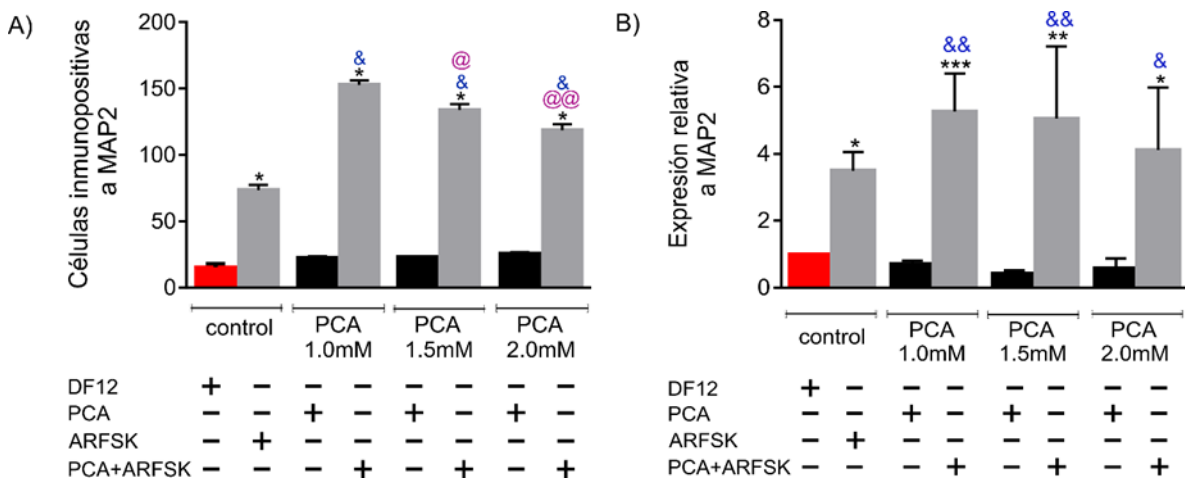


Figura 22. Análisis del efecto de la procainamida en la diferenciación neuronal de las células del epitelio olfatorio de ratón. A) Representación gráfica del número de células inmunopositivas para MAP2 en el grupo control y los tratados con PCA a 1.0, 1.5 y 2.0 mM. Los valores representan el promedio \pm SEM ($*p < 0.001$ vs DF12; $&p < 0.001$ vs AR/FSK; $@p < 0.05$; $@@p < 0.001$ vs PCA 1.0mM + AR/FSK en una ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tuckey's. ($n=3$). B) Representación gráfica de la expresión relativa a MAP2 (ARN mensajero) en los grupos controles y tratados con procainamida + ácido retinoico y forskolina $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ vs DF12. $&&p < 0.01$ vs PCA 1.0 mM y 1.5 mM. $&p < 0.05$ vs PCA 2.0 mM en una ANOVA de una vía seguida de un post prueba Fisher-LSD. Los datos se normalizaron con respecto al grupo control y utilizó GADH como gen de referencia. Control (DMEM-F12 + 3% SFB, barras rojas), tratados con procainamida 1.0, 1.5 y 2.0 mM (barras negras), AR/FSK con y sin PCA (barras grises). (+) Tratamiento utilizado. AR: ácido retinoico. FSK: forskolina. PCA: procainamida.

Se ha descrito que el tratamiento con ácido retinoico y forskolina promueve la actividad neuritogénica (lo que implica el crecimiento de axones, dendritas o ambos) con la diferenciación de las estructuras neuronales maduras. Para determinar si el tratamiento con procainamida, forskolina y ácido retinoico favorecía el incremento en el número de neuritas, se realizó un conteo de las neuritas primarias una vez inducida la diferenciación.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo en el número de neuritas primarias por célula en los grupos tratados con ácido retinoico, forskolina y procainamida a las concentraciones de 1.0 mM (5.667 ± 0.667 ; $p < 0.01$) y 1.5 mM ($4.333 \pm .333$; $p < 0.05$) respecto al grupo tratado únicamente con ácido retinoico y forskolina ($2.333 \pm .333$) (ver figura 23). Estos resultados demuestran que la metilación del ADN está involucrada en el proceso de diferenciación neuronal *in vivo* en las células del epitelio olfatorio de ratón.

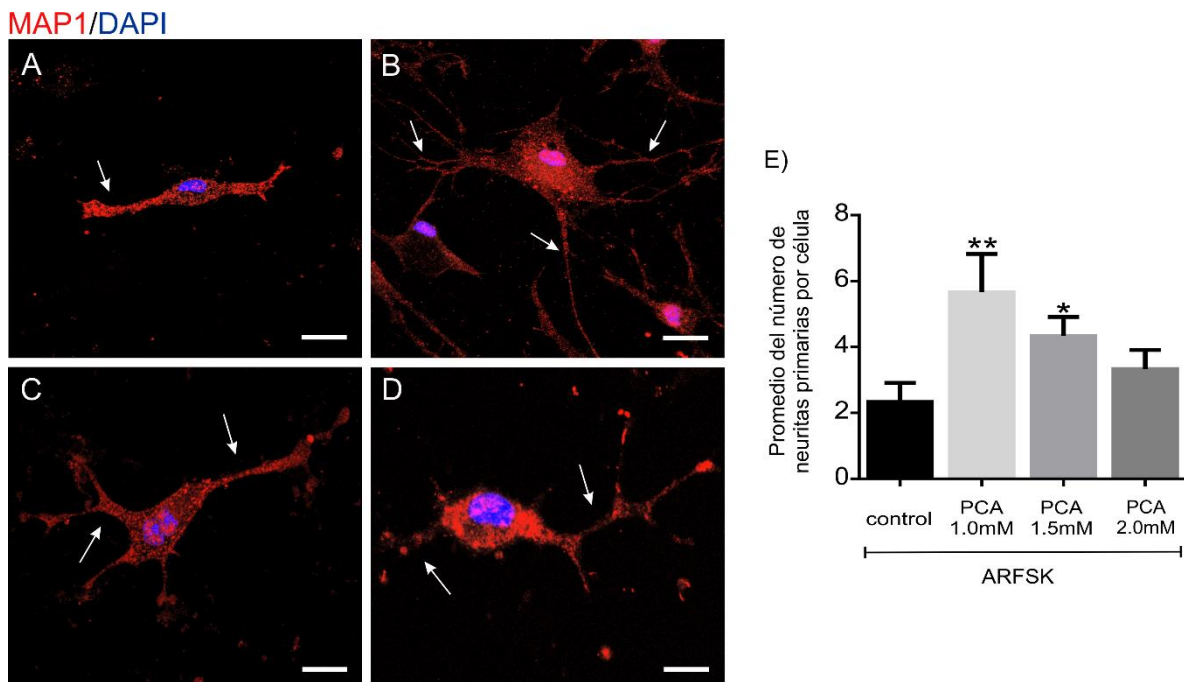


Figura 23. La procainamida promueve la formación de neuritas en las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio de ratón. A-D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para MAP2 (rojo) en las células del epitelio olfatorio 7 días después de haber inducido la diferenciación con AR/FSK (A), PCA 1.0 mM+ AR/FSK (B), PCA 1.5 mM+ AR/FSK (C), PCA 2.0 mM+AR/FSK (D). Los núcleos fueron marcados con DAPI y las flechas indican las neuritas primarias. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio

confocal. E) Cuantificación del número de neuritas primarias por célula después de la inducción neuronal con ácido retinoico, forskolina y procainamida. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ respecto al control. ANOVA 1 vía seguida de una prueba de Tukey. AR: ácido retinoico. FSK: forskolina. Barras de calibración 20 μm .

6.8 Análisis de la persistencia de mecanismos moleculares en las células troncales derivadas del epitelio olfatorio de ratón y humano en el proceso de diferenciación neuronal

6.8.1 Obtención de cultivos de células del epitelio olfatorio de humano

Las células del epitelio olfatorio de humano, fueron aisladas en el laboratorio de neurogénesis del Instituto Nacional de Psiquiatría de acuerdo con el método de exfoliación reportado por Benítez-King en el 2011. Las células aisladas se propagaron y posteriormente se mantuvieron en congelación en nitrógeno líquido del P1 al P25. Para nuestro trabajo, se utilizaron células de los pasajes P2 al P10 que fueron descongeladas bajo condiciones controladas y resembradas para su proliferación en DMEM-F12 + 10% SFB + glutamax y antibióticos, a 37° C con 5% de CO₂ hasta su confluencia (aproximadamente 2 semanas). Bajo estas condiciones control, las células del epitelio olfatorio de humano presentan una morfología fusiforme de tamaño relativamente pequeño, además fueron inmunopositivas a marcadores de linaje neuronal tempranos: nestina y beta tubulina III (figura 24).

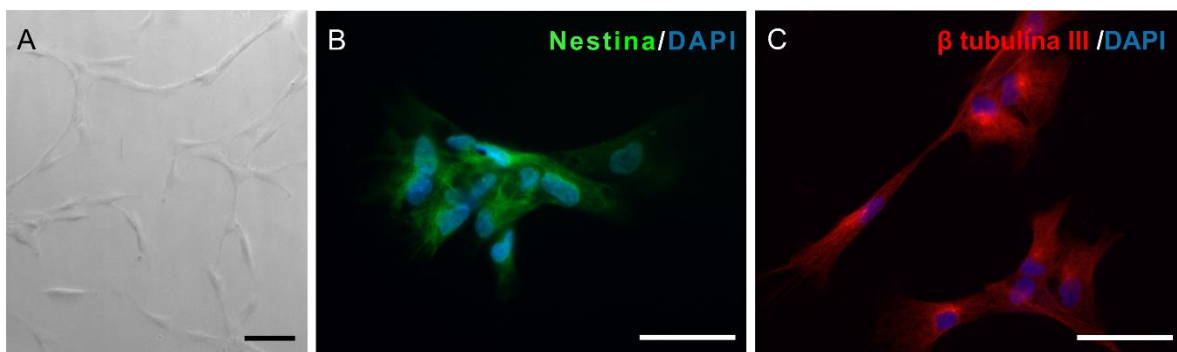


Figura 24. Análisis de marcadores de linajes neurales tempranos en células del epitelio olfatorio de humano. A) Morfología *in vitro* de las células troncales del epitelio olfatorio, estas células presentan una forma semejante a un fibroblasto. B y C) Imágenes representativas para la inmunofluorescencia a nestina (A) y beta tubulina III en células del epitelio olfatorio de humano. DAPI (en azul). Barras de calibración 50 μm .

6.8.2 Análisis de la proliferación y viabilidad celular

Al igual que las células del epitelio olfatorio de ratón, se realizó un análisis de la proliferación celular en los cultivos del epitelio olfatorio de humano. La proliferación se determinó con el reactivo WST-1 en el pasaje 2 y el curso temporal se realizó a los días 1, 3, 5, 7 y 9. Se puede observar en la gráfica un crecimiento celular de tipo exponencial donde el pico máximo de crecimiento fue al día 9 (ver figura 25A), donde el porcentaje de viabilidad de las células del epitelio olfatorio de humano corresponde al 92% (ver figura 25B). Al igual que las células del epitelio olfatorio de ratón, los pasajes de las células del epitelio olfatorio de humano se realizaron cada semana.

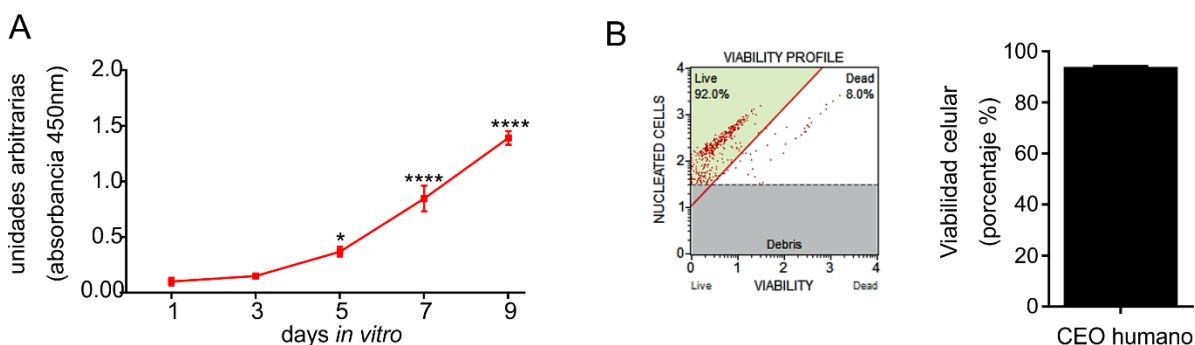


Figura 25. Análisis de la proliferación y viabilidad en células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio de humano. A) Curso temporal de la proliferación in vitro de las células del epitelio de humano. Se observa un crecimiento a partir del día 5 al 9, sin embargo, los pasajes para las células del epitelio olfatorio se realizaron cada semana. Representación gráfica del porcentaje de células viables al día 7 in vitro, correspondiente al 92%.

6.8.3 Análisis de la expresión de marcadores asociados a pluripotencia

Se evaluó mediante RT-PCR, la expresión del ARNm de genes asociados a pluripotencia (*Sox2*, *Oct4*, *Klf4*, *Lin28* y *Nanog*) en células del epitelio olfatorio de humano en los pasajes 2 y 10. Los resultados mostraron, la presencia de estos genes en los pasajes analizados, lo cual sugiere que las células del epitelio olfatorio en condiciones control se mantienen en un estado indiferenciado y estas características permanecen hasta el pasaje 10. Sin embargo, se puede observar una disminución en la expresión del gen *Sox2* en el pasaje 10.

Para validar esta información, realizamos un ensayo mediante PCR en tiempo real e inmunofluorescencia para Sox2. Los resultados mediante la RT-qPCR muestran un incremento significativo en los niveles de este gen en el pasaje 4 ($p < 0.001$ respecto al P2), sin embargo, los pasajes 6, 8 y 10 presentaron niveles de expresión de Sox2 similares al pasaje 2, no hubo diferencias significativas (ver figura 26B). Por otra parte, mediante la inmunofluorescencia para Sox2 el 99% de las células fue positiva para este factor de transcripción en el pasaje 2 (figura 26C).

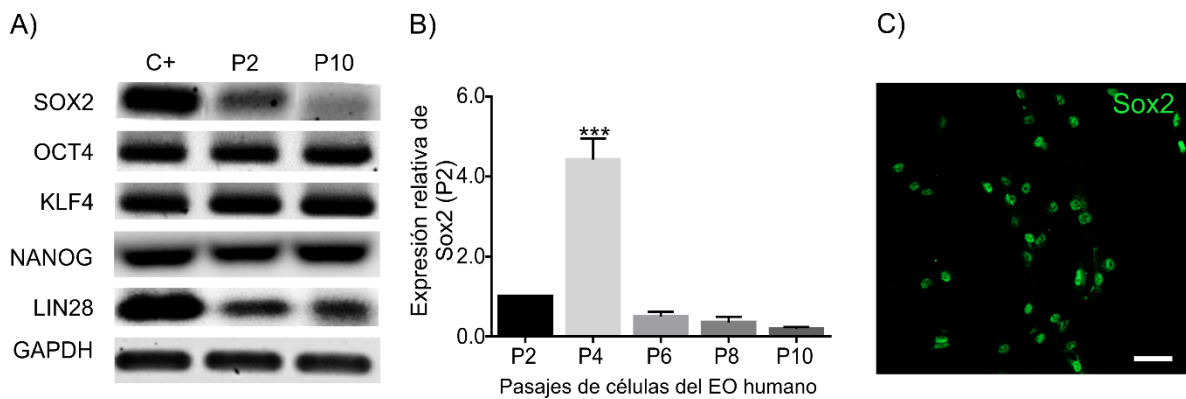


Figura 26. Análisis de la expresión de marcadores asociados a pluripotencia en las células del epitelio olfatorio de humano. A) Esquema representativo de la amplificación de genes asociados a la pluripotencia de células troncales (Sox2, Oct4, Klf4, Nanog y lin28) mediante RT-PCR. De derecha a izquierda: Control positivo (células epiteliales amnióticas de humano); células del epitelio olfatorio del pasaje 2 y 10. B) Perfil de expresión de Sox2 en los pasajes 2, 4, 6, 8 y 10 de células del epitelio olfatorio de ratón, mediante PCR en tiempo real. Los datos fueron normalizados respecto al P2 y se utilizó GAPDH como gen endógeno. *** $p < 0.001$ versus P2; ANOVA una vía seguida de una prueba de Dunnet ($n=4$). C) Imagen representativa de la inmunofluorescencia para el factor de transcripción Sox2 (verde) en células del epitelio olfatorio de humano en el pasaje 2 (P2). La marca se delimita al núcleo. Barra de calibración 50 μ m.

6.8.4 Formación de neuroesferas.

Para la formación de neuroesferas, las células del epitelio olfatorio de humano fueron tratadas en condiciones no adherentes (DMEM-F12, 1%ITS, factores de crecimiento EGF y FGF-2). A diferencia de las células del epitelio olfatorio de ratón, las células de humano formaron los agregados celulares rápidamente, es decir, al día 2 este conjunto esférico de células estaba casi totalmente formado y pocas células se pueden observar alrededor del agregado celular (ver figura 27A). Al día 7 se observó la formación completa de neuroesferas de tamaño pequeño y mediano (figura 27B). Para comprobar el linaje neuronal de los agregados celulares derivados del epitelio olfatorio de humano, se realizó una inmunofluorescencia para nestina y beta tubulina III, marcadores para los cuales la mayoría de las células fueron positivas (figura 27C y D).

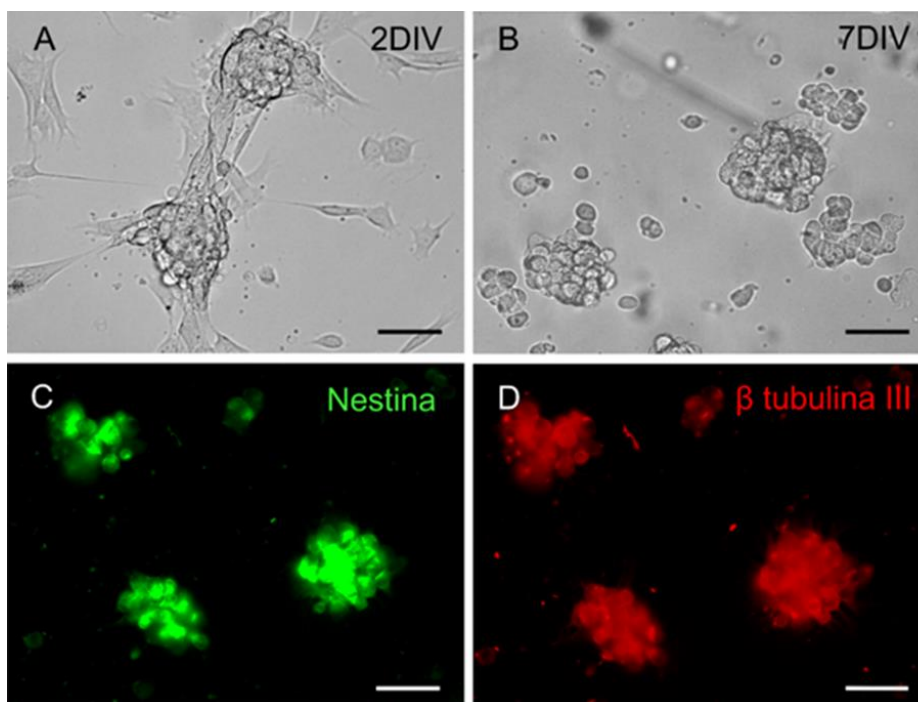


Figura 27. Formación de neuroesferas de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano. A) Las células comienzan a formar agregados celulares en medio sin suero y en factores de crecimiento *in vitro* desde el día 2. B) Neuroesfera día 7. C y D) Imágenes representativa de la inmunofluorescencia para nestina (verde) y β tubulina III en neuroesferas de células del EO de humano sin disociar. Barras de calibración 50 μ m.

6.8.5 Diferenciación de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano hacia neuronas maduras.

Inicialmente, se estandarizó el protocolo de diferenciación neuronal para las células del epitelio olfatorio de humano, para ello se probaron diferentes concentraciones reportadas de ácido retinoico: 1, 5, 10, 15 y 20 μM . Nuestros resultados mostraron que, con concentraciones bajas de ácido retinoico 1.0 y 5.0 μM + forskolina, no hay ningún cambio morfológico en las células tratadas. Por otra parte, las concentraciones 15 y 20 μM tuvieron un efecto tóxico sobre las células (figura 28). Por lo que, la concentración que utilizamos para inducir la diferenciación neuronal en las células del epitelio de humano fue de 10 μM , a diferencia de las células de ratón que fueron tratadas con 20 μM de ácido retinoico.

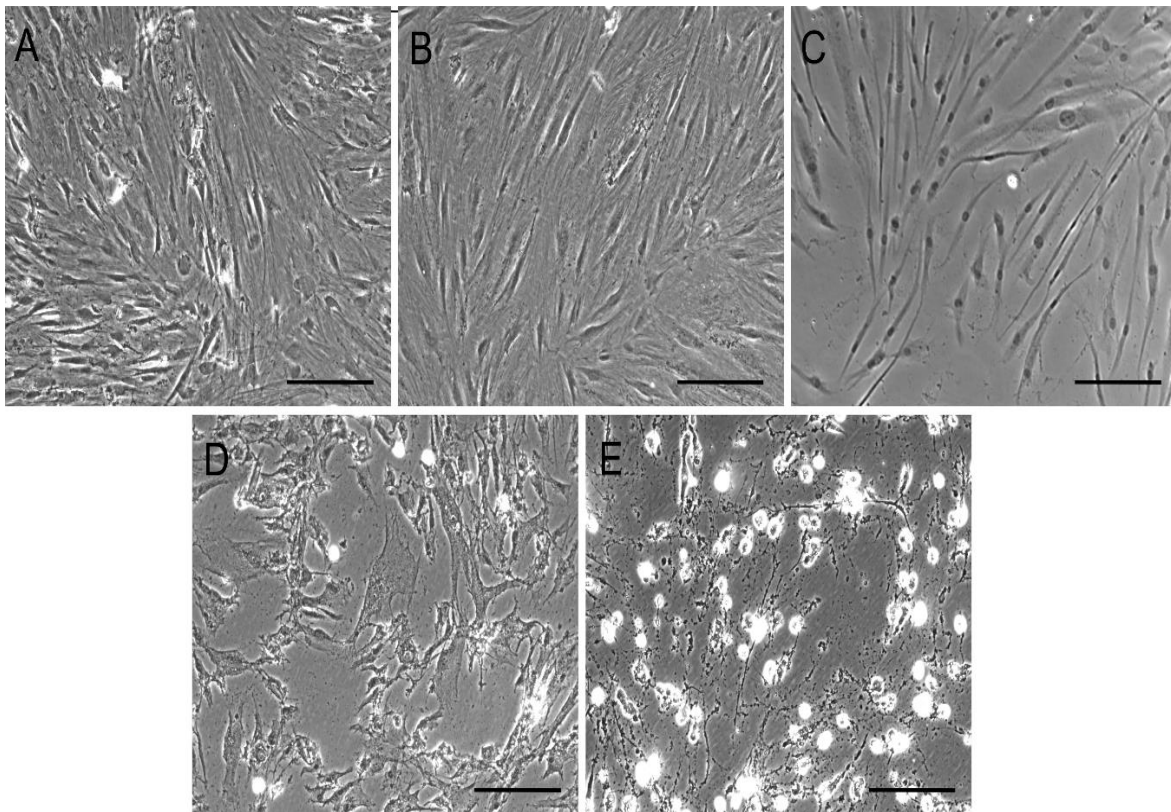


Figura 28. Morfología de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano una semana después del tratamiento con ácido retinoico (AR) y forskolina (5 μM). A) 1 μM AR+FSK; B) 5 μM AR+FSK; C) 10 μM AR+ FSK; D) 15 μM AR+FSK; E) 20 μM AR+FSK. Barras de calibración 50 μm .

Es importante mencionar que el marcador utilizado para el análisis de la diferenciación en las células del epitelio olfatorio de humanos fue MAP1B. La proteína asociada a microtubulos MAP1B pertenece a la familia de las MAP, es una proteína altamente expresada durante el desarrollo neuronal temprano y disminuye gradualmente durante la maduración. En el desarrollo de neuronas en cultivo, la proteína MAP1B se localiza en las neuritas menores y de manera similar a MAP2, la proteína MAP1B se requiere para el crecimiento axonal, por lo que son considerados marcadores neuronales tardíos o maduros (Halpain y Dehmelt, 2006).

Las células del epitelio olfatorio del pasaje 2 al 10 se trataron con 10 μ M de ácido retinoico y 5 μ M de forskolina en neurobasal durante 7 días. Para determinar los cambios en la diferenciación neuronal, se analizaron los cambios morfológicos en las células antes y después del tratamiento con AR/FSK. Mediante el análisis en campo claro, se observó que las células tratadas con ácido retinoico y forskolina no muestran cambios morfológicos radicales, como las células del epitelio olfatorio de ratón, sin embargo, se puede observar en la figura 29 B, que las células del epitelio olfatorio de humano tratadas muestran una morfología más alargada con núcleos relativamente pequeños a diferencia de las células sin tratamiento (figura 29 A).

Como se observa en la figura 29A las células control (DMEM-F12) no fueron inmunopositivas para la proteína MAP1B. Por otra parte, la mayoría de las células tratadas con ácido retinoico y forskolina, resultaron positivas para MAP1B (figura 29B), una vez que se realizó la cuantificación para esta proteína se demostró que el 69.66% son positivas a MAP1B.

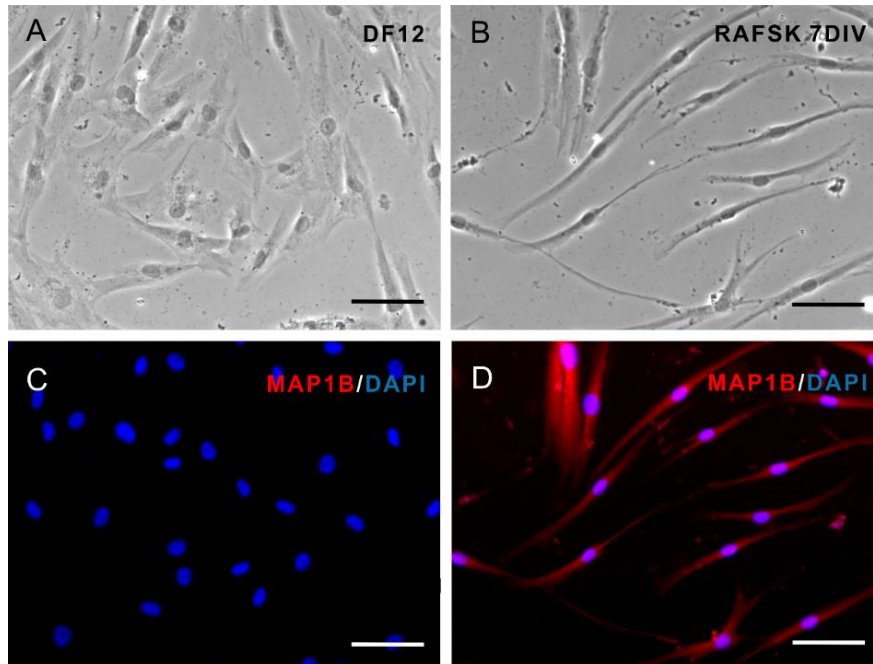


Figura 29. Diferenciación de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano hacia neuronas maduras. A y B) Imágenes en campo claro de la morfología en células del epitelio olfatorio control (A) y células tratadas con AR/FSK (AR: 10 μ M de ácido retinoico y FSK: 5 μ M de forskolina). C y D) Inmunofluorescencia para MAP1B (rojo), una semana después del tratamiento. Los núcleos fueron marcados con DAPI. Barra de calibración 50 μ m.

6.9 Análisis de los patrones de metilación/desmetilación del ADN en las células del epitelio olfatorio de humano.

Para la determinación de los patrones de metilación en las células del epitelio olfatorio de humano, se realizó una inmunofluorescencia para la 5 metilcitosina y se calculó la cantidad de fluorescencia emitida por célula (al igual que las células del epitelio olfatorio de ratón).

La metilación es un proceso extremadamente dinámico y se sabe poco de los cambios en la expresión de marcadores asociados a metilación y desmetilación del ADN *in vitro*, por lo que, fue importante la evaluación de la expresión del ARN mensajero para las enzimas ADN metiltransferasas y Gadd45a/b durante los pasajes 2, 4, 6, 8 y 10 en condiciones control de las células del epitelio olfatorio de humano.

Los resultados mostraron que los niveles en la expresión del ARN mensajero para las ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b) se mantienen constantes a través de los pasajes, al igual que el ARN mensajero para las proteínas Gadd45 a y b (ver figura 30).

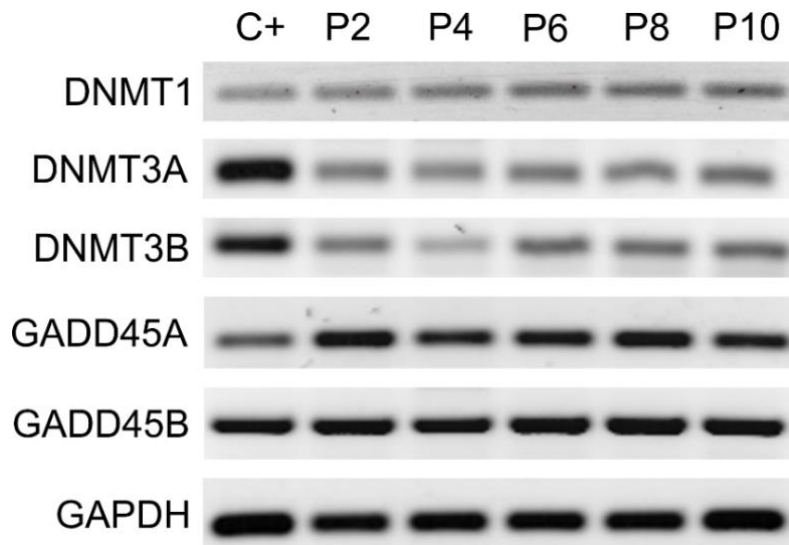


Figura 30. Esquema representativo de la expresión de marcadores asociados a metilación (DNMTs) y desmetilación (Gadd45) en el ARN mensajero en células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano mediante RT-PCR. De izquierda a derecha: C+ (control positivo, células epiteliales amnióticas de humano); P2, P4, P6, P8 y P10: pasajes de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano. Se muestra GAPDH como gen de referencia.

6.10 Evaluación del tratamiento farmacológico con la procainamida como inhibidor de la ADN metiltransferasa1 en la capacidad de diferenciación neuronal de las células del epitelio olfatorio de humano

6.10.1 Análisis de la viabilidad celular con procainamida

Para la inhibición de la metilación del ADN se utilizó procainamida en concentraciones de 1.0, 1.5 y 2.0 mM. Para determinar si las concentraciones usadas del inhibidor afectaron la viabilidad de las células del EO, se realizó un ensayo con anexina V 48 horas después de haber iniciado el tratamiento con la procainamida. Con las concentraciones de procainamida usadas no observamos cambios en la morfología celular (figura 31A-D). Los porcentajes de viabilidad fueron \pm 93-95% para todas las condiciones (ver figura 31E).

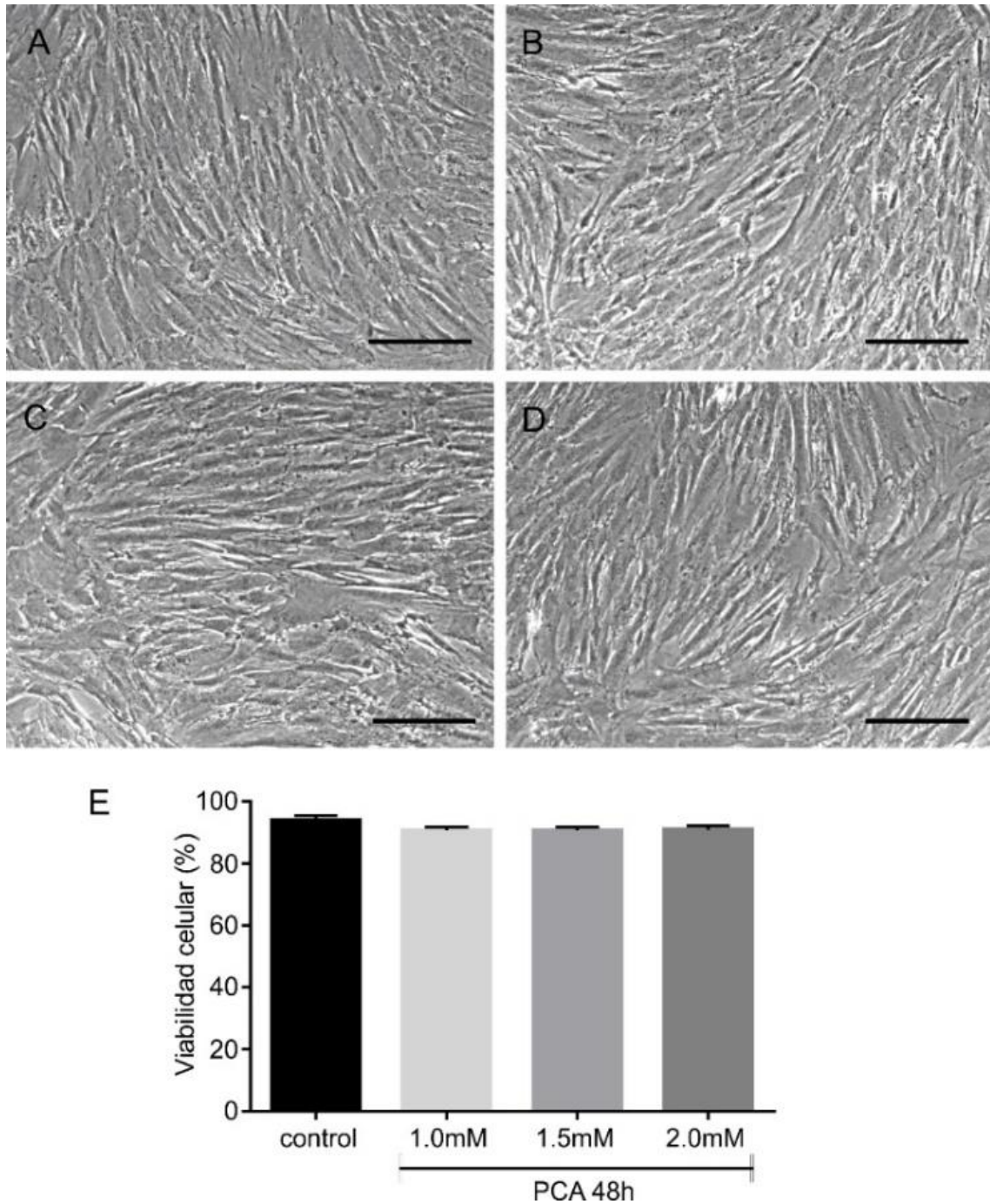


Figura 31. Análisis de la viabilidad en células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano tratadas con procainamida (PCA). A-D) Imágenes en campo claro representativas de la morfología de las células del epitelio olfatorio de humano: A) control (DMEM- F12 + glutamax, 48h); B) PCA 1.0 mM (48h); C) PCA 1.5 mM (48h); D) PCA 2.0 mM (48h). No se observaron cambios morfológicos en ninguna de las concentraciones usadas. Barra de calibración 100 μ m. E) Representación gráfica del porcentaje de células viables con procainamida en la prueba de Anexina V. No existen diferencias significativas entre los grupos (ANOVA 1 vía, $n=3$).

6.10.2 Efecto de la inhibición de la metilación de la procainamida en las células del epitelio olfatorio de humano

Analizamos el efecto que tiene la procainamida sobre la metilación del ADN en las células del epitelio de humano. Mediante la cuantificación de la densidad óptica derivada del marcaje para la 5-metilcitosina (figura 32A). El análisis mediante la inmunofluorescencia, mostró un patrón de disminución en la metilación de las células tratadas con procainamida: 1.0 mM, 17%; 1.5 mM, 25% y 2.0 mM un 26%. Sin embargo, mediante esta prueba, sólo las células tratadas con concentraciones de 1.5 y 2.0 mM de procainamida tuvieron una disminución significativa ($p < 0.05$) respecto a las células control (figura 32B).

Para corroborar los resultados obtenidos de la inmunofluorescencia para 5mC, se analizó el patrón global de metilación mediante una prueba colorimétrica, para lo cual fue necesario la extracción de ADN genómico de las células del epitelio de humano. Con este análisis obtuvimos datos en donde el efecto de la inhibición en la metilación inducida por la procainamida disminuyo en las concentraciones usadas respecto al control (PCA 1.0 mM, 48.86 ± 5.071 ; PCA 1.5 mM, 33.93 ± 3.92 ; PCA 2.0 mM, 52.53 ± 9.9). El tratamiento con procainamida mostro una disminución significativa de la metilación global respecto al control. Esta disminución corresponde a un 51.2% en las células tratadas con PCA 1.0 mM; 66,1% para la concentración de 1.5 mM y finalmente una disminución estadísticamente significativa del 48% en la metilación global de las células tratadas con 2.0 mM de procainamida respecto al control (100% de metilación). Sin embargo, a diferencia de las células de ratón, la mayor inhibición de la metilación en las células del epitelio de humano la obtuvimos con la concentración de 1.5 mM (una disminución del 66% respecto al grupo control $p < 0.01$, ver figura 32C).

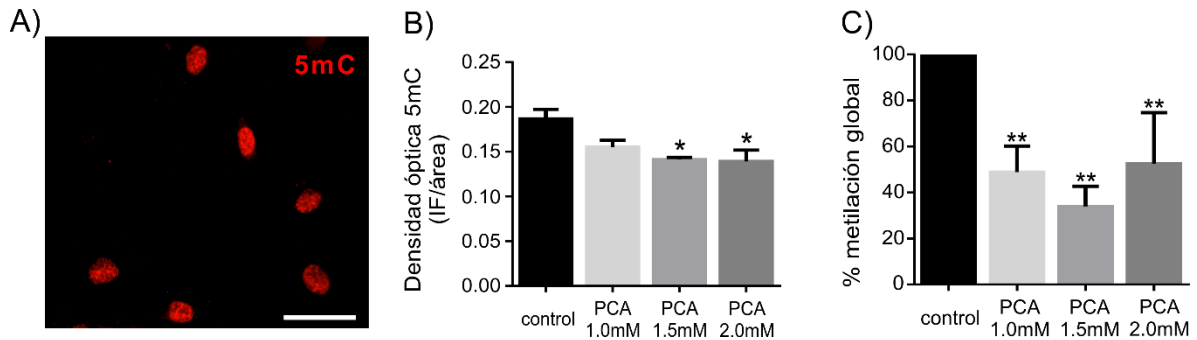


Figura 32. Análisis del efecto inhibitorio de la procainamida en las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano. A) Imagen representativa de la inmunofluorescencia para 5mC, la marca se delimita al núcleo. B) Cuantificación de la densidad óptica (D.O) para 5mC del grupo control y los tratados con PCA 1.0, 1.5 y 2.0 mM después de 48hrs. Mediante este método existe una disminución significativa con las concentraciones de PCA 1.5 y 2.0 mM, en una ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Dunnet (* $p < 0.05$). C) Representación gráfica del porcentaje de metilación global en las células del EO de humano en condiciones control y tratadas con el inhibidor. En las tres condiciones existe una disminución significativa de la metilación. Los valores representan el promedio de \pm SEM. ** $p < 0.01$ comparado con el grupo control. Prueba U de Mann-Whitney ($n=5$).

6.10.3 Análisis de la procainamida en el proceso de diferenciación neuronal en las células el epitelio olfatorio de humano

Para demostrar que el proceso de inhibición de la metilación favorece el proceso de diferenciación neuronal en las células del epitelio olfatorio, las células se trataron con procainamida (1.0, 1.5 y 2.0 mM) durante 2 días y posteriormente con ácido retinoico y forskolina en neurobasal por 7 días. Como se mencionó en el apartado 6.8.5, se realizó una inmunofluorescencia para MAP1B en los diferentes tratamientos. Las células control (DMEMF-12) no fueron positivas para MAP1B, al igual que las células tratadas únicamente con procainamida.

Inicialmente se esperaba que el tratamiento con AR/FSK indujera de manera similar el proceso de diferenciación neuronal en las células del epitelio olfatorio de humano y ratón (35%), sin embargo, obtuvimos un $69.66\% \pm 2.667$ de células positivas a MAP1B (ver figura 33C). Los resultados de la inmunofluorescencia muestran un incremento en el número de células positivas a MAP1B en las células tratadas con ácido retinoico, forskolina y procainamida: PCA 1.0 mM, 93.63 ± 0.6667 ; PCA 1.5

mM, 84.33 ± 0.8819 y PCA 2.0 mM, 93.67 ± 1.856 . Este incremento fue significativo en un 34.44% para las células tratadas con PCA 1.0 y 2.0 mM + AR/FSK ($p < 0.001$ respecto al control), mientras que el incremento para las células tratadas con PCA 1.5 mM fue del 21% ($p < 0.05$ respecto al control).

Las células tratadas con AR/FSK del epitelio olfatorio de humano no tuvieron un cambio drástico de su morfología, o aparición de neuritas primarias y/o secundarias. Sin embargo, las células tratadas con ácido retinoico, forskolina y PCA presentaron prolongaciones más largas en comparación a las células tratadas únicamente con ácido retinoico y forskolina.

En el proceso de diferenciación neuronal, la formación y el crecimiento/elongación de una neurita es primordial para el correcto funcionamiento neuronal. Debido a la observación en el cambio de las prolongaciones en las células tratadas con ácido retinoico, forskolina y procainamida, se evaluó el crecimiento neurítico en las células del epitelio olfatorio de humano tratadas. De acuerdo con la morfología bipolar de nuestras neuronas, se midió la longitud de las prolongaciones, las cuales clasificamos en neuritas mayores y menores (ver figura 33 A y B).

El resultado de la cuantificación del crecimiento neurítico, mostró un incremento estadísticamente significativo en las neuritas mayores y menores de las células tratadas con ácido retinoico, forskolina y procainamida. Neuritas mayores: PCA 1.0 mM + AR/FSK, 121.99 ± 7.25 ($p < 0.001$); PCA 1.5 mM + AR/FSK, 129 ± 6.42 ; PCA 2.0 mM, 134.93 ± 7.92 ($p < 0.001$) en comparación con las células control; 84.53 ± 4.36 , es decir, tratadas únicamente con ácido retinoico y forskolina (ver figura 33D, barras negras). También existió un incremento significativo para las neuritas menores: PCA 1.0 mM + AR/FSK, 81.97 ± 4.63 ($p < 0.001$); PCA 1.5 mM + AR/FSK, 91.35 ± 5.21 ; PCA 2.0 mM 99.74 ± 5.16 ($p < 0.001$), respectivamente cuando se compara con la longitud de las neuritas del grupo control (55.97 ± 3.52).

Estos resultados nos indican que la metilación no sólo participa en el proceso de diferenciación neuronal, sino que favorece el crecimiento neurítico de las células *in vitro*, llevándolas así a un estadio de maduración mayor.

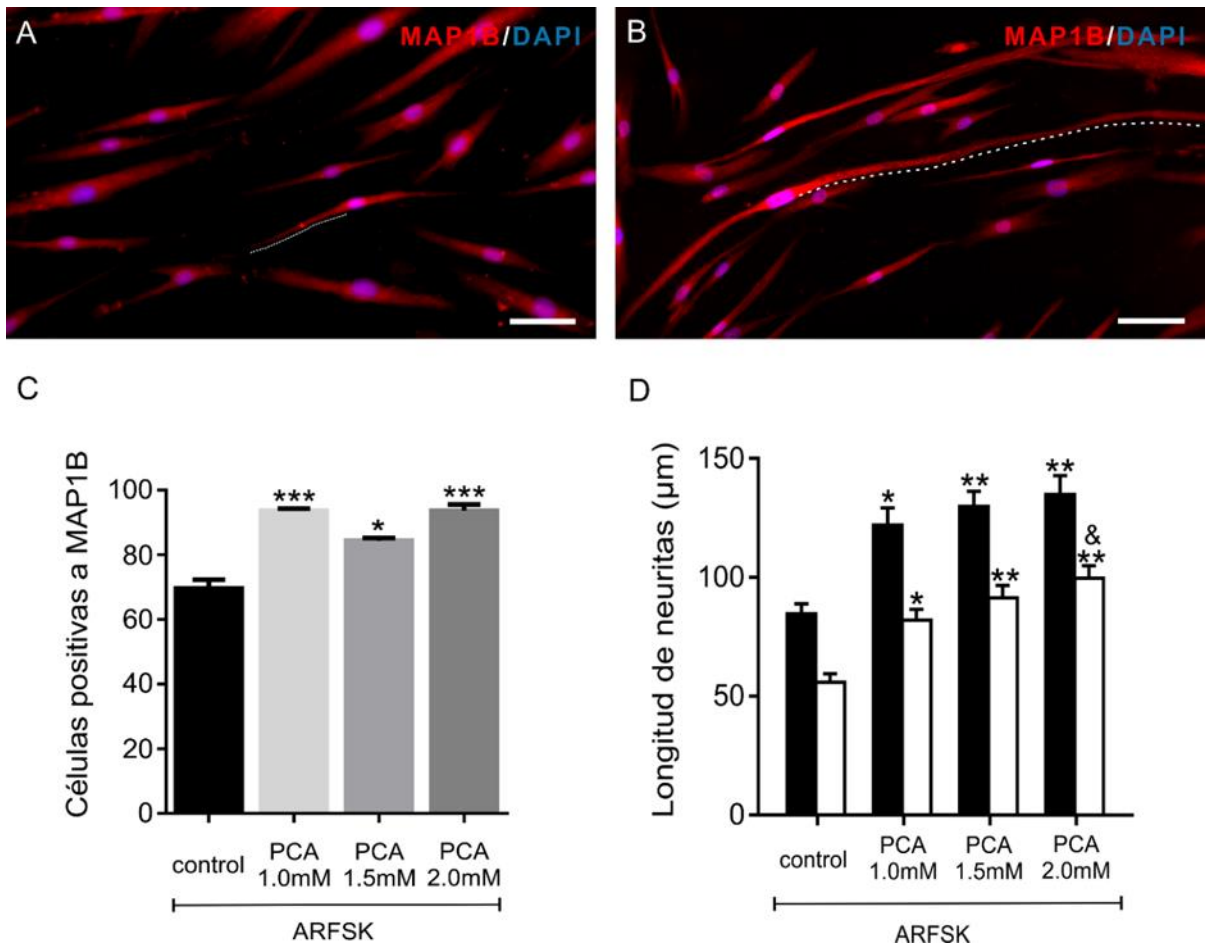


Figura 33. Efecto de la procainamida en el proceso de diferenciación neuronal y el crecimiento neurítico de células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano. A y B) Imágenes de la inmunofluorescencia para MAP1B en células del epitelio olfatorio de humano después de la inducción neuronal con AR/FSK (A) y AR/FSK + PCA (B). Las líneas blancas punteadas indican la traza tomada para la longitud de las neuritas. Los núcleos fueron marcados con DAPI. Barras de calibración 50 µm. C) Gráfica representativa de la cuantificación de células positivas para MAP1B en células del epitelio olfatorio de humano en condiciones control (AR/FSK) y procainamida (1.0, 1.5 y 2.0 mM + AR/FSK). Los datos representan la media \pm SEM de 100 células en total positivas para DAPI de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ comparado con el control. La diferencia significativa se obtuvo mediante el análisis ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunnett. H) Cuantificación de la longitud de las neuritas después de la inducción neuronal. Las longitudes de las neuritas se clasificaron como neuritas mayores/largas (barras negras) y neuritas menores/cortas (barras blancas). * $p < 0.001$; ** $p < 0.001$ vs control AR/FSK; & $p < 0.05$ vs AR/FSK+PCA 1.0 mM. El análisis estadístico se realizó con una ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

7. Discusión

En este trabajo se evaluaron dos aspectos diferentes, pero complementarios de la fisiología de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón y humano. Primero, evaluamos en los cultivos la morfología y proliferación celular, el patrón de expresión de marcadores asociados a pluripotencia y la capacidad de diferenciación neuronal de las células. En segundo lugar, utilizamos una aproximación farmacológica para evaluar el efecto de la inhibición de la metilación del ADN sobre la capacidad de diferenciación neuronal en las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón y humano.

7.1 Células troncales del epitelio olfatorio: Ratón Vs Humano

Aunque desde hace tiempo se ha caracterizado anatómicamente al epitelio olfatorio de ratón y se ha descrito que conservan su capacidad vitalicia para la recuperación anatómica y funcional después de una lesión (Graziadei et al., 1978, 1979; Iwema et al., 2004; Morrison y Costanzo, 1989; Schwob et al., 1995), las aproximaciones en la caracterización y funcionalidad del epitelio olfatorio de humano se han realizado vagamente mediante biopsias de participantes post mortem (Holbrook et al., 2012).

Sin embargo, durante los últimos años, la capacidad de regeneración neuronal de las células del epitelio olfatorio ha llamado mucho la atención y han sido consideradas como una fuente de células troncales/progenitores con fines de estudios clínicos sobre la capacidad de responder ante algunas patologías como la enfermedad de Alzheimer (Hori et al., 2015; Jimbo et al., 2011; Seligman et al., 2013) y la enfermedad de Parkinson (Li et al., 2016; Morley y Duda, 2011). En un inicio, los estudios se concentraron un tipo celular: la glía envolvente olfatoria, debido a su gran capacidad de regeneración axonal, por lo que estas células han sido utilizadas como una alternativa terapéutica en patologías que involucran procesos desmielinizantes, por ejemplo, de la medula espinal. Sin embargo, la obtención de esta fuente celular requiere un procedimiento quirúrgico altamente invasivo ya que la mayor fuente de la glía envolvente se encuentra en el bulbo olfatorio, siendo así un gran obstáculo para su obtención en el ser humano (Lu et al.,

2001). En contraste con la glía envolvente, las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio tienen capacidad de regeneración y son de fácil acceso accesible debido a su ubicación en la cavidad nasal, permitiendo su recolección y aislamiento en participantes sin causar algún tipo de daño (Benítez-King et al., 2011). Por esta razón, las células del epitelio olfatorio de humano, están siendo utilizadas para el estudio de enfermedades relacionadas con el neurodesarrollo como son, la esquizofrenia y trastorno bipolar (Benítez-King et al., 2016; Muñoz-Estrada et al., 2015; Solís-Chagoyán et al., 2016). Además, están siendo trasplantadas con fines regenerativos en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (Krolewski et al., 2011; Murrell et al., 2008; Nivet et al., 2011).

Sin embargo, hasta la fecha no existía una caracterización exhaustiva de las semejanzas o diferencias entre las células del epitelio olfatorio de ratón y humano *in vitro*. La comparación entre las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de ratón y humano fue parte indispensable en este trabajo. Observamos comportamientos semejantes de las células respecto a su capacidad de proliferación y supervivencia en cultivo. Morfológicamente, las células troncales/progenitores de ratón y humano presentaron características fusiformes, muy semejantes, con gran capacidad de formar agregados celulares (neuroesferas) y en ambos tipos celulares se encontró la expresión de marcadores de linajes neuronales tempranos nestina y beta tubulina III.

Por otro lado, se evaluó la expresión del ARN mensajero de marcadores asociados a pluripotencia (Sox2, Oct4, Klf4, Nanog, Lin28) y el ARN mensajero para las enzimas ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT3a y 3b) y Gadd45a/b en las células del epitelio olfatorio de ratón y humano durante los pasajes. Este análisis cualitativo, indicó que en las células del epitelio olfatorio de ratón la expresión del ARN mensajero para la ADN metiltransferasa 3a es menor en comparación a ARN mensajero de DNMT1 y DNMT3a. En las células del epitelio olfatorio de humano, el ARN mensajero para las tres enzimas fue más equitativo. Por otra parte, cuando se evaluó el efecto de la procainamida como inhibidor de la metilación global y la fluorescencia a 5mC en las células del epitelio olfatorio de humano y ratón se

observó una disminución en las tres concentraciones de procainamida utilizadas. Para inducir la diferenciación neuronal se utilizó ácido retinoico y forskolina, en este caso existieron diferencias morfológicas entre especies después del tratamiento y se utilizaron diferentes marcadores de maduración neuronal (MAP2, para ratón y MAP1B para humano).

7.2 El linaje neural de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio

Una de las primeras aproximaciones en nuestro trabajo fue la evaluación y comparación de la expresión de marcadores de linaje neural en las células del epitelio olfatorio de humano y ratón. Por definición, una célula troncal neural (NSC) se describe como una población indiferenciada, capaz de autorrenovarse y con alto potencial para dar origen a neuronas y células gliales (Juliandi et al., 2010). En este sentido, las proteínas nestina y beta tubulina III han sido asociadas como marcadores para las células troncales neurales, incluyendo aquellas células troncales derivadas del sistema nervioso embrionario (Espinosa-Jeffrey et al., 2002), neonatal (Zhang et al., 1998) y adulto (Gritti et al., 1996). Se tiene evidencia de que las células positivas a nestina pueden diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage, 2012), mientras que las células beta tubulina III se comprometen aún más a un linaje neuronal (Ray y Gage, 2006).

En este trabajo tanto las células del epitelio olfatorio de ratón como de humano, expresaron nestina y beta tubulina III, indicando así su compromiso con el linaje neuronal. Estos resultados son consistentes con lo reportado previamente en células del epitelio olfatorio de ratas (Girard et al., 2011; Stamegna et al., 2014) y humanos (Benítez-King et al., 2011; Boone et al., 2010; Ortiz-López et al., 2016).

La caracterización *in vitro* de las células troncales neurales, se ha favorecido por diversos sistemas de cultivo, que permiten la propagación de las células indiferenciadas. Uno de ellos induce la generación de agregados celulares esféricos heterogéneos que reciben el nombre de neuroesferas (Jensen y Parmar, 2006). En este trabajo se indujo la formación de neuroesferas de cultivos (P2) de células del epitelio. Mediante inmunofluorescencia, se demostró la presencia de marcadores

del linaje neural: nestina y beta tubulina III en las neuroesferas de células del epitelio de ratón y humano.

La capacidad de formación de neuroesferas de células del epitelio olfatorio de humano y su expresión de nestina y beta tubulina III, había sido previamente demostrada (Boone et al., 2010; Marshall et al., 2005; Murrell et al., 2008; Othman et al., 2005b; Zhang et al., 2004). Zhang y colaboradores en el 2004, probaron en distintos medios de cultivo, la capacidad de respuesta de las células del EO. Demostraron que al mantener las neuroesferas del epitelio olfatorio de humano en medios como DMEM o MEM + 10% SFB incrementa el número de células positivas a nestina (78%) y beta tubulina III (97%). Bajo estas condiciones de cultivo, las células no expresan marcadores de células gliales (GFAP) o astrocitos (04). De manera semejante, nuestros resultados mostraron una inmunoreactividad alta de nestina y beta tubulina III cuando llevamos a cabo la formación de neuroesferas del epitelio olfatorio de humano y ratón. Bajo nuestras condiciones de cultivo no encontramos la presencia de la proteína glial GFAP, reforzando la noción sobre el compromiso neuronal de las células del epitelio olfatorio.

7.3 Expresión de marcadores asociados a pluripotencia

Las células troncales pueden autorrenovarse conservando su estado indiferenciado. En este sentido se han identificado reguladores muy importantes asociados a la pluripotencialidad de las células troncales, los cuales son proteínas que reconocen secuencias específicas del ADN y regulan la síntesis de ARN. Algunos de estos componentes son factores de transcripción como Sox2, Oct4, Nanog, Lin28 y Klf4. Estos factores de transcripción mantienen una cromatina “abierta” en el núcleo celular, además de permitir la expresión de genes asociados con la proliferación y la pluripotencialidad e impedir la expresión de genes que puedan causar diferenciación (Boyer et al., 2005).

La sobreexpresión de Sox2, Oct4 y Nanog favorecen el mantenimiento del estado pluripotente de las células troncales embrionarias humanas (Boyer et al., 2005) y junto con Klf4 promueven la reprogramación en fibroblastos humanos y ratón hacia células pluripotentes inducidas (Takahashi y Yamanaka, 2006). En el 2007 Junying

Yu y colaboradores demostraron que Sox2, Oct4, Nanog y Lin28 son suficientes para llevar a cabo la reprogramación de las células somáticas humanas (Yu et al., 2008).

En el caso particular de las células del epitelio olfatorio de ratón y humano existe una controversia en cuanto a, si las células cumplen con los criterios de autorenovación y multipotencialidad para ser clasificadas como células troncales (Schwob et al, 2016). En este trabajo, evaluamos la expresión de Sox2, Oct4, Nanog, Klf4 y Lin28, demostrando la presencia de estos marcadores al menos hasta el pasaje 10. Es importante mencionar, que en la literatura no existen estudios puntuales *in vitro* que demuestren las características troncales del epitelio olfatorio de ratón y humano, siendo así nuestros resultados los primeros en reportar la expresión de estos marcadores.

Sin embargo, la expresión de estos genes no es suficiente para asegurar el estado pluripotente de las células del epitelio olfatorio de ratón y humano. Hasta la fecha existen estudios en tejido de mucosas olfatorias de ratón, que han demostrado que las células basales globosas, son quienes expresan Sox2, por lo que, estas células en particular han sido consideradas como la fuente de células troncales del epitelio olfatorio (Guo et al., 2010; Kawauchi et al., 2004; Nelson et al., 2012; Packard et al., 2011) mientras que las células horizontales podrían ser solo una reserva celular del nicho (Schwob, 2016). Sin embargo, esta estrategia de caracterización, no es aplicable *in vitro*, ya que no se cuenta con un protocolo para cultivar únicamente células basales globosas y aún más nos limita la falta de anticuerpos comerciales que ayuden a la identificación de marcadores específicos para estos tipos celulares.

A diferencia de las células del epitelio de ratón, la mayoría de la caracterización de las células del epitelio olfatorio de humano, se ha realizado *in vitro*. Nicolas Matigan y colaboradores en el 2010, describieron mediante el análisis de citometría de flujo, la expresión del factor de transcripción *Oct4* en un 48% en neuroesferas derivadas del epitelio olfatorio de humanos. De manera interesante el patrón de expresión Sox2 se encontró insignificante (1%) (Matigian et al., 2010). Nosotros realizamos un estudio más detallado de la expresión de Sox2, se encontró que, aunque Sox2 es detectable a través de los pasajes en cultivo, disminuye significativamente después

del pasaje 4. Sería interesante evaluar si estos cambios en la expresión de Sox2 afectan la capacidad de diferenciación de las células del epitelio olfatorio tanto de ratón como de humano.

Estudios *in vitro* de las células del epitelio olfatorio de humano, han evaluado la estabilidad genética de las células a través de variables tales como edad, sexo, fuente del donante o las consecuencias de la manipulación *in vitro* que podrían afectar su potencial clínico. Estos estudios han demostrado que la duración o el número de pasajes de las células del epitelio olfatorio en humanos no afecta la viabilidad celular, capacidad de proliferativa, la actividad de las telomerasas, o su capacidad de clonación (Marshall et al., 2005; Othman et al., 2005a, 2005b).

En este contexto, el balance génico juega un papel indispensable para el mantenimiento y estabilidad de las propiedades de las células de la mucosa olfatoria. Sin embargo, existen otros mecanismos que pueden afectar las propiedades de las células, tal es el caso de procesos epigenéticos como la metilación del ADN. En los últimos años se ha descrito a la metilación del ADN como un mecanismo esencial para “proteger” a las células troncales de una activación prematura en el proceso de diferenciación además, se ha sugerido que la dinámica de la metilación determina las funciones de las células troncales (Bröske et al., 2009). Se ha demostrado que tanto la metilación de *nov*o (mediada por Dnmt3a y Dnmt3b) como la metilación de mantenimiento (Dnmt1) son necesarias para mantener el estado de autorenovación en células troncales hematopoyéticas y en células cancerígenas (Bröske et al., 2009; Tadokoro et al., 2007; Trowbridge et al., 2009).

La idea de que los patrones de metilación del ADN se establecen en el desarrollo mediante la actividad de las ADN metiltransferasas *de novo* es elegante y simple. Sin embargo, este proceso no puede explicar completamente la estabilidad en los patrones de metilación durante la proliferación a través de múltiples generaciones celulares. Se entiende por mantenimiento de la metilación al proceso que “*reproduce*” los patrones de metilación del ADN entre las generaciones celulares y donde Dnmt1 es responsable de esta estabilidad (Bird, 2002). En este aspecto,

Jenifer Trombridge en el 2009, describió que DNMT1 es requerida para el mantenimiento de autorenovación de las células troncales hematopoyéticas adultas (HSCs) y que su deficiencia provoca una inapropiada diferenciación (Trowbridge et al., 2009). Por otra parte, Chin-Chien Tsai y colaboradores en el 2012, describieron que existe una regulación directa entre el promotor de DNMT1 y los factores de transcripción Oct4 y Nanog en células troncales mesenquimales adultas, que reprime la expresión de proteínas como p16 y p21 sosteniendo la metilación del ADN después de cada ronda del ciclo celular para así mantener a las células en estadios proliferativos e indiferenciados (Tsai et al., 2012).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, analizamos los niveles de expresión de las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) y proteínas asociadas a desmetilación (Gadd45s) en las células del epitelio olfatorio de ratón y humano. Encontramos que la expresión de estos genes se mantiene constante a lo largo de los pasajes analizados (P2, P4, P6, P8 y P10).

En este trabajo abordamos, la idea de que los patrones de metilación de las células del epitelio olfatorio pudieran verse afectados con los pasajes y a su vez, estos posibles cambios afectarían el proceso de diferenciación, sin embargo, no encontramos cambios aparentes en el ARN mensajero de las ADN metiltransferasas y las proteínas Gadd45 del pasaje 2 al 10. Estos resultados son los primeros en realizar una caracterización del ARN mensajero para las enzimas de metilación y desmetilación del ADN en las células del epitelio olfatorio de ratón y humano *in vitro* en distintas generaciones.

7.4 Evaluación del tratamiento farmacológico con la procainamida como inhibidor de la ADN metiltransferasa 1 en la capacidad de diferenciación neuronal de las células del epitelio olfatorio

DNMT1 es la ADN metiltransferasa más abundante en células proliferantes y es quien se encarga de mantener los patrones de metilación durante la replicación celular (Robertson, 2001). Además, el cerebro de mamíferos expresa altos niveles de Dnmt1 durante el desarrollo como en la edad adulta y se ha demostrado que Dnmt1 es crucial para la supervivencia de neuronas postnatales (Fan et al., 2001).

Hirofumi Noguchi en el 2014 demostró que DNMT1 se encuentra altamente expresada en progenitores neurales del giro dentado y que su supresión no afecta los procesos de proliferación o diferenciación neuronal (Noguchi et al., 2015). En el epitelio olfatorio de ratón DNMT1 se expresa en células progenitoras (proliferantes) y es retenida en células post-mitóticas, es decir, en neuronas inmaduras y maduras durante el proceso neurogénico (MacDonald et al., 2005).

Debido a lo anterior, en este proyecto analizamos el efecto de la procainamida como agente inhibidor de la ADN metiltransferasa 1, sobre la inducción de la diferenciación neuronal de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano y ratón *in vitro*. Los resultados mostraron que el pretatamiento con procainamida (1.0, 1.5 y 2.0 mM) reduce los niveles de metilación global en las células del epitelio olfatorio. Posteriormente el tratamiento con ácido retinoico y forskolina incrementó el número de neuronas positivas a MAP2 y MAP1B demostrando así, que la inhibición de la metilación (específicamente la inhibición de la DNMT1) favorece en el proceso de diferenciación neuronal.

Diversos estudios han demostrado que agentes hipometilantes como la curcumina y la 5 azacitidina o sus derivados participan en el proceso de diferenciación celular. Suzhen Dong y colaboradores en el 2012, demostraron que la curcumina media la activación de genes como NeuroD1 y NeuroD6 que favorecen la diferenciación y promueven la supervivencia neuronal. Además el tratamiento con curcumina también incrementa la expresión de genes como Wnt2 o Tiam que favorecen el desarrollo y crecimiento de neuritas así como los procesos para el restablecimiento de la arborización neuronal (Dong et al., 2012).

La 5 azacitidina ha sido utilizada potencialmente para lograr la diferenciación hacia cardiomiocitos de células troncales mesenquimales (Fukuda, 2003a, 2003b), células troncales embrionarias de humano (Yoon et al., 2006) y células P19 del carcinoma embrionario de ratón (Abbey and Seshagiri, 2013; Choi SC et al., 2005). Además, se ha estudiado que el tratamiento con 5-azacitidina reduce significativamente los niveles de metilación global en células troncales mesenquimales derivadas de adipocitos, mejorando así, su potencial de

diferenciación hacia hepatocitos (Seeliger et al., 2013) y osteoblastos (Yan et al., 2014).

El tratamiento con procainamida disminuyó significativamente los niveles globales de metilación del ADN y la inmunoreactividad de la forma metilada de la citosina (5mC) en las células del epitelio olfatorio de ratón y humano. Bajo estas condiciones se comprobó que el inhibidor no tiene efecto por sí solo sobre la diferenciación neuronal. El efecto de la procainamida se observó exclusivamente cuando las células se habían sometido a un protocolo de diferenciación neuronal. El protocolo de inducción utilizado incluyó ácido retinoico (AR) y forskolina. Está ampliamente descrito que estos dos factores favorecen la diferenciación neuronal y glial en células progenitoras neurales de hipocampo en ratón y rata (Ray y Gage, 2006). La combinación de estas moléculas ha sido utilizada para llevar a cabo la inducción de la diferenciación neuronal de las células/progenitoras del epitelio olfatorio de humano *in vitro* (Boone et al., 2010; X Zhang et al., 2006; Xiaodong Zhang et al., 2006).

En este trabajo estandarizamos las condiciones y concentraciones de ácido retinoico necesarias para inducir la diferenciación neuronal *in vitro* de las células del epitelio olfatorio. El ácido retinoico (AR) y sus isómeros son los compuestos funcionalmente activos de la vitamina A, se ha descrito que es importante para numerosos procesos biológicos como el crecimiento, la regulación de la proliferación y diferenciación de tejidos epiteliales (Corcoran y Maden, 1999). El AR aumenta la neurogénesis en cultivos primarios de neuronas de la médula espinal y es capaz de diferenciar hacia fenotipos neuronales algunas líneas celulares establecidas de carcinoma embrionario (Wuarin y Sidell, 1991)

Estudios previos, han utilizado la concentración de ácido retinoico de 1 μM , en combinación con 5 μM de forskolina y 15 nM de Sonic hedgehog para inducir la diferenciación de las células del epitelio olfatorio de humano *in vitro* (Boone et al., 2010; Pavlova et al., 2012; Ray y Gage, 2006; Zhang et al., 1998). En cambio, en nuestro estudio la concentración de ácido retinoico usada para inducir la diferenciación en las células del epitelio de ratón fue de 20 μM , mientras que la

concentración utilizada de ácido retinoico en células del epitelio olfatorio de humano fue de 10 μM . El mecanismo molecular exacto por el cual el AR favorece el proceso de diferenciación neuronal y el crecimiento axonal no se conoce por completo. Sin embargo, se sabe que las células del epitelio olfatorio expresan y liberan una serie de proteínas que pueden colaborar con este proceso, entre estas destacan las neurotrofinas. Los efectos de las neurotrofinas están mediados por la interacción y activación de receptores específicos de la familia Trk, que pertenecen a la familia de receptores con actividad de tirosina cinasa, que activan cascadas que permiten cambios en la expresión de diversos genes como NGF, BDNF, NT3, GDNF entre otros. Se sabe que las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio tienen receptores a TrkA y TrkB (Ortiz-López et al., 2016; Roisen et al., 2001). Jonathan Corcoran en 1999, describió que el factor neurotrófico NGF o factor de crecimiento nervioso actúa por medio de la síntesis de ácido retinoico para estimular la proliferación de las neuritas y este factor neurotrófico está altamente expresado en células basales globosas y horizontales del epitelio olfatorio de ratón (Corcoran y Maden, 1999), lo que podría mediar los efectos ácido retinoico en las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio de humano y ratón *in vitro*.

El AR interacciona con receptores nucleares RAR y RXR: α , β , γ para la activar la expresión de genes de respuesta del ácido retinoico como factores de transcripción; CREB (proteína de unión al elemento respuesta de AMPc), NF κ B, MAPKs, proteína kinansa A (PKA), caseína dependiente de ciclinas (CDks) (Despouy et al., 2003) Un paso crítico y limitante de la velocidad en la biosíntesis del retinol es la conversión a retinaldehído para convertirse en la forma activa: el ácido retinoico, esta reacción esta medida por las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDH). En este aspecto se ha demostrado que la isoforma ALDH3 es la enzima clave que mantiene el depósito de progenitores del epitelio olfatorio para así controlar su potencial de diferenciación (Kawauchi et al., 2004; Paschaki et al., 2013).

En la parte final de este trabajo, decidimos utilizar a la procainamida como agente hipometilante de manera previa al tratamiento con ácido retinoico y forskolina en las células del epitelio olfatorio de ratón y humano. Diversos estudios en los cuales han

utilizado inhibidores de la metilación del ADN, como la 5 azacitidina, un análogo de la citidina que sustituye directamente a la citosina metilada durante la replicación del ADN inhibiendo así la actividad de las ADN metiltransferasa de *ново* y mantenimiento (Singh et al., 2013), causan un estado hipometilante que promueve la diferenciación celular y en concentraciones mayores apoptosis celular. En combinación con otras moléculas la 5 azacitidina se ha probado para aumentar la diferenciación neuronal. Király y colaboradores en el 2009, describieron que el pretatamiento con 5 azacitidina (10 μ M) y la combinación de factores como forscolina, la neurotrofina-3 y dibutiril AMP cíclico favorecen la diferenciación, maduración y supervivencia neuronal en las células troncales de la pulpa dental de humano *in vitro* (Király et al., 2009). Por su parte Pavlona y colaboradores en el 2012, describieron que la combinación con 5-azacitidina, ácido retinoico y BDNF favorece la diferenciación neuronal de las células troncales derivadas de adipocitos. Estas células diferenciadas expresan un alto porcentaje de marcadores neuronales como beta-tubulina III, NSE o ENO2 y MAP2 (Pavlova et al., 2012). Por lo tanto, los estudios anteriores podían relacionar un efecto general de los procesos de metilación del ADN sobre la capacidad de diferenciación neuronal de las células troncales.

La procainamida, es un inhibidor específico de la ADN metiltransferasa 1 (Lee et al., 2005). Previo a nuestro estudio no existían reportes sobre el efecto de este fármaco sobre la capacidad de diferenciación de las células troncales y, por lo tanto, ningún reporte directo sobre la posible acción de la DNMT1. En este trabajo se mostró que el pre-tratamiento con procainamida induce un incremento significativo en el número de células diferenciadas (MAP2 para ratón y MAP1B para humano) en células que posteriormente fueron tratadas con ácido retinoico y forscolina.

El ácido retinoico actúa fundamentalmente modificando a nivel transcripcional la expresión de sus genes diana (ver anexo), a través de receptores nucleares que se subclasifican en dos subfamilias: los receptores nucleares del ácido retinoico (RAR) y los receptores X o de retinoides (RXR). En ambos casos, el receptor está codificado por tres genes α , β y γ . La manera de actuar de los receptores es por

medio de la formación de heterodímeros (RAR/RXR) que reconocen secuencias consenso conocidas como elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE) (Balmer y Blomhoff, 2002).

Existe en la literatura un antecedente que, junto con nuestros resultados, pudiera esclarecer la vía molecular involucrada en el proceso de inducción de la diferenciación neuronal mediada por la actividad de la ADN metiltransferasa 1. Shuken Boku y colaboradores en el 2015, utilizaron un modelo conocido como separación neonatal materna. En este modelo, el estrés neonatal disminuye la neurogénesis hipocámpal, lo cual se relaciona con desórdenes neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, abuso de sustancias, trastornos de personalidad, de ánimo y ansiedad en la vida adulta del animal. Boku sugirió que estos desórdenes podrían deberse a un déficit en el proceso de diferenciación neuronal el cual podría estar mediado a través de un mecanismo epigenético (Boku et al., 2015).

Para corroborar la hipótesis, utilizaron un sistema *in vitro*, con cultivos de células granulares del giro dentado de los animales separados maternalmente (56 días posteriores a la separación). La separación neonatal materna no afectó la tasa de proliferación y/o apoptosis en los cultivos celulares respecto a los animales control. La primera aproximación epigenética que realizaron fue medir la expresión de ARN mensajero para DNMT1, DNMT3a y DNMT3b, donde los animales separados maternalmente mostraron un aumento significativo en la ADN metiltransferasa 1, pero no en la DNMT3 a/b. Posteriormente evaluaron el proceso de diferenciación neuronal, el cual fue inducido con 1 $\mu\text{mol/L}$ de ácido retinoico y observaron una diferenciación normal hacia astrocitos, pero la diferenciación neuronal era aminorada en los cultivos de animales separados maternalmente. Debido a que el ácido retinoico está involucrado en la diferenciación neuronal, analizaron los niveles de los receptores alfa y beta, encontraron que en los animales separados maternalmente existía una disminución en la expresión del receptor del ácido retinoico RAR α . Sugiriendo así, que la separación materna neonatal incrementa la actividad de la enzima DNMT1, reduce la expresión del receptor a ácido retinoico alfa y mostraron que el promotor para el receptor RAR α se encontraba altamente

metilado lo que probablemente ocasionaba la deficiencia en la capacidad de diferenciación neuronal *in vitro*. Finalmente, utilizaron 5 azacitidina en los cultivos de animales separados maternalmente para inducir la inhibición de DNMT1. Lo cual provocó la desmetilación del receptor a ácido retinoico RAR α y su incremento, restableciendo el proceso de diferenciación neuronal. (Boku et al., 2015).

A diferencia del estudio mencionado anteriormente, en este trabajo se evaluó la expresión del ARN mensajero para DNMT1 sin que se observaran cambios cualitativos entre los pasajes. Sin embargo, para inducir la diferenciación neuronal en nuestras células utilizamos ácido retinoico, en diferentes concentraciones para ambas especies, de tal modo que sería interesante realizar estudios para evaluar los niveles de expresión de los receptores de ácido retinoico y evaluar su estado de metilación, ya que observamos que al tratar las células con procainamida existe un incremento en el número de neuronas maduras tanto en las células de ratón como en las de humano. Esto nos da una primera aproximación del posible mecanismo por el cual la metilación del ADN se encuentra involucrada en el proceso de diferenciación de nuestras células.

Por otra parte, las células del epitelio olfatorio de ratón y humano mostraron diferentes morfologías después de inducir la diferenciación neuronal con ácido retinoico y forskolina. En las células del epitelio olfatorio de ratón hubo un incremento en el número de neuritas primarias, mientras que en las células del epitelio olfatorio de humano mantuvieron una morfología bipolar y el efecto se observó en el incremento de la longitud de las neuritas. Estas diferencias morfológicas después de la diferenciación podrían obedecer a la capacidad de las células para responder a las señales inductivas y a las concentraciones de AR utilizadas para inducir la diferenciación. Jasodhara Ray y Fred Gage en 2006, demostraron que la capacidad de respuesta de los progenitores neurales del hipocampo responde de manera diferente al proceso de diferenciación, no solo entre especies si no también dependiendo del estímulo aplicado. Ray y Gage demostraron que el tratamiento con ácido retinoico estimulaba mayoritariamente la diferenciación hacia astrocitos y en menor proporción a neuronas en progenitores

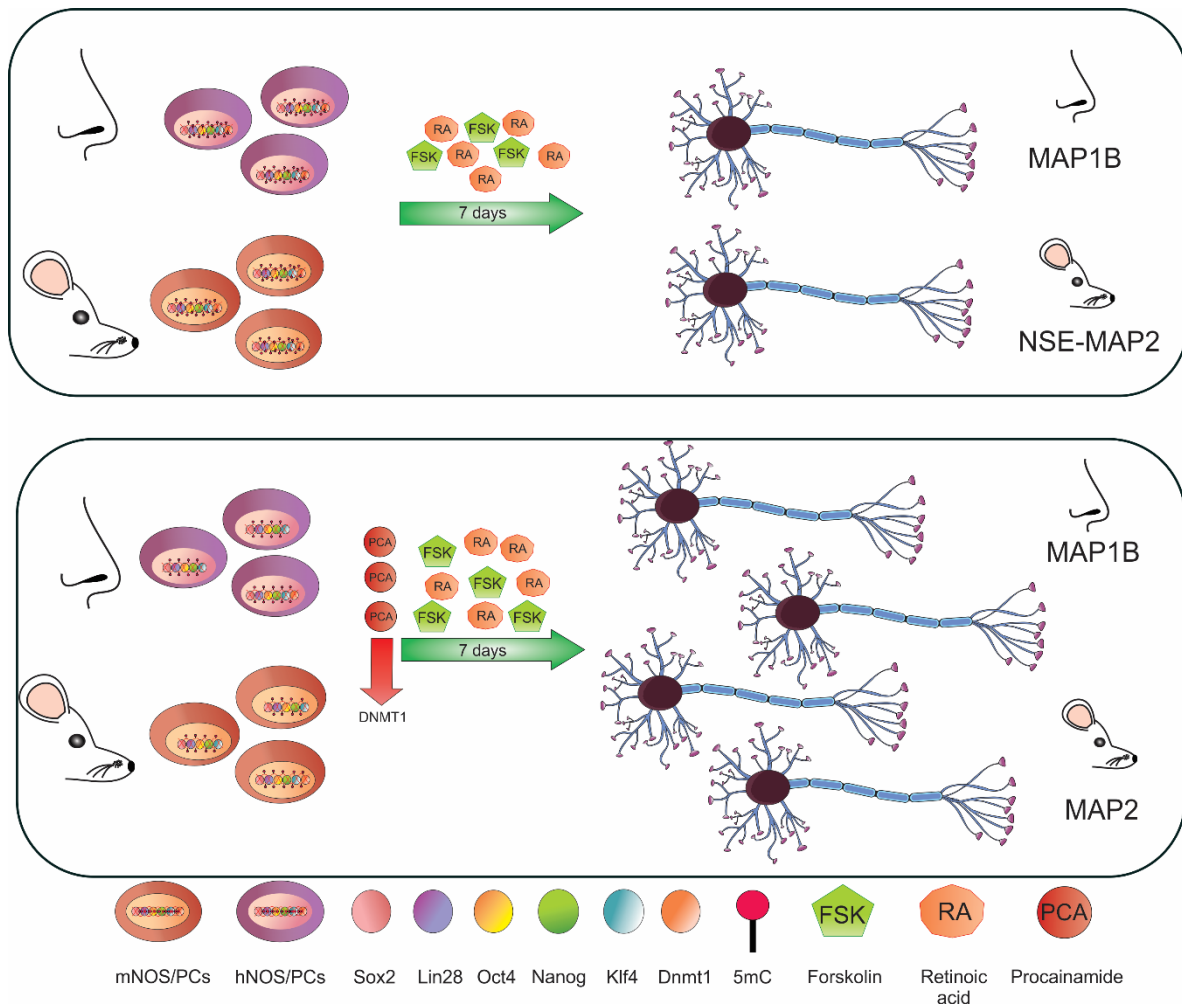
neurales de ratón, mientras que en los progenitores de rata se favorece la diferenciación hacia neuronas principalmente, astrocitos y oligodendrocitos. Por otra parte, en cultivos de ratón la forskolina favorece preferentemente la diferenciación hacia neuronas, mientras que en cultivos de rata esta diferenciación se centra en los tres tipos celulares neurales. Nosotros utilizamos la combinación de estos dos factores de inducción, además partimos de células inmunopositivas a beta tubulina III, es decir, unas células comprometidas al linaje neuronal, esto podría explicar el incremento en el número de células inmunopositivas a NSE, MAP2 y MAP1B, es decir, hacia el fenotipo neuronal. Además, nosotros corroboramos la ausencia de algún tipo glial mediante la identificación de la proteína GFAP una vez que las células fueron tratadas con procainamida, ácido retinoico y forskolina, tanto en las células del epitelio olfatorio de ratón como en las de humano.

Finalmente, reportes previos han demostrado que al menos las células del epitelio olfatorio de humano al ser tratadas durante 7 días con concentraciones más bajas de ácido retinoico (1 μ M) exhiben por lo menos dos neuritas primarias (Boone et al., 2010; X Zhang et al., 2006). En cambio, otros protocolos de diferenciación en las células del epitelio de humano con glutamato durante 21 días producen neuronas de tipo bipolar (Delorme et al., 2010; Girard et al., 2011), lo cual indica la capacidad de respuesta de las células del epitelio olfatorio de humano ante el estímulo aplicado.

8. Conclusión

En conclusión, con el protocolo utilizado en este trabajo, logramos obtener células con una alta capacidad de proliferación *in vitro*, que expresan marcadores asociados a pluripotencia y finalmente mantienen la expresión de marcadores que las comprometen con el linaje neuronal.

Es importante destacar que este trabajo representa el primer estudio que muestra que la inhibición de la ADN metiltransferasa 1 (DNMT1), causada por la procainamida, más el tratamiento con la combinación de ácido retinoico y forskolina, favorece la diferenciación neuronal madura de las células troncales del epitelio olfatorio de ratón y humano *in vitro*.



9. Perspectivas

Como hemos mencionado durante la discusión, aún quedan varias interrogantes que son necesarias responder para esclarecer nuestros resultados, con base a ello es necesario cubrir los siguientes puntos:

- Realizar una caracterización más detallada de la población de las células troncales/progenitores del epitelio olfatorio.
- Demostrar su carácter unipotente o multipotente.
- Evaluar si otros mecanismos epigenéticos como la acetilación/desacetilación de histonas incrementa/mejora el proceso de diferenciación neuronal *In vitro* de las células del epitelio olfatorio de ratón y humano.
- Validar si la combinación de fármacos inhibidores de la metilación del ADN (procainamida) y de histonas deacetilasas (ácido valpróico, fenil butirato de sodio) incrementan el proceso de diferenciación neuronal de las células del epitelio olfatorio.
- Validar nuestros resultados en un modelo *in vivo*, donde podamos evaluar si la modificación del perfil epigenético de estos cultivos con procainamida antes de ser trasplantadas favorezca su diferenciación neuronal para mejorar las respuestas conductuales en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, enfermedad del Parkinson y/o epilepsia.

10. Referencias

- Abbey, D., Seshagiri, P.B., 2013. Aza-induced cardiomyocyte differentiation of P19 EC-cells by epigenetic co-regulation and ERK signaling. *Gene* 526, 364–373. doi:10.1016/j.gene.2013.05.044
- Aguirre-Arteta, a M., Grunewald, I., Cardoso, M.C., Leonhardt, H., 2000. Expression of an alternative Dnmt1 isoform during muscle differentiation. *Cell Growth Differ.* 11, 551–9.
- Altman J, D.G., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124(3), 319–35.
- Antequera, F., 2004. Genomic specification and epigenetic regulation of eukaryotic DNA replication origins 23, 4365–4370. doi:10.1038/sj.emboj.7600450
- Asaba, A., Hattori, T., Mogi, K., Kikusui, T., 2014. Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front. Neurosci.* 8, 1–13. doi:10.3389/fnins.2014.00231
- Astic, L., Saucier, D., 2001. Neuronal plasticity and regeneration in the olfactory system of mammals: morphological and functional recovery following olfactory bulb deafferentation. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 538–545.
- Balmer, J.J.E., Blomhoff, R., 2002. Gene expression regulation by retinoic acid. *J. Lipid Res.* 43, 1773–808. doi:10.1194/jlr.R100015-JLR200
- Barreto, G., Schäfer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S.K., Handa, V., Döderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., Niehrs, C., 2007. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445, 671–675. doi:10.1038/nature05515
- Bauer, S., Rasika, S., Han, J., Mauduit, C., Raccurt, M., Morel, G., Jourdan, F., Benahmed, M., Moyse, E., Patterson, P.H., 2003. Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *J. Neurosci.* 23, 1792–803.
- Beites, C.L., Kawauchi, S., Crocker, C.E., Calof, A.L., 2005. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp. Cell Res.* 306, 309–316. doi:10.1016/j.yexcr.2005.03.027
- Benítez-King, G., Riquelme, A., Ortíz-López, L., Berlanga, C., Rodríguez-Verdugo, M.S., Romo, F., Calixto, E., Solís-Chagoyán, H., Jiménez, M., Montaña, L.M., Ramírez-Rodríguez, G., Morales-Mulia, S., Domínguez-Alonso, A., 2011. A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *J. Neurosci. Methods* 201, 35–45. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.07.009

- Benítez-King, G., Valdés-Tovar, M., Trueta, C., Galván-Arrieta, T., Argueta, J., Alarcón, S., Lora-Castellanos, A., Solís-Chagoyán, H., 2016. The microtubular cytoskeleton of olfactory neurons derived from patients with schizophrenia or with bipolar disorder: Implications for biomarker characterization, neuronal physiology and pharmacological screening. *Mol. Cell. Neurosci.* 73, 84–95. doi:10.1016/j.mcn.2016.01.013
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21. doi:10.1101/gad.947102
- Bless, E.P., Yang, J., Acharya, K.D., Nettles, S.A., Vassoler, F.M., Byrnes, E.M., Tetel, M.J., 2016. Adult neurogenesis in the female mouse hypothalamus: Estradiol and high fat diet alter the generation of newborn neurons expressing estrogen receptor. *eNeuro* 3. doi:10.1523/ENEURO.0027-16.2016
- Boku, S., Toda, H., Nakagawa, S., Kato, A., Inoue, T., Koyama, T., Hiroi, N., Kusumi, I., 2015. Neonatal maternal separation alters the capacity of adult neural precursor cells to differentiate into neurons via methylation of retinoic Acid receptor gene promoter. *Biol. Psychiatry* 77, 335–344.
- Bonfils, C., Beaulieu, N., Chan, E., Cotton-Montpetit, J., MacLeod, a R., 2000. Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b. *J. Biol. Chem.* 275, 10754–10760. doi:10.1074/JBC.275.15.10754
- Boone, N., Loriod, B., Bergon, A., Sbai, O., Formisano-Tréziny, C., Gabert, J., Khrestchatisky, M., Nguyen, C., Féron, F., Axelrod, F.B., Ibrahim, E.C., 2010. Olfactory stem cells, a new cellular model for studying molecular mechanisms underlying familial dysautonomia. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0015590
- Bostick, M., Kim, J.K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S., Jacobsen, S.E., 2007. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317, 1760–4. doi:10.1126/science.1147939
- Boyer, L. a L. a., Lee, T.I.T.I., Cole, M.F.M.F., Johnstone, S.E.S.E., Stuart, S., Zucker, J.P.J.P., Guenther, M.G.M.G., Kumar, R.M.R.M., Murray, H.L.H.L., Jenner, R.G.R.G., Gifford, D.K., Melton, D. a, Jaenisch, R., Young, R. a, Levine, S.S., Others, 2005. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Young* 122, 947–956. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020.Core
- Brewer, W.J., Edwards, J., Anderson, V., Robinson, T., Pantelis, C., 1996. Neuropsychological, olfactory, and hygiene deficits in men with negative symptom schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 40, 1021–1031. doi:10.1016/0006-3223(95)00594-3
- Bröske, A.-M., Vockentanz, L., Kharazi, S., Huska, M.R., Mancini, E., Scheller, M., Kuhl, C., Enns, A., Prinz, M., Jaenisch, R., Nerlov, C., Leutz, A., Andrade-Navarro, M.A., Jacobsen, S.E.W., Rosenbauer, F., 2009. DNA methylation

- protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat. Genet.* 41, 1207–1215. doi:10.1038/ng.463
- Burón, E., Bulbena, A., Bulbena-Cabré, A., 2015. Olfactory functioning in panic disorder. *J. Affect. Disord.* 175, 292–298. doi:10.1016/j.jad.2015.01.049
- Calof, A.L., Chikaraishi, D.M., 1989. Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: Proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro. *Neuron* 3, 115–127. doi:10.1016/0896-6273(89)90120-7
- Calof, A.L., Hagiwara, N., Holcomb, J.D., Mumm, J.S., Shou, J., 1996. Neurogenesis and cell death in olfactory epithelium. *J. Neurobiol.* 30, 67–81. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(199605)30:1<67::AID-NEU7>3.0.CO;2-E
- Carter, L.A., Jessica L. MacDonald, Roskams, A.J., 2004. Olfactory Horizontal Basal Cells Demonstrate a Conserved Multipotent Progenitor Phenotype. *J. Neurosci.* 24, 5670–5683. doi:10.1523/JNEUROSCI.0330-04.2004
- Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C., Guillemot, F., 1997. Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* 124, 1611–21.
- Chestnut, B. a., Chang, Q., Price, A., Lesuisse, C., Wong, M., Martin, L.J., 2011. Epigenetic Regulation of Motor Neuron Cell Death Through DNA Methylation. *J. Neurosci.* 31, 16619–16636. doi:10.1523/JNEUROSCI.1639-11.2011.Epigenetic
- Cheung, M.C., Jang, W., Schwob, J.E., Wachowiak, M., 2013. Functional recovery of odor representations in regenerated sensory inputs to the olfactory bulb. *Front. Neural Circuits* 7, 207. doi:10.3389/fncir.2013.00207
- Choi, D., Law, S., Raisman, G., Li, D., 2008. Olfactory ensheathing cells in the nasal mucosa of the rat and human. *Br. J. Neurosurg.* 22, 301–2. doi:10.1080/02688690701883442
- Cirio, M.C., Ratnam, S., Ding, F., Reinhart, B., Navara, C., Chaillet, J.R., 2008. Preimplantation expression of the somatic form of Dnmt1 suggests a role in the inheritance of genomic imprints. *BMC Dev. Biol.* 8, 1. doi:10.1186/1471-213X-8-9
- Corcoran, J., Maden, M., 1999. Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth. *Nat. Neurosci.* 2, 307–308. doi:10.1038/7214
- Costanzo, R.M., 2000. Rewiring the olfactory bulb: changes in odor maps following recovery from nerve transection. *Chem. Senses* 25, 199–205. doi:10.1093/chemse/25.2.199
- Dahlstrand, J., Zimmerman, L.B., McKay, R.D., Lendahl, U., 1992. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J. Cell Sci.* 103 (Pt 2, 589–97.

- Deckner, M.L., Risling, M., Frisé, J., 1997. Apoptotic death of olfactory sensory neurons in the adult rat. *Exp. Neurol.* 143, 132–140. doi:10.1006/exnr.1996.6352
- Delorme, B., Nivet, E., Gaillard, J., Haupl, T., Ringe, J., Deveze, A., Magnan, J., Sohier, J., Khrestchatisky, M., Roman, F.S., Charbord, P., Sensebe, L., Layrolle, P., Feron, F., 2010. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev.* 19, 853–866. doi:10.1089/scd.2009.0267
- Dennis, K., Fan, T., Geiman, T., Yan, Q., Muegge, K., 2001. Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation 2940–2944. doi:10.1101/gad.929101.2940
- Despouy, G., Bastie, J.N., Deshaies, S., Balitrand, N., Mazharian, A., Rochette-Egly, C., Chomienne, C., Delva, L., 2003. Cyclin D3 is a cofactor of retinoic acid receptors, modulating their activity in the presence of cellular retinoic acid-binding protein II. *J. Biol. Chem.* 278, 6355–6362. doi:10.1074/jbc.M210697200
- Ding, F., Chaillet, J.R., 2002. In vivo stabilization of the Dnmt1 (cytosine-5)-methyltransferase protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14861–6. doi:10.1073/pnas.232565599
- Dong, S., Zeng, Q., Mitchell, E.S., Xiu, J., Duan, Y., Li, C., Tiwari, J.K., Hu, Y., Cao, X., Zhao, Z., 2012. Curcumin enhances neurogenesis and cognition in aged rats: Implications for transcriptional interactions related to growth and synaptic plasticity. *PLoS One* 7, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0031211
- Ehrlich, M., 2003. The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin. Immunol.* 109, 17–28. doi:10.1016/S1521-6616(03)00201-8
- Eibenstein, A., Fioretti, A.B., Lena, C., Rosati, N., Amabile, G., Fusetti, M., 2005. Modern psychophysical tests to assess olfactory function. *Neurol. Sci.* 26, 147–155. doi:10.1007/s10072-005-0452-3
- Ennis, M., Zhou, F., Ciombor, K.J., Aroniadou-anderjaska, V., Hayar, A., Borrelli, E., Zimmer, L.E.E.A., Margolis, F., Shipley, M.T., Zhou, F., Ciombor, K.J., Aro, V., Hayar, A., Borrelli, E., Lee, A., Margolis, F., Shipley, M.T., Dopamine, D., 2001. Dopamine D2 Receptor – Mediated Presynaptic Inhibition of Olfactory Nerve Terminals.
- Espinosa-Jeffrey, A., Becker-Catania, S.G., Zhao, P.M., Cole, R., Edmond, J., De Vellis, J., 2002. Selective specification of CNS stem cells into oligodendroglial or neuronal cell lineage: Cell culture and transplant studies. *J. Neurosci. Res.* 69, 810–825. doi:10.1002/jnr.10344
- Esteller, M., 2008. Epigenetics in Cancer. *N. Engl. J. Med.* 1–12.
- Fan, G., Beard, C., Chen, R.Z., Csankovszki, G., Sun, Y., Siniaia, M., Biniszkiwicz,

- D., Bates, B., Lee, P.P., Kühn, R., Trumpp, A., Poon, C., Wilson, C.B., Jaenisch, R., 2001. DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals. *J. Neurosci.* 21, 788–797. doi:21/3/788 [pii]
- Federico, G., Maremmani, C., Cinquanta, L., Baroncelli, G.I., Fattori, B., Saggese, G., 1999. Mucus of the human olfactory epithelium contains the insulin-like growth factor-I system which is altered in some neurodegenerative diseases. *Brain Res.* 835, 306–314. doi:10.1016/S0006-8993(99)01614-5
- Firestein, S., 2013. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 423, 211–8. doi:10.1038/35093026
- Fuentes, A., Fresno, A., Santander, H., Valenzuela, S., Gutiérrez, M., Miralles, R., 2011. Sensopercepción olfatoria:Una revisión. *Rev. Med. Chil.* 139, 362–367.
- Fukuda, K., 2003a. Use of adult marrow mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocytes. *Bone Marrow Transplant.* 32 Suppl 1, S25-7. doi:10.1038/sj.bmt.1703940
- Fukuda, K., 2003b. Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy. *Hum. Cell* 16, 83–94.
- Gage, F.H., 2012. Mammalian Neural Stem Cells. *Science* (80-.). 287, 1433–1438. doi:10.1126/science.287.5457.1433
- Gao, Z., Xu, Z., Hung, M.-S., Lin, Y.-C., Wang, T., Gong, M., Zhi, X., Jablons, D.M., You, L., 2009. Procaine and procainamide inhibit the Wnt canonical pathway by promoter demethylation of WIF-1 in lung cancer cells. *Oncol. Rep.* 22, 1479–84.
- Garzon, R., Calin, G., Croce, C., 2009. MicroRNAs in Cancer. *Annu. Rev. Med.* 60, 167–179. doi:doi: 10.1146/annurev.med.59.053006.104707
- Girard, S.D., Devéze, A., Nivet, E., Gepner, B., Roman, F.S., Féron, F., 2011. Isolating nasal olfactory stem cells from rodents or humans. *J. Vis. Exp.* 1–5. doi:10.3791/2762
- Gottfried, J.A., Small, D.M., Zald, D.H., 1982. *The Chemical Senses* 125–172.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., Pevny, L., 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749–765. doi:10.1016/S0896-6273(03)00497-5
- Graziadei, P.P., Levine, R.R., Graziadei, G.A., 1978. Regeneration of olfactory axons and synapse formation in the forebrain after bulbectomy in neonatal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 5230–4. doi:10.1073/pnas.75.10.5230
- Graziadei, P.P.C., Levine, R.R., Monti Graziadei, G.A., 1979. Plasticity of connections of the olfactory sensory neuron: Regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse. *Neuroscience* 4, 713–727.

doi:10.1016/0306-4522(79)90002-2

- Gritti, a, Parati, E. a, Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D.J., Roisen, F., Nickel, D.D., Vescovi, a L., 1996. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 16, 1091–1100.
- Gross, E.A., Swenberg, J.A., Fields, S., Popp, J.A., 1982. Comparative morphometry of the nasal cavity in rats and mice. *J. Anat.* 135, 83–88.
- Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, A., Anderson, D.J., Joyner, A.L., 1993. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463–476. doi:10.1016/0092-8674(93)90381-Y
- Guo, Z., Packard, A., Krolewski, R.C., Harris, M.T., Manglapus, G.L., Schwob, J.E., 2010. Expression of Pax6 and Sox2 in adult olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 518, 4395–4418. doi:10.1002/cne.22463
- Hahn, C.-G., Han, L.-Y., Rawson, N.E., Mirza, N., Borgmann-Winter, K., Lenox, R.H., Arnold, S.E., 2005. In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 483, 154–63. doi:10.1002/cne.20424
- Halpain, S., Dehmelt, L., 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 7, 224. doi:10.1186/gb-2006-7-6-224
- Holbrook, E.H., Iwema, C.L., Peluso, C.E., Schwob, J.E., 2014. The regeneration of P2 olfactory sensory neurons is selectively impaired following methyl bromide lesion. *Chem. Senses* 39, 601–616. doi:10.1093/chemse/bju033
- Holbrook, E.H., Szumowski, K.E.M., Schwob, J.E., 1995. An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 363, 129–146. doi:10.1002/cne.903630111
- Holbrook, E.H., Wu, E., Curry, W.T., Lin, T.D., Schwob, J.E., 2012. Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue 121, 1687–1701. doi:10.1002/lary.21856.Immunohistochemical
- Holcomb, J.D., Mumm, J.S., Calof, A.L., 1995. Apoptosis in the neuronal lineage of the mouse olfactory epithelium: regulation in vivo and in vitro. *Dev. Biol.* 172, 307–323. doi:10.1006/dbio.1995.0025
- Hori, Y., Matsuda, O., Ichikawa, S., 2015. Olfactory function in elderly people and patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 15, 179–85. doi:10.1111/psyg.12092
- Hsu, D.W., Lin, M.J., Lee, T.L., Wen, S.C., Chen, X., Shen, C.K., 1999. Two major forms of DNA (cytosine-5) methyltransferase in human somatic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9751–9756. doi:10.1073/pnas.96.17.9751

- Hsu, P., 2001. Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptors in adult olfactory epithelium. *Brain Res.* 896, 188–197. doi:10.1016/S0006-8993(01)02173-4
- Huard, J.M.T., Schwob, J.E., 1995. Cell cycle of globose basal cells in rat olfactory epithelium. *Dev. Dyn.* 203, 17–26. doi:10.1002/aja.1002030103
- Iwema, C.L., Fang, H., Kurtz, D.B., Youngentob, S.L., Schwob, J.E., 2004. Odorant Receptor Expression Patterns Are Restored in Lesion-Recovered Rat Olfactory Epithelium. *Neuroscience* 24, 356–369. doi:10.1523/JNEUROSCI.1219-03.2004
- Jang, W., Chen, X., Flis, D., Harris, M., Schwob, J.E., 2014. Label-retaining, quiescent globose basal cells are found in the olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 522, 731–749. doi:10.1002/cne.23470
- Jang, W., Youngentob, S.L., Schwob, J.E., 2003. Globose basal cells are required for reconstitution of olfactory epithelium after methyl bromide lesion. *J. Comp. Neurol.* 460, 123–140. doi:10.1002/cne.10642
- Jensen, J.B., Parmar, M., 2006. Strengths and Limitations of the Neurosphere Culture System 34, 153–161.
- Jimbo, D., Inoue, M., Taniguchi, M., Urakami, K., 2011. Specific feature of olfactory dysfunction with Alzheimer's disease inspected by the Odor Stick Identification Test. *Psychogeriatrics* 11, 196–204. doi:10.1111/j.1479-8301.2011.00387.x
- Juliandi, B., Abematsu, M., Nakashima, K., 2010. Chromatin remodeling in neural stem cell differentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 408–415. doi:10.1016/j.conb.2010.04.001
- Kawauchi, S., Beites, C.L., Crocker, C.E., Wu, H.-H., Bonnin, A., Murray, R., Calof, A.L., 2004. Molecular Signals Regulating Proliferation of Stem and Progenitor Cells in Mouse Olfactory Epithelium. *Dev. Neurosci.* 26, 166–180. doi:10.1159/000082135
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27, 447–452. doi:10.1016/j.tins.2004.05.013
- Király, M., Porcsalmy, B., Pataki, A., Kádár, K., Jelítai, M., Molnár, B., Hermann, P., Gera, I., Grimm, W.-D., Ganss, B., Zsembergy, A., Varga, G., 2009. Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochem. Int.* 55, 323–32. doi:10.1016/j.neuint.2009.03.017
- Kivity, S., Ortega-Hernandez, O.D., Shoenfeld, Y., 2009. Olfaction - A window to the mind. *Isr. Med. Assoc. J.* 11, 238–243.
- Kohli, P., Soler, Z.M., Nguyen, S.A., Muus, J.S., Schlosser, R.J., 2016. The

- association between olfaction and depression: A systematic review. *Chem. Senses* 41, 479–486. doi:10.1093/chemse/bjw061
- Kohli, R.M., Zhang, Y., 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472–9. doi:10.1038/nature12750
- Kringelbach, M.L., 2005. The human orbitofrontal cortex: linking reward to hedonic experience. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 691–702. doi:10.1038/nrn1748
- Krolewski, R.C., Jang, W., Schwob, J.E., 2011. The generation of olfactory epithelial neurospheres in vitro predicts engraftment capacity following transplantation in vivo. *Exp. Neurol.* 229, 308–323. doi:10.1016/j.expneurol.2011.02.014
- Landgrave-Gómez, J., Mercado-Gómez, O., Guevara-Guzmán, R., 2015. Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 58. doi:10.3389/fncel.2015.00058
- Lee, B.H., Yegnasubramanian, S., Lin, X., Nelson, W.G., 2005. Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* 280, 40749–40756. doi:10.1074/jbc.M505593200
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., McKay, R.D., 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585–595. doi:10.1016/0092-8674(90)90662-X
- Leung, C.T., Coulombe, P. a, Reed, R.R., 2007. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat. Neurosci.* 10, 720–726. doi:10.1038/nn1882
- Li, E., 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3, 662–73. doi:10.1038/nrg887
- Li, E., Beard, C., Jaenisch, R., 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366, 362–5. doi:10.1038/366362a0
- Li, J., Gu, C.-Z., Su, J.-B., Zhu, L.-H., Zhou, Y., Huang, H.-Y., Liu, C.-F., 2016. Changes in Olfactory Bulb Volume in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 11, e0149286. doi:10.1371/journal.pone.0149286
- Lin, X., Asgari, K., Putzi, M.J., Gage, W.R., Yu, X., Cornblatt, B.S., Kumar, A., Piantadosi, S., DeWeese, T.L., De Marzo, A.M., Nelson, W.G., 2001. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. *Cancer Res.* 61, 8611–6.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

- Loo, A.T., Youngentob, S.L., Kent, P.F., Schwob, J.E., 1996. The aging olfactory epithelium: Neurogenesis, response to damage, and odorant-induced activity. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14, 881–900. doi:10.1016/S0736-5748(96)00046-9
- Lu, J., Féron, F., Ho, S.M., Mackay-Sim, A., Waite, P.M.E., 2001. Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain Res.* 889, 344–357. doi:10.1016/S0006-8993(00)03235-2
- Luo, J., Zheng, H., Zhang, L., Zhang, Q., Li, L., Pei, Z., Hu, X., 2017. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) improves functional recovery by enhancing neurogenesis and activating BDNF/TrkB signaling in ischemic rats. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18020455
- MacDonald, J.L., Gin, C.S.Y., Roskams, A.J., 2005. Stage-specific induction of DNA methyltransferases in olfactory receptor neuron development. *Dev. Biol.* 288, 461–73. doi:10.1016/j.ydbio.2005.09.048
- MacDonald, J.L., Verster, A., Berndt, A., Roskams, A.J., 2010. MBD2 and MeCP2 regulate distinct transitions in the stage-specific differentiation of olfactory receptor neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 55–67. doi:10.1016/j.mcn.2010.02.003
- Mackay-Sim, A., 2010. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa. *Arch. Ital. Biol.* 148, 47–58. doi:10.4449/AIB.V148I2.1143
- Mackay-Sim, A., Kittel, P., 1991. Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 979–84.
- Magavi, S.S., Leavitt, B.R., Macklis, J.D., 2000. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405, 951–955. doi:10.1038/35016083
- Majumder, A., Dhara, S.K., Swetenburg, R., Mithani, M., Cao, K., Medrzycki, M., Fan, Y., Stice, S.L., 2013. Inhibition of DNA methyltransferases and histone deacetylases induces astrocytic differentiation of neural progenitors. *Stem Cell Res.* 11, 574–86. doi:10.1016/j.scr.2013.03.003
- Manglapus, G.L., Youngentob, S.L., Schwob, J.E., 2004. Expression patterns of basic helix-loop-helix transcription factors define subsets of olfactory progenitor cells. *J. Comp. Neurol.* 479, 216–233. doi:10.1002/cne.20316
- Marshall, C.T., Guo, Z., Lu, C., Klueber, K.M., Khalyfa, A., Cooper, N.G.F., Roisen, F.J., 2005. Human adult olfactory neuroepithelial derived progenitors retain telomerase activity and lack apoptotic activity. *Brain Res.* 1045, 45–56. doi:10.1016/j.brainres.2005.03.041
- Matigian, N., Abrahamsen, G., Sutharsan, R., Cook, A.L., Vitale, A.M., Nouwens, A., Bellette, B., An, J., Anderson, M., Beckhouse, A.G., Bennebroek, M., Cecil, R., Chalk, A.M., Cochrane, J., Fan, Y., Féron, F., McCurdy, R., McGrath, J.J., Murrell, W., Perry, C., Raju, J., Ravishankar, S., Silburn, P. a, Sutherland, G.T., Mahler, S., Mellick, G.D., Wood, S. a, Sue, C.M., Wells, C. a, Mackay-Sim, A.,

2010. Disease-specific, neurosphere-derived cells as models for brain disorders. *Dis. Model. Mech.* 3, 785–798. doi:10.1242/dmm.005447
- McCurdy, R.D., Féron, F., McGrath, J.J., Mackay-Sim, A., 2005. Regulation of adult olfactory neurogenesis by insulin-like growth factor-I. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1581–1588. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04355.x
- Med, E.M., 2005. Choi, S. C. et al. 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. *Development* 132, 515–523. doi:10.1038/emmm.2004.66
- Michel, D., Moyse, E., Brun, G., Jourdan, F., 1994. Induction of apoptosis in mouse [correction of rat] olfactory neuroepithelium by synaptic target ablation. *Neuroreport* 5, 1329–32.
- Miragall, F., Kadmon, G., Husmann, M., Schachner, M., 1988. Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult mouse: Presence of the embryonic form of N-CAM. *Dev. Biol.* 129, 516–531. doi:10.1016/0012-1606(88)90397-1
- Mobley, A.S., Rodriguez-Gil, D.J., Imamura, F., Greer, C.A., 2014. Aging in the olfactory system. *Trends Neurosci.* 37, 77–84. doi:10.1016/j.tins.2013.11.004
- Mombaerts, P., 2006. Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 713–37. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012804.093915
- Morley, J.F., Duda, J.E., 2011. Neuropsychological correlates of olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 310, 228–230. doi:10.1016/j.jns.2011.05.030
- Morrison, E.E., Costanzo, R.M., 1989. Scanning electron microscopic study of degeneration and regeneration in the olfactory epithelium after axotomy. *J. Neurocytol.* 18, 393–405.
- Muñoz-Estrada, J., Benítez-King, G., Berlanga, C., Meza, I., 2015. Altered Subcellular Distribution of the 75-kDa DISC1 Isoform, cAMP Accumulation, and Decreased Neuronal Migration in Schizophrenia and Bipolar Disorder: Implications for Neurodevelopment. *CNS Neurosci. Ther.* 21, 446–453. doi:10.1111/cns.12377
- Murrell, W., Féron, F., Wetzig, A., Cameron, N., Splatt, K., Bellette, B., Bianco, J., Perry, C., Lee, G., Mackay-Sim, A., 2005. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev. Dyn.* 233, 496–515. doi:10.1002/dvdy.20360
- Murrell, W., Wetzig, A., Donnellan, M., Féron, F., Burne, T., Meedeniya, A., Kesby, J., Bianco, J., Perry, C., Silburn, P., Mackay-Sim, A., 2008. Olfactory mucosa is a potential source for autologous stem cell therapy for Parkinson's disease. *Stem Cells* 26, 2183–2192. doi:10.1634/stemcells.2008-0074
- Nelson, C.M., Gorsuch, R.A., Bailey, T.J., Ackerman, K.M., Kassen, S.C., Hyde, D.R., 2012. r Fo Pe er Re vi r Fo Pe Re vi 1–63. doi:10.1002/cne.23

- Newman, M., Féron, F., Mackay-Sim, a, 2000. Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neuroscience* 99, 343–350. doi:10.1016/S0306-4522(00)00194-9
- Nguyen, S., Meletis, K., Fu, D., Jhaveri, S., Jaenisch, R., 2007. Ablation of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in the nervous system leads to neuromuscular defects and shortened lifespan. *Dev. Dyn.* 236, 1663–1676. doi:10.1002/dvdy.21176
- Nivet, E., Vignes, M., Girard, S.D., Pierrisnard, C., Baril, N., Devèze, A., Magnan, J., Lanté, F., Khrestchatsky, M., Féron, F., Roman, F.S., 2011. Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions. *J. Clin. Invest.* 121, 2808–2820. doi:10.1172/JCI44489
- Noguchi, H., Kimura, A., Murao, N., Matsuda, T., Namihira, M., Nakashima, K., 2015. Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *Neurosci. Res.* 95, 1–11. doi:10.1016/j.neures.2015.01.014
- Orasji, S.S.S., Mulder, J.L., De Bruijn, S.F.T.M., Wirtz, P.W., 2016. Clinical Neurology and Neurosurgery Olfactory dysfunction in behavioral variant frontotemporal dementia. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 141, 106–110. doi:10.1016/j.clineuro.2016.01.003
- Ortiz-López, L., Vega-Rivera, N.M., Babu, H., Ramírez-Rodríguez, G.B., 2016. Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Cell Survival and the Migration of Murine Adult Hippocampal Precursor Cells During Differentiation In Vitro. *Neurotox. Res.* 1–14. doi:10.1007/s12640-016-9673-x
- Othman, M., Klueber, K., Lu, C., Winstead, W., Roisen, F., 2005a. Immunomagnetic separation of adult human olfactory neural progenitors. *Biotech. Histochem.* 80, 177–188. doi:10.1080/10520290500469769
- Othman, M., Lu, C., Klueber, K., Winstead, W., Roisen, F., 2005b. Clonal analysis of adult human olfactory neurosphere forming cells. *Biotech Histochem* 80, 189–200. doi:10.1080/10520290500469777
- Packard, A., Giel-Moloney, M., Leiter, A., Schwob, J.E., 2011. Progenitor cell capacity of NeuroD1-expressing globose basal cells in the mouse olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 519, 3580–3596. doi:10.1002/cne.22726
- Paschaki, M., Cammas, L., Muta, Y., Matsuoka, Y., Mak, S., Rataj-baniowska, M., Fraulob, V., Dollé, P., Ladher, R.K., 2013. Retinoic acid regulates olfactory progenitor cell fate and differentiation Retinoic acid regulates olfactory progenitor cell fate and differentiation. doi:10.1186/1749-8104-8-13
- Pavlova, G., Lopatina, T., Kalinina, N., Rybalkina, E., Parfyonova, Y., Tkachuk, V., Revishchin, A., 2012. In vitro neuronal induction of adipose-derived stem cells and their fate after transplantation into injured mouse brain. *Curr. Med. Chem.*

19, 5170–5177. doi:CMC-EPUB-20120816-6 [pii]

- Praag van, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030–1034. doi:10.1038/4151030a
- Ramón-Cueto, A., Nieto-Sampedro, M., 1992. Glial cells from adult rat olfactory bulb: Immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* 47, 213–220. doi:10.1016/0306-4522(92)90134-N
- Ray, J., Gage, F.H., 2006. Differential properties of adult rat and mouse brain-derived neural stem/progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 560–573. doi:10.1016/j.mcn.2005.11.010
- Rietze, R.L., Reynolds, B.A., 2006. Neural Stem Cell Isolation and Characterization. *Methods Enzymol.* 419, 3–23. doi:10.1016/S0076-6879(06)19001-1
- Robertson, K.D., 2001. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 20, 3139–55. doi:10.1038/sj.onc.1204341
- Robertson, K.D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F.A., Jones, P.A., 1999. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: Coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 27, 2291–2298. doi:10.1093/nar/27.11.2291
- Roisen, F.J., Klueber, K.M., Lu, C.L., Hatcher, L.M., Dozier, a., Shields, C.B., Maguire, S., 2001. Adult human olfactory stem cells. *Brain Res.* 890, 11–22. doi:10.1016/S0006-8993(00)03016-X
- Sasaki, H., Ishihara, K., Kato, R., 2000. Mechanisms of Igf2/H19 Imprinting: DNA Methylation, Chromatin and Long-Distance Gene Regulation. *JB Rev.* 127, 711–715.
- Schubert, C.R., Carmichael, L.L., Murphy, C., Klein, B.E.K., Klein, R., Cruickshanks, K.J., 2008. Olfaction and the 5-year incidence of cognitive impairment in an epidemiological study of older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* 56, 1517–1521. doi:10.1111/j.1532-5415.2008.01826.x
- Schwob, J.E., 2002. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat. Rec.* 269, 33–49. doi:10.1002/ar.10047
- Schwob, J.E., Jang, W., Holbrook, E.H., Lin, B., Herrick, D.B., Peterson, J.N., Coleman, J.H., 2016. Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *J. Comp. Neurol.* 525(4), 1034–1054. doi:10.1002/cne.24105
- Schwob, J.E., Youngentob, S.L., Mezza, R.C., 1995. Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J. Comp. Neurol.* 359, 15–37. doi:10.1002/cne.903590103

- Schwob, J.E., Youngentob, S.L., Ring, G., Iwema, C.L., Mezza, R.C., 1999. Reinnervation of the rat olfactory bulb after methyl bromide-induced lesion: Timing and extent of reinnervation. *J. Comp. Neurol.* 412, 439–457. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19990927)412:3<439::AID-CNE5>3.0.CO;2-H
- Seeliger, C., Culmes, M., Schyschka, L., Yan, X., Damm, G., Wang, Z., Kleeff, J., Thasler, W.E., Hengstler, J., Stöckle, U., Ehnert, S., Nüssler, A.K., 2013. Decrease of global methylation improves significantly hepatic differentiation of Ad-MSCs: Possible future application for urea detoxification. *Cell Transplant.* 22, 119–131. doi:10.3727/096368912X638946
- Seligman, S.C., Kamath, V., Giovannetti, T., Arnold, S.E., Moberg, P.J., 2013. Olfaction and apathy in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and healthy older adults. *Aging Ment. Health* 17, 564–70. doi:10.1080/13607863.2013.768208
- Shetty, R.S., Bose, S.C., Nickell, M.D., McIntyre, J.C., Hardin, D.H., Harris, A.M., McClintock, T.S., 2005. Transcriptional changes during neuronal death and replacement in the olfactory epithelium. *Mol. Cell. Neurosci.* 30, 90–107. doi:10.1016/j.mcn.2005.06.003
- Singh, V., Sharma, P., Capalash, N., 2013. DNA methyltransferase-1 inhibitors as epigenetic therapy for cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 13, 379–99.
- Sivam, A., Wroblewski, K.E., Alkorta-Aranburu, G., Barnes, L.L., Wilson, R.S., Bennett, D.A., Pinto, J.M., 2016. Olfactory dysfunction in older adults is associated with feelings of depression and loneliness. *Chem. Senses* 41, 293–299. doi:10.1093/chemse/bjv088
- Sohrabi, H.R., Bates, K.A., Rodrigues, M., Taddei, K., Laws, S.M., Lautenschlager, N.T., Dhaliwal, S.S., Johnston, A.N.B., MacKay-Sim, A., Gandy, S., Foster, J.K., Martins, R.N., 2009. Olfactory dysfunction is associated with subjective memory complaints in community-dwelling elderly individuals. *J. Alzheimer's Dis.* 17, 135–142. doi:10.3233/JAD-2009-1020
- Solís-Chagoyán, H., Flores-Soto, E., Reyes-García, J., Valdés-Tovar, M., Calixto, E., Montañó, L.M., Benítez-King, G., 2016. Voltage-activated calcium channels as functional markers of mature neurons in human olfactory neuroepithelial cells: Implications for the study of neurodevelopment in neuropsychiatric disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 17. doi:10.3390/ijms17060941
- Stamegna, J.C., Girard, S.D., Veron, A., Sicard, G., Khrestchatisky, M., Feron, F., Roman, F.S., 2014. A unique method for the isolation of nasal olfactory stem cells in living rats. *Stem Cell Res.* 12, 673–679. doi:10.1016/j.scr.2014.02.010
- Suzuki, Y., Takeda, M., Farbman, A.I., 1996. Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy. *J. Comp. Neurol.* 376, 509–517. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961223)376:4<509::AID-CNE1>3.0.CO;2-5

- Swaminathan, A., Kumar, M., Sinha, S.H., Schneider-Anthony, A., Boutillier, A.L., Kundu, T.K., 2014. Modulation of neurogenesis by targeting epigenetic enzymes using small molecules: An overview. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 1164–1177. doi:10.1021/cn500117a
- Tabakow, P., Jarmundowicz, W., Czapiga, B., Fortuna, W., Miedzybrodzki, R., Czyz, M., Huber, J., Szarek, D., Okurowski, S., Szewczyk, P., Gorski, A., Raisman, G., 2013. Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell Transplant.* 22, 1591–1612. doi:10.3727/096368912X663532
- Tadokoro, Y., Ema, H., Okano, M., Li, E., Nakauchi, H., 2007. De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 204, 715–722. doi:10.1084/jem.20060750
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- The Stem and Progenitor Cells of the Mammalian Olfactory Epithelium: Talking Poietic License, 2016. . *J. Comp. Neurol.*
- Trowbridge, J.J., Snow, J.W., Kim, J., Orkin, S.H., 2009. DNA Methyltransferase 1 Is Essential for and Uniquely Regulates Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* 5, 442–449. doi:10.1016/j.stem.2009.08.016
- Tsai, C.C., Su, P.F., Huang, Y.F., Yew, T.L., Hung, S.C., 2012. Oct4 and Nanog Directly Regulate Dnmt1 to Maintain Self-Renewal and Undifferentiated State in Mesenchymal Stem Cells. *Mol. Cell* 47, 169–182. doi:10.1016/j.molcel.2012.06.020
- Waddington, C.H., 1939. Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 25, 299–307. doi:10.1073/pnas.25.7.299
- Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, 75–85. doi:10.2144/05391RV01
- Wuarin, L., Sidell, N., 1991. Differential susceptibilities of spinal cord neurons to retinoic acid-induced survival and differentiation. *Dev Biol* 144, 429–435. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(91)90435-6
- Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.W., Okumura, K., Li, E., 1999. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 236, 87–95. doi:10.1016/S0378-1119(99)00252-8
- Yan, X., Ehnert, S., Culmes, M., Bachmann, A., Seeliger, C., Schyschka, L., Wang, Z., Rahmanian-Schwarz, A., Stöckle, U., De Sousa, P.A., Pelisek, J., Nussler, A.K., 2014. 5-azacytidine improves the osteogenic differentiation potential of

- aged human adipose-derived mesenchymal stem cells by DNA demethylation. *PLoS One* 9, e90846. doi:10.1371/journal.pone.0090846
- Yoon, B.S., Yoo, S.J., Lee, J.E., You, S., Lee, H.T., Yoon, H.S., 2006. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment. *Differentiation* 74, 149–159. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00063.x
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A., 2008. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* (80-.). 1917. doi:10.1126/science.1151526
- Yu, T.T., McIntyre, J.C., Bose, S.C., Hardin, D., Owen, M.C., McClintock, T.S., 2005. Differentially expressed transcripts from phenotypically identified olfactory sensory neurons. *J. Comp. Neurol.* 483, 251–262. doi:10.1002/cne.20429
- Zelano, C., Sobel, N., 2005. Humans as an animal model for systems-level organization of olfaction. *Neuron* 48, 431–454. doi:10.1016/j.neuron.2005.10.009
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, L., Chopp, M., 2001. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 105, 33–41. doi:10.1016/S0306-4522(01)00117-8
- Zhang, S.C., Lundberg, C., Lipsitz, D., O'Connor, L.T., Duncan, I.D., 1998. Generation of oligodendroglial progenitors from neural stem cells. *J. Neurocytol.* 27, 475–489. doi:10.1023/A:1006953023845
- Zhang, X., Cai, J., Klueber, K.M., Guo, Z., Lu, C., Qiu, M., Roisen, F.J., 2005. Induction of oligodendrocytes from adult human olfactory epithelial-derived progenitors by transcription factors. *Stem Cells* 23, 442–53. doi:10.1634/stemcells.2004-0274
- Zhang, X., Cai, J., Klueber, K.M., Guo, Z., Lu, C., Winstead, W.I., Qiu, M., Roisen, F.J., 2006. Role of transcription factors in motoneuron differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. *Stem Cells* 24, 434–442. doi:10.1634/stemcells.2005-0171
- Zhang, X., Klueber, K.M., Guo, Z., Cai, J., Lu, C., Winstead, W.I., Qiu, M., Roisen, F.J., 2006. Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. *Brain Res* 1073–1074, 109–119. doi:S0006-8993(05)01761-0 [pii]r10.1016/j.brainres.2005.12.059
- Zhang, X., Klueber, K.M., Guo, Z., Lu, C., Roisen, F.J., 2004. Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined medium. *Exp. Neurol.* 186, 112–123. doi:10.1016/j.expneurol.2003.10.022

- Zou, D.-J., Chesler, A., Firestein, S., 2009. How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 611–8. doi:10.1038/nrn2666
- Zou, L. quan, Geng, F. lei, Liu, W. hua, Wei, X. hua, Jiang, X. qing, Wang, Y., Shi, H. song, Lui, S.S.Y., Cheung, E.F.C., Chan, R.C.K., 2015. The neural basis of olfactory function and its relationship with anhedonia in individuals with schizotypy: An exploratory study. *Psychiatry Res. - Neuroimaging* 234, 202–207. doi:10.1016/j.psychresns.2015.09.011

11. Anexos

Tabla de genes regulados por el ácido retinoico.

Nombre común (por sus siglas en ingles).

14.5-D lectin	CD43
25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylasa	CD50
34kDa lectin	CD51
92kDA gelatinase	CD71
A4	CD82
ACS	CD95
Activin A	c-fms
Acyl-coA synthase	Cg B
ADD1	CGRP
ADH3	Cholesterol sulfotransferase
Aggrecanase	CIP1
α 1-microglobulin	CL-20
α -SM	Clusterin
Aminopeptidase-B	c-myb
AML2	c-myc
ANF	Collagenase
ANP	Connexin31
Antithrombin III	Connexin43
AP-2	Contact
AP-2.2	Cornifin
Ap-B	COUP-TF II
Apolipoprotein (a)	COUP-TF 1
ARP-1	COX-1
Arrestin	COX-2
ATX	CRBPI
β 1-AR	CRBP II
β -amyloid precursor protein	CT
Bone sialoprotein I	Cu/Zn superoxide dismutase
Brn-3.2	Cx43
c-abl	Cyclin D3
Calcineurin A	Cyclin E
Calcineurin B	Cyclooxygenase-1
CBFA3	D3
CD10	D9
CD11a	DEAD box protein
CD11b	DEAD box protein p72
CD15	D-II
CD157	Dopamine D2 receptor
CD18	DOR
CD23	Drg1
CD31	Dystroglycan α , β

E3
EAT
E-cadherin
E-MAP-115
EndoA
EndoB
Endolyn
eNOS
Epithelin
ERA-1
Erk2
ET-1
F1
F3
FAK
Fas
FasL
FATP
FBPase isozyme
Fra-1
Fru1, 6-P2ase
Gelatinase A
Gene 33
GLUT 2
GLUT 3
gp91-phox
gp96
GR
GST 5.7
H218
HAKR e
HB-EGF
HER4
HERG
HGFL
HIOMT
hlx-1
HNF-1 α
HNF-1 β
HNF-3 α
HNF-3 β
Hox-2.b
Hox4.2
hRDH-TBE
HSP86
HSP90
HSPCA

HSPG
Htf9-a / RanBP1
IAP
ICE
Ikaros
IL-1b
Importin α
INK4B
iNOS
J6 serpin
K2e
K6
k-casein
K-FGF
KOR
Krox-24
L-14
L-34
Lamins A/C
Lefty
Lewis x
LFA-3
Liver/bone/ kidney AP
1-myc
LNGFR
LOX-1
LPL
1-selectin
MAC-1
Major histocompatibility class I
MASH1
Mash-2
MCAD
MCP-1
M-CSF
Mda-6
MDR1
mdr3
Meis2
MK
MLN/ CAB1
MnSOD
MOR
Mox1
mph1
mrp2
MRP-8

Msx-1	PCD5
m Wnt-8	PCDHX
MZF-1	PCDHY
Na, K-ATPase	PEPCK
Na ⁺ / H ⁺ antiporter	PGHS1
N-cadherin	PGHS2
Ndr1	pgp1
NEP	PK
NGFI-B	PKC
NHE-2	PKC β 1
NIS	Placental lactogen
NKX3.2	Plasminogen activator inhibitors 1
nm23-H1	Plasminogen activator inhibitors 2
NMDAR1	pRbAp46
NN8-4AG	proinsulin
nNOS	promyocytic defensin-1
NOR -1	ProT α
NSP-A	Psoriasis
NSP-C	PTHrP
ntcp	RA28
Nur77	Rae-28
Nurr1	Rae-30
Ob	Rb
Oct3	RBP
Oct3/4	RC3
OP	RDH
Osteocalcin	Retinal fascin
Osteonectin	Rex-1
Osteopontin	Rh
OT	RIG
P15	RIHB
P190 GAP-associated protein	RIP140
p21	RIS-1
p34 (CDC2)	RMUC176
P450RAI	Rod-specific opsin
p47-phox	RTP
p53	RTR
p67-phox	S14
p68 kinase	Sar1a
p75NTR	SCCE
PACAP	SCF
PACAP1 receptor	Sgp-2
PACAP2 receptor	SLAP
PAFR	SPA
PAI-1	SP-B
PAI-2	SP-C
P-cadherin	Spr1

SSAT	TM
SSEA-1	TNAP
SSeCS	Topoll
ST3	t-PA
Stem cell factor (Kitl)	TR2-11
Stra 1	TR4
Stra 10	TrkA
Stra 11	Trkb
Stra 3	TrkC
Stra 7	TRP-2
Stromelysin	Ulip
Stromelysin-3	u-PA
Survivin	VACHT
TBR11	Vesicular acetylcholine transporter
TF	Vitronectin receptor
TF CA150	WAF1
TfR	Xlim-1
TGase K	Y1R
TIG1	Zif 268
TIG2	
TIG3	
TIS10	
Tissue factor	

Tomada de Balmer E. James 2002 (Balmer and Blomhoff, 2002).



Pharmacological inhibition of DNA methyltransferase 1 promotes neuronal differentiation from rodent and human nasal olfactory stem/progenitor cell cultures

I. Franco^a, L. Ortiz-López^b, B. Roque-Ramírez^a, G.B. Ramírez-Rodríguez^b, M. Lamas^{a,*}

^a Departamento de Farmacobiología, CINVESTAV-Sede Sur, Ciudad de México, Mexico

^b Laboratorio de Neurogénesis, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2016

Received in revised form 28 January 2017

Accepted 29 January 2017

Available online 1 February 2017

Keywords:

Olfactory epithelium

DNA methylation

Procainamide

Adult neurogenesis

ABSTRACT

Nasal olfactory stem and neural progenitor cells (NOS/PCs) are considered possible tools for regenerative stem cell therapies in neurodegenerative diseases. Neurogenesis is a complex process regulated by extrinsic and intrinsic signals that include DNA-methylation and other chromatin modifications that could be experimentally manipulated in order to increase neuronal differentiation. The aim of the present study was the characterization of primary cultures and consecutive passages (P2–P10) of NOS/PCs isolated from male Swiss-Webster (mNOS/PCs) or healthy humans (hNOS/PCs). We evaluated and compared cellular morphology, proliferation rates and the expression pattern of pluripotency-associated markers and DNA methylation-associated gene expression in these cultures. Neuronal differentiation was induced by exposure to all-trans retinoic acid and forskolin for 7 days and evaluated by morphological analysis and immunofluorescence against neuronal markers MAP2, NSE and MAP1B. In response to the inductive cues mNOS/PCs expressed NSE (75.67%) and MAP2 (35.34%); whereas the majority of the hNOS/PCs were immunopositive to MAP1B. Treatment with procainamide, a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1 (DNMT1), increases in the number of forskolin/retinoic acid-induced mature neuronal marker-expressing mNOS/PCs cells and enhances neurite development in hNOS/PCs. Our results indicate that mice and human nasal olfactory stem/progenitors cells share pluripotency-related gene expression suggesting that their application for stem cell therapy is worth pursuing and that DNA methylation inhibitors could be efficient tools to enhance neuronal differentiation from these cells.

© 2017 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The nasal olfactory mucosa contains, among other cells, neural stem/progenitor cells with the capacity to proliferate and differentiate into new sensory neurons and it is considered a regenerable tissue through life (Schwob et al., 2016). Several studies have evaluated the capacity of nasal olfactory stem/progenitors cells (NOS/PCs) from human and rodent origin to produce neurons *in vitro* (Girard et al., 2011; Zhang et al., 2006, 2004) and their competence for central nervous system (CNS) repair after damage in experimental models and, recently, in clinical trials (Moriwaki et al.,

2014; Tabakow et al., 2013; Wang et al., 2012). Human and rodent NOS/PCs cultures can be easily obtained from epithelial biopsies fulfilling the requirement of accessibility (Benítez-King et al., 2011; Girard et al., 2011; Roisen et al., 2001). However, the cellular heterogeneity of the nasal olfactory mucosa adds a level of complexity to the interpretation of these studies. Most of them evaluate four types of cells belong to olfactory epithelium: horizontal basal (HBCs), globose basal (GBCs), mesenchymal stem (MCS) and olfactory ensheathing cells. These four types of cells present stem cell properties and are capable of producing neurons *in vitro* and *in vivo* (Girard et al., 2011; Schwob et al., 2016; Zhang et al., 2006, 2004), i.e. they can differentiate into several neural lineages (Delorme et al., 2010; Murrell et al., 2005; Zhang et al., 2005) and release trophic factors that may influence the differentiation or survival of surrounding cells (Urdzíkóvá et al., 2014). Potential risks associated to NOS/PCs exploitation in regenerative medicine include low

* Corresponding author at: Departamento de Farmacobiología, CINVESTAV-Sede Sur, Calzada de los Tenorios 235, Ciudad de México, Mexico. Tel.: +52 55 54832876; fax: +52 55 54832863.

E-mail address: mlamas@cinvestav.mx (M. Lamas).

efficiency of transplantation, limited beneficial effects and tumor formation (Nivet et al., 2011). Promoting neural commitment of these cells before transplantation could be a strategy to overcome such risks. Neurogenesis from precursor cells is a response to extra and intracellular cues that trigger multiple epigenetic mechanisms to dictate fate specification (Ma et al., 2010). DNA methylation, the addition of a methyl group at the 5' position of cytosine, is an epigenetic mechanism that contributes to cellular fate determination. DNA methylation is initiated by the *de novo* DNA methyltransferases 3a,b (DNMT3a/b) and cofactor DNMT3L, and maintained by DNA methyltransferase1 (DNMT1) (Feng et al., 2010). In the olfactory epithelium of the adult mice, DNMTs are expressed in a sequential and stage-specific manner during olfactory receptor neuron differentiation (MacDonald et al., 2005). Several studies demonstrated that unspecific DNA hypomethylating agents, such as curcumin or 5-azacytidine, favor neuronal differentiation and survival, as well as neurite development from neural precursors and dental pulp stem cells (Dong et al., 2012; Király et al., 2009). Here, we characterized mice and human NOS/PC cultures evaluating if successive passaging affected pluripotency and DNA-methylation associated gene expression. We found that procainamide, a specific DNMT1 inhibitor, that reduces its affinity for its two substrates: S-adenosylmethionine and hemimethylated DNA but does not inhibit the *de novo* methyltransferases (Lee et al., 2005), enhances neuronal commitment from human and rodent NOS/PCs cultures.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and culture of human nasal olfactory stem/progenitors cells

Isolation of human NOS/PCs was performed as previously described (Benítez-King et al., 2011) and as depicted in Fig. 1. The Ethical Committee of the National Institute of Psychiatry approved the study (CEI/C/084/2015). Prior to exfoliation of the medial lateral turbinate, participants gave their written informed consent to all procedures. The mini-international neuropsychiatric interview and Symptom Checklist-90-R were applied to evaluate participants for signs of psychopathological antecedents. Then, their noses were washed twice (Afrin Pure Sea, Schering Plough) and cleaned with soft tissue paper. Then, cells were obtained from the medial lateral turbinate and the initial part of the superior turbinate by brushing in circular movements in the lateral wall of nasal cavity and septum. Following nasal exfoliation, cells contained in the brush were detached by washing with DMEM-F12 (Gibco) with 10% of fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 UI/ml streptomycin, and 100 UI/ml penicillin (Sigma). The clump of cells was mechanically dissociated, centrifuged ($250 \times g$ for 5 min) and resuspended in DMEM/F12 with 10% FBS and antibiotics.

2.2. Isolation and culture of mice nasal olfactory stem/progenitors cells

Laboratory animals were treated and handled in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and the guidelines of the internal animal care committee (CICUAL-CINVESTAV). The method used was modified from Girard, 2001 (Girard et al., 2011). Swiss Webster male mice (25–30 g; five weeks old) underwent deep anesthesia with sodium pentobarbital, were decapitated and the skin was removed. For isolation of the mouse NOS/PCs, it was necessary to remove the olfactory turbinates cutting the tissue along three lines: the arc of the perpendicular plate, the cribriform plate and the ceiling of the nasal cavity. The biopsies were washed in DMEM-F12 and incubated in dispase II

(Sigma) for 1 h at 37 °C. The tissue was dissociated in collagenase IA (Gibco) for 10 min at 37 °C and washed with phosphate-buffered saline (PBS). The pellet was resuspended in DMEM-F12 with 10% FBS and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The medium was renewed every 3 days until they reached confluence and a weekly cell passage was performed using trypsin/EDTA at 0.25% (Gibco).

2.3. Cell proliferation and viability assay

Cell proliferation and viability were evaluated, in at least three independent experiments, with cell proliferation reagent WST-1 (Roche, Life Science) or with Muse Count and Viability Kit (Merck-Millipore) in a Muse™ Cell Analyzer, respectively.

2.4. Sphere formation and neuronal differentiation of mouse and human nasal olfactory stem/progenitors cells

To generate stem cells spheres, cells were plated in poly-L-lysine treated flasks at a density of 16,000 cells/cm² in serum free DMEM-F12 supplemented with insulin, transferrin, sodium selenite (ITS 1%), epidermal growth factor (EGF, 50 ng/ml) and fibroblast growth factor-2 (FGF2, 50 ng/ml). The medium was changed every 2 days and spheres were obtained after one week.

For neuronal induction cells in passages 2–10 were cultured in DMEM-F12 with 10% fetal bovine serum until adhesion. After 24 h in culture, the media was removed and the cells were cultured in neurobasal medium supplemented with 1% B27 for 2 days. After, the B27 was removed and the cells were cultured in neurobasal with 10 or 20 μM all-trans retinoic acid (RA) and 5 μM forskolin (FSK) for seven days, according to previously described procedures (Boone et al., 2010; Zhang et al., 2006). For DNA methylation inhibition, cells were treated with 1.0 mM, 1.5 mM and 2.0 mM of procainamide (PCA; Sigma) in DMEM-F12 containing 3% FBS for 48 h (Király et al., 2009) before neuronal induction. To evaluate the neuronal differentiation, the expression of MAP1B and MAP2 was detected by immunofluorescence at the end of the neuronal differentiation induction with RA/FSK. The number of neurites was quantified in a confocal laser scanning microscope Zeiss LSM 800 and the length of total neurites per cell were measured in an epifluorescence microscope Zeiss Axiovert 40 CFL. In each experiment, 50 cells were analyzed. Data presented as means ± SEM derived from at least three independent experiments.

2.5. DNA isolation and DNA methylation quantification

Genomic DNA was isolated using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer protocol. Global DNA methylation was quantified using methylated DNA Colorimetric Quantification Kit (Abcam) following manufacturer instructions. One hundred ng of DNA was used per reaction.

2.6. Immunofluorescence

Cells were cultured on poly-L-lysine coated coverslips, fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde at room temperature (RT) and incubated in PBS containing 5% goat normal serum, 3% bovine serum albumin and 0.1% TritonX-100 for 2 h at RT. Primary antibodies nestin (1:200; Millipore), βIII-tubulin (1:1000; Millipore), anti-neuron specific enolase (1:100; Millipore), MAP1B (1:200; Abcam), MAP2 (1:100; Sigma), 5mC (1:200; Diagenode), were incubated overnight at 4 °C. For immunolabeling with 5mC, prior to incubation with the antibody, the cells were treated with 2N HCL for 1 h at 37 °C and 0.1 M of borate buffer for 15 min. After washing, the cells were incubated for 2 h at RT with secondary antibodies: Alexa Flour anti-mouse 488, 568 and anti-rabbit 568 (Invitrogen, 1:500).

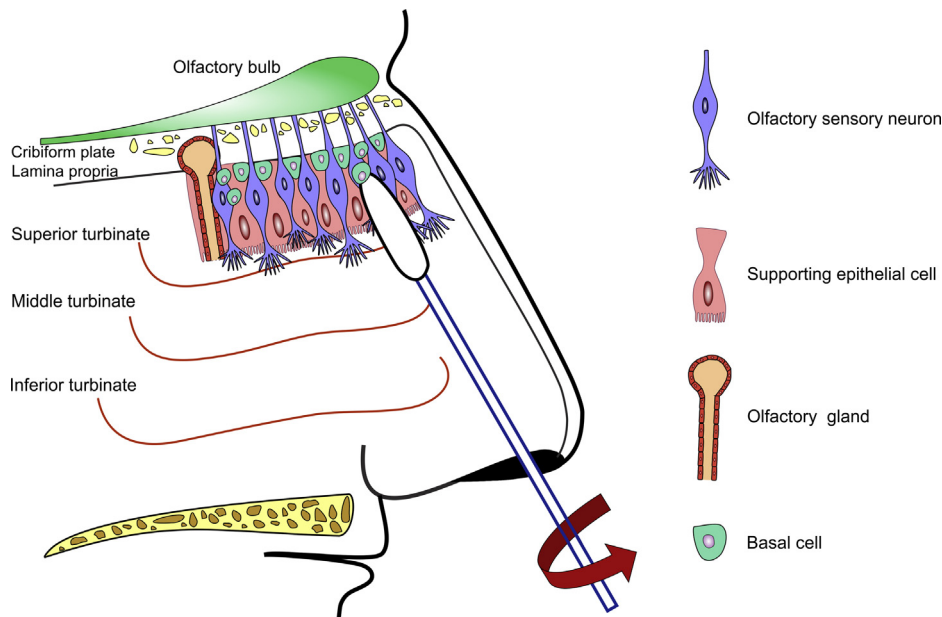


Fig. 1. Schematic drawing of the nasal cavity containing the superior, middle and inferior turbinate. To isolate hNOS/PCs cells were exfoliated from the median lateral turbinate.

Cell nuclei were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) and coverslipped with DABCO. Two hundred DAPI-positive cells were counted, in three different fields for each treatment and 5mC staining was quantified by calculating the optical density in a total of 180 cells from independent experiments.

2.7. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was isolated using TRIzol (Sigma) and cDNA was synthesized using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Specific cDNAs were amplified by PCR over 30–40 cycles using DreamTaq Green DNA polymerase (Thermo Scientific). Mouse primers: *Sox2* F:TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA, R:TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA; *Oct4* F:TCITTTCCACCAGGCCCGGCTC, R:TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC; *Klf4* F:GGCGAGTCTGACATGGCTG, R:GCTGGACGCAGTGTCTTCTC; *Nanog* F:GACTGAGATATGGCTTGCTC, R:CITTTCTGAGGGATAGGTCT; *Lin28* F:AGGCGGTGGAGTTCACCTTAAAGA, R:AGCTTGCATTCCTTGGCATGATGG; *Dnmt1* F:AGCTTGCATTCCTTGGCATGATGG, R:GGCTTGGTCACAAAACAAAC; *Dnmt3a* F:CCAACATCGAATCCATGAAATGGAGG, R:CTGGTGAATGCACTGCAGAAGGAG; *Dnmt3b* F:TGGGTACAGTGGTTTGGTGA, R:GCCCTTGTGTGGTGACTT; *Gadd45a* F:GCGAGAACGACATCAACATCCTGC, R:GCGAGAACGACATCAACATCCTGC; *Gadd45b* F:TCGGCCCTGACATCAGTTTCTG, R:TCGGCCCTGACATCAGTTTCTG; *Gapdh* F:ACTGGCATGGCTTCGGTGTTCCTA, R:TCAGTGTAGCCCAAGATGCCCTTC. Human primers: *Sox2* F:CTCCGGGACATGATCAGC, R:CTGGGACATGTGAAGTCTGC; *Oct4* F:AGCAAAACCCGAGGAGT, R:CCACATCGGCTGTCTATATC; *Klf4* F:GATGGGGTCTGTGACTGGAT, R:CCCCCACTCACGGATATAA; *Nanog* F:CAGCTGTGTACTCAATGATAGATT, R:CAACTGGCCGAAGAATAGCAATGGTGT; *Lin28* F:CTGTCCAATGCAAGTGAAGG, R:GCAGTTGTAGGGTGAATCC; *Dnmt1* F:CGGCTCAAAGATTGGAAG, R:AGGTAGCCCTCTCGGATAA; *Dnmt3a* F:ACCCGACTCATAATGGTGTCTTC, R:CGCATCTGCAAGCTGCTCT; *Dnmt3b* F:CCC-AATCTGGAGGCTATC, R:CGCCTGCAAGTCTGTGT; *Gadd45a* F:TAGTGAGTGCAGAAAGCAG, R:TTTGCTGACACTTCTCCA; *Gadd45b* F:AACATGACGCTGGAAGAGCT, R:AGAAGACTGGATGAGCGTG; *Gapdh* F:AGCCACATCGCTCAGACAC, R:GCCCAATACGACCAATCC. Cycling parameters were 95 °C 1–3 min, 95 °C 30seg, 50–65 °C 30seg and

72 °C 5 min. Images of 2% agarose gels were captured using the LabWorks 4.5 software (BioImaging Systems). Embryonic mice (E10) and human amniotic epithelial cells cDNA was used as positive control. Quantitative PCR was performed with KAPASYBR® FAST qPCR Kit Master Mix Universal (KAPA Biosystems). Gene expression data were normalized to the GAPDH gene using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Quantitative analysis was performed three times on three different cultures.

2.8. Statistical analysis

The data are reported as the means \pm standard error of the mean. The mean differences were compared using un-paired Student's *t* test or one-way ANOVA followed by the appropriate post hoc test. A *P* value of ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Morphological and molecular features of mouse and human nasal olfactory stem/progenitor cells culture

Accordingly to their complex nature, mNOS/PCs primary cultures exhibit morphological heterogeneity one week after tissue explant plating (Fig. 2A and B). Two types of cells are evident, those with a spherical shape and those that appear well adhered and elongated. These morphological characteristics are conserved at passage two (P2) (Fig. 2C and D). The cells grew exponentially until day 7 after plating (Fig. 2E), when approximately 85% of the cells were viable (Fig. 2E, inset). We evaluated the expression of the neural progenitor marker nestin and the early neuronal marker β -III tubulin by immunofluorescence. We found that mNOS/PCs primary cultures express both nestin (82.33%) and β -III tubulin (92.33%) and that marker expression is sustained in P2 (Fig. 2F–J). Similarly, hNOS/PCs can be maintained as exponentially growing primary cultures containing cells that express nestin and β -III tubulin (Fig. 2K–N). Additionally, both cultures could be expanded as neurospheres (Fig. 3). Mice and human spheres were immunopositive for nestin (green) consistent with their progenitor nature. The neuronal lineage restriction of NOS/PCs was probed with β III tubulin (red).

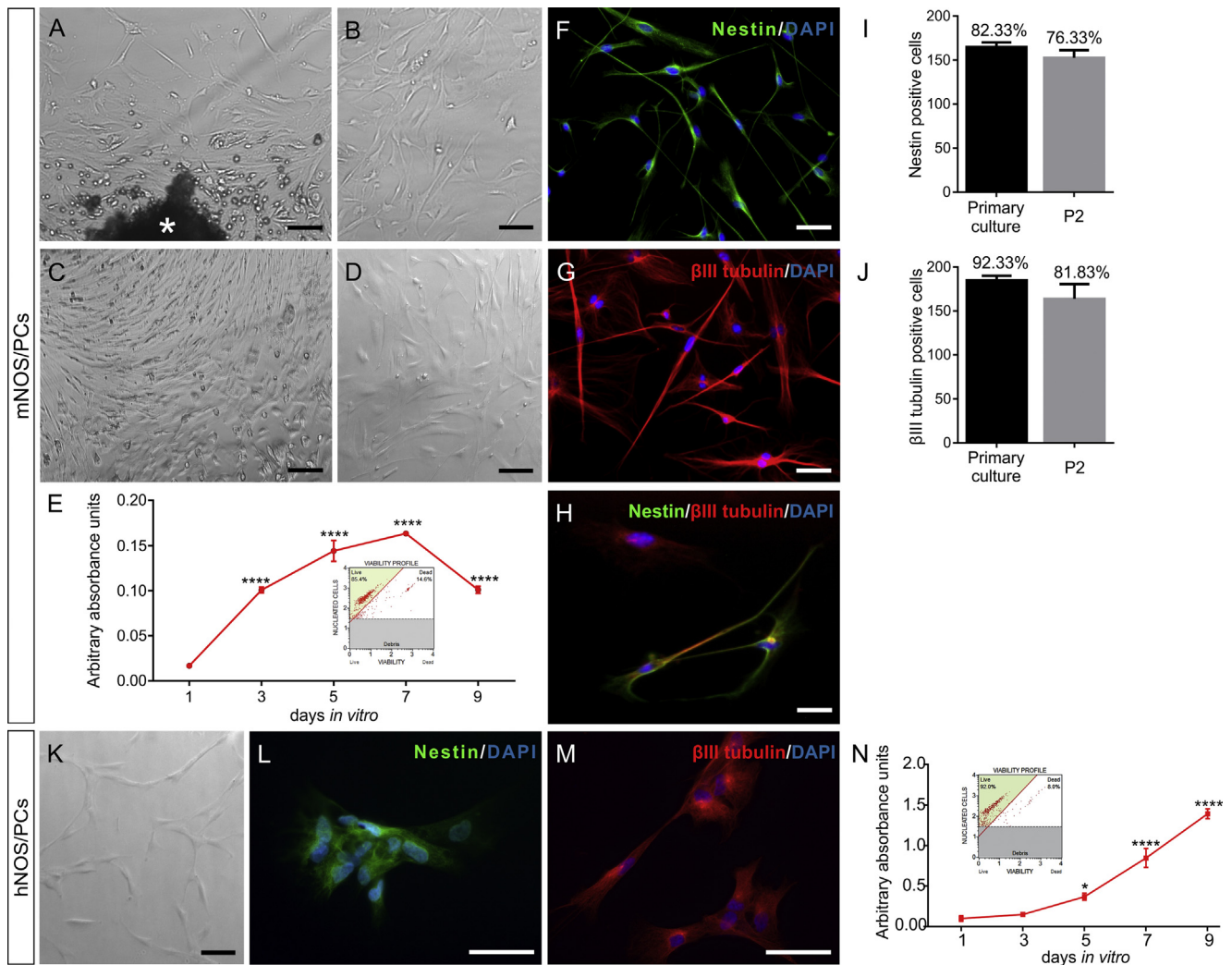


Fig. 2. Mouse and human NOS/PCs culture characterization. (A–D) Bright-field microscopy images of primary (A and B) and P2 (C and D) mNOS/PCs culture. (*) explant. Scale bars: 100 μm (A and C) and 50 μm (B,D). (F–H) Representative images of nestin (green) and β III tubulin (red) immunolabeled in mNOS/PCs. Cell nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 50 μm . (I and J) Quantification of nestin and β III tubulin immunopositive mNOS/PCs in primary culture (black bars) and P2 (grey bars). (E,N) WST-1 cell proliferation and viability assays of P2 mNOS/PCs and hNOS/PCs cultures. Statistical significance was evaluated by one way ANOVA followed by Dunnett's test: * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$ versus D1. (K) Bright-field microscopy representative image of hNOS/PCs after one week in culture (P2). Scale bar: 50 μm . (L and M) Representative images on nestin (green) and β III tubulin (red) immunolabeled hNOS/PCs. Scale bar: 50 μm .

3.2. The expression of pluripotency-associated markers and DNA methylation modifying genes is sustained in mouse and human nasal olfactory stem/progenitor cells culture after passage

The expression of pluripotency-associated markers Sox2, Oct4, Klf4, Nanog and Lin28 was sustained in mNOS/PCs and hNOS/PCs at P2 and P10 (Fig. 4A and D). Variations in the expression level of Sox2 throughout passages were analyzed by QPCR (Fig. 4B and E) showing that, after a peak of expression at early passages (P2 in mNOS/PCs and P4 in hNOS/PCs), Sox2 expression is decreased to a basal level that is sustained at least until P10. We also evaluated the expression pattern of DNA methyltransferases (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) and growth-arrest and DNA damage family genes (Gadd45A and B) that have been previously implicated in DNA demethylation (Kaufmann et al., 2011). The RT-PCR analysis demonstrates that the expression of the five genes is sustained at least until P10 in both cell cultures (Fig. 4C and F).

3.3. Pharmacological inhibition of DNMT1 promotes neuronal differentiation from mouse and human nasal olfactory stem progenitor cells cultures

We used a previously described protocol for NOS/PCs neuronal differentiation (Boone et al., 2010; Zhang et al., 2006) and evaluated the induction of expression of the early (NSE) and late (MAP2) neuronal markers in mNOS/PCs (Fig. 5A). We found that 75.67% of mNOS/PCs exposed to the neuronal inductive cues (RAFSK without pretreatment with procainamide) expressed NSE while only 35.34% expressed MAP2. Thus, to evaluate the effect of the pharmacological inhibition of DNMT1 in mNOS/PCs neuronal differentiation, we subjected the cells to procainamide at a concentration of 1, 1.5 and 2 mM. Cell viability and proliferation assays verified that these procainamide concentrations had no effect on cell culture viability (not shown). Next, we determined by immunofluorescence with antibodies against 5mC and with a methylated DNA Colorimetric Quantification Kit that immunoreactivity to 5mC and the percentage of global methylation presented significant decreases with increasing concentrations of procainamide (PCA 1.0 mM and 1.5 mM: 50% reduction; PCA 2.0 mM: 72% reduction) (Fig. 5B).

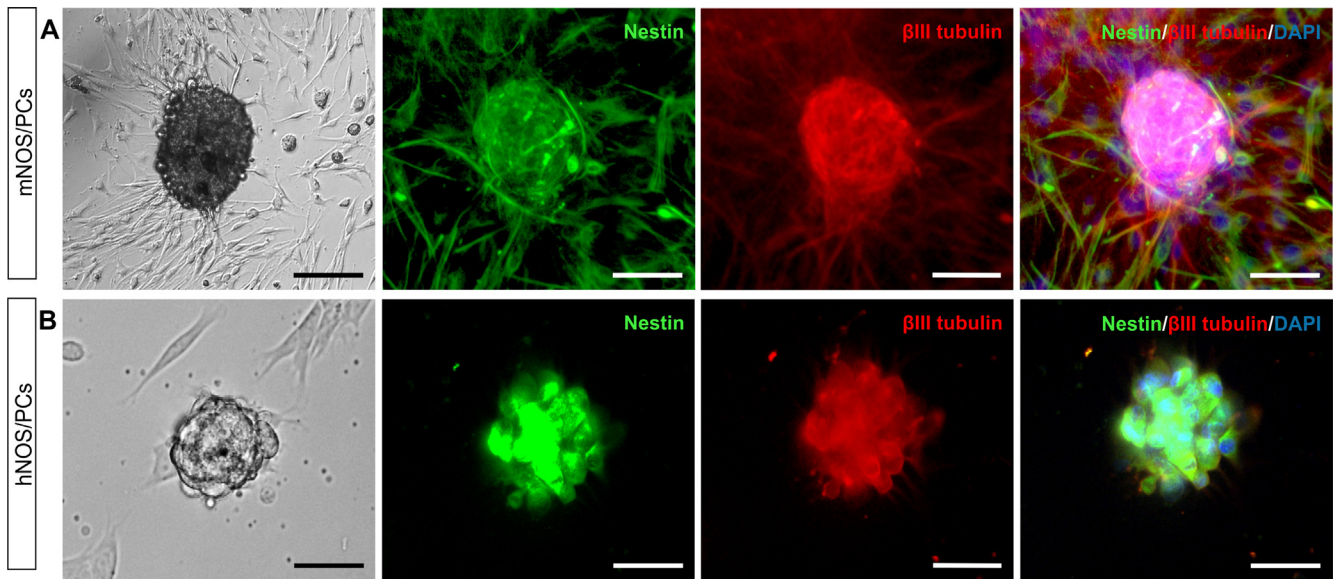


Fig. 3. Nasal Olfactory stem progenitors cells sphere formation assay. Mice (A) and human (B) nasal olfactory stem progenitors cells gave rise to spherical clusters in medium supplemented with ITS and growth factors (*left panels*: bright-field representative images; *right panels*: representative images of nestin (green) and β III tubulin (red) immunolabeled spheres). Nuclear DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar: 50 μ m.

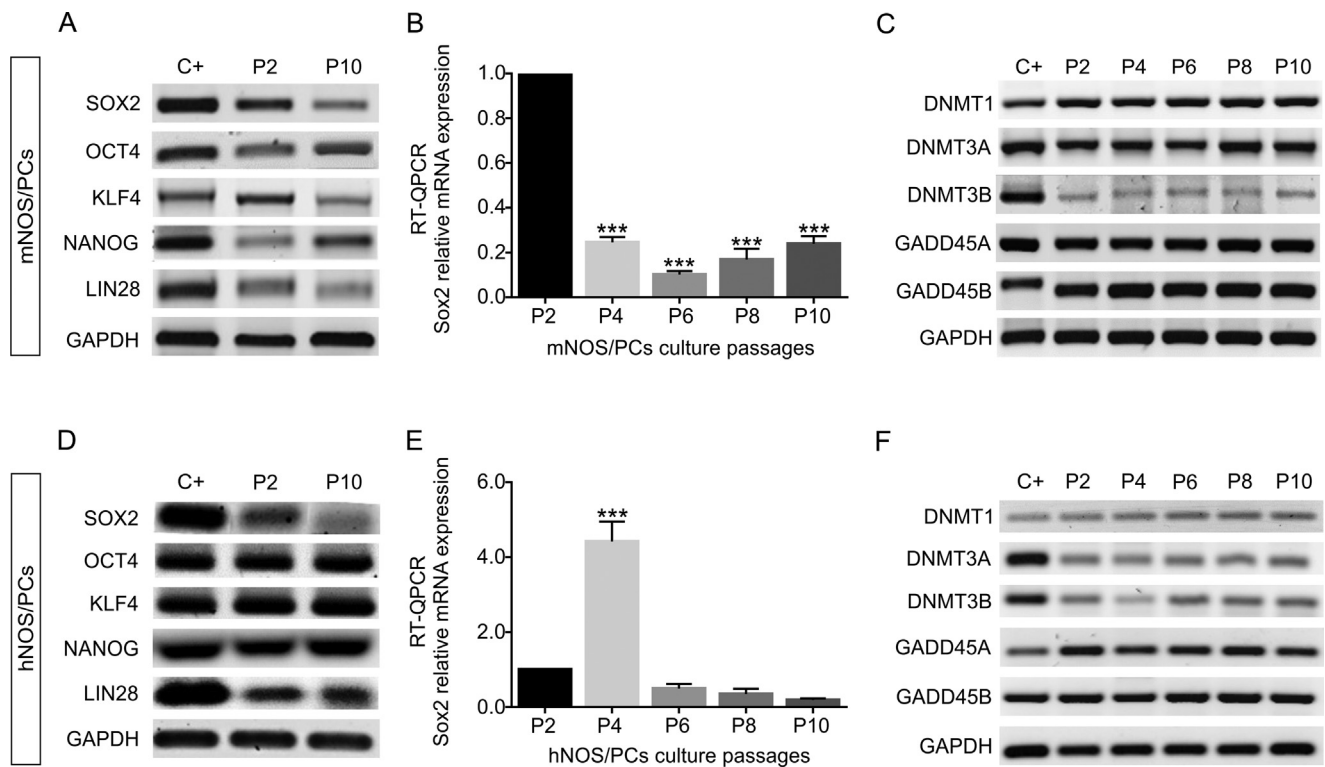


Fig. 4. Pluripotency and DNA methylation/demethylation-associated gene expression profile. (A and D) RT-PCR analysis of Sox2, Oct4, Klf4, Nanog, and Lin28. C+: positive controls: mouse embryo E10 (in mNOS/PCs) and human amniotic epithelial cells (in hNOS/PCs), P: passages 2–10. (B and E) Quantitative QPCR analysis of Sox2 expression in mouse and human NOS/PCs culture passages. Data were normalized to GAPDH and represent the media \pm SEM of at least three different experiments. *** $p < 0.001$ versus P2. (C and F) RT-PCR analysis of Dnmt1, Dnmt3a/3b, Gadd45a and Gadd45b in mNOS/PCs and hNOS/PCs culture passages.

The neuronal differentiation capacity of hNOS/PCs was assessed through the evaluation of the induction of expression of MAP1B. We found that hNOS/PCs primary cultures express negligible levels of MAP1B but strongly induce its expression upon neuronal inductive cues (Fig. 5C). Treatment of hNOS/PCs with procainamide reduces the immunoreactivity to 5mC and the percentage of global methy-

lation (PCA 1.0 and 2.0 mM in approximately 50%, PCA 1.5 mM in 66%) (Fig. 5D).

Under procainamide treatment, the expression of MAP2 and MAP1B significantly increased in RAFSK-treated mNOS/PCs and hNOS/PCs cultures respectively (Fig. 6 A–H). We observed that neuronal differentiated mNOS/PCs cultures presented a restricted

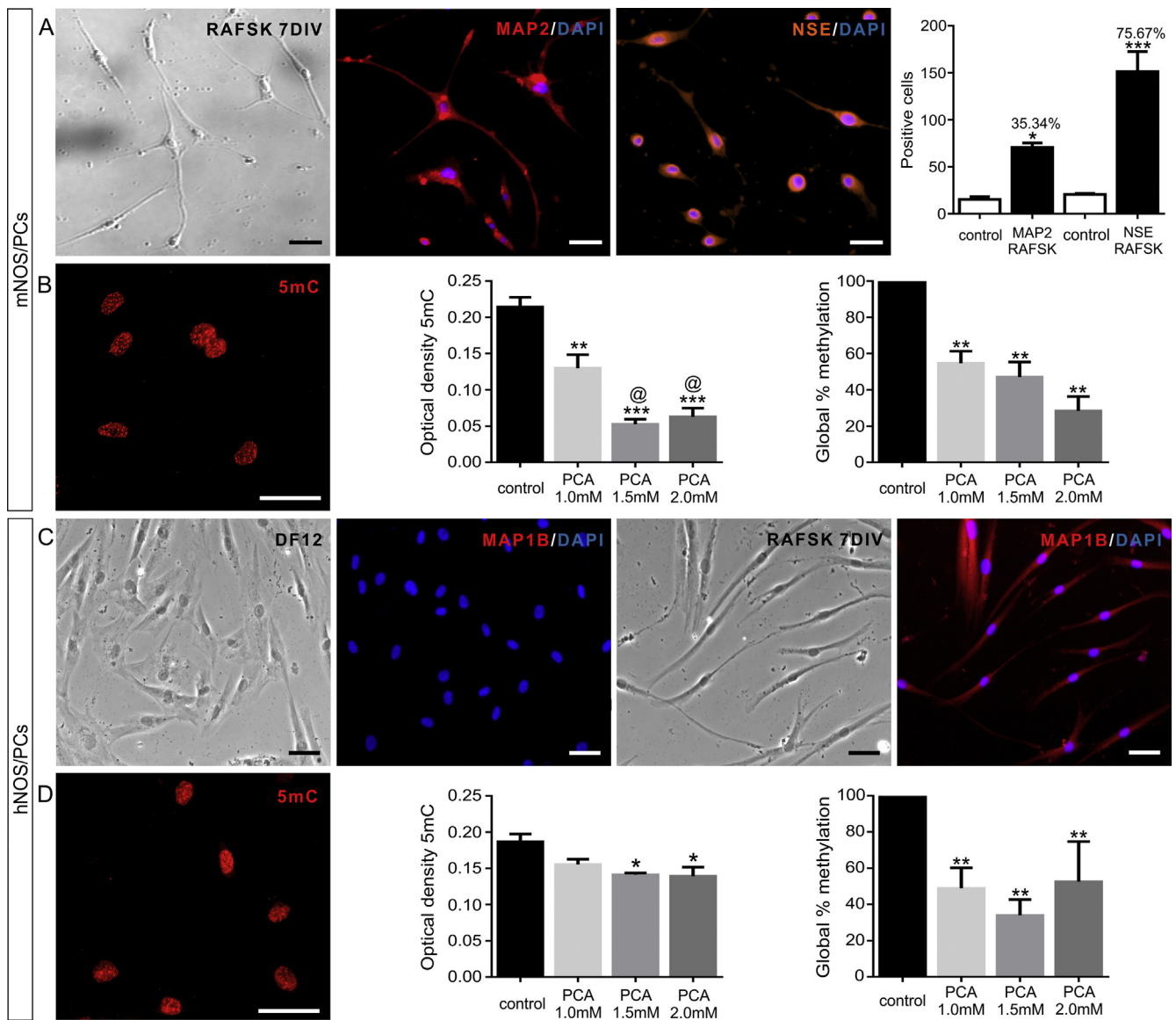


Fig. 5. Neuronal differentiation and DNA methylation inhibition. (A) Representative images of mNOS/PCs cultures grown in the presence of retinoic acid (20 μ M) and forskolin (5 μ M): bright-field (RAFSK), MAP2 and NSE immunolabeled. (Right panel) Quantification of MAP2 and NSE immunopositive cells 7 days after treatment. Nuclei were labeled with DAPI (blue). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus control ($n = 3$). Scale bar: 50 μ m. (B and D) Representative photomicrographs of 5mC (red) immunolabeled mNOS/PCs (B) and hNOS/PCs (D). Scale bar: 50 μ m. Graphs represent optical density for 5mC and global methylation percentage in control and PCA treated groups. Statistical significance for optical density was evaluated by one way ANOVA followed by Tukey's test. Data represent the media \pm SEM of 180 cells counted in three different experiments: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus control group, and @ $p < 0.05$ versus PCA 1.0 mM. Global methylation data represent the media \pm SEM of six independent experiments ** $p < 0.01$ versus control by the Mann-Whitney U-test. (C) Representative bright-field images of hNOS/PCs in control condition (DF12) and seven days after differentiation with 10 μ M of RA and 5 μ M FSK, labeled with MAP1B (red) and counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 50 μ m.

cytoplasmic MAP2 distribution whereas procainamide-treated cells MAP2 immunolabeling revealed an increased number of neurites and branching points (Fig. 6B). In hNOS/PCs, MAP1B immunolabeling was uniformly distributed along the cells independently of the experimental conditions (Fig. 6E and F). However, cellular quantification demonstrated that the number of MAP1B immunopositive cells increases in procainamide treated cultures (Fig. 6G). Finally, a neurite outgrowth analysis revealed a significant increase neurite length in procainamide-pretreated cells (Fig. 6H).

4. Discussion

The purpose of the present study was twofold. First, to evaluate cellular morphology, proliferation, the expression pattern

of pluripotency-associated markers and the neuronal differentiation capacity in primary cultures and successive passages of rodent olfactory epithelium cells and to compare them with human olfactory epithelium cells. Second, to evaluate the effect of DNA methylation blockade in the neuronal differentiation capacity of these cells.

We found that the majority of the cells in exponentially growing primary and in further passages of mNOS/PCs and hNOS/PCs cultures express nestin and β -III tubulin, indicating their commitment to a neuronal lineage. This would be consistent with previously reported data in human olfactory stem cells (Benítez-King et al., 2011; Boone et al., 2010) and in neurospheres-derived from olfactory epithelium obtained from human biopsies that were maintained in culture for several passages (Marshall et al., 2005;

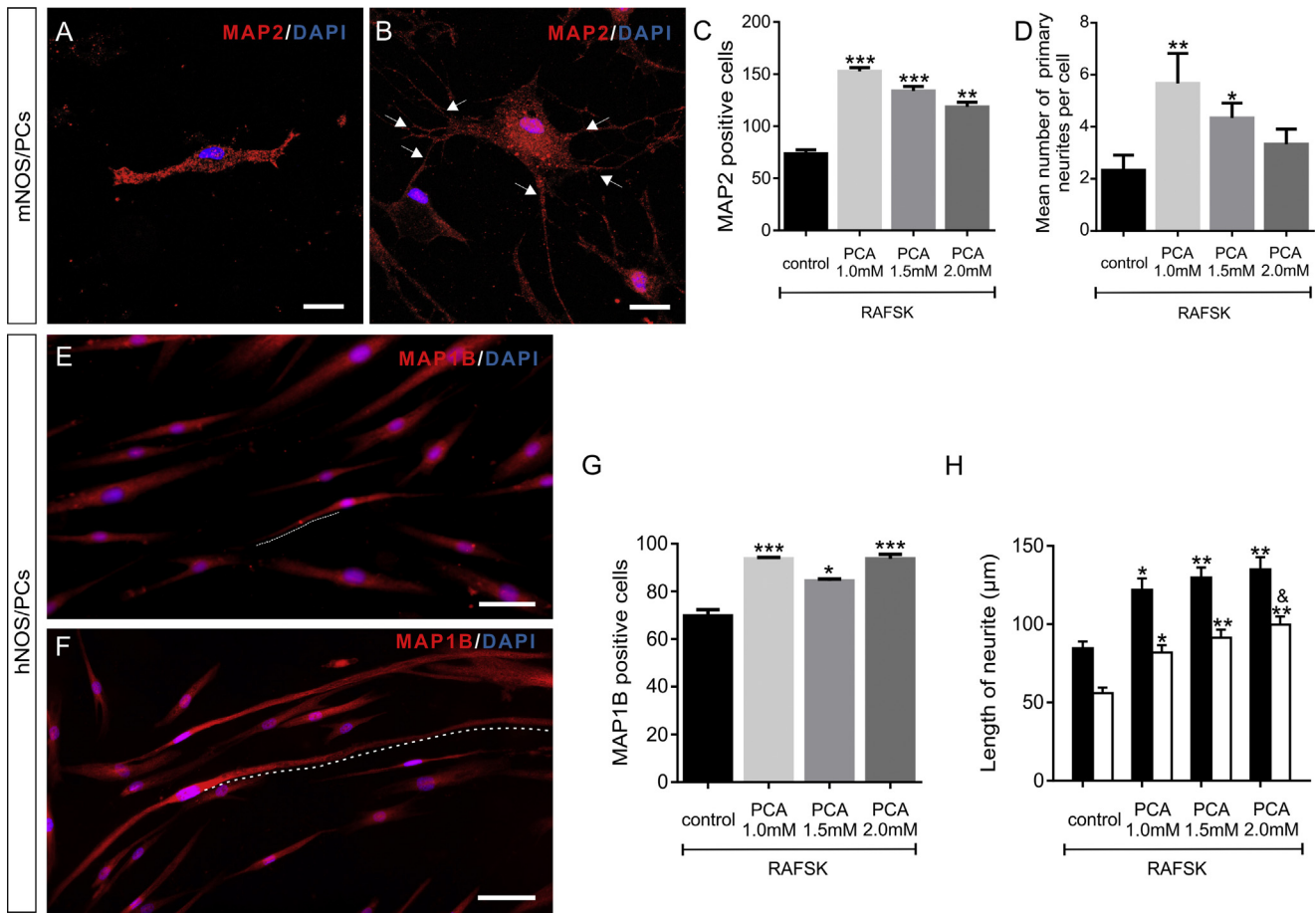


Fig. 6. Procainamide effects on NOS/PCs neuronal differentiation and maturation. Representative confocal images of immunofluorescence for MAP2 in mNOS/PCs 7 days after neuronal induction with RAFSK (A) and RAFSK + PCA (B). Nuclei were labeled with DAPI (blue). Scale bar: 20 μm . (C) Quantification of MAP2 immunopositive mNOS/PCs in control conditions (RAFSK) and procainamide. Data represent the media \pm SEM of 200 immunopositive cells in three different experiments (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus RAFSK). (D) Quantification of number of primary neurites (arrows) per cell in mNOS/PCs after neuronal induction with RAFSK and procainamide (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus control). Images of immunofluorescence for MAP1B in hNOS/PCs after neuronal induction with RAFSK (E) and RAFSK + PCA (F). Dotted lines indicate the trace taken for neurite length. Nuclei were labeled with DAPI (blue). Scale bar: 50 μm . (G) Quantification of MAP1B positive cells in hNOS/PCs in control conditions (RAFSK) and procainamide. Data represents the media \pm SEM of 100 MAP1B positive cells (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ versus control). Statistical significance was evaluated by one way ANOVA followed by Dunnett's test. (H) Quantification of neurite length in hNOS/PCs after neuronal induction. The lengths of the longest neurites were measured in minor axis/short neurite (white bars) and major axis/long neurites (black bars). * $p < 0.001$; ** $p < 0.0001$ versus RAFSK; &#pound; $p < 0.05$ versus RAFSK + PCA 1.0 mM, by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test.

Murrell et al., 2005; Othman et al., 2005b; Roisen et al., 2001; Zhang et al., 2004).

The controversy persists as to whether nasal olfactory mucosa cells satisfy the criteria of self-renewal and multipotency to be classified as bona fide stem cells (Schwob et al., 2016). Here, we evaluated the expression of the reprogramming factors and pluripotency-associated markers Sox2, Oct4, Klf4, nanog and Lin28 (Takahashi and Yamanaka, 2006). We found that mNOS/PCs and hNOS/PCs express pluripotency-related markers at least until P10. Although the expression of these genes is not enough to ensure a pluripotent state of NOS/PCs cultures, it could represent a molecular sustain for the efficacy of transplantation studies. The expression pattern of Sox2 had been previously assessed in human and mice olfactory epithelium cultures and had been found either negligible or present (Guo et al., 2010; Matigian et al., 2010; Tucker et al., 2010). We found that, although Sox2 expression is detectable throughout culture passages, it significantly decreases from P4. It would be interesting to evaluate whether this affects mouse and human nasal olfactory stem progenitor cells differentiation capacity.

Long-term genetic stability of human-derived olfactory mucosa cell cultures has been previously evaluated to assess the effect of variables such as age, sex, donor source and consequences of *in vitro* manipulation that could limit or impair their clinical exploitation. These studies demonstrated that human nasal olfactory cultures maintained a uniform level of viability, proliferation capacity, telomerase activity, clonal capacity and mitotic activity (Marshall et al., 2005; Othman et al., 2005a, 2005b). We now demonstrate that the expression of DNA methylation-associated genes is also sustained during passages. The relevance of these observations is reinforced by the well-established role of DNA methylation in different stages of neurogenesis and makes these genes suitable putative targets to develop tools to modulate the epigenetic profile of NOS/PCs cultures and, therefore, their neuronal differentiation capacity.

DNMT1 is crucial for survival of postnatal neurons (Fan et al., 2001) but DNMT1 ablation does not interfere with neuronal precursor proliferation or differentiation through adult neurogenesis in the dentate gyrus *in vivo* (Noguchi et al., 2015). In the developing mouse retina, DNMT1 gene deletion affects progenitor proliferation, photoreceptor differentiation and neuronal formation (Rhee et al., 2012). Interestingly, the olfactory epithelium retain neu-

rogenic capacity throughout life and respond to yet unidentified tissue-damage inductive cues *in vivo* (Schwob et al., 2016). *In vitro*, culture conditions have been implemented that propitiate cell proliferation (Girard et al., 2011) or neuronal differentiation through exposure to the cells to forskolin and retinoic acid (Boone et al., 2010; Zhang et al., 2006). We here found that procainamide-induced inhibition of DNMT1 function in NOS/PCs cultures leads to partial DNA hypomethylation and that this is sufficient to increase the number of forskolin/retinoic acid-induced mature neuronal marker-expressing cells. This would be consistent with a recently described molecular pathway that leads from an increased DNMT1 expression to a reduction in hippocampal neuronal differentiation in a mouse model of neonatal stress (Boku et al., 2015). Such effect involves a DNMT1-mediated increase methylation at the promoter region of the retinoic acid receptor RAR α . Evaluation of the methylation profile of RAR α through neuronal differentiation would help to understand whether this pathway is also functional in NOS/PCs cultures.

The morphologies of mNOS/PCs and hNOS/PCs are different after neuronal induction. These disparities may obey to the capability of the cells to respond to the inductive cues or to the concentrations used to induce neuronal differentiation. Previous reports have shown that at least hNOS/PCs treated for 7 days with lower concentrations of RA than those used in the present study exhibited more than two primary neurites (Zhang et al., 2006; Boone et al., 2010). However, protocols of differentiation with glutamate for 21 days produce bipolar neurons (Delorme et al., 2010; Girard et al., 2011).

We demonstrated that DNMT 1 inhibition with procainamide favors an increase on the number of mature neurons derived from NOS/PCs cultures caused by RA and FSK treatment *in vitro*. In this sense, it is important to note that the treatment with procainamide *per se* does not change the neuronal differentiation ratio (data not shown). However two challenges still remain: (1) to identify which type of cell within the heterogeneous NOS/PCs culture population is majoritarian; and (2) to evaluate whether the modification of the epigenetic profile of these cultures with procainamide before transplant would result in augmented transplant efficiency and improved behavioral responses in experimental models.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

We thank Antonio Huerta for his technical assistance and to all the members of Dr. Lamas' laboratory. FI and RRB received PhD (243297) and postdoctoral scholarships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Research supported by a Grant from CONACYT (219847) to ML and the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (SIC-2000) to GBRR.

References

- Benítez-King, G., Riquelme, A., Ortíz-López, L., Berlanga, C., Rodríguez-Verdugo, M.S., Romo, F., Calixto, E., Solís-Chagoyán, H., Jiménez, M., Montaño, L.M., Ramírez-Rodríguez, G., Morales-Mullá, S., Domínguez-Alonso, A., 2011. A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *J. Neurosci. Methods* 201, 35–45.
- Boku, S., Toda, H., Nakagawa, S., Kato, A., Inoue, T., Koyama, T., Hiroi, N., Kusumi, I., 2015. Neonatal maternal separation alters the capacity of adult neural precursor cells to differentiate into neurons via methylation of retinoic acid receptor gene promoter. *Biol. Psychiatry* 77, 335–344.
- Boone, N., Loriód, B., Bergon, A., Sbai, O., Formisano-Tréziny, C., Gabert, J., Khrestchatsky, M., Nguyen, C., Féron, F., Axelrod, F.B., Ibrahim, E.C., 2010. Olfactory stem cells, a new cellular model for studying molecular mechanisms underlying familial dysautonomia. *PLoS ONE* 5 (12), e15590.
- Delorme, B., Nivet, E., Gaillard, J., Haupl, T., Ringe, J., Deveze, A., Magnan, J., Sohler, J., Khrestchatsky, M., Roman, F.S., Charbord, P., Sensebe, L., Layrolle, P., Feron, F., 2010. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev.* 19, 853–866.
- Dong, S., Zeng, Q., Mitchell, E.S., Xiu, J., Duan, Y., Li, C., Tiwari, J.K., Hu, Y., Cao, X., Zhao, Z., 2012. Curcumin enhances neurogenesis and cognition in aged rats: Implications for transcriptional interactions related to growth and synaptic plasticity. *PLoS ONE* 7, 1–12.
- Fan, G., Beard, C., Chen, R.Z., Csankovszki, G., Sun, Y., Siniaia, M., Biniszkiwicz, D., Bates, B., Lee, P.P., Kühn, R., Trumpp, A., Poon, C., Wilson, C.B., Jaenisch, R., 2001. DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals. *J. Neurosci.* 21, 788–797.
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S.L., Le, T., Li, E., Sweatt, J.D., Silva, A.J., Fan, G., 2010. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat. Neurosci.* 13, 423–430.
- Girard, S.D., Devèze, A., Nivet, E., Gepner, B., Roman, F.S., Féron, F., 2011. Isolating nasal olfactory stem cells from rodents or humans. *J. Vis. Ex.*, p1–p5.
- Guo, Z., Packard, A., Krolewski, R.C., Harris, M.T., Manglapus, G.L., Schwob, J.E., 2010. Expression of Pax6 and Sox2 in adult olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 518, 4395–4418.
- Kaufmann, L.T., Gierl, M.S., Niehrs, C., 2011. Gadd45a, Gadd45b and Gadd45g expression during mouse embryonic development. *Gene Expr. Patterns* 11, 465–470.
- Király, M., Porcálmay, B., Pataki, Á., Kádár, K., Jelitai, M., Molnár, B., Hermann, P., Gera, I., Grimm, W.D., Ganss, B., Zsembergy, Á., Varga, G., 2009. Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochem. Int.* 55, 323–332.
- Lee, B.H., Yegnasubramanian, S., Lin, X., Nelson, W.G., 2005. Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* 280, 40749–40756.
- Ma, D.K., Marchetto, M.C., Guo, J.U., Ming, G., Gage, F.H., Song, H., 2010. Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.* 13, 1338–1344.
- MacDonald, J.L., Gin, C.S.Y., Roskams, A.J., 2005. Stage-specific induction of DNA methyltransferases in olfactory receptor neuron development. *Dev. Biol.* 288, 461–473.
- Marshall, C.T., Guo, Z., Lu, C., Klueber, K.M., Khalyfa, A., Cooper, N.G.F., Roisen, F.J., 2005. Human adult olfactory neuroepithelial derived progenitors retain telomerase activity and lack apoptotic activity. *Brain Res.* 1045, 45–56.
- Matigian, N., Abrahamsen, G., Sutharsan, R., Cook, A.L., Vitale, A.M., Nouwens, A., Bellette, B., An, J., Anderson, M., Beckhouse, A.G., Bennebroek, M., Cecil, R., Chalk, A.M., Cochrane, J., Fan, Y., Féron, F., McCurdy, R., McGrath, J.J., Murrell, W., Perry, C., Raju, J., Ravishankar, S., Silburn, P.a., Sutherland, G.T., Mahler, S., Mellick, G.D., Wood, S.a., Sue, C.M., Wells, C.a., Mackay-Sim, A., 2010. Disease-specific, neurosphere-derived cells as models for brain disorders. *Dis. Model. Mech.* 3, 785–798.
- Moriwaki, T., Iwatsuki, K., Mochizuki-Oda, N., Ohnishi, Y., Ishihara, M., Umegaki, M., Ninomiya, K., Yoshimine, T., 2014. Presence of trans-synaptic neurons derived from olfactory mucosa transplanted after spinal cord injury. *Spine (Phila, Pa. 1976)* 39, 1267–1273.
- Murrell, W., Féron, F., Wetzig, A., Cameron, N., Splatt, K., Bellette, B., Bianco, J., Perry, C., Lee, G., Mackay-Sim, A., 2005. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev. Dyn.* 233, 496–515.
- Nivet, E., Vignes, M., Girard, S.D., Pierrisnard, C., Baril, N., Devèze, A., Magnan, J., Lanté, F., Khrestchatsky, M., Féron, F., Roman, F.S., 2011. Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions. *J. Clin. Invest.* 121 (7), 2808–2820.
- Noguchi, H., Kimura, A., Murao, N., Matsuda, T., Namihira, M., Nakashima, K., 2015. Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *Neurosci. Res.* 95, 1–11.
- Othman, M., Klueber, K., Lu, C., Winstead, W., Roisen, F., 2005a. Immunomagnetic separation of adult human olfactory neural progenitors. *Biotechn. Histochem.* 80, 177–188.
- Othman, M., Lu, C., Klueber, K., Winstead, W., Roisen, F., 2005b. Clonal analysis of adult human olfactory neurosphere forming cells. *Biotech. Histochem.* 80, 189–200.
- Rhee, K.-D., Yu, J., Zhao, C.Y., Fan, G., Yang, X.-J., 2012. Dnmt1-dependent DNA methylation is essential for photoreceptor terminal differentiation and retinal neuron survival. *Cell Death Dis.* 3, e427.
- Roisen, F.J., Klueber, K.M., Lu, C.L., Hatcher, L.M., Dozier, a., Shields, C.B., Maguire, S., 2001. Adult human olfactory stem cells. *Brain Res.* 890, 11–22.
- Schwob, J.E., Jang, W., Holbrook, E.H., Lin, B., Herrick, D.B., Peterson, J.N., Hewitt Coleman, J., 2016. The stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: talking poietic license. *J. Comp. Neurol.*, <http://dx.doi.org/10.1002/cne.24105>.
- Tabakow, P., Jarmundowicz, W., Czapiga, B., Fortuna, W., Miedzybrodzki, R., Czyn, M., Huber, J., Szarek, D., Okurowski, S., Szewczyk, P., Gorski, A., Raisman, G., 2013. Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell Transplant.* 22, 1591–1612.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Tucker, E.S., Lehtinen, M.K., Maynard, T., Zirlinger, M., Dulac, C., Rawson, N., Pevny, L., Lamantia, A.S., 2010. Proliferative and transcriptional identity of distinct classes of neural precursors in the mammalian olfactory epithelium. *Development* 137, 2471–2481.
- Urdžíková, L.M., Růžička, J., LaBagnara, M., Kárová, K., Kubínová, Š., Jiráková, K., Murali, R., Syková, E., Jhanwar-Uniyal, M., Jendelová, P., 2014. Human

- mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 11275–11293.
- Wang, M., Lu, C., Roisen, F., 2012. Adult human olfactory epithelial-derived progenitors: a potential autologous source for cell-based treatment for Parkinson's disease. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 492–502.
- Zhang, X., Cai, J., Klueber, K.M., Guo, Z., Lu, C., Qiu, M., Roisen, F.J., 2005. Induction of oligodendrocytes from adult human olfactory epithelial-derived progenitors by transcription factors. *Stem Cells* 23, 442–453.
- Zhang, X., Klueber, K.M., Guo, Z., Cai, J., Lu, C., Winstead, W.I., Qiu, M., Roisen, F.J., 2006. Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. *Brain Res.* 1073–1074, 109–119.
- Zhang, X., Klueber, K.M., Guo, Z., Lu, C., Roisen, F.J., 2004. Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined medium. *Exp. Neurol.* 186, 112–123.