



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**“TRASPLANTE DE ASTROCITOS DERIVADOS DEL EPITELIO  
OLFATORIO HUMANO AL CUERPO ESTRIADO EN RATONES  
NEONATOS”**

**TESIS**  
**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**DENISSE VEGA MACKEPRANG**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. ADÁN HERNÁNDEZ CORTÉS**  
**INB, UNAM**

**COMITÉ TUTOR**

**DR. PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO**  
**INB, UNAM**

**DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO**  
**FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM**

**Querétaro, Julio, 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Beca de maestría No: 778780.

Al financiamiento de Proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM IN205321 a AH y IN204520 a AMT y CONACYT A1S7659 a AMT.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM, por otorgar las facilidades y equipamiento necesarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Adán Hernández Cortés, mi tutor, por la dirección de este proyecto, y por su guía y apoyo tanto académico como personal a largo de estos dos años.

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres, titular del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por su dirección e ideas que permitieron desarrollar este proyecto.

Al Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco y el Dr. Hugo Sánchez Castillo, miembros de mi comité tutor, por sus observaciones y críticas constructivas.

A la Dra. Edith Espino Saldaña, técnico académico del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, por su enseñanza teórica y práctica.

A la Dra. Alejandra Castilla León y al M.V.Z. José Martín García Servín, de la Unidad de Bioterio, por el apoyo en el alojamiento y cuidados de los animales utilizados en este proyecto.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y a la Dra. Ericka Alejandra de los Ríos Arellano, de la Unidad de Microscopía, por su asesoría técnica.

A la Dra. Nuri Aranda López, de la Unidad de Enseñanza, por su guía en trámites académicos.

Al Dr. Diego Delgado Álvarez, técnico del CICESE adscrito al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, por las imágenes obtenidas en el confocal.

A mis roomies, mis amigos de la maestría y del laboratorio por su constante apoyo, compañía, empatía y consejos que me dieron la fortaleza para seguir.

A mi familia, en especial a mi mamá y a mi papá, que me acompañaron tanto en los momentos alegres como los tristes, por siempre creer en mí.

## Resumen

El epitelio olfatorio humano (EOh) se distingue por una regeneración continua de las neuronas sensoriales olfativas y las células gliales que persiste hasta la edad adulta. Estos eventos importantes (neuro y gliogénesis) en el EOh, son posibles debido a las células troncales conocidas como células globosas basales (activas) y células horizontales basales (quiescentes). El fácil acceso y obtención de estas células en la cavidad nasal por parte de donantes adultos se considera una gran ventaja. Las células basales del EOh representan una fuente de células progenitoras neurales (NPC, por sus siglas en inglés) que podrían usarse potencialmente en aplicaciones terapéuticas como los trasplantes autólogos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de los astrocitos derivados de NPCs del EOh para sobrevivir y desarrollarse morfológicamente después de ser trasplantados al cuerpo estriado de ratones neonatos. Para lograr este objetivo, las células se transdujeron con un vector de adenovirus que porta el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) y se indujo su diferenciación en astrocitos empleando el medio comercial de diferenciación ScienCell. Posteriormente se trasplantaron al cuerpo estriado de ratones neonatos (P1-3) de la cepa CD1. Los resultados obtenidos muestran la sobrevivencia de estas células al menos dos meses después del trasplante, denotada por la presencia de células GFP<sup>+</sup>. Para evaluar la complejidad de las células trasplantadas se empleó el análisis de Sholl en un curso temporal (Semana 1 a Semana 8). Se observa que las células trasplantadas después de 4 y 8 semanas son más complejas ya que presentan una mayor cantidad de prolongaciones, mismas que incrementan su longitud con el tiempo alcanzando un máximo a las cuatro semanas postrasplante. Adicionalmente, también se observó la expresión del marcador de astrocitos GFAP (proteína ácida fibrilar glial) en las células trasplantadas, lo cual denota que éstas mantienen su identidad astrocítica. Estos resultados nos brindan la información necesaria para estudiar más a fondo a las NPC del EOh como candidatos valiosos para la obtención de astrocitos y su uso en terapia celular para trastornos neurodegenerativos.

## Abstract

The human olfactory epithelium (hOE) is characterized by a continuous regeneration of olfactory sensory neurons and glial cells that persist into adulthood. These notable events (neuro and gliogenesis) in the hOE, are possible due to the stem cells known as the (active) globose and the (quiescent) horizontal basal cells. The easy access to these cells in the nasal cavity of adult human donors is considered a great advantage. Basal cells from the hOE represent a pool of neural progenitor cells (NPC) that could be used in therapeutic applications such as autologous transplants. The aim of this work was to evaluate the potential of human OE NPC-derived astrocytes to survive and morphologically develop after grafting into the striatum of neonatal mice. To achieve this goal, cells were transduced with an adenovirus vector carrying the gen that codes for the green fluorescent protein (GFP) and their differentiation into astrocytes was induced using the commercial ScienCell differentiation medium. Subsequently, the cells were transplanted into the striatum of neonatal P1-3 CD1 mice. The results obtained show the survival of these cells at least two months after transplantation, denoted by the presence of GFP<sup>+</sup> cells. To evaluate the complexity of grafted cells, Sholl analysis was used through a time course (week 1 to week 8). It was observed that the grafted cells after 4 and 8 weeks are more complex since they present a greater number of processes, and these processes increased their length throughout time reaching a maximum at 4 weeks posttransplant. Additionally, grafted cells expressed the astrocytic marker GFAP (glial fibrillar acid protein), showing that hOE cells maintain their astrocytic identity after transplantation. These results provide information necessary to further study hOE NPCs as valuable candidates for obtaining astrocytes and their use in cell therapy for neurodegenerative disorders.

## Abreviaturas

<b>AdV-GFP</b>	Adenovirus que porta el gen para la proteína verde fluorescente
<b>AF 594</b>	Alexa Flúor 594
<b>ALDH1L1</b>	Aldehído deshidrogenasa familia 1 miembro L1
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM/F12</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EOh</b>	Epitelio olfatorio humano
<b>FBS</b>	Suero Fetal Bovino
<b>GBC</b>	Células basales globosas
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>HBC</b>	Células basales horizontales
<b>hESC</b>	Células troncales embrionarias humanas
<b>iPSC</b>	Células troncales pluripotentes inducidas
<b>NeuN</b>	Proteína nuclear neuronal
<b>NPC</b>	Células progenitoras neurales
<b>P1-3</b>	Día posnatal 1 al 3
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PT</b>	Postrasplante
<b>S1(2,3,4,8)</b>	Semana 1, 2, 3, 4 o 8
<b>S100β</b>	Proteína B de unión al calcio S100
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>Sox2</b>	SRY homology box

# Índice

Resumen .....	3
Abstract .....	4
1. Introducción .....	7
2. Antecedentes .....	10
3. Justificación .....	13
4. Hipótesis .....	13
5. Objetivos .....	14
5.1. <i>Objetivo General</i> .....	14
5.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	14
6. Materiales y Métodos .....	14
6.1. <i>Cultivos primarios de células progenitoras del epitelio olfatorio humano</i> .	14
6.2. <i>Diferenciación en astrocitos y transducción viral</i> .....	15
6.3. <i>Xenotrasplante</i> .....	15
6.4. <i>Histología y adquisición de imágenes</i> .....	17
6.5. <i>Análisis de Sholl</i> .....	19
6.6. <i>Inmunohistoquímica</i> .....	19
6.7. <i>Análisis estadístico</i> .....	20
7. Resultados .....	21
7.1. <i>Diferenciación y transducción de las NPC del EOh</i> .....	21
7.2. <i>Curso temporal del xenotrasplante</i> .....	21
7.3. <i>Análisis de Sholl para las células trasplantadas</i> .....	26
7.4. <i>Inmunodetección de GFAP</i> .....	28
8. Discusión .....	30
9. Conclusiones .....	33
10. Referencias .....	34
Índice de figuras .....	38

## 1. Introducción

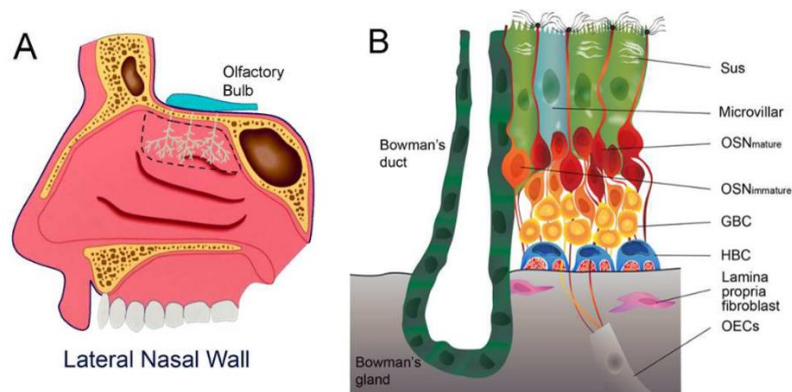
En años recientes se ha incrementado el interés en las terapias celulares debido a que se consideran una estrategia terapéutica novedosa para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Tang et al., 2017). En la terapia celular se reemplazan las células dañadas y/o muertas con células nuevas que poseen capacidades regenerativas o de restitución. Comúnmente las células trasplantadas son células troncales o diferenciadas.

Las células troncales tienen la capacidad de autorrenovarse y de convertirse en múltiples linajes celulares. Según su potencial de diferenciación, estas células pueden clasificarse en: totipotentes, aquellas que pueden dar lugar a todos los tejidos del cuerpo, los tejidos extraembrionarios y la línea germinal; pluripotentes, las cuáles pueden diferenciarse en todas las células del cuerpo pero no en tejido extraembrionario; multipotentes, células que se desarrollan en varios tipos de células especializadas presentes en un tejido u órgano específico y, por último, las unipotentes dan lugar a células de un único linaje. Las células progenitoras son descendientes de las células troncales, pueden ser multipotentes o unipotentes y tienen una capacidad limitada de autorrenovación (Jafek, 2002; Benítez-King et al., 2016; Martínez & Noctor, 2018; Zakrzewski et al., 2019).

En el sistema nervioso de mamíferos adultos, la neurogénesis y la gliogénesis son eventos que ocurren a lo largo de la vida de un organismo y se concentran en nichos específicos en el sistema nervioso central (SNC). Se encuentran principalmente en la zona subventricular de la pared lateral del ventrículo lateral y la zona subgranular en el hipocampo. A nivel periférico, un nicho neurogénico de gran importancia se encuentra en el epitelio olfatorio (EO). Debido a su ubicación relativamente desprotegida en la cavidad nasal, las células del EO son susceptibles a daños por exposición a toxinas, agentes infecciosos o traumatismos. Esto activa a las células progenitoras del EO para reemplazar las células de este epitelio que se perdieron (Schwob, 2002; Frisén, 2016; Child et al., 2018).



El epitelio olfatorio humano (Fig. 1) se localiza en la parte superior de la cavidad nasal y está especializado en la percepción del olor. Desde la región más externa hasta la más interna, el EO está conformado por: células sustentaculares (SUS) y células microvellosas que proveen de sostén, las neuronas sensoriales olfativas (OSN) maduras e inmaduras responsables de la detección de olores, glándulas de Bowman, las células basales horizontales y globosas (HBC y GBC) y por último, las células olfatorias envoltantes (OEC), las cuáles son morfológica y funcionalmente parecidas a las células de Schwann (Chen et al., 2014; Schwob et al., 2016; Lavoie et al., 2017).



**Figura 1.** Representación esquemática del epitelio olfatorio humano. **A)** Ubicación del EO en la pared nasal lateral. **B)** Principales constituyentes celulares del EO (Schwob et al., 2016).

Las células HBC y GBC representan la población progenitora neural (NPC, por sus siglas en inglés) del EO que se encargan de restituir al epitelio olfatorio a lo largo de la vida del mamífero adulto. Las HBC son una población quiescente y de reserva caracterizada por una lenta replicación y autorrenovación. Se ha reportado que se activan cuando existe un daño tisular y pueden regenerar algunos tipos de células epiteliales. Por otro lado, las GBC son las principales células progenitoras del EO, dan lugar mayormente a OSN y células SUS. Existen trabajos donde se evalúa la capacidad multipotencial de estas NPC logrando su diferenciación *in vitro* tanto en neuronas como en células gliales (Beites et al., 2005; Schwob et al., 2016; Minovi et al., 2017; Herrick et al., 2017; Jiménez-Vaca et al., 2018).

Las células gliales más abundantes del SNC son los astrocitos. Estas células están involucradas en varios eventos que sirven para el correcto funcionamiento del

SNC, como regulación de la sinaptogénesis, el control de la actividad sináptica, la secreción de factores tróficos, homeostasis de iones (el mantenimiento del pH extracelular), formación de la barrera hematoencefálica, entre otras funciones (Matias et. al, 2019; Westergard & Rothstein, 2020) .

A lo largo de los años se ha determinado una heterogeneidad de los astrocitos basada en su origen, morfología, fisiología y metabolismo. Se pueden identificar a través de la detección de proteínas específicas de astrocitos como proteína ácida fibrilar glial (GFAP), glutamina sintetasa (GS), los transportadores GLAST, la proteína de unión al calcio S100 $\beta$  y aldehído deshidrogenasa familia 1 miembro L1 (ALDH1L1) (Parpura et al., 2009; Chai et al., 2017). Esta heterogeneidad también se ha observado entre diferentes regiones del SNC. Recientemente, Chai et al., (2017) demostraron que los astrocitos del estriado y el hipocampo murino difieren morfológica, funcional y molecularmente. En este estudio descubrieron que los astrocitos del estriado ocupan un mayor espacio, pero los territorios de astrocitos del hipocampo presentan contactos físicos más estrechos con sinapsis excitadoras. A nivel funcional, mostraron diferentes dinámicas de señalización de Ca<sup>2+</sup> y acoplamiento de uniones estrechas (mayor expresión de Conexina 43 en astrocitos del hipocampo). Los análisis de transcriptómica y proteómica revelaron que los astrocitos del hipocampo y del estriado son poblaciones celulares molecularmente distintas ya que la proteína con mayor expresión en los astrocitos del estriado fue  $\mu$ -cristalina (gen: *Crym*) y para los del hipocampo fue GFAP (gen: *Gfap*).

En otro estudio se observó que la atenuación de las señales de Ca<sup>2+</sup> de los astrocitos del estriado reduce los niveles tónicos de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en el espacio extracelular y consecuentemente la corriente GABAérgica. Esto resulta en la alteración de la actividad de las neuronas espinosas medianas (MSN) y el circuito neuronal que a su vez aumento el número de MSN correlacionadas para la conducta de acicalamiento excesivo, reflejando que los ratones presentan anomalías funcionales a nivel estriado (Yu et al., 2018).

Con estos estudios se determinó que los astrocitos juegan un papel muy importante en el cuerpo estriado y que los déficits en estas células tienen un impacto en el correcto funcionamiento de los circuitos neuronales de dicha área.

En el proyecto aquí presentado, se estudió el potencial de sobrevivencia y dispersión de astrocitos derivados de las NPC del EOH en el estriado murino.

## **2. Antecedentes**

Actualmente existe una gran cantidad de estudios en los que se ha logrado exitosamente el trasplante de células troncales y/o progenitoras en diferentes áreas del SNC en modelos murinos, tanto en organismos sanos como en modelos de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson.

De los trabajos más recientes sobre terapia celular destaca un trabajo en el cual Xiong y colaboradores (2020) encontraron que las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (mDA) derivadas de células troncales embrionarias humanas (hESC, por sus siglas en inglés) al ser trasplantadas en el estriado y la sustancia nigra, son capaces de integrarse anatómicamente y funcionalmente al circuito nigro-estriatal resultando en la recuperación de la conducta inducida en ratones a través del modelo de hemi-Parkinson evaluado con Rotarod y conducta de giro.

Para el trasplante de NPC se han empleado principalmente hESC y células troncales pluripotentes inducidas (iPSC), las cuales presentan limitantes como el rechazo por incompatibilidad inmune. Sin embargo, en años recientes han surgido estudios donde se obtienen células progenitoras neurales a partir del EOH debido a la facilidad de obtención (Benítez-King et al., 2011) y en comparación con las otras células troncales/progenitoras no presentan limitantes como implicaciones éticas y formación de tumores (Goldman, 2016; Li et al., 2020). El trasplante de estas células se ha realizado en el sistema nervioso, desde la médula espinal hasta el hipocampo.

Actualmente, los estudios que existen sobre trasplantes realizados de células del epitelio olfatorio emplean a las células troncales ecto-mesenquimales olfatorias (OE-MSCs) presentes en la lámina propia. Estas células poseen capacidades pluripotentes mientras que las células empleadas en este trabajo son multipotentes, sin embargo, comparten varias características morfológicas y funcionales.

En un estudio indujeron a las células troncales derivadas de la mucosa olfatoria humana adulta a diferenciarse en células que presentan fenotipos similares a las de las neuronas dopaminérgicas *in vitro* e *in vivo* después de ser trasplantadas

en el estriado lesionado de un modelo de hemi-Parkinson (HP) en ratas. Finalmente, a nivel funcional observaron una mejora en las pruebas de conducta rotacional (Murrell et al., 2008).

En un estudio similar, Wang et al. (2012) realizaron trasplantes de células progenitoras del EOH en un modelo de ratas Parkinsonianas y concluyeron que el microambiente de la sustancia nigra puede influenciar a estas células para convertirse en células funcionales, estables y liberadoras de dopamina que sobreviven al largo plazo sin formación de tumores y reducen los déficits de comportamiento.

Por otra parte, existen estudios que han demostrado la multipotencialidad de las NPC del EO, tanto de las HBC como de las GBC. Un estudio realizado por Durante y colaboradores (2020) con la técnica de secuenciación de ARN de célula única, demostró que tanto las células del EO de ratones como de humanos adultos presentan el gen SOX2 (marcador altamente expresado en las NPC). En otros trabajos han observado que pueden diferenciarse no solamente en neuronas sino también en células gliales (células de Schwann y astrocitos). La identificación de las células en diferentes etapas de diferenciación se ha realizado mediante técnicas de inmunohistoquímica utilizando marcadores como  $\beta$ -III tubulina y NeuN para las neuronas y GFAP y S100 $\beta$  para neuroglia (Carter et al., 2004; Ohnishi et al., 2013; Grégory et al., 2020).

El trasplante de astrocitos derivados de células troncales ha sido un área de interés relativamente nueva con resultados favorables ya que se ha observado que pueden integrarse a las redes gliales y neuronales ya existentes. Han y colaboradores (2013) crearon ratones quiméricos con células progenitoras gliales humanas (hGPC) obtenidas de fetos de 12 a 22 semanas. Las hGPC fueron xenotrasplantadas al prosencéfalo de ratones en el día posnatal 1 (P1) y observaron la integración de la glía humana en el cerebro del ratón, presentando morfologías típicas de astrocitos humanos. De manera interesante, estos astrocitos no solo lograron incorporarse a las redes neurales del prosencéfalo, hipocampo y corteza sino también propagaron la señal de Ca<sup>2+</sup> tres veces más rápido, mejoraron la

potenciación sináptica de largo plazo (LTP) e incrementaron el aprendizaje de los ratones que se determinó en el laberinto de Barnes.

Con la finalidad de determinar el potencial neurogénico y la capacidad de diferenciarse de las células de cuerpos embrioides (EB) provenientes de hESC, Maya-Espinosa y colaboradores (2015) trasplantaron dichas células a sitios neurogénicos (vía rostral migratoria [RMS]) y no neurogénicos (cuerpo estriado) del cerebro de ratas neonatales así como al estriado de ratas adultas con una lesión isquémica. Lo que observaron fue que, en el cuerpo estriado neonatal, a diferencia de la RMS, se promueve la diferenciación astrocítica de las células de EB, probablemente a expensas de la diferenciación neuronal. Cabe resaltar que la lesión promovió la aparición de un microambiente que favoreció la neurogénesis y las células de los EB pudieron detectar este cambio. Los autores concluyeron que es importante conocer las condiciones adecuadas del microambiente en las que se realizará el trasplante para promover la sobrevivencia y diferenciación específica de las células que se trasplantarán.

Recientemente ha surgido el interés en trasplantar células troncales junto con astrocitos ya que al ambiente desfavorable creado por el incremento de reacciones inflamatorias que se genera después de realizar un trasplante. Partiendo de esta premisa, Song et al. (2018) cotrasplantaron astrocitos del mesencéfalo medial (VM), que coexpresan los factores neurotróficos Nurr1 y Foxa2, junto con VM-NPC al cuerpo estriado en modelos de ratas adultas HP (hemi-Parkinson). Los efectos del cotrasplante en este estudio permitieron el cambio del ambiente en el cerebro huésped, logrando así la supervivencia de las NPC trasplantadas, su diferenciación en neuronas dopaminérgicas, maduración neuronal e integración sináptica y mejora en la conducta de las ratas HP en un periodo de 6 meses después del trasplante. Finalmente, los autores concluyeron que su trabajo indica que el cotrasplante de astrocitos sea usado como una opción de terapia celular para Parkinson.

Nuestro equipo de investigación ha logrado exitosamente el xenotrasplante de las NPC del EOh al cuerpo estriado de ratones adultos. Las células trasplantadas sobreviven hasta al menos 10 semanas, presentan desplazamiento dentro del cuerpo estriado y del cuerpo calloso y sus arborizaciones se incrementan con el paso del tiempo (Leyva-López, Tesis de maestría en proceso).

Adicionalmente, en el laboratorio se ha establecido un protocolo que permite la diferenciación de astrocitos *in vitro* a partir de células NPC del EOh empleando diferentes medios de diferenciación. Los resultados obtenidos muestran que los astrocitos así generados presentan fenotipos típicos de estas células y expresan los marcadores GFAP, ALDH1L1 y S100 $\beta$  (Arellano-Contreras José Rodrigo, Tesis de maestría, UNAM, 2022).

### **3. Justificación**

Entre los numerosos candidatos para terapia celular del SNC, las células progenitoras neurales del epitelio olfatorio humano representan una muy buena opción debido a que son fáciles de colectar, mantener en cultivo y a que poseen capacidad multipotente.

En la literatura existen estudios que reportan la diferenciación neuronal y glial de las células progenitoras del EOh, sin embargo, no hay trabajos en los que se haya realizado la diferenciación de dichas células en astrocitos.

Nuestro interés en estas células gliales radica en que los astrocitos cumplen un papel muy importante en el funcionamiento de circuitos neuronales y recientemente se ha destacado su participación en diversas patologías del SNC. Esto resalta la importancia de desarrollar proyectos para estudiar las características de los astrocitos humanos trasplantados a una región neurotrófica como el núcleo estriado.

El estriado ha sido ampliamente utilizado como un sitio óptimo para el trasplante de diversos tipos de células neurales, por lo que representa un blanco idóneo para determinar la sobrevivencia y desarrollo de los astrocitos humanos generados en el presente proyecto.

### **4. Hipótesis**

Las células con identidad de astrocitos derivadas de células progenitoras del EOh, sobreviven y se desarrollan morfológicamente a largo de dos meses al ser trasplantadas en el cuerpo estriado del ratón.

## **5. Objetivos**

### **5.1. Objetivo General**

Determinar la sobrevivencia de los astrocitos derivados de células progenitoras del EOh trasplantados al estriado de ratones neonatos.

### **5.2. Objetivos Específicos**

- Inducir la diferenciación en astrocitos de las células progenitoras del EOh y su transducción con un adenovirus que porta el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (AdV-GFP).
- Xenotrasplantar las células diferenciadas y transducidas en el cuerpo estriado de ratones neonatos.
- Evaluar la integridad e identidad de las células trasplantadas mediante un análisis fenotípico y de reconocimiento de marcadores de linaje celular por inmunofluorescencia en un curso temporal determinado.

## **6. Materiales y Métodos**

### **6.1. Cultivos primarios de células progenitoras del epitelio olfatorio humano**

Se utilizaron células progenitoras del epitelio olfatorio de donadores sanos, colectadas en el laboratorio de la Dra. Benítez-King. Las células del EOh se mantuvieron en congelación (-80°C) en un medio de criopreservación DMEM F-12 (FBS 20%, glutamina 1%, anti/anti al 1%, DMSO 7%). La descongelación de las células se realizó aproximadamente una semana antes del xenotrasplante. Para descongelar las células, los viales fueron colocados en baño maría a 37°C y posteriormente se colocó la suspensión celular en frascos de cultivo T-25 a los cuáles se les adicionó 5 ml de medio DMEM F-12 con FBS al 10%, pre-equilibrado en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Alrededor de 4 a 12 horas después, se cambió al medio DMEM F-12 suplementado con FBS 10%, glutamina al 2% y antibiótico/antimicótico (estreptomicina, anfotericina B, penicilina) 100X al 1%.

Posteriormente se realizaron 1 o 2 pases para permitir la propagación y supervivencia de las células. Para un pase se realizó un lavado con PBS 1X,

posteriormente se incubaron 10 minutos con tripsina para desprender las células del sustrato y finalmente se colocó medio DMEM F-12 suplementado y se sembró la cantidad de células calculada en frascos T-25 para proceder a la diferenciación y la transducción.

## **6.2. Diferenciación en astrocitos y transducción viral**

La diferenciación en astrocitos de las células y su transducción viral se realizaron en un periodo de 72 horas antes del trasplante los sujetos que recibieron el trasplante fueron utilizados entre 1 y 3 días de edad (P1 a P3).

Para la diferenciación de las células progenitoras del EOh en astrocitos se añadieron 5 ml del medio de diferenciación astrocítica ScienCell Astrocyte Medium (AM) a los frascos de cultivo T-25, la elección de este medio se basó en los resultados obtenidos por Rodrigo Arellano (Tesis de Maestría, UNAM, 2022).

Las células fueron transducidas con un vector viral (adenovirus) que porta el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (AdV-GFP) bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). La transducción se realizó con la finalidad de poder detectarlas después del trasplante. En el trabajo de maestría en proceso desarrollado por Brenda Leyva se determinó la cantidad de partículas virales requeridas que permiten un 80% de eficiencia de transducción de la proteína GFP en estas células, por tanto, se agregaron al medio de cultivo una suspensión viral a razón de  $4.3 \times 10^3$  partículas virales por célula.

## **6.3. Xenotrasplante**

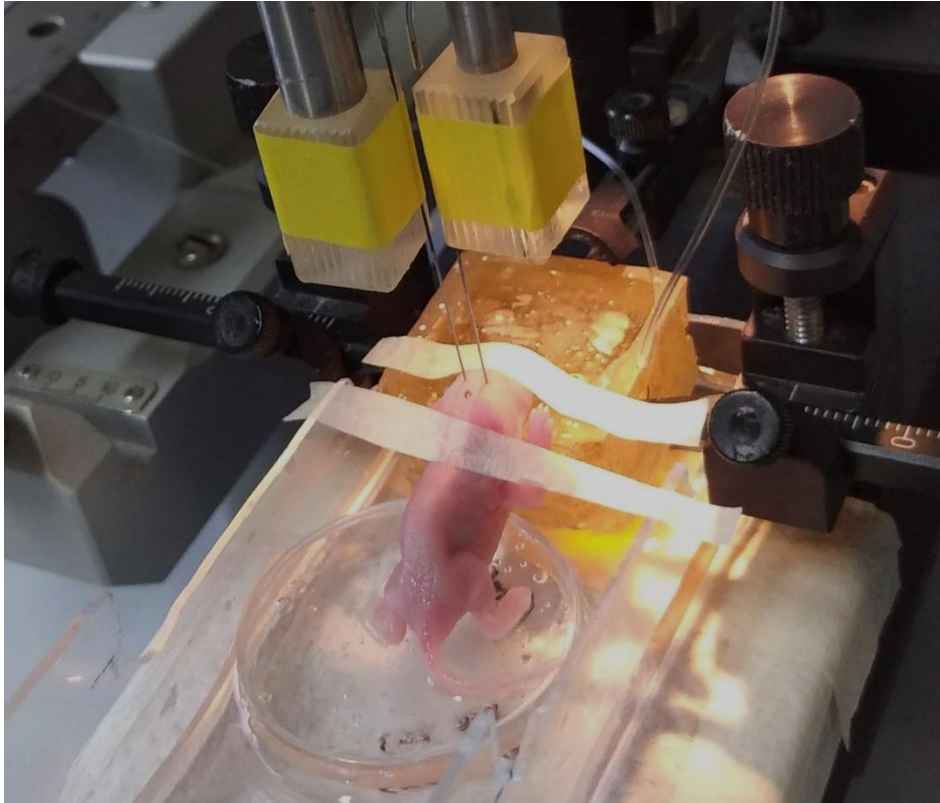
El xenotrasplante de las células diferenciadas y transducidas con AdV-GFP al cuerpo estriado del ratón neonato se realizó por medio de cirugía estereotáxica.

Se emplearon ratones macho de la cepa CD1 con un rango de edad entre P1 y P3, provenientes del bioterio del Instituto de Neurobiología, alojados en cajas de acrílico y cama de aserrín, mantenidos en ciclo luz/obscuridad 12 h a 24°C, con agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos del bioterio se apegan a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el manejo de animales de experimentación y el protocolo de experimentación número 120.A fue aprobado por el comité ético de la investigación del INB.



Para realizar el trasplante se empleó como base el protocolo descrito por Chen, Kuo, & Liu (2018). Los pasos por seguir fueron los siguientes:

- Se realizó la anestesia por hipotermia que es recomendada para ratones neonatos. Para la inducción se colocó al ratón en un dedo de un guante de látex y se sumergió en hielo hasta el cuello durante 5 min. Se pinchó una pata o la cola para asegurarse de que estuviese anestesiado. Finalmente, se colocó al ratón en el marco estereotáxico con hielo a su alrededor durante toda la cirugía.
- Se preparó el área de cirugía estéril limpiando con etanol al 70% y se aseguró de tener todo el material necesario previamente esterilizado.
- Una vez posicionado el ratón, se localizó lambda en el cráneo y se marcó. Se colocó la punta de la aguja en lambda y se establecieron las coordenadas anterior-posterior (AP) y medial-lateral (ML) en cero.
- Se movió el brazo de inyección al sitio objetivo (estriado) de acuerdo con las coordenadas X e Y del sitio objetivo. Para el cuerpo estriado de las crías entre P1 y P3, las coordenadas son: AP, +2.4 mm anterior a la lambda; ML,  $\pm 1.1$  mm lateral desde la línea media; dorsal-ventral (DV), -3.0 mm desde el cráneo (modificado de Chen, Kuo & Liu, 2018).
- Las cánulas de inyección de 30G se bajaron lentamente hasta que alcanzaron la coordenada DV del sitio de destino. Se esperó 1 minuto para permitir que el parénquima recupere su forma normal (Fig. 2).
- La velocidad de inyección establecida fue de 200 nL cada 1.5 min. En cada hemisferio se depositó un 1  $\mu$ L de la suspensión celular en PBS 1X y en una concentración aproximada de 50,000 células/ $\mu$ L.
- Al finalizar la inyección en ambos hemisferios se dejaron pasar 5 min para retirar la aguja y asegurar que la mayoría de las células se liberaran y se depositaran en el sitio de interés.
- Finalmente, se colocó al ratón durante 10-15 min en una incubadora a 33°C. Su recuperación de la anestesia por hipotermia se comprobó cada 5 minutos hasta que el ratón recuperó la movilidad suficiente para mantener el decúbito esternal. Después de que se recuperó por completo, se regresó al ratón a la nodriza.



**Figura 2.** Cirugía estereotáxica en un ratón macho neonato. Se muestra el equipo estereotáxico adaptado para realizar el trasplante en ratones neonatos con un adaptador de resina para fijar la cabeza del ratón y por debajo de la base se coloca el hielo para que permanezca anestesiado.

#### **6.4. Histología y adquisición de imágenes**

Posterior al trasplante de las células diferenciadas y transducidas se realizó un seguimiento temporal para determinar la presencia y el destino de las células. Transcurridos los tiempos PT establecidos (una, dos, tres, cuatro y ocho semanas [n=4]) se obtuvieron rebanadas del estriado para detectar las células trasplantadas mediante microscopía de fluorescencia. El procesamiento del tejido se describe a continuación:

- Los ratones de una a tres semanas de edad PT fueron anestesiados por inhalación con isoflurano, mientras que los de cuatro y ocho semanas fueron anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico en una concentración de 10  $\mu$ l 30 g administrada vía intraperitoneal.
- Posteriormente, se perfundieron intracardiamente con 10-30 mL de PBS 1X. Los, seguido de 30 mL de PFA 4% (esto último únicamente

para los ratones de cuatro y ocho semanas). Mientras que los cerebros de ratones más jóvenes fueron extraídos y fijados por inmersión con PFA 4%. Los ratones de 4 y 8 semanas fueron perfundidos con 30 mL de PFA 4%.

- Se procedió a extraer el cerebro y colocarlo en viales con 15 mL de PFA 4% a 4 °C por 24 hrs para la post-fijación del tejido.
- Después los cerebros fueron colocados en sacarosa al 20% por 24 hrs y posteriormente en sacarosa al 30% por 24 hrs.
- La sacarosa permite la preservación del tejido para su procesamiento en el criostato. Se empleó el criostato (Cryostat Leica CM3050) para obtener rebanadas coronales de 50 µm en las que se encontraba la zona de interés (cuerpo estriado). Las rebanadas se recolectaron en portaobjetos.
- Finalmente, el tejido, protegido de la luz, se tiñó con DAPI (1:10,000) para observar los núcleos celulares, se agregó el medio de montaje Mowiol y se colocó un cubreobjetos. Las muestras se almacenaron a 4°C.

La adquisición de las imágenes de las células xenotrasplantadas en el cuerpo estriado se realizó con el microscopio para epifluorescencia (Zeiss Axio Imager, Zeiss Group, Alemania). Para la adquisición de imágenes panorámicas se utilizó el módulo MosaiX con los canales activados para visualizar tanto DAPI (emisión= 405 nm) y GFP (emisión= 488 nm). Las imágenes panorámicas se obtuvieron para detectar la ubicación de las células trasplantadas en las rebanadas coronales del estriado.

A continuación, se utilizó el microscopio confocal (Zeiss LSM 780 DUO) para adquirir imágenes a lo largo del eje Z (Z Stack) con los objetivos de 25x, 40x y 63x de las células trasplantadas aisladas y en el estriado para visualizar a detalle la morfología que adquieren las NPC después del xenotrasplante. También se utilizó un microscopio confocal LSM Olympus FV1000 para la obtención de imágenes de las células trasplantadas con DAPI.

## **6.5. Análisis de Sholl**

Para determinar la complejidad morfológica adquirida de las células trasplantadas en el curso temporal establecido se realizó el análisis de Sholl con el programa Neurolucida.

El análisis de Sholl genera un conjunto de esferas concéntricas anidadas centradas en el cuerpo de la celda. Las esferas aumentan de tamaño por un cambio constante en el radio ( $r$ ) que se determinó de  $5\ \mu\text{m}$ . Neurolucida Explorer determina la esfera más grande para encerrar todo lo que se cuenta.

El punto central del análisis de Sholl es el centro del soma. El centro se encuentra examinando todos los cuerpos celulares y encontrando el centroide de cada uno. El promedio de todos los centroides se usa luego como punto central.

El centroide es el punto de equilibrio. Si se ha trazado el cuerpo de la célula en varios planos focales diferentes, se calculan varios centroides. El promedio de los centroides es el promedio de cada coordenada.

En los resultados del análisis se obtiene una tabla con los siguientes datos: Radio, cada radio corresponde a una capa; Intersecciones, el número de intersecciones entre el proceso y la esfera en el radio dado y Longitud, que corresponde a la longitud total de todos los procesos que pasan por una esfera.

Para las gráficas se emplearon los datos de radio/distancia/longitud ( $\mu\text{m}$ ) y número de intersecciones para 10 células trasplantadas por cada semana.

## **6.6. Inmunohistoquímica**

Para determinar si las células mantuvieron su linaje astrocítico después de ser trasplantadas, se realizó un marcaje por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo primario anti-GFAP anti-mouse Santa Cruz® y el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (AF 594) anti-mouse Thermofisher®. Se siguió el protocolo de inmunofluorescencia para rebanadas montadas ya estandarizado en el laboratorio (Pétriz et al., 2014).

Se emplearon rebanadas coronales del estriado de 3 ratones de S2, S4 y S8 PT. Dichas rebanadas se encontraban previamente montadas en portaobjetos. Para

comenzar se realizaron tres lavados con PBS 1X. Las rebanadas se permeabilizaron utilizando PBS 1X + Tween-20 (PBST) al 0.1% para después incubar las muestras con suero de bloqueo (PBS 1X + 0.3% Tritón X-100 + 2% de BSA) durante 30 minutos. Hecho esto, se agregó el anticuerpo primario anti-GFAP (1:200) y se dejaron en incubación a 4 °C por 24 hrs. Las muestras fueron lavadas con PBST, se les agregó el anticuerpo secundario AF 594 (1:200) y se dejaron en incubación durante dos horas.

Después de varios lavados con PBS 1X, las muestras fueron contrateñidas con DAPI (1:10,000). Finalmente se colocó el medio de montaje Mowiol y se almacenó a 4°C durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo se procedió a tomar fotografías de las laminillas en el microscopio confocal (Zeiss LSM 780 DUO).

Se empleó el programa Zen Blue para la edición y análisis de las fotografías de las inmunos positivas donde se observó el doble marcaje GFP/GFAP.

### **6.7. Análisis estadístico**

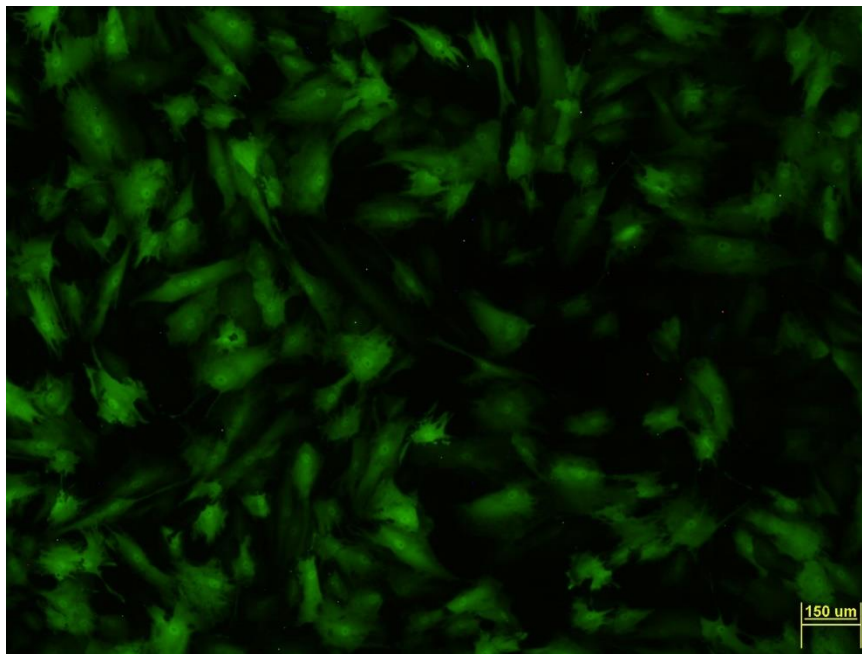
El análisis estadístico y la elaboración de las gráficas se realizó con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software v. 5). Los datos obtenidos se analizaron con el método de Sholl y se les aplicó primero la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Posteriormente, se aplicaron las pruebas estadísticas como análisis de varianza (ANOVA) de una vía con la prueba Tukey post-hoc o en su caso, Kruskal Wallis con la prueba Dunns post-hoc. La diferencia estadística fue considerada cuando se alcanzó un nivel de confianza del 95 % ( $p < 0.05$ ), los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media.

## 7. Resultados

### 7.1. Diferenciación y transducción de las NPC del EOh

La diferenciación en astrocitos y transducción viral de las células progenitoras del EOh se logró exitosamente, basándose en los resultados obtenidos en las tesis de maestría de Rodrigo Arellano (cambios morfológicos evidentes después de tres días de inducción de la diferenciación) y Brenda Leyva (eficiencia de transducción viral en estas células). En la Fig. 3 se observan, mediante microscopía de epifluorescencia, estas células 48h después de la inducción de su diferenciación en astrocitos y su expresión de la GFP a través de la transducción con AdV-GFP.

Las células se mantuvieron en el medio de diferenciación astrocítica ScienCell e incubadas con AdV-GFP en un periodo de entre 3 y 5 días antes del xenotrasplante en los ratones neonatos (P1-P3).



**Figura 3.** NPC del EOh 48h después de su inducción de diferenciación en astrocitos y su transducción viral con AdV-GFP.

### 7.2. Curso temporal del xenotrasplante

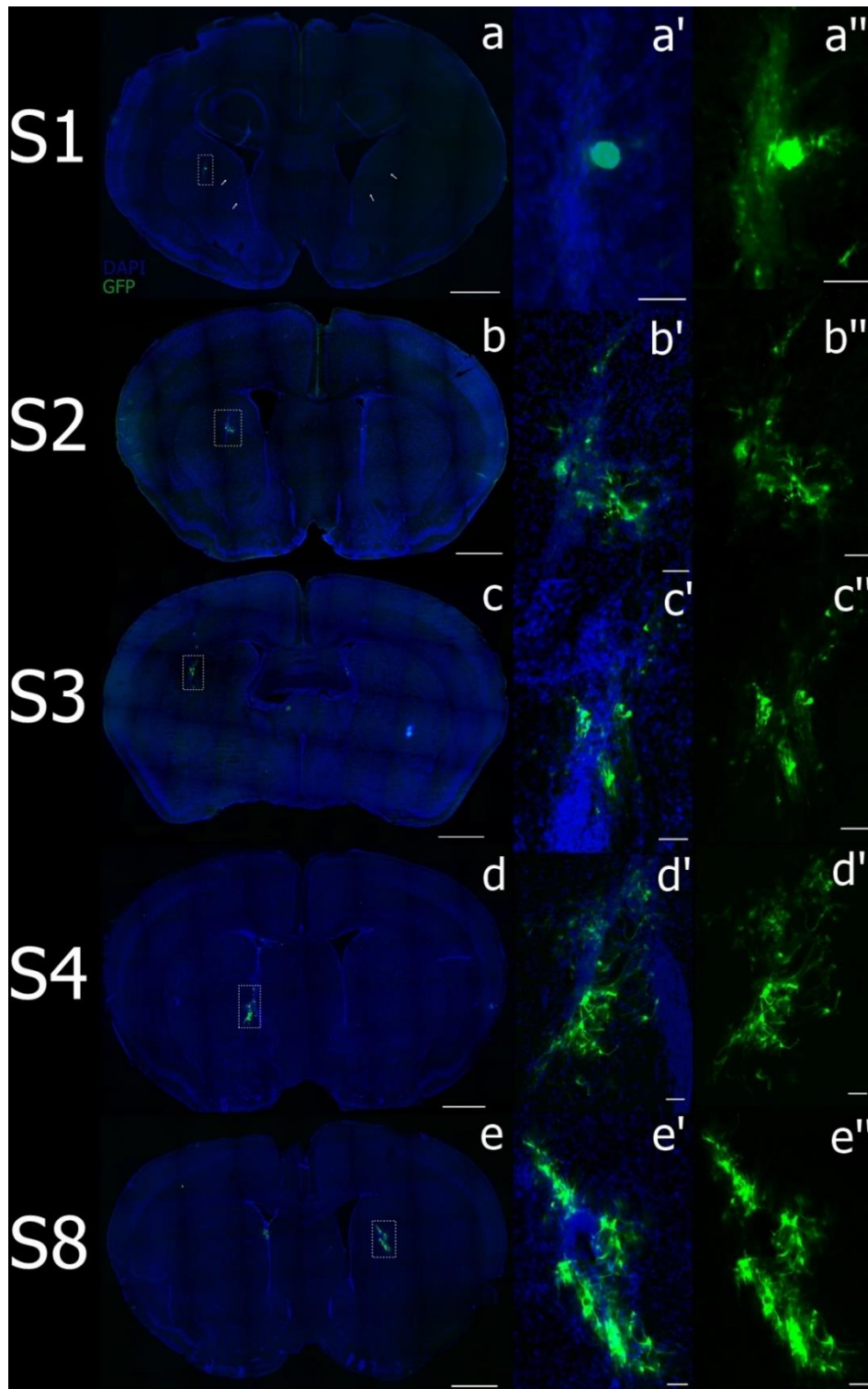
Para determinar la sobrevivencia y desarrollo de las células trasplantadas se obtuvieron los cerebros de los ratones (n=4) una, dos, tres, cuatro y ocho semanas (S1-S4 y S8) postrasplante (PT).

Se obtuvieron imágenes panorámicas de los cortes coronales a lo largo del cuerpo estriado para cada semana PT con una cámara acoplada a un microscopio de epifluorescencia. En la Fig. 4 se muestra una imagen panorámica representativa para cada semana PT con sus respectivas ampliaciones digitales en presencia y en ausencia de DAPI, para visualizar mejor las células trasplantadas que son detectadas por la fluorescencia de la GFP.

En la S1 PT (Fig. 4a-a”) la mayoría de las células se encuentran aglomeradas y confinadas en una región delimitada del estriado. En la Fig. 4a se pueden observar los estriosomas tópicos de esta región (señalados en la figura). En este caso se trata de una región posterior del estriado ya que se evidencia la formación del hipocampo. En las muestras para la S1 PT prevaleció la distribución de las células en cúmulos que se identificaron por la fluorescencia emitida. Las células que no se encontraban en cúmulos presentaron pocas y cortas prolongaciones que fueron posibles de detectar con el microscopio de epifluorescencia y después con el confocal.

Cabe resaltar que se observaron células trasplantadas en otras regiones del SNC como el ventrículo lateral, el cuerpo caloso, el globo pálido y el tálamo en cualquier tiempo de PT (S1-S8). Esto puede ser debido a la dificultad técnica de precisión para la inyección de las células ya que el equipo estereotáxico fue adaptado para realizar los trasplantes en ratones neonatos, sin embargo, no es posible fijar la cabeza con la misma precisión que a los ratones adultos. Otra razón que se sugiere es que las células estén presentando mecanismos que les permitan migrar, sin embargo, para comprobar dicho comportamiento se requieren realizar otros experimentos con inhibidores de migración celular.

Para la S2 PT (Fig. 4 b-b”) se puede distinguir que las células se encuentran más separadas y distribuidas dentro del estriado en comparación con la primera semana PT. Esto se evidenció aún más en rebanadas de las S3, S4 y S8 PT, por lo que, se podría especular que las células presentan una mayor dispersión dentro del estriado conforme aumenta el tiempo postrasplante. Adicionalmente, las células de S4 y S8 PT presentaron una mayor complejidad y variedad morfológica en comparación con las células observadas en las primeras semanas PT.



**Figura 4.** Curso temporal del xenotrasplante de las células progenitoras del EOH diferenciadas en astrocitos transducidas con AdV-GFP (en verde) en el estriado de ratones neonatos. Para cada semana PT se muestra una imagen panorámica representativa de un corte coronal a nivel del estriado con la región de interés (ROI), la ubicación de las células trasplantadas, delimitada en un recuadro (a-e). Por cada panorámica se obtuvo la amplificación digital del ROI en presencia (a'-e') y ausencia de DAPI (en azul) (a''-e''). Escala: 1000  $\mu\text{m}$  (a-e) y 50  $\mu\text{m}$  (a'-e' y a''-e'').



Posteriormente, para poder observar a detalle los fenotipos morfológicos adquiridas por las células trasplantadas en cada semana PT se adquirieron imágenes de microscopía confocal.

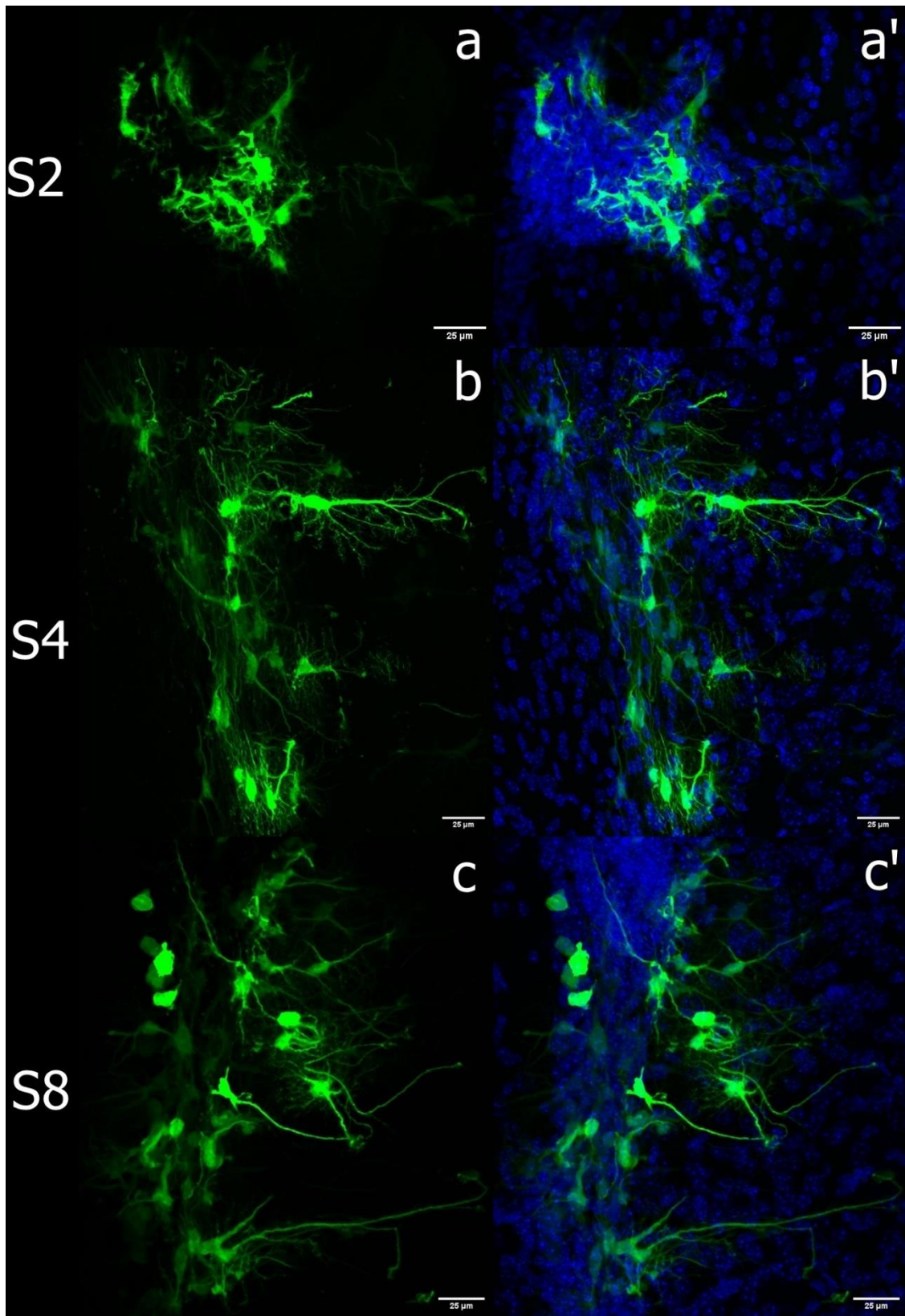
Se realizaron proyecciones en Z a partir de una secuencia de imágenes obtenidas en el microscopio confocal a diferentes planos focales. Finalmente, se obtuvo la reconstrucción bi y tridimensional de las células trasplantadas en muestras de S1 a S8 PT. En la Fig. 5 se representan reconstrucciones de Z-stacks realizadas en ImageJ para células ubicadas en el estriado de S2, S4 y S8 PT.

Para la semana 2 PT (Fig. 5 a-a') se observó que la mayoría de las células seguían aglomeradas, presentando morfologías sencillas denotadas por procesos cortos y reducidos en cantidad. Sin embargo, para las semanas 4 y 8 PT (Fig. 5 b-b' y 5 c-c', respectivamente), las morfologías que presentan las células trasplantadas son más complejas ya que se observan un mayor número de procesos y con longitudes mayores con respecto a las primeras semanas (S1-S3).

Cabe resaltar que los fenotipos de las células, no solo es diferente en los diferentes tiempos PT. También mostraron diferencias dependiendo de la zona del estriado en la que las células se depositaron. Por ejemplo, para aquellas células que se encontraban cerca o en la pared del ventrículo lateral presentaron proyecciones muy largas que parecen extenderse hacia el estriado (Fig. 5 c).

Estas imágenes sirvieron para realizar el análisis de Sholl, de células trasplantadas que se encuentran aisladas con Con la finalidad de elucidar la complejidad morfológica adquirida por las células semanas después del trasplante, las células que se encontraban aisladas, se analizaron con el método de Sholl.

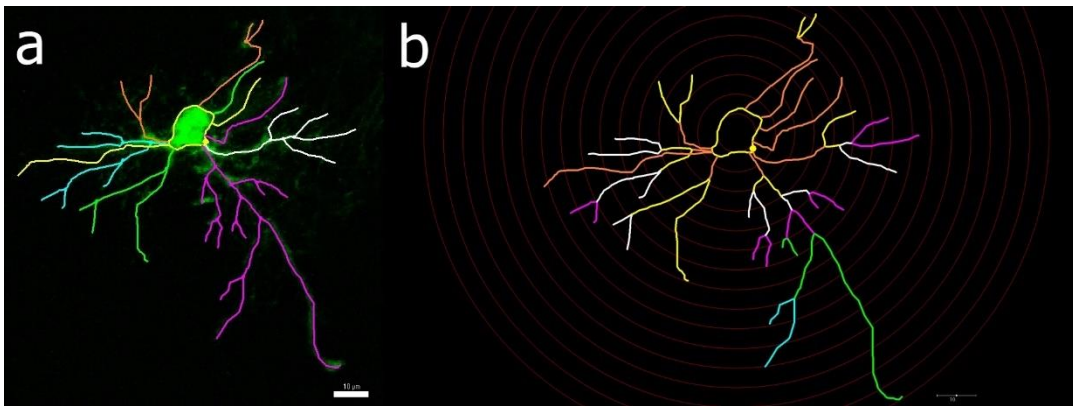
Considerando que en el trabajo realizado por Brenda Leyva (Tesis de MC en proceso) en donde el trasplante de las NPC sin diferenciar en ratones adultos también demostró la capacidad de sobrevivencia y desarrollo, se sugiere que estas células son buenas candidatas para la terapia celular en el SNC por su capacidad de sobrevivir y dispersarse en una región considerada como no neurogénica (el estriado) y adicionalmente por su multipotencialidad que les permite dirigirse tanto al linaje neuronal como al glial.



**Figura 5.** Fenotipos morfológicos de NPC del EOH diferenciadas en astrocitos y trasplantadas al estriado de ratones neonatos. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal de muestras obtenidas de ratones procesados 2, 4 y 8 semanas después del xenotrasplante. En verde las células con GFP y en azul los núcleos teñidos con DAPI. Escala: 25 µm.

### 7.3. Análisis de Sholl para las células trasplantadas

Para determinar la complejidad morfológica de las células trasplantadas desarrollada después del trasplante a diferentes tiempos, las fotografías 2D de las células aisladas de S1 a S4 y S8, se reconstruyeron en Neurolucida como se ejemplifica para una célula de la S3 PT en la Fig. 6. Se cuantificaron las intersecciones y la longitud de las ramificaciones con el análisis de Sholl y se obtuvo una gráfica a partir de los datos obtenidos (Fig. 7).



**Figura 6.** Reconstrucción en Neurolucida y análisis de Sholl de una NPC del EOh diferenciada en astrocito y trasplantada al estriado. a) Representación del trazo realizado sobre una proyección en Z de una célula fotografiada 3 semanas PT. b) En Neurolucida Explorer se adquieren los análisis de los trazos obtenidos. El soma se encuentra delimitado por un círculo rojo y a partir de dicho soma Neurolucida identifica las prolongaciones que protruyen del soma. Las esferas concéntricas incrementan 5  $\mu\text{m}$  y se detienen hasta la última prolongación. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

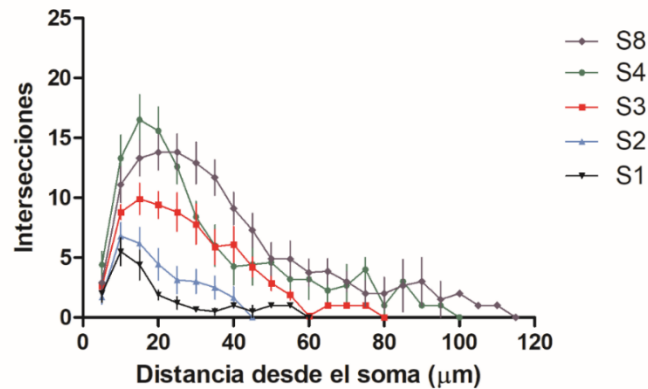
A partir de estos datos obtenidos, podemos indicar que las células de S4 y S8 PT presentan una mayor complejidad morfológica asociada al número de intersecciones y la longitud de dichos procesos.

Respecto a la longitud de los procesos, las células de S3 ( $58.5 \pm 3.5$ ), S4 ( $55.0 \pm 5.4$ ) y S8 ( $75.0 \pm 6.2$ ) PT alcanzaron longitudes significativamente mayores a las de las células de las S1 ( $32.5 \pm 3.9$ ) y S2 ( $30.0 \pm 2.8$ ) PT. La prueba Kruskal-Wallis, post-hoc: Dunn's (alfa 0.05), mostro diferencias significativas entre S1 vs S3 y S8 y entre S2 vs S3, S4 y S8 (n=10, Fig. 8a).

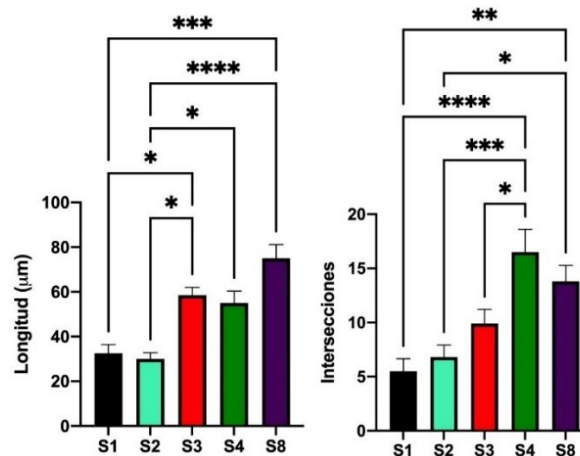
En cuanto a la cantidad de intersecciones se observó que las células correspondientes a la S4 ( $16.5 \pm 2.1$ ) y S8 ( $13.8 \pm 1.5$ ) PT presentan un número de intersecciones significativamente mayor (ANOVA-Tukey's) al de las células de S1

( $5.5 \pm 1.1$ ), S2 ( $6.8 \pm 1.1$ ) y S3 ( $9.9 \pm 1.3$ ), con excepción de S3 vs S8 (n=10, Fig. 8b). Cabe resaltar que las células de la S4 vs S8 no muestran diferencias significativas, lo que podría denotar que las células alcanzan un desarrollo morfológico máximo un mes después de ser trasplantadas.

Con estos resultados podemos concluir que las células de la S1 y S2 PT presentan un patrón muy similar de morfología por lo que estas células requieren de al menos tres semanas para desarrollar un fenotipo morfológico más complejo como las observadas en células de S3 y, sobre todo, en S4 y S8 PT.



**Figura 7.** Resumen del análisis de Sholl de las NPC del EOh diferenciadas en astrocitos y trasplantadas al estriado. Las células se analizaron de 1, 2, 3, 4 y 8 semanas postrasplante (n=10). En el eje x se representa la distancia desde el soma ( $\mu\text{m}$ ). En el eje y está representado el número de intersecciones. Los valores son presentados como la media  $\pm$  el error estándar de la media.



**Figura 8.** Complejidad morfológica de las células trasplantadas adquirida a lo largo del tiempo. a) Longitud máxima de los procesos de las células trasplantadas. b) Intersecciones en el pico máximo para cada semana en un radio determinado (10  $\mu\text{m}$  para S1 y S2, 15  $\mu\text{m}$  para S3 y S4, y 20  $\mu\text{m}$  para S8). (n=10, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

#### 7.4. Inmunodetección de GFAP

Se realizaron inmunofluorescencias en rebanadas de cerebro en los intervalos de tiempo S2, S4 y S8 PT (n=3) previamente obtenidas y montadas en un portaobjetos con la finalidad de determinar si se mantiene el linaje de los astrocitos después de ser trasplantados, se realizó la detección de un marcador específico de astrocitos (la proteína GFAP) por inmunofluorescencias en rebanadas de cerebro obtenidas de S2, S4 y S8 PT (n=3). Cabe resaltar que se empleó el anticuerpo primario anti-GFAP debido a que es un marcador por excelencia de astrocitos de varias zonas del SNC y, por otro lado, con base en los resultados de Rodrigo Arellano (Tesis de maestría), en cultivo dichas células diferenciadas presentaron un mayor porcentaje de marcaje con GFAP en los medios de diferenciación a comparación de otros marcadores para astrocitos empleados (anti-ALDH1L1 y anti-S100 $\beta$ ).

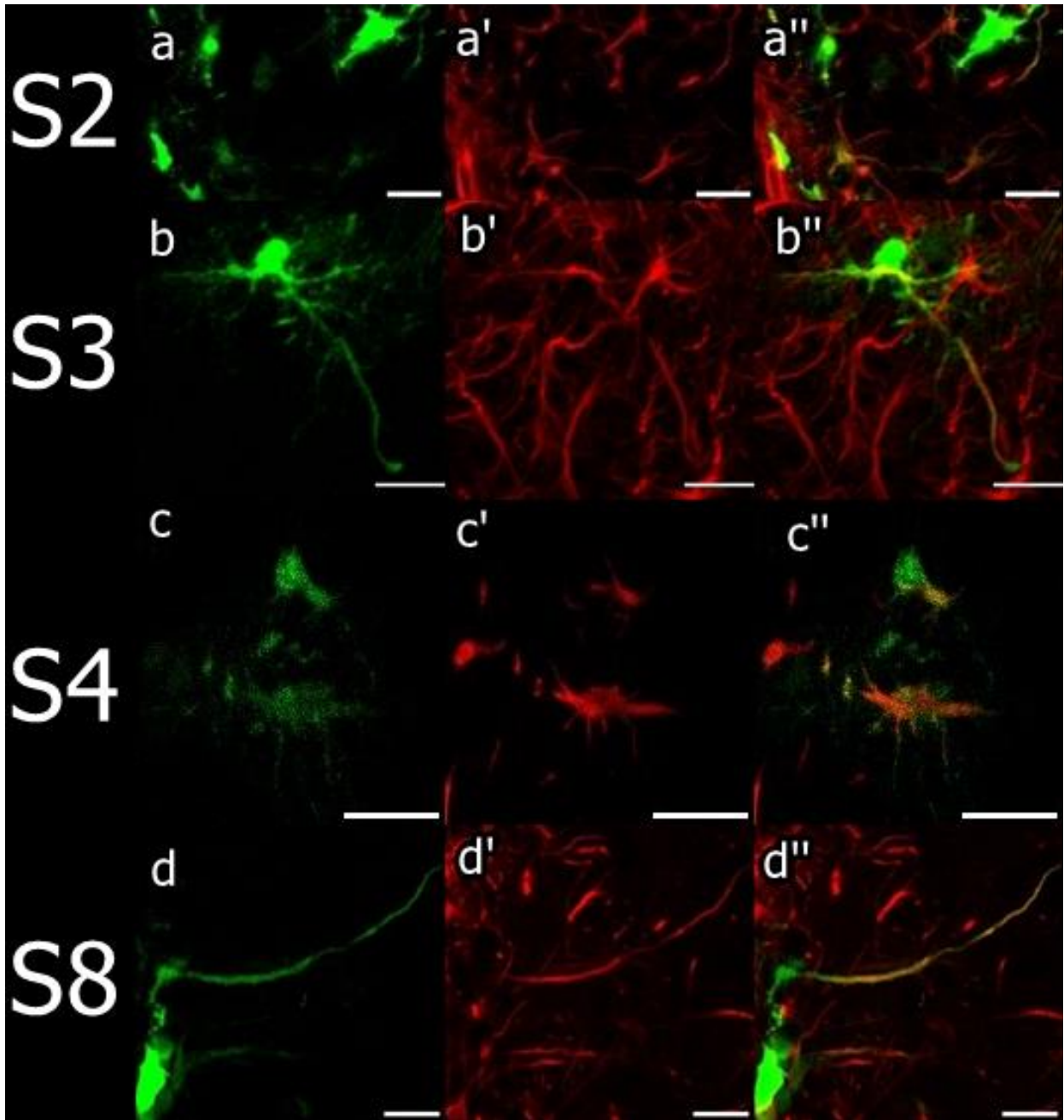
La inmunodetección de GFAP realizada en rebanadas de cerebro fijado a diferentes tiempos postrasplante (S2, S3, S4 y S8), demuestran que las células trasplantadas preservan su estado diferenciado a astrocitos (Fig 9). La presencia de células GFP/GFAP<sup>+</sup> (Fig. a''-d'') se determinó por la colocalización de la expresión de GFP con la expresión de GFAP evidenciada por la fluorescencia de AF 594.

El anticuerpo primario dirigido contra GFAP se observa principalmente en las prolongaciones más que en el soma, mientras que la expresión de GFP se manifiesta con mayor intensidad en el soma, por lo que la colocalización se analiza con mayor detenimiento en las prolongaciones.

Para aquellas células que no presentan colocalización se hipotetiza que se hayan dirigido a otro linaje debido a la presencia de múltiples factores tróficos en el estriado que pudieron haberlas redireccionado a su estado progenitor, otro tipo de células gliales o inclusive a neuronas.

Para poder probar esta hipótesis se podrían realizar inmunohistoquímicas con marcadores específicos para progenitoras neurales y marcadores para neuronas. Otra posibilidad es que las células trasplantadas no se encontraban en un estado óptimo para permitir la expresión de GFAP.





**Figura 9.** Expresión de GFAP (en rojo) en las células trasplantadas y observadas en cortes coronales del estriado después de 2, 3, 4 y 8 semanas postrasplante. a-d: NPC del EOh (en verde) diferenciadas en astrocitos y trasplantadas al estriado. a'-d': Inmunofluorescencias para GFAP/AF 594. a''-d'': Células GFP/GFAP+. Escala: 20  $\mu$ m.

## 8. Discusión

Este trabajo tuvo como propósito evaluar la capacidad de las células progenitoras del EOh, sometidas a su diferenciación *in vitro* en astrocitos, de sobrevivir y desarrollarse dentro del estriado de ratones neonatos. Previamente, en nuestro laboratorio se realizaron trasplantes de estas células sin diferenciar en ratones adultos. En este trabajo se observó que las células xenotrasplantadas sobrevivieron hasta 10 semanas después del trasplante y también se desarrollaron a lo largo del curso temporal (S1-S10) (Leyva-López, Tesis de maestría en proceso).

Estos antecedentes establecieron la capacidad que tienen estas células progenitoras de sobrevivir e incluso desarrollarse en un ambiente neurotrófico como es el núcleo estriado. De manera similar, en este trabajo se reportó la sobrevivencia y la diferenciación de dichas células diferenciadas en astrocitos.

Las células progenitoras/troncales neurales del EOh se han empleado en trasplantes al estriado de roedores hemiparkinsonianos. En estos estudios se ha observado la diferenciación de estas células en neuronas dopaminérgicas, tanto *in vitro* en cultivos primarios como *in vivo* dentro del estriado después de ser trasplantadas (Murrell et al., 2008; Wang et al., 2012; Chabrat et al., 2019).

Los autores reportan que la diferenciación y maduración de las células está influenciada por el ambiente extracelular en el que se encuentran donde posiblemente existan factores tróficos como las neurotrofinas 3 y 4. También sugieren que las mismas células progenitoras son capaces de liberar factores neurotróficos que favorecen su integración en conexiones neuronales existentes.

Otros datos por resaltar de estos trabajos es que las células trasplantadas con identidad dopaminérgica sobrevivieron hasta 6 meses, presentaron procesos largos y migraron a zonas lejos del sitio de inyección (Wang et al., 2012).

Adicionalmente, en un estudio donde se realizaron co-cultivos de las células progenitoras del EOh con cultivos primarios obtenidos de la corteza y el hipocampo de ratones neonatos mostraron que las células progenitoras pueden diferenciarse e integrarse a un circuito maduro con células neuronales y gliales (Grégory et al., 2020). Esto concuerda con estudios recientes que indican que estas células pueden responder a factores externos como el factor de crecimiento endotelial vascular

(VEGF) o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) para la proliferación, viabilidad y migración (Ramírez-Rodríguez et al., 2017).

En conjunto, todos estos trabajos dan pauta para hipotetizar que la sobrevivencia y desarrollo morfológico de las células trasplantadas en este trabajo se debe o está influenciada por factores genéticos que están presentes en las células en su estado progenitor y muy posiblemente se preservan después de su diferenciación en astrocitos. Además, los factores neurotróficos presentes en el estriado podrían jugar un rol muy importante para permitir que las células trasplantadas sobrevivan y posteriormente puedan manifestar morfologías complejas (Grondin et al., 2019; Leal-Galicia et al., 2021).

Los estudios mencionados junto con este trabajo incrementan el interés en realizar más experimentos para evaluar el potencial de las células progenitoras neurales del EOh como modelos para investigar enfermedades neurodegenerativas y establecerlas como candidatas para su uso en terapia celular del sistema nervioso. En conjunto, todos estos trabajos dan pauta para hipotetizar que la sobrevivencia y desarrollo morfológico de las células trasplantadas en este trabajo se debe o está influenciada por mensajeros y proteínas que están presentes en las células en su estado progenitor y muy posiblemente se preservan después de su diferenciación en astrocitos. Además, los factores neurotróficos presentes en el estriado podrían jugar un rol muy importante para permitir que las células trasplantadas sobrevivan y posteriormente puedan manifestar morfologías complejas (Grondin et al., 2019; Leal-Galicia et al., 2021).

Los estudios mencionados junto con este trabajo incrementan el interés en realizar más experimentos para evaluar el potencial de las células progenitoras neurales del hEO como modelos para investigar enfermedades neurodegenerativas y establecerlas como candidatas para su uso en terapia celular del sistema nervioso.

Por otro lado, en el laboratorio también se determinó la capacidad de estas células progenitoras neurales de diferenciarse en astrocitos ya que al ser multipotentes pueden dirigirse tanto a neuronas como a células gliales. Los resultados obtenidos fueron la expresión de marcadores típicos de astrocitos como S100 $\beta$ , ALDH1L1 y GFAP (Arellano Contreras, Tesis de maestría). En concordancia con este antecedente, se observaron células xenotrasplantadas que expresaron GFAP, sugiriendo que mantuvieron su identidad astrocítica observada *in vitro*.



En cuanto a la morfología de las células xenotrasplantadas, concuerda con lo reportado en la literatura de la complejidad de los astrocitos humanos referente al tamaño, diámetro del soma y la longitud y cantidad de procesos que presentan (Oberheim et al., 2009). Cabe resaltar que estos parámetros varían dependiendo del tipo de astrocito y la región en la que se encuentran y la mayoría de los datos reportados han sido de astrocitos de la corteza.

El diámetro de los somas de astrocitos humanos está entre 10 y 20  $\mu\text{m}$ , las células obtenidas y analizadas en esta trabajo están en ese rango. Adicionalmente, los datos obtenidos en esta trabajo en cuanto a las longitudes de los procesos son similares a los reportados en la literatura sobre astrocitos protoplásmicos de la corteza humana (97.9  $\mu\text{m}$ ) (Oberheim et. al, 2006).

Algunas de las células trasplantadas presentaron procesos largos ( $\sim 100 \mu\text{m}$ ) que también se ha reportado para astrocitos humanos en general, principalmente los de la corteza pero también se han descrito en otras regiones del SNC como en el hipocampo (Singh et al., 2022; Vasile et al. & Rouach, 2017).

Otra característica morfológica distintiva de los astrocitos protoplásmicos es la presencia de pies terminales que les permite establecer contacto con la vasculatura del SNC. En algunas imágenes (Fig. 5b-c, Fig. 7b) se observaron estructuras similares a los pies terminales, sin embargo, para poder confirmarlo se requiere hacer inmunohistoquímicas con marcadores para vasos sanguíneos para determinar si esas estructuras están en contacto con la vasculatura.

Respecto a la identidad de las NPC sometidas a su diferenciación en astrocitos y posteriormente trasplantadas al estriado de ratones neonatos, se empleó únicamente el marcador para astrocitos GFAP. Sin embargo, aunque se esperaría que la mayoría de las células mantengan su identidad astrocítica, al estar presente componentes genéticos que las identifican como progenitoras neurales, algunas células podrían estar desdiferenciándose, es decir, regresando a su estado progenitor o incluso podrían estar dirigiéndose a neuronas u oligodendrocitos (Ohnishi et al., 2015), sin embargo, se requieren otros experimentos para comprobar estas hipótesis, como por ejemplo determinar la expresión de Sox2, NeuN y Olig2 mediante ensayos inmunohistoquímicos.

En la literatura, la mayoría de los estudios sobre trasplantes de células troncales neurales no incluyen la diferenciación in vitro de dichas células en

astrocitos. Sin embargo, hay aspectos básicos que si se comparten con los resultados obtenidos en este proyecto como una mayor dispersión de las células trasplantadas dentro del sitio de trasplante después de un mes (Park et al., 2021).

Este trabajo es de carácter mayormente cualitativo, por lo que, es necesario complementar la información obtenida sobre la morfología de los astrocitos derivados de NPC del EOh. Actualmente se está evaluando la funcionalidad de estas células *in vitro* mediante imagenología de calcio y se evaluará la actividad de calcio de las células diferenciadas y trasplantadas al estriado.

Estos estudios son necesarios para una caracterización completa de estas células y para poder realizar comparaciones con estudios de trasplantes de astrocitos humanos en donde evalúan tanto la complejidad morfológica como su actividad de calcio *in vitro* e *in vivo* (Xiaoning et al., 2013; Allen et al., 2022).

## **9. Conclusiones**

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que las NPC del EOh inducidas a su diferenciación en astrocitos sobreviven al menos hasta 8 semanas después de su trasplante al estriado en ratones neonatos.

Adicionalmente, las células trasplantadas adquieren morfologías más complejas a lo largo del tiempo denotado por el incremento tanto en la longitud como en la cantidad de procesos presentes en las células analizadas de 4 a 8 semanas postrasplante.

Las morfologías de las células y desarrollo de los procesos varían conforme a la zona del estriado, o incluso de otra región del SNC, en la que se encuentren.

Finalmente, la mayor parte de las células mantienen su identidad astrocítica a través de la expresión de GFAP, sin embargo, algunas células no expresan la misma identidad celular.

## 10. Referencias

- Allen, M., Huang, B. S., Notaras, M. J., Lodhi, A., Barrio-Alonso, E., Lituma, P. J., ... Colak, D. (2022). Astrocytes derived from ASD individuals alter behavior and destabilize neuronal activity through aberrant Ca<sup>2+</sup> signaling. *Molecular Psychiatry*, 27(5), 2470–2484. <https://doi.org/10.1038/S41380-022-01486-X>
- Beites, C. L., Kawauchi, S., Crocker, C. E., & Calof, A. L. (2005). Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.03.027>
- Benítez-King, G., Riquelme, A., Ortíz-López, L., Berlanga, C., Rodríguez-Verdugo, M. S., Romo, F., ... Domínguez-Alonso, A. (2011). A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *Journal of Neuroscience Methods*, 201(1), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.07.009>
- Benítez-King, G., Valdés-Tovar, M., Trueta, C., Galván-Arrieta, T., Argueta, J., Alarcón, S., ... Solís-Chagoyán, H. (2016, June 1). The microtubular cytoskeleton of olfactory neurons derived from patients with schizophrenia or with bipolar disorder: Implications for biomarker characterization, neuronal physiology and pharmacological screening. *Molecular and Cellular Neuroscience*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.01.013>
- Carter, L. A., MacDonald, J. L., & Roskams, A. J. (2004). Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *Journal of Neuroscience*, 24(25), 5670–5683. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0330-04.2004>
- Chabrat, A., Lacassagne, E., Billiras, R., Landron, S., Pontisso-Mahout, A., Darville, H., ... Hanna, J. H. (2019). Pharmacological Transdifferentiation of Human Nasal Olfactory Stem Cells into Dopaminergic Neurons. <https://doi.org/10.1155/2019/2945435>
- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Ochteau, J. C., Yu, X., ... Khakh, B. S. (2017). Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron*, 95(3), 531-549.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.029>
- Chen, C. R., Kachramanoglou, C., Li, D., Andrews, P., & Choi, D. (2014, June 26). Anatomy and Cellular Constituents of the Human Olfactory Mucosa: A Review. *Journal of Neurological Surgery, Part B: Skull Base*. Thieme Medical Publishers, Inc. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1361837>
- Child, K. M., Herrick, D. B., Schwob, J. E., Holbrook, E. H., & Jang, W. (2018). The Neuroregenerative Capacity of Olfactory Stem Cells Is Not Limitless: Implications for Aging. *Neurobiology of Disease*, 38(31), 6806–6824. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3261-17.2018>
- Goldman, S. A. (2016, February 4). Stem and Progenitor Cell-Based Therapy of the Central Nervous System: Hopes, Hype, and Wishful Thinking. *Cell Stem Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.012>

- Grégory, P., Nassila, A., Jean-Louis, M., Jean-Louis, G., Jean-Luc, D., & Carine, B. P. (2020). The fate of transplanted olfactory progenitors is conditioned by the cell phenotypes of the receiver brain tissue in cocultures. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(19), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21197249>
- Grondin, R., Littrell, O. M., Zhang, Z., Ai, Y., Huettl, P., Pomerleau, F., ... Gerhardt, G. A. (2019). GDNF revisited: A novel mammalian cell-derived variant form of GDNF increases dopamine turnover and improves brain biodistribution. *Neuropharmacology*, *147*, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.05.014>
- Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., ... Nedergaard, M. (2013). Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*, *12*(3), 342–353. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.015>
- Herrick, D. B., Lin, B., Peterson, J., Schnittke, N., & Schwob, J. E. (2017). Notch1 maintains dormancy of olfactory horizontal basal cells, a reserve neural stem cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(28), E5589–E5598. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701333114>
- Jafek, B. W. (2002). Biopsies of Human Olfactory Epithelium. *Chemical Senses*, *27*(7), 623–628. <https://doi.org/10.1093/chemse/27.7.623>
- James E. Schwob, Woochan Jang, Eric H. Holbrook, Brian Lin, Daniel B. Herrick, Jesse N. Peterson, and J. H. C. (2016). THE STEM AND PROGENITOR CELLS OF THE MAMMALIAN OLFACTORY EPITHELIUM: TAKING POIETIC LICENSE. *Journal of Comparative Neurology*, *346*(October 2007), 339–346. <https://doi.org/10.1002/cne.24105>
- Jiménez-Vaca, A. L., Benitez-King, G., Ruiz, V., Ramírez-Rodríguez, G. B., Hernández-de la Cruz, B., Salamanca-Gómez, F. A., ... Ordoñez-Razo, R. M. (2018). Exfoliated Human Olfactory Neuroepithelium: A Source of Neural Progenitor Cells. *Molecular Neurobiology*, *55*(3), 2516–2523. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0500-z>
- Lavoie, J., Astorga, P. G., Segal-Gavish, H., Wu, Y. C., Chung, Y., Cascella, N. G., ... Ishizuka, K. (2017). The Olfactory Neural Epithelium As a Tool in Neuroscience. *Trends in Molecular Medicine*, *23*(2), 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.12.010>
- Leal-Galicia, P., Elena Chávez-Hernández, M., Mata, F., Mata-Luévanos, J., Miguel Rodríguez-Serrano, L., Tapia-de-Jesús, A., ... Ortega, C. (2021). Adult Neurogenesis: A Story Ranging from Controversial New Neurogenic Areas and Human Adult Neurogenesis to Molecular Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*. <https://doi.org/10.3390/ijms222111489>
- Li, Q., Siri, T., Bressan, C., de Koninck, Y., & Saghatelian, A. (2020). Developmental Potential and Plasticity of Olfactory Epithelium Stem Cells Revealed by Heterotopic Grafting in the Adult Brain. *Stem Cell Reports*, *14*(4), 692–702. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.03.008>
- Martínez-Cerdeño, V., & Noctor, S. C. (2018, December 6). Neural progenitor cell

- terminology. *Frontiers in Neuroanatomy*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00104>
- Matias, I., Morgado, J., & Gomes, F. C. A. (2019, March 19). Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>
- Maya-Espinosa, G., Collazo-Navarrete, O., Millán-Aldaco, D., Palomero-Rivero, M., Guerrero-Flores, G., Drucker-Colín, R., ... Guerra-Crespo, M. (2015). Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Cells Reveal Niches that Support Neuronal Differentiation in the Adult Rat Brain. *STEM CELLS*, 33(2), 491–502. <https://doi.org/10.1002/stem.1856>
- Minovi, A., Aguado, A., Brunert, D., Kurtenbach, S., Dazert, S., Hatt, H., & Conrad, H. (2017). Isolation, culture optimization and functional characterization of stem cell neurospheres from mouse neonatal olfactory bulb and epithelium. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 274(8), 3071–3085. <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4590-z>
- Muniswami, D. M., Kanakasabapathy, I., & Tharion, G. (2017). Globose basal cells for spinal cord regeneration. *Neural Regeneration Research*, 12(11), 1895–1904. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.219052>
- Murrell, W., Wetzig, A., Donnellan, M., Féron, F., Burne, T., Meedeniya, A., ... Mackay-Sim, A. (2008). Olfactory Mucosa Is a Potential Source for Autologous Stem Cell Therapy for Parkinson's Disease. *Stem Cells*, 26(8), 2183–2192. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0074>
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H. C., Wang, F., ... Nedergaard, M. (2009). Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 29(10), 3276. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>
- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in Neurosciences*, 29(10), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.08.004>
- Ohnishi, Y. ichiro, Iwatsuki, K., Ishihara, M., Shikina, T., Shinzawa, K., Moriwaki, T., ... Yoshimine, T. (2015). Isolation of human adult olfactory sphere cells as a cell source of neural progenitors. *Stem Cell Research*, 15(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.04.006>
- Ohnishi, Y. ichiro, Iwatsuki, K., Shinzawa, K., Ishihara, M., Moriwaki, T., Umegaki, M., ... Yoshimine, T. (2013). Adult olfactory sphere cells are a source of oligodendrocyte and Schwann cell progenitors. *Stem Cell Research*, 11(3), 1178–1190. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.08.005>
- Park, H. J., Jeon, J., Choi, J., Kim, J. Y., Kim, H. S., Huh, J. Y., ... Song, J. (2021). Human iPSC-derived neural precursor cells differentiate into multiple cell types to delay disease progression following transplantation into YAC128 Huntington's disease mouse model. *Cell Proliferation*, 54(8). <https://doi.org/10.1111/cpr.13082>

- Ramírez-Rodríguez, G. B., Perera-Murcia, G. R., Ortiz-López, L., Vega-Rivera, N. M., Babu, H., García-Anaya, M., & González-Olvera, J. J. (2017). Vascular endothelial growth factor influences migration and focal adhesions, but not proliferation or viability, of human neural stem/progenitor cells derived from olfactory epithelium. *Neurochemistry International*, *108*(June), 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.06.001>
- Schwob, J. E. (2002). Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anatomical Record*, *269*(1), 33–49. <https://doi.org/10.1002/ar.10047>
- Singh, S., Johnson, N. E., Lee, J., Kim, S. W., & Kim, K.-T. (2022). Region-Specific Characteristics of Astrocytes and Microglia: A Possible Involvement in Aging and Diseases. <https://doi.org/10.3390/cells11121902>
- Song, J. J., Oh, S. M., Kwon, O. C., Wulansari, N., Lee, H. S., Chang, M. Y., ... Lee, S. H. (2018). Cografting astrocytes improves cell therapeutic outcomes in a Parkinson's disease model. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(1), 463–482. <https://doi.org/10.1172/JCI93924>
- Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017, July 1). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure and Function*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>
- 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 TRANSLATIONAL MEDICINE*, *1*, 492–502. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0012>
- Westergard, T., & Rothstein, J. D. (2020). Astrocyte Diversity: Current Insights and Future Directions. *Neurochemical Research*, *45*(6), 1298–1305. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02959-7>
- Xiaoning, H., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., ... Nedergaard, M. (2013). Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*, *12*(3), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.015>. Forebrain
- Xiong, M., Tao, Y., Gao, Q., Feng, B., Yan, W., Zhou, Y., ... Zhang, S. C. (2020). Human Stem Cell-Derived Neurons Repair Circuits and Restore Neural Function. *Cell Stem Cell*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.08.014>
- Yu, X., Taylor, A. M. W., Nagai, J., Golshani, P., Evans, C. J., Coppola, G., & Khakh, B. S. (2018). Reducing Astrocyte Calcium Signaling In Vivo Alters Striatal Microcircuits and Causes Repetitive Behavior. *Neuron*, *99*(6), 1170–1187.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.015>
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019, February 26). Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del epitelio olfatorio humano.....	8
<b>Figura 2.</b> Cirugía estereotáxica en un ratón macho neonato .....	17
<b>Figura 3.</b> NPC del EOh 48h después de la inducción de diferenciación en astrocitos y su transducción viral con AdV-GFP .....	21
<b>Figura 4.</b> Curso temporal del xenotrasplante de las NPC del EOh diferenciadas en astrocitos y transducidas con AdV-GFP en el estriado de ratones neonatos.....	23
<b>Figura 5.</b> Fenotipos morfológicos de NPC del EOh diferenciadas en astrocitos y trasplantadas al estriado de ratones neonatos.....	25
<b>Figura 6.</b> Reconstrucción en Neurolucida y análisis de Sholl de una NPC del EOh diferenciada en astrocito y trasplantada al estriado.....	26
<b>Figura 7.</b> Resumen del análisis de Sholl de las NPC del EOh diferenciadas en astrocitos y trasplantadas al estriado .....	27
<b>Figura 8.</b> Complejidad morfológica de las células trasplantadas adquirida a lo largo del tiempo.....	27
<b>Figura 9.</b> Expresión de GFAP en las células trasplantadas y observadas en cortes coronales del estriado después de 2, 3, 4 y 8 semanas postrasplante.....	29