



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**Facultad de Medicina**

FACULTAD DE MEDICINA



**Comparación de los perfiles de liberación de factores solubles secretados por las células troncales/ progenitores neurales del epitelio olfatorio obtenidos a partir de sujetos pertenecientes a dos grupos de edad.**

**TESIS**

para obtener el título de:

**Licenciado en Neurociencias**

**P R E S E N T A:**

Lora Marín Obed Ricardo

**DIRECTORA DE TESIS**

Dra. Cárdenas Aguayo María del Carmen

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., abril de 2024



**NEUROCIENCIAS  
UNAM**



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.



*A mis abuelos Don Gil y Doña Chelis, a mi Señor padre, y mis hermanos: María, Abraham y Daniel. Sin ustedes no estaría qui hoy. Yo ya hubiera muerto hace muchos años.*

*A Jalim, quiero seguir sus pasos en la academia. Me gustaría ser Jalim chiquito.*

*A Baam, Angel, Pau, y Vee.*



## ÍNDICE

Abreviaturas .....	7
Índice de Figuras y Tablas.....	10
Resumen .....	12
Abstract.....	13
1. Introducción.....	14
2. Antecedentes .....	15
2.1. Definición de célula troncal y nicho celular .....	15
2.2 Neurogénesis post embrionaria.....	15
2.3. Nicho neurogénico. Matrix extracelular .....	17
2.4. Nicho neurogénico. Interacciones célula-célula durante la neurogénesis .....	18
2.5. Nicho neurogénico: señalización por factores solubles .....	20
2.6. Neurotransmisores .....	20
2.7. Factores neurotróficos y factores de crecimiento. ....	22
2.8. Proteínas solubles .....	23
2.9. Epitelio olfatorio: región neurogénica extracraneal .....	28
3.0. Neurogénesis extracraneal.....	30
3.1. Medicina regenerativa. Uso de terapia con células troncales.....	32
3.2. Uso de las células troncales para el tratamiento de lesiones medulares .....	34
3.3. Uso de las células troncales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas .....	35
3.4. Limitaciones en la terapéutica utilizando células troncales. ....	36
3.5. Enfoque terapéutico del secretoma.....	36
3.6. Implementación del secretoma para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas .....	38
3.7. Enfoque terapéutico del secretoma asociado a la edad. ....	39
4.0. Justificación .....	41
5.0. Hipótesis .....	41
6.0. Objetivo general .....	41
6.1. Objetivos específicos .....	41
7.0. Diseño Experimental.....	42
8.0. Materiales y Métodos .....	43

8.1. Reclutamiento de sujetos. ....	43
8.2. Aislamiento y caracterización de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano. ....	43
8.3. Inmunofluorescencia.....	44
8.4. Extracción, preparación y cuantificación de proteína.....	45
8.5. Western Blot.....	45
8.6. Determinación del tiempo de duplicación de las células progenitoras del epitelio olfatorio. ....	47
8.7. Determinación de los perfiles de expresión y factores solubles en los medios condicionados de las células troncales/precursoras del epitelio olfatorio humano. ....	48
8.7.1. Obtención de los medios condicionados de las células progenitoras del epitelio olfatorio.....	48
8.8. Softwares para el análisis de datos. ....	52
9.0. Resultados.....	53
9.1. Reclutamiento de los donantes. Breve historia clínica.....	53
9.2. Caracterización fenotípica de las hNS/PCs-OE.....	53
9.3. Caracterización funcional de las células precursoras del epitelio olfatorio.....	59
9.4. Determinación de los perfiles de expresión de las hNS/PCs-OE asociados a dos grupos de edad.....	62
9.5. Caracterización y comparación de las moléculas secretadas a partir las células precursoras del epitelio olfatorio asociado a dos grupos de edad.....	63
10.0. Discusión.....	70
11.0. Conclusión.....	77
12.0. Perspectivas.....	78
14.0. Anexos.....	88
14.1. Congresos Nacionales e Internacionales donde se presentaron los resultados derivados de esta Tesis.....	88
15.0. Agradecimientos extendidos.....	89

## Abreviaturas

**SC**, del inglés *Stem Cells*. Células troncales

**NSC**, del inglés *Neural Stem Cells*, Células troncales neurales

**NPC**, del inglés *Neuronal Progenitor Cell*. Célula progenitora neuronal

**GFAP**, del inglés *Glial fibrilar acidic protein*. Proteína ácida fibrilar glial

**OB**, del inglés *Olfactory Bulb*. Bulbo olfatorio

**RMS**, del inglés *Rostral Migratory Stream*. Vía rostral migratoria

**ECM**, del inglés *Extracellular Matrix*. Matrix extracelular

**CSGs**, del inglés *Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycans*. Proteoglicano de sulfato de condroitina

**MMP**, del inglés *Matrix Metalprotease*. Metaloproteasas

**VEGF**, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*. Factor de crecimiento endotelial vascular

**BDNF**, del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*. Factor neurotrófico derivado del cerebro

**NF**, del inglés *Neurotophic Factor*. Factor neurotrófico

**GF**, del inglés *Growth Factor*. Factor de crecimiento

**NT**, del inglés *Neurotransmitter*. Neurotransmisor

**CNS**, del inglés *Central Nervous System*. Sistema nervioso central

**PNS**, del inglés *Peripheral Nervous System*. Sistema nervioso periférico

**EGF**, del inglés *Epidermal Growth Factor*. Factor de crecimiento epidérmico

**EGFR**, del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*. Receptor de EGF

**FGF-2**, del inglés *Fibroblast Growth Factor*. Factor de crecimiento de fibroblastos

**NGF**, del inglés *Neuronal Growth Factor*. Factor de crecimiento nervioso.

**FGFR**, del inglés *Fibroblast Growth Factor Receptor*. Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos.

**Eph**, del inglés *Ephrin*. Efrinas

**IL**, del inglés *Interleukine*. Interleucina

**AMPA**, del inglés  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*. ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

**BMP**, del inglés *Bone Morphogenetic Protein*. Proteína morfogenética ósea.

**OE**, del inglés *Olfactory Epithelium*. Epitelio Olfatorio

**mOSN**, del inglés *Mature Olfactory Sensory Neuron*. Neurona sensorial olfatoria madura.

**imOSN**, del inglés *Inmature Olfactory Sensorial Neuron*. Neurona sensorial olfatoria inmadura

**OPC, del inglés *Olfactory Progenitor Cells*.** Células progenitoras olfatorias.

**hNS/PCs-OE del inglés *human Neuronal Stem or Progenitor Cells Olfactory Epitelium*.** Células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humanas

**GBC, del inglés *Globose Basal Cell*.**  
Célula basal globosa.

**HB, del inglés *Horizontal Basal Cell*.**  
Célula basal horizontal.

**MC, del inglés *Microvellar Cell*.** Célula microvelar.

**BGC, del inglés *Basal Glomerular Cell*.**  
Células glomerulares basales

**ESC, del inglés *Embryonic Stem Cells*.**  
Células troncales embrionarias

**IPSC, del inglés *Induced Pluripotent Stem Cells*.** Células troncales pluripotentes inducidas

**MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cell*.**  
Célula troncal mesenquimal.

**EVs del inglés *Extracellular Vesicles*.**  
Vesículas extracelulares.

**CM, del inglés *Conditioned Medium*.**  
Medio condicionado.

**AD, del inglés *Alzheimer Disease*.**  
Enfermedad de Alzheimer

**PD, del inglés *Parkinson Disease*.**  
Enfermedad de Parkinson

**A $\beta$ , del inglés *Amyloid beta*.** Beta-Amiloide.



## Índice de Figuras y Tablas

<b>Figura 1. Representación del proceso neurogénico. ....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 2. Principales regiones neurogénicas del cerebro adulto en mamíferos.....</b>	<b>¡Error!</b>
<i>Marcador no definido.</i>	
<b>Tabla 1. Moléculas solubles y su efecto en el proceso neurogénico.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 3. Anatomía del epitelio olfatorio: región neurogénica extracraneal. En .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 4. Esquema representativo de la neurogénesis adulta dentro de todas las capas pertenecientes al OE .....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 5. Esquema representativo que indica la ubicación de las principales fuentes de células troncales halladas en diferentes regiones del cuerpo humano. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 6. Células troncales mesenquimales: fuentes y fenotipos generados. ....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 7. Descripción del secretoma .....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 8. Diseño experimental general.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 9. Diseño experimental para la caracterización fenotípica mediante inmunodetección de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano</b>	<b>47</b>
<b>Figura 11. Fórmula para determinar el tiempo de duplicación teórico.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 12. Diseño experimental para la obtención de los medios condicionados de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 13. Diseño experimental para la identificación de los factores solubles liberados por las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 14. Datos demográficos relacionados con los sujetos participantes. ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 15. Imágenes de campo claro hNS/PCs-OE provenientes de sujetos pertenecientes a dos grupos de edad. ....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 16. Inmunofluorescencia para marcadores de troncalidad, proliferación y compromiso celular en hNS/PCs-OE pertenecientes al grupo joven. ....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 17. Inmunofluorescencia para marcadores de troncalidad, proliferación y compromiso celular en hNS/PCs-OE pertenecientes al grupo adulto.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 18. Conteos celulares de Ki67+ hNS/PCs-OE provenientes de dos grupos de edad a partir de dos condiciones de crecimiento. ....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 19. Caracterización de las hNS/PCs-OE mediante Western Blot.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 20. Representación cuantitativa mediante densitometrías de los resultados obtenidos mediante Western Blot de las hNS/PCs-OE.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 21. Curva de crecimiento de las hNS/PCs-OE pertenecientes al grupo joven .</b>	<b>60</b>
<b>Figura 22. Curva de crecimiento de las hNS/PCs-OE pertenecientes al grupo adulto.</b>	<b>61</b>

<b>Figura 23. Determinación de los tiempos de duplicación de las hNS/PCs-OE procedentes a dos grupos de edad. ....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 24. Determinación de los perfiles de expresión provenientes del CM derivado de las hNS/PCs-OE a partir de dos grupos de edad. ....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 25. Proteínas detectadas en el medio condicionado de las hNS/PCs-OE procedentes a dos grupos de edad .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 26. Factores solubles hallados en el medio condicionado derivado de las hNS/PC-OE procedentes de dos grupos de edad .....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 27. Proteínas detectadas en el medio condicionado de las hNS/PCs-OE procedentes a dos grupos de edad (Duplicado biológico).....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 28. Factores solubles hallados en el medio condicionado derivado de las hNS/PCs-OE procedentes a dos grupos de edad (Duplicado biológico). ....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 29. Continuación. Factores solubles hallados en el medio condicionado derivado de las hNS/PCs-OE procedentes a dos grupos de edad (Duplicado biológico). ....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 30. Comparación de las biomoléculas halladas en el CM procedentes de las hNS/PCs-OE procedentes a dos grupos de edad. ....</b>	<b>67</b>
<b>Tabla 2. Factores solubles liberados por las hNS/PCs-OE.....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 31. Red de interacción entre las proteínas expresadas por las hNS/PCs-OE procedentes de dos grupos de edad. ....</b>	<b>69</b>

## Resumen

Las células troncales (SC) son células con capacidad de autorrenovación y un amplio especto de potencialidad. La progenie inmediata de las SC son las células progenitoras. Estas células se encuentran en regiones particulares dentro del parénquima cerebral. Estas células troncales/progenitoras pueden generar diversos tipos celulares desde neuronas hasta glía. En los últimos años se ha descrito la existencia de una población de células troncales/progenitoras de alto interés ya que se encuentran ubicadas fuera del parénquima cerebral, exactamente dentro del epitelio olfatorio. La comunicación celular se da gracias a la liberación y respuesta a múltiples tipos de biomoléculas también llamadas como factores solubles, así como no solubles. Muchas algunas de estas con carácter proteico. Estudios previos señalan que estas moléculas presentan diferencia en cuanto abundancia y expresión asociada al envejecimiento. El estudio de las biomoléculas liberadas se hace mediante el aislamiento y análisis de los medios condicionados obtenidos a partir de diferentes subtipos celulares, como son las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio. En este trabajo se realizó la caracterización fenotípica y funcional de las células troncales/precursoras del epitelio olfatorio aisladas a partir de sujetos de dos grupos de edad, mientras que la caracterización proteómica de estos factores proteicos liberados por dichas células se realizó en los medios condicionados obtenidos de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio. Se demostró un cambio diferencial de perfil de liberación de biomoléculas asociado al envejecimiento en la expresión de marcadores asociados a procesos celulares como la proliferación y estadios de troncalidad, al igual que comportamientos heterogéneos en las curvas de crecimiento junto con los tiempos de duplicación. Por último, se encontró una expresión diferencial de múltiples proteínas obtenidas del medio condicionado de las células troncales/precursoras del epitelio olfatorio aisladas. Algunas de estos factores proteicos cuya expresión cambia asociada al envejecimiento fueron TIMP-1, TIMP-2, MMP1, IGFBP-1, IL-6 junto con IL-8 así como VEGF entre otros. Estas moléculas tienen diversas implicaciones en procesos celulares asociados a la proliferación, migración y diferenciación. El entendimiento de la expresión diferencial permitiría el desarrollo de una terapia libre de células para múltiples patologías y enfermedades crónico-degenerativas.

## **Abstract**

Stem cells are cells with the capacity for self-renewal and multipotentiality. The immediate progeny of stem cells are progenitor cells. These cells are found in particular regions within the brain parenchyma. These stem/progenitor cells allow the creation of new neurons as well as non-neuronal cells. In recent years, a population of stem/progenitor cells of high interest has been described since they are located outside the brain parenchyma, specifically within the olfactory epithelium. Cellular communication occurs due to the release and response of multiple types of biomolecules (soluble and non-soluble). Previous studies indicate that these molecules exhibit differences in abundance and expression associated with aging. To achieve a comprehensive study of the released biomolecules, isolation and analysis of the conditioned media obtained from different cell subtypes, such as the stem/progenitor cells of the olfactory epithelium, are necessary. In this work, the phenotypic and functional characterization of the stem/precursor cells of the olfactory epithelium isolated from subjects of two age groups was carried out. Simultaneously, the proteomic characterization of the released biomolecules present in the conditioned media of the stem/progenitor cells of the olfactory epithelium was conducted. A differential expression associated with aging was demonstrated in the levels of markers linked to cellular processes such as proliferation and stemness stages, as well as heterogeneous behaviors in growth curves along with cellular population doubling times. Finally, a differential expression of multiple proteins obtained from the conditioned medium of the isolated stem/precursor cells of the olfactory epithelium was found. These multiple biomolecules have implications in cellular processes associated with proliferation, migration, and differentiation, suggesting that these soluble factors could be key molecules for proposing and implementing a possible cell-free therapy for multiple pathologies and chronic-degenerative diseases.

## 1. Introducción

La mucosa olfatoria es una región constituida por diferentes poblaciones celulares, entre ellas células troncales (SC), las cuales presentan características como autorrenovación y multipotencialidad [1, 2]. La progenie inmediata de las SC son las células progenitoras quienes a su vez generan neuronas sensoriales [3]. El epitelio olfatorio, una zona perteneciente a la mucosa olfatoria, se encuentra constituido por una población de células progenitoras, dicha población se encuentra accesible y puede obtenerse de una manera no invasiva [4]. Por otro lado, para que las dinámicas celulares de proliferación, autorrenovación y diferenciación, propias de las células progenitoras, se lleven a cabo se requiere, en parte, de la secreción de moléculas solubles y vesículas extracelulares conocidas como secretoma, así como de la posterior estimulación por parte de dicho secretoma de las diferentes poblaciones celulares presentes en la zona olfatoria [4, 5]. El envejecimiento afecta la función de diferentes poblaciones celulares, entre ellas las asociadas al cerebro, lo que conlleva a déficits en la memoria. En este sentido, estudios previos muestran un cambio diferencial asociado a la edad tanto en la expresión como en la liberación de diferentes moléculas presentes tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo e incluso el medio condicionado obtenido a partir de células troncales mesenquimales [4, 6, 7]. Se ha reportado que la caracterización y posterior aplicación de dichas moléculas provenientes de las muestras de sujetos jóvenes, “rejuvenecen” el cerebro de roedores envejecidos o reestablecen el fenotipo joven de células troncales mesenquimales envejecidas [7].

En los últimos años el estudio del secretoma ha adquirido mayor interés por parte de diversos grupos de investigación biomédica, lo que ha permitido desarrollar nuevas perspectivas para el manejo de los medios condicionados y en conjunto proponer diversas aplicaciones en el campo de la investigación clínica [8]. En este sentido, se destaca la terapia molecular como una de las principales aplicaciones para diferentes patologías que van desde cáncer, lesiones medulares hasta neurodegeneración [8-10]. El presente trabajo contribuye a estudiar un modelo humano, *in vitro* de fácil acceso poco invasivo, como son las células del epitelio olfatorio junto con el secretoma asociado a este subtipo neuronal, que permite comparar el secretoma de dos grupos de edad.

## **2. Antecedentes**

### **Marco teórico**

#### **2.1. Definición de célula troncal y nicho celular**

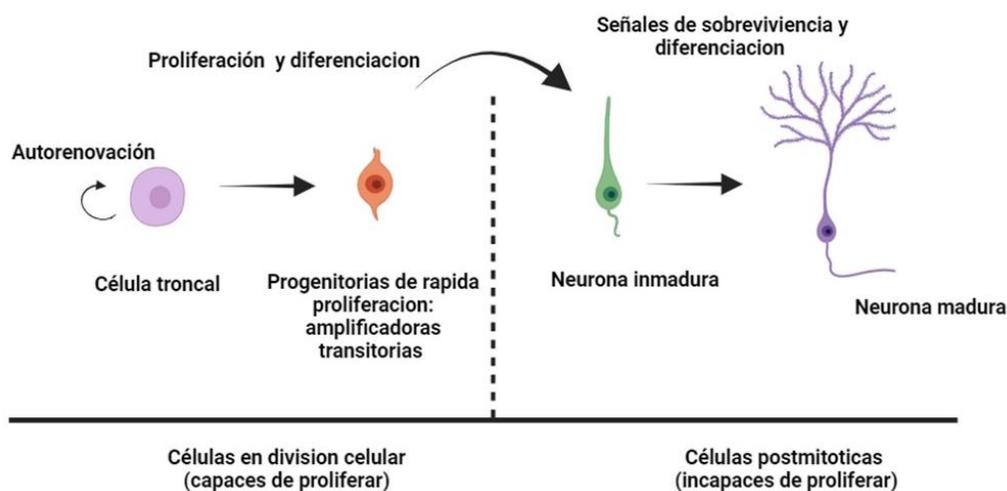
Las células troncales (SC, del inglés *Stem cells*) son células que presentan diversas características que las hacen diferentes a otros tipos celulares; algunas de éstas son la potencialidad y autorrenovación. La primera característica se refiere a la capacidad de generar los diferentes subtipos celulares presentes en un tejido. Mientras que la autorrenovación consiste en la división simétrica de la célula troncal progenitora, esta división da lugar al nacimiento de células hijas idénticas a la célula troncal [5, 11, 12]. Además de simétrica, también existe la división asimétrica, donde cada hija comienza a tener un compromiso de linaje o bien empieza a formarse su destino celular perdiendo su potencialidad [5].

De acuerdo con el desarrollo embrionario, las células troncales pueden generar dos tipos de progenie inmediata. Por un lado, tenemos a las células precursoras, las cuales presentan una reducción en su capacidad de proliferación conservando así la autorrenovación y potencialidad; mientras que, por otro lado, tenemos a las células progenitoras, las cuales poseen una alta tasa de proliferación, pero no conservan la capacidad de autorrenovarse ni tampoco la potencialidad, ya que estas células presentan en gran medida un mayor grado de compromiso celular [11]. Tanto las células troncales como las precursoras y progenitoras residen en microambientes de alta especialización conocidos como nichos. Dentro de estas regiones especializadas, estas células interactúan con otros tipos celulares como células endoteliales, endimarias y gliales. En los nichos se llevan a cabo diversas dinámicas celulares que permiten mantener la homeostasis, controlar la proliferación y maduración de la progenie, ya sea mediante interacciones directas de célula a célula, interacciones indirectas mediante la señalización a partir de las moléculas solubles liberadas por estas mismas células adyacentes y a través de las interacciones con la matriz extracelular [5, 13, 14].

#### **2.2 Neurogénesis post embrionaria**

Las células troncales neurales (NSCs, del inglés *Neural Stem Cells*) dan origen a los dos tipos celulares más abundantes del sistema nervioso central; las neuronas y la glía. El proceso neurogénico también conocido como neurogénesis consiste en una serie de pasos altamente regulados que permiten la generación de neuronas y los cuales serán descritos a continuación. Las NSCs, al igual que las células troncales presentes en otras partes del cuerpo, tienen dos tipos de comportamientos. Por un lado, existen las NSCs con una proliferación y autorrenovación lenta pero sostenida en el tiempo, por lo cual son llamadas NSCs de largo plazo [15, 16]. De primera instancia existe una alta proliferación de las NSCs, las cuales continúan su destino celular y permiten la generación de progenitores neuronales. Los progenitores neuronales conservan las propiedades de las NSCs como la autorrenovación y proliferación, sin embargo, pueden clasificarse fenotípicamente. Este tipo de precursor

expresa marcadores fenotípicos asociados a glía, expresando principalmente la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *Glial fibrillary acidic protein*) [17-19]. Este tipo de NSC a su vez genera un subtipo de células progenitoras neuronales (NPCs, del inglés *Neuronal progenitor cells*) de alta proliferación que a su vez comienzan su proceso de diferenciación convirtiéndose en neuroblastos e iniciando la migración hacia el destino correspondiente (Figura 1). Durante el proceso migratorio, los neuroblastos comienzan a generar neuronas inmaduras que extienden y crecen sus proyecciones para entablar comunicación con otras neuronas, integrarse a los sistemas neuronales existentes y así terminar su maduración [12]. Hacia finales del siglo XX se pensaba que este proceso se presentaba únicamente durante estadios embrionarios. No obstante, se ha encontrado evidencia que apoya la existencia de un proceso neurogénico en etapas post-embriónicas. Estos estudios han hallado factible el proceso neurogénico usando modelos murinos y más recientemente modelos humanos [20-24]

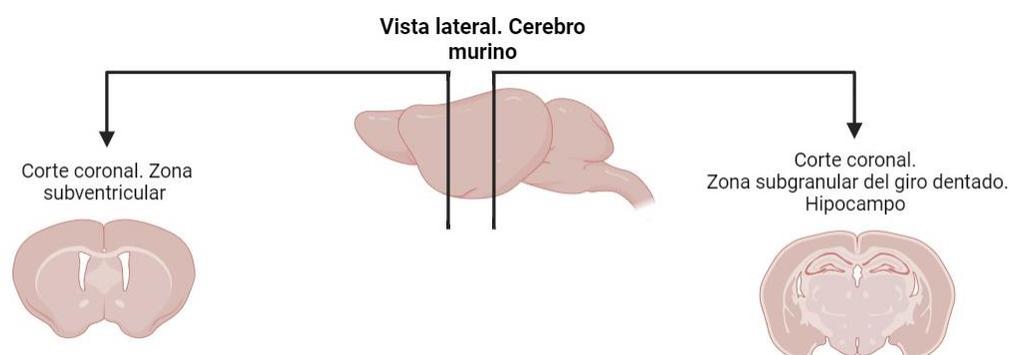


**Figura 1. Representación del proceso neurogénico.** De la línea punteada hacia el lado izquierdo, en color azul, se encuentran representadas las células troncales que dan origen a las células progenitoras de alta proliferación esquematizadas en rosa. Posteriormente estas células de alta proliferación comienzan la diferenciación hacia neuronas inmaduras representada en color verde. Del lado derecho a la línea punteada, es que mediante señales intracelulares mantiene la supervivencia y conduce hacia la madurez neuronal, en color azul [11]. Imagen realizada en Biorender®

La neurogénesis ocurre principalmente en dos regiones cerebrales pertenecientes al telencéfalo: la zona subgranular en el giro dentado ubicado en el hipocampo (SGZ, del inglés *Subgranular zone*) y en la zona aledaña a los ventrículos laterales (SVZ, del inglés *Subventricular zone*) (Figura 2) [5, 21].

El hipocampo adulto, al igual que el resto del parénquima cerebral adulto, se encuentra dividido en capas o estratos y dentro de cada una de estas capas existen diversos subtipos celulares [25]. Por otro lado, diversos estudios han determinado como la neurogénesis hipocámpal existe dentro de la SGZ adulta iniciando el proceso dentro de la capa subgranular.

En estas zonas existen NSCs que, mediante una proliferación asimétrica, generan células tipo troncal que expresan GFAP (NSC-GFAP+)[17, 18]. En este sentido, se ha demostrado que este tipo de célula es la fuente principal del proceso neurogénico, ya que se ha reportado que dichas células pueden diferenciarse y dar origen a NPCs de alta proliferación, conocidas como células progenitoras amplificadoras transitorias, las cuales migran desde la capa subgranular hasta la CA3, que también se encuentra dentro del hipocampo [11, 26, 27]. Durante este proceso de migración las células comienzan a diferenciarse hacia neuroblastos y posteriormente a neuronas granulares inmaduras. Finalmente, al extender sus proyecciones hasta circuitos preexistentes tienden a formar nuevos circuitos dentro del hipocampo, con lo cual se logra la maduración permitiendo así que las nuevas neuronas sean funcionales [28].



**Figura 2. Principales regiones neurogénicas del cerebro adulto en mamíferos.** Imagen representativa de las dos regiones neurogénicas presentes en el cerebro murino adulto. En el extremo izquierdo de la figura se esquematiza la zona subventricular (SVZ) mientras que, en el lado derecho, se muestra la zona subgranular (SGZ). Imagen realizada en Biorender ®

Por otro lado, Doetsche et al., realizaron un estudio sobre neurogénesis dentro de la segunda región neurogénica, la zona subventricular. En dicho estudio se determinó como las NSCs dan origen a precursores neuronales, que al igual que en la otra región neurogénica, presentan fenotipo glial [26]. Posteriormente estos precursores tienden a migrar tangencialmente hacia el bulbo olfatorio (OB, del inglés *Olfactory Bulb*) mediante la vía rostral migratoria (RMS; del inglés *Rostral Migratory Stream*). Durante este recorrido muchas de las células progenitoras comienzan un proceso complejo y muy detallado para adquirir fenotipo neuronal, es decir diferenciarse y lograr una maduración completa (ver figura 2). Al término de la migración gran parte de los precursores neuronales han terminado su maduración generando, por ejemplo, interneuronas; sin embargo, hay precursores que se mantienen en estado indiferenciado [19, 21].

### 2.3. Nicho neurogénico. Matrix extracelular

Existen diversos componentes que integran el nicho neurogénico, uno de los más importantes es la matriz extracelular (ECM, del inglés *Extracellular Matrix*). La ECM permite adquirir una composición estructural adecuada junto con una arquitectura favorable dentro del nicho para la supervivencia de las NSCs, asimismo favorece el proceso neurogénico [5, 29, 30].

Por ello en 2002, un estudio reportó la composición y arquitectura de la ECM dentro de los nichos neurogénicos, demostrando las implicaciones estructurales durante la neurogénesis y también la angiogénesis [31]. Mientras que, en trabajos recientes, se han identificado una gran cantidad de proteínas estructurales junto con las implicaciones en el proceso neurogénico. Dentro de las proteínas estructurales identificadas se destaca la presencia de proteoglicano de sulfato de condroitina (CSG, del inglés *Chondroitin Sulfate Proteoglycan*) que es una glicoproteína estructural presente en la ECM de los nichos neurogénicos [31, 32]. Múltiples estudios han mostrado el mecanismo por el cual los CSGs son considerados no sólo como proteínas estructurales sino también como moduladores del proceso neurogénico. Así, los resultados de dichos trabajos han evidenciado que la eliminación de esta glicoproteína tiende a disminuir la proliferación de las NSCs además de limitar y oponerse a la diferenciación neuronal [33, 34]. Se ha propuesto que el efecto de los CSG sobre estos procesos neurogénicos se debe a la interacción y asociación con diversos factores neurotróficos e interleucinas, además de que se ha descrito la potenciación en la funcionalidad de dichas moléculas gracias al papel de correceptor que tienen los CSGs, permitiendo así una mayor afinidad sustrato-receptor [33]. Además de los CSG, también se ha descrito la presencia dos glicoproteínas de suma importancia durante el proceso neurogénico: la reelina junto con la proteína tenascina, [29]. Ambas proteínas tienen implicaciones en la modulación de la proliferación de las NSCs dentro del SGZ, sin embargo, también se han reportado otras implicaciones. Por un lado, la reelina es una proteína inductora y regulatoria del proceso de migración dentro de la RMS hacia el OB, mientras que la tenascina tiene una función detonante para la diferenciación neuronal [35, 36].

Además de la existencia de proteínas estructurales, también existen, dentro de la ECM, enzimas metaloproteasas (MMPs, del inglés *Matrix Metalloproteinases*). Este tipo de enzimas, se encuentran constituidas por una amplia familia de hasta 23 subtipos. Entre las funciones de las MMPs se encuentra su relación con la degradación de proteínas, permitiendo así la remodelación de la ECM en demanda de las dinámicas celulares adyacentes. Los estudios para determinar las implicaciones de las MMPs en el proceso neurogénico se han estudiado en condiciones basales, así como en estados patológicos. En Agrawal et al., describen que las MMP son importante durante la migración de los neuroblastos a través del a RMS en condiciones basales durante el desarrollo embrionario. No obstante, también para la migración de células precursoras posterior a eventos cerebrovasculares del tipo isquémico [29, 37]. Además, existe evidencia de la implicación funcional de las MMPs durante la neurogénesis en regiones del sistema nervioso periférico [38]. Aunado a esto, también se ha demostrado la existencia una fuerte correlación entre la síntesis de la glicoproteína tenascina y la síntesis de MMPs y la implicación que esto tiene durante la angiogénesis [37, 39].

#### **2.4. Nicho neurogénico. Interacciones célula-célula durante la neurogénesis**

Para lograr un proceso neurogénico adecuado se requieren de diversas interacciones y señales dadas por el microambiente. Algunas de estas interacciones son promovidas por las células adyacentes encontradas en el nicho neurogénico. Un ejemplo de ello es la glía, la cual destaca tanto por su abundancia dentro del parénquima cerebral como por su versatilidad en

funciones metabólicas, regulatorias y protectoras. Los astrocitos son el tipo más abundante de células gliales, así como de todas las células presentes en el sistema nervioso central, representando aproximadamente entre un 20% y un 40% [40]. Los astrocitos son células morfológica y funcionalmente heterogéneas. Su alta especialización respecto a la funcionalidad radica en la ubicación espacial en la que se encuentren. Existen diferencias en su morfología, proyecciones y en su función dependiendo de su ubicación en diferentes áreas cerebrales e inclusive dentro de una misma región [40]. Respecto al desempeño de estas células en la neurogénesis, los astrocitos tienen un papel modulador de la proliferación y diferenciación de las NSCs hacia neuronas. Se han realizado estudios usando co-cultivos celulares de NSCs y astrocitos para determinar la influencia que tiene la glía en la proliferación de las NSCs. Para ello se buscó eliminar farmacológicamente la presencia de los astrocitos en los co-cultivos, los resultados indicaron que la proliferación de las NSCs fue abatida. Sin embargo, existe un incremento en la diferenciación de las NSCs preexistentes hacia neuronas. Por otro lado, otro reporte muestra que el apoyo que brindan los astrocitos para la maduración neuronal es permitir la correcta formación de nuevos circuitos neuronales o bien, la integración hacia circuitos preexistentes, permitiendo así una correcta maduración y una funcionalidad completa [41, 42]. Otro tipo celular de alta importancia son las células endimarias. Este subtipo celular se encuentra principalmente en la zona ventricular o subventricular, muy próxima al nicho neurogénico hallado en la SVZ, además de tener una morfología cuboide y un núcleo bastante redondo y fino. Por otro lado, su superficie está cubierta por finas microvellosidades. Dentro de sus funciones, las células endimarias permiten la síntesis de líquido cefalorraquídeo; sin embargo, en los últimos años, se ha determinado su desempeño en el proceso neurogénico de las NSCs ubicadas en el SVZ [43]. En este sentido, las células endimarias presentan uniones estrechas lo que les permite interactuar de forma directa con los astrocitos encontrados en el nicho neurogénico. Gracias a estas uniones es que logran censar, coordinar y permitir el paso de señales extrínsecas. Por esta razón, debido a las demandas y cambios metabólicos ocurridos en el nicho neurogénico, es que se permite el intercambio de iones y metabolitos hacia el interior del nicho neurogénico, lo que regula las dinámicas celulares de las NSCs [5, 14].

Debido a la alta demanda metabólica que existe por parte de las NSCs durante la neurogénesis es que la vasculatura se convierte en una gran proveedora de más nutrientes, iones y oxígeno, así como acarreadora de desechos. Siguiendo con esta idea, Palmer et al., 2000 mostraron que la neurogénesis en SGZ ocurre de forma muy cercana a los vasos sanguíneos presentes en esta región [44]. Además, otros estudios han demostrado una íntima y recíproca relación entre la neurogénesis con la angiogénesis gracias a la presencia de subtipos celulares como células gliales, células endoteliales y endimarias, así como moléculas solubles en común. En este sentido, un reporte mostró la realización de co-cultivos celulares de las NSCs con células endoteliales buscando determinar la regulación de estas células en el proceso neurogénico. Los resultados mostraron que el co-cultivo de las NSCs con células endoteliales duplicaban la proliferación a diferencia de otros subtipos celulares. Por lo anterior, dicho estudio concluyó que las células endoteliales tienen funciones regulatorias sobre el proceso neurogénico más allá de ser únicamente células estructurales en la vasculatura [45, 46]. Por otro lado, una de las moléculas reguladoras en ambos procesos es el factor de crecimiento

vascular endotelial (VEGF, del inglés Vascular Endothelial Growth Factor) la cual es una proteína secretada. El efecto de esta proteína se debe a la unión a los receptores tirosina cinasa encontradas en las células endoteliales donde promueven la angiogénesis por lo que se le considera un factor angiogénico. Otra de las moléculas reguladoras en ambos procesos es el factor neurotrófico derivado del cerebro

(BDNF, del inglés Brain Derived Neurotrophic Factor), miembro de la familia de las neurotrofinas, que usualmente liberada por neuronas; sin embargo, se ha determinado que también las células endoteliales mantienen una liberación constitutiva [47]. Respecto a la función de ambos factores en la neurogénesis, estudios muestran que la adición exógena de VEGF y BDNF favorece el proceso neurogénico a través de la regulación en la proliferación de las NSCs, así como la diferenciación de dichas NSCs hacia neuronas maduras [48, 49]. De acuerdo con lo reportado se concluye que ambos procesos, neurogénesis y angiogénesis, mantienen una alta comunicación y una coordinación mutua [5, 44]. Dentro de la ECM también existen receptores de superficie que permiten una asociación directa entre las células y la ECM. Un ejemplo bien documentado es la familia de receptores de superficie denominado como integrinas, las cuales se asocian con el citoesqueleto favoreciendo así una orientación espacial determinada permitiendo a su vez que los procesos celulares se lleven con normalidad [5].

## **2.5. Nicho neurogénico: señalización por factores solubles**

Los factores solubles son moléculas biológicamente activas que ejercen su función a través de receptores expresados en las células diana. La versatilidad de los factores solubles permite englobarlos en múltiples moléculas, abarcando desde familias de neurotransmisores (NTs, del inglés Neurotransmisor), neurotrofinas (NF, del inglés Neurotrophins) y de factores de crecimiento (GFs, del inglés Growth Factors) hasta otro tipo de moléculas halladas en el nicho neurogénico, tal y como se muestra en la Tabla 1. Muchos de estos factores solubles son secretados de forma constitutiva o bien de manera regulada, es decir mediante una señal específica permitiendo su liberación [13, 50]. Asimismo, dichos factores son liberados por los múltiples subtipos celulares encontrados en el nicho neurogénico. De igual manera, existen moléculas que se encuentran de forma adyacente, además, como se describió anteriormente, estas moléculas se pueden almacenar en la ECM para tener implicaciones celulares futuras. A continuación, se agrupan los factores solubles en familias y se hace una descripción general de los efectos e implicaciones que tienen durante el proceso neurogénico en etapa adulta.

## **2.6. Neurotransmisores**

Si bien los NTs son moléculas biológicas liberadas por las neuronas para mantener la comunicación entre las mismas neuronas y las células gliales [14], se ha estudiado ampliamente su efecto en la neurogénesis adulta tanto en estadios fisiológicos como durante procesos patológicos. Los neurotransmisores que mayormente se han estudiado son los inhibitorios y excitatorios como GABA y glutamato (Glu) respectivamente, al igual que

serotonina (5-HT) junto con dopamina (DA). Esto no quiere decir que no exista participación de otros neurotransmisores, sin embargo, los efectos dados por otros neurotransmisores presentan una señalización regulada por los cuatro neurotransmisores mencionados previamente [5, 11, 14, 29].

GABA es el principal NT de carácter inhibitorio presente en sistema nervioso central adulto (CNS, del inglés Central Nervous System). Al unirse a su receptor ionotrópico GABA-A permite la entrada del anión de cloruro [ $Cl^-$ ] haciendo que el potencial de membrana disminuya alejándose del potencial de acción. Por el contrario, durante periodos embrionarios el NT GABA resulta ser excitatorio. Es gracias a la alta concentración de [ $Cl^-$ ] citoplasmática. Cuando GABA se une a su receptor permite la salida, por difusión de gradiente del anión y con esto comienza a despolarizar la célula lo que a su vez permite la apertura de otros canales iónicos dependientes de voltaje permeables a cationes como [ $Ca^{2+}$ ] y [ $Na^+$ ]. Todo esto contribuye a despolarizar la membrana hasta llegar a realizar un potencial de acción [51, 52]. El rol funcional que tiene GABA durante la neurogénesis adulta es variado, por ejemplo, en 2005 se demostró, mediante el uso de registros electrofisiológicos, como las NPCs neuronales encontradas en el SGZ adulto eran excitadas en presencia de GABA, asimismo, esta excitación podía modular la diferenciación de los NPCs hacia neuronas granulares inmaduras y a su vez la señalización de GABA permitía la correcta integración a circuitos sinápticos, es decir una maduración funcional [53, 54]. Por otro lado, estudios realizados en SVZ demostraron la existencia de un ciclo de retroalimentación positiva respecto a la liberación y señalización de GABA que controla la proliferación de las NSCs-GFAP+ [55] y por otro lado permitía actuar como un represor durante migración de neuroblastos a través de la vía RMS [56].

Glutamato (Glu) es el principal NT excitador del sistema nervioso, esta función se realiza a partir de su unión con dos tipos de receptores: AMPA/Kainato y NMDA. Para lograr activar el receptor NMDA es necesario que de primera instancia se active el receptor AMPA mediante la unión a Glutamato, lo que permite la entrada de iones [ $Na^+$ ] y esto permite a su vez a la neurona alcanzar un potencial de membrana alto, es decir que se despolarice. Lo anterior porque el receptor NMDA presenta un bloqueo por el ion [ $Mg^{2+}$ ] que se desprende cuando se aumenta el potencial de membrana [14]. Estudios realizados *in vitro* dentro de la SGZ demostraron la regulación que tiene la activación y la inhibición de ambos receptores durante la neurogénesis. Primeramente, con la activación exógena del receptor NMDA, modulando la actividad endógena dada por el Glu, se determinó como disminuye la proliferación en las células precursoras y favorece el proceso de diferenciación neuronal, mientras que el bloqueo farmacológico del mismo receptor, así como del receptor AMPA, restaura y favorece la proliferación de dichos precursores [57-59].

La serotonina (5-HT) es una molécula ampliamente estudiada en procesos neuronales tales como la atención, motivación, adicciones y en patologías psiquiátricas. Su origen proviene desde el tallo cerebral, lugar donde se originan las proyecciones serotoninérgicas, las cuales provienen del núcleo dorsal y medial de rafe. Dichas proyecciones inervan múltiples estructuras del CNS entre las que destacan las dos zonas neurogénicas: SVZ y SGZ. Respecto

al papel que juega la serotonina en el proceso neurogénico, se ha estudiado dicho papel utilizando métodos de ablación farmacológica del neurotransmisor, o bien, mediante una denervación de las proyecciones serotoninérgicas provenientes de ambos núcleos. En este sentido, dos estudios concluyeron que la eliminación de la serotonina abate la proliferación en ambas regiones neurogénicas [60, 61]. Como parte de lo reportado en los estudios mencionados, los autores postulan que las alteraciones en la neurogénesis se deben a una modulación de ciertos factores tróficos dada por la 5-HT; mientras que también discuten si la 5-HT modula la excitabilidad de las células precursoras e inmaduras dentro del SGZ, al igual que la sobreactividad de los receptores NMDA [61, 62].

Por último, la dopamina (DA) es el principal neurotransmisor de la familia de las catecolaminas. La DA está ampliamente estudiada en procesos relacionados a la motivación, la atención y el movimiento [63, 64]. Al igual que la 5-HT, su síntesis y distribución tiene origen en el tallo cerebral, específicamente dentro del mesencéfalo en el área tegmental ventral donde reside la sustancia negra *pars compacta*, la cual es el principal centro de producción de dopamina en todo el sistema nervioso; además de que se han detectado proyecciones dopaminérgicas en ambas regiones neurogénicas [63, 65, 66]. Respecto a su funcionalidad, para que la dopamina tenga una función fisiológica se requiere que la molécula se una a un receptor. Por un lado, se tienen los receptores D1 (D1 y D3) y por otro los receptores D2 (D2, D4, D5). En 2004, mediante inmunodetección, se describió la distribución de los receptores D1 y D2 dentro de la SVZ. Aunado a lo anterior, se demostró que las NSCs-*GFAP*<sup>+</sup> expresan receptores de la familia D2, mientras que los neuroblastos expresan receptores de ambas familias. Posteriormente, se probó el efecto de la DA sobre la proliferación en la SVZ a través de la observación y posterior reporte de que la adición exógena de la DA favorece la proliferación de las NSCs-*GFAP*<sup>+</sup> gracias al receptor tipo D2 hallado previamente, mientras que, la denervación de las proyecciones dopaminérgicas resultaba en una disminución en la proliferación de estas mismas células [65, 67]. Por otro lado, un reporte mostró la importancia de la DA en la neurogénesis hipocámpal mediante la adición exógena del NT junto con la activación farmacológica de los receptores dopaminérgicos. Los resultados indicaron que la DA, mediante la activación de los receptores de la familia D1, promueve la proliferación de las NPCs [63].

## **2.7. Factores neurotróficos y factores de crecimiento.**

Como se describió anteriormente, los factores solubles pueden englobar una gran cantidad de moléculas biológicamente activas. Entre ellas se encuentran los factores neurotróficos y crecimientos, tal como se resume en la Tabla 1. Respecto a los factores neurotróficos, uno de los principales factores estudiados en relación con la neurogénesis en etapa adulta es el BDNF [5, 14, 68]. Existen dos tipos de receptores para el BDNF que permiten la señalización asociada a esta molécula. El primer tipo de receptor se conoce como TrkB, mientras que el otro tipo de receptor es p75. Ambos tipos de receptores presentan una afinidad diferente por el ligando además de activar diferentes vías de señalización [68].

Se ha determinado como la liberación de NFs están mediados por diferentes subtipos celulares, tal es el caso de células neuronales, gliales, endoteliales y endimarias encontradas si bien en los nichos neurogénicos de la SGZ y la SVZ, también se han encontrado en áreas próximas a estos nichos. Asimismo, se ha estudiado la señalización paracrina que presentan estas moléculas durante el proceso neurogénico. Mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se ha establecido la señalización paracrina de BDNF liberado por células endoteliales durante la neurogénesis. De primera instancia se demostró que sin la existencia de la interacción directa entre célula-célula, el BDNF soluble promueve la proliferación celular [14]. Mientras que, en otro estudio, se comprobó como el BDNF soluble endógeno, así como el exógeno, sostiene y regula el proceso de migración de los neuroblastos presentes en la vía RMS [69]. Algo a destacar es que, los efectos moderadores del BDNF sobre la neurogénesis, se deben a la señalización bivalente de ambos tipos de receptores tanto el receptor TrkB como el receptor p75. Por otro lado, en otro estudio, se demostró como la síntesis del BDNF por neuronas granulares dentro de SGZ permitía la diferenciación y posterior maduración de las NPCs hacia neuronas, además demostraron que este proceso estaba fuertemente relacionado por el aumento en liberación y difusión de GABA dentro de esta región neurogénica [53, 68, 70]. Otra gran familia de proteínas involucradas en la neurogénesis son los factores de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés Epidermal Growth Factor) así como el de fibroblastos tipo 2 (FGF-2 (bFGF), del inglés Fibroblast Growth Factor) [5, 12, 14]. Cada uno de estos factores tiene su propio receptor mediante el cual se modula la unión del ligando y, al igual que la gran mayoría de moléculas solubles, la acción de los factores de crecimiento esta mediada por un receptor. Sin embargo, la señalización intracelular de cada factor de crecimiento se encuentra íntimamente asociada entre cada subtipo de receptor. En este sentido, se ha investigado el papel que tiene cada uno de estos factores durante la neurogénesis, demostrando como ambas moléculas favorecen la proliferación de los NPCs dentro de ambas regiones neurogénicas [5, 14, 71]. Sin embargo, existen variaciones en el proceso de diferenciación que es dado por cada factor. Tomando en cuenta lo anterior, dos reportes demostraron la diferencia que tenían ambas moléculas en el proceso de diferenciación dentro de la SVZ. En uno de dichos reportes se determinó que el EGF permitía la proliferación de los precursores, pero promovía fuertemente una diferenciación hacia subtipos gliales. Mientras que otro trabajo demostró que el FGF-2, al igual que EGF, además de favorecer la proliferación, tendía a promover la supervivencia y en particular el bFGF puede promover la diferenciación hacia neuronas [72, 73]. Por otro lado, también se ha estudiado la expresión y función del receptor de FGFR junto con el receptor de EGFR en los nichos neurogénicos. Estudios han caracterizado, dentro de la SVZ, la presencia y función de EGFR en poblaciones NSCs-*GFAP*<sup>+</sup> y en células precursoras de rápida proliferación [65, 72, 73]. Recientemente, se ha estudiado la influencia del ambiente enriquecido como promotor de la neurogénesis mediando sus efectos a través del FGFR ubicado en SGZ [74].

## **2.8. Proteínas solubles.**

Dentro este último grupo se agrupan a todas aquellas moléculas biológicamente activas que han sido estudiadas con relación al proceso neurogénico (ver Tabla 1). En algunas revisiones

se describen los múltiples factores solubles secretados tanto por las NSCs y NPCs así como por las células periféricas adyacentes al nicho neurogénico, al igual que las implicaciones que tienen dentro del proceso neurogénico [5, 11, 14]. Mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* se permitió definir y estudiar las implicaciones que tienen estas moléculas durante dicho proceso. De las moléculas ampliamente descritas son las interleucinas (ILs, del inglés Interleukine), Wnt, BMP/Noggin, Notch/Delta-Jagged y algunas efrinas (Ephs, del inglés Ephrines) por mencionar algunas. Las ILs constituyen una familia bastante amplia y compleja de moléculas biológicamente activas que usualmente están asociadas a una respuesta inmune gracias al efecto que ejercen sobre células especializadas como linfocitos T, células NK entre otras. Las ILs permiten la proliferación, maduración, migración y adhesión de este tipo de células mediante una comunicación paracrina o autocrina [75]. Además, esta gran familia puede ser clasificada en dos tipos; moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias. Por otro lado, se han estudiado sus implicaciones biológicas en procesos neuronales gracias a la secreción de estas proteínas por parte de las NSCs. Un ejemplo de ello es mostrado por un reporte en donde se determina la secreción constitutiva de interleucinas, principalmente IL6 así como IL-8 a partir de modelos *in vitro* de NSCs o NPCs [13]. Además de la secreción constitutiva de estas ILs, se evaluaron los cultivos de NPCs en presencia de IL-6 para determinar sus implicaciones sobre la neurogénesis, demostrando que dicha IL influye para la diferenciación glial principalmente hacia astrocitos [13, 76]. Por otro lado, en otro trabajo, se generaron ratones transgénicos para eliminar la expresión de IL-6, al analizarlos se observó una caída significativa en la proliferación de las NPCs dentro del SGZ [77]. Mientras que, en otro reporte, se demostró la secreción constitutiva de IL-10 dentro de la SVZ, asimismo se determinaron las implicaciones biológicas de la IL-10 sobre la proliferación y diferenciación de las NPCs, determinando que la IL-10 permitía el mantenimiento de la proliferación en las células sin permitir dar paso a la diferenciación [78]. Los resultados de estos estudios muestran un papel heterogéneo respecto a los múltiples tipos de ILs y su implicación sobre la neurogénesis, sin embargo, se puede concluir que son moléculas moduladoras e influyentes en dicho proceso.

Durante el desarrollo, Wnt es una de las moléculas más importantes para el proceso neurogénico. Se ha descrito mucho acerca de sus diferentes actividades biológicas durante el proceso neurogénico prenatal, mientras que, en estadio adulto, se ha determinado su presencia para orquestar procesos de diferenciación neuronal. De acuerdo a un trabajo publicado en 2004, al evaluar la secreción de la proteína sFRP3, el cual es un inhibidor en la señalización de Wnt, se observó un abatimiento de la diferenciación neuronal inducida por Wnt [5]. Además de ser una proteína soluble liberada mediante difusión, también se ha visto que Wnt es secretada de forma constitutiva dentro de exosomas junto con otras proteínas, así como RNAs [13].

Otra de las proteínas constitutivamente secretadas por las NPCs, es la proteína BMP, junto con Noggin, en ambas regiones neurogénicas. Se ha descrito que BMP bloquea de forma directa la proliferación de las NSCs ya que promueve una diferenciación hacia fenotipo glial [14, 79, 80]. Por otro lado, dentro de la SVZ, existe también la producción y secreción de la proteína Noggin por parte de las células endimarias presentes en el nicho neurogénico, esta

proteína inhibe la señalización inducida por BMP. De acuerdo con Lim y colaboradores, la activación de Noggin favorece el bloqueo en la señalización de BMP, lo que permite recuperar la proliferación disminuida inducida por BMP [80]. De igual forma Bonaguidi et al., 2008 indujeron la activación de Noggin, lo que corroboró el favorecimiento de la proliferación, pero además también permitió mantener la autorrenovación en cultivo *in vitro* de las NSCs evaluadas [81]. Finalmente, Notch es una proteína transmembranal fuertemente implicada en la autorrenovación y en la diferenciación glial [5]. Sin embargo, para que sea funcional, se requiere de una cascada de señalización que se da a partir de la unión entre proteínas membranales como Delta y Jagged, las cuales, al unirse con Notch generan una modificación estructural lo que le permite desprenderse de la membrana así generar una señalización que tiene por objetivo el núcleo y así favorecer la modulación de diversos factores de transcripción [5, 82]. Por otro lado, las Ephs son proteínas que tienen su función biológica gracias a la asociación con receptores transmembranales. En un reporte previo se describió la presencia de múltiples receptores asociados a Efrinas (Ephs) a través de la SVZ [83]. Posteriormente, en otro trabajo, se demostró la implicación biológica que tienen las Ephs para la proliferación y migración neuronal [83, 84]. Sin embargo, en 2005 se demostró también la regulación negativa por parte de Ephs durante la neurogénesis [85]. Lo que se puede concluir de estos trabajos es la importancia biológica de las Ephs dentro de la neurogénesis, sin embargo, aún falta por establecer los subtipos de estas proteínas y sus posibles funciones durante el proceso neurogénico.

---

**Tabla 1. Moléculas solubles y su efecto en el proceso neurogénico.**

---

<b>Molécula</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Implicaciones en el proceso neurogénico</b>	<b>Referencia</b>
GABA	Neurotransmisor	Proliferación+, diferenciación+ y migración -	Liu et al., 2005
			LoTurco et al., 1995
			Ge et al., 2006
			Tozuka et al., 2005
			Waterhouse et al., 2012
			Bolteus et al., 2004
Glutamato	Neurotransmisor	Proliferación +/- , y Diferenciación	Nacher, J., et al., 2007
			Bernabeu et al., 2000
			LoTurco et al., 1995

---

---

Serotonina	Neurotransmisor	Proliferación +	Brezun et al., 1999 Brezun et al., 2000 Piguet et al., 1994 Banasr et al. 2004 Santarelli et al. 2003
Dopamina	Neurotransmisor	Proliferación + y Diferenciación+	Takamura, N., et al., 2014 Hoglinger et al., 2004 Hoglinger et al., 2007 Malberg et al., 2000
Acetilcolina	Neurotransmisor	Proliferación +	Mohapel et al., 2005 Veena et al., 2011 Cooper-Kuhn et al 2009
BDNF	Factor neurotrófico	Proliferación +	Waterhouse et al., 2012, Vilar et al., 2016
VEGF	Factor neurotrófico	Proliferación +	Gómez et al., 2017 Jin et al., 2002 Suh et al., 2009 Zhu et al., 2003
EGF	Factor neurotrófico	Proliferación + y mantenimiento de troncalidad	Kuhn et al., 1997 Craig et al., 1996 Lie et al., 2004
FGF-2/ bFGF	Factor neurotrófico	Proliferación +	Palmer et al., 1995 Suh et al., 2009 Taupin et al., 2000 Riquelme et al., 2006
Noggin	Proteína soluble.	Proliferación +	Lim et al., 2000 Bonaguidi et al., 2008
	Proteína transmembranal.		Gaiano et al., 2002

---

Notch		Diferenciación +	Riquelme et al., 2006 Suh et al., 2009
Delta	Proteína soluble.	Diferenciación +	Gaiano et al., 2002 Riquelme et al., 2006 Suh et al., 2009
Jagged	Proteína soluble.	Diferenciación+	Gaiano et al., 2002 Riquelme et al., 2006 Suh et al., 2009
EphB2	Proteína soluble.	Proliferación + y Migración +	Conover et al., 2000
Efrina B2	Proteína soluble.	Proliferación +	Holmberg et al., 2005
Shh	Proteína soluble.	Proliferación + y Diferenciación +	Machold et al. 2003 Lai et al. 2003
Sox2	Factor de transcripción	Proliferación + y mantenimiento troncalidad	Suzuki et al., 2015 Calof et al., 1989 Suh et al., 2007
NeuroD	Factor de transcripción	Proliferación + y Diferenciación	Galichet et al., 2008 Liu et al. 2000 Suh et al 2009
Olig2	Factor de transcripción	Diferenciación +	Suh et al., 2009 Sokpor et al., 2018
Pax6	Factor de transcripción	Diferenciación +	Suh et al., 2009 Sokpor et al., 2018

*Notas.* En la presente tabla la información de las moléculas participantes en el proceso neurogénico se muestra distribuida en cuatro columnas. En la primera columna se indica el nombre de cada molécula, seguido de su respectiva clasificación, luego su implicación en el proceso neurogénico y finalmente la bibliografía. Por un lado, el signo + indica que es promotora o favorecedora del proceso neurogénico, mientras que el signo - indica inhibición del proceso al que esté implicado ya sea por su presencia o bien directamente por la ausencia de cada biomolécula.

## 2.9. Epitelio olfatorio: región neurogénica extracraneal

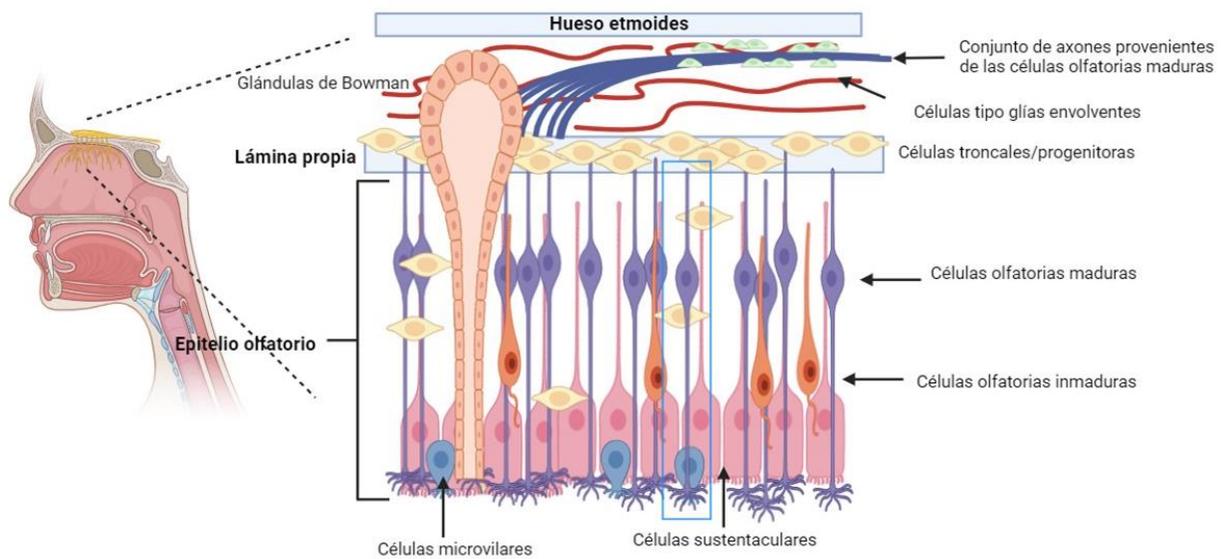
La mayoría de los enfoques para el estudio del proceso neurogénico se han hecho bajo dos condiciones particulares; se estudia en etapas embrionarias y en estructuras internas del parénquima cerebral. Sin embargo, para estudiar dicho proceso se han realizado aproximaciones que van desde el estudio en etapa adulta hasta su evaluación en regiones neurogénicas fuera del parénquima cerebral. Siguiendo con este orden de ideas, en 1979, Graziadei et al., realizaron una caracterización del epitelio olfatorio (OE, del inglés Olfactory Epithelium) murino determinando la presencia de múltiples tipos celulares, algunas con características y dinámicas de troncalidad (autorrenovación, proliferación y diferenciación). Respecto a la capacidad de diferenciación, las células troncales de esta región generan neuronas sensoriales olfatorias (mOSN, del inglés mature Olfactory Sensory Neuron), así como neuronas sensoriales olfatorias inmaduras (imOSN, del inglés Immature Olfactory Sensory Neuron) y células de soporte. Por lo tanto, en dicho estudio se concluyó la existencia de neurogénesis dentro del epitelio olfatorio murino [3, 86]. Por otro lado, dentro de la cavidad nasal, en la parte posterior del hueso etmoides y en la pared medial interna se encuentra el septo nasal junto al turbinado superior, en esta región, orientándose en la parte dorsal, se encuentra la mucosa olfatoria, la cual se define como el órgano sensorial para el sentido del olfato. Al respecto, el sentido del olfato consiste en un epitelio pseudoestratificado [87, 88] (Figuras 3A y 3B) y se constituye por cuatro elementos: el bulbo olfatorio, lámina cribiforme, lámina propia y el epitelio olfatorio (OE). Cada uno de estos elementos está ubicado en un eje dorsoventral [89, 90], es decir, el bulbo olfatorio se encuentra en la parte más dorsal de la mucosa olfatoria, mientras que el OE se halla en la parte ventral (ver figura 3). Respecto a su histología, el OE murino es un epitelio pseudoestratificado columnar que se divide en tres capas y en cada una de estas existen diversos tipos celulares que conforman una compleja y bien definida citoarquitectura: una capa apical donde residen las células sustentaculares, una capa media, la cual contiene mOSN, imOSN, y una capa basal donde residen las células basales globosas (GBC, del inglés Globose Basal Cell) así como las horizontales globosas (HBC, del inglés Horizontal Basal Cell). Ambos subtipos celulares son reconocidos como células progenitoras olfatorias (OPC, del inglés Olfactory Progenitor Cells) (Figura 3C) [2-4, 88, 89, 91, 92].

Como se mencionó previamente, en la capa apical se encuentran las células sustentaculares, las cuales presentan un fenotipo glial no neuronal y pese a mantenerse en estado proliferativo no presentan comportamiento de progenitor neural, aunque expresan marcadores de progenitores tales como Pax6 y Sox2. Estas células presentan grandes elongaciones que se extienden a través de todo el epitelio llegando hasta la lámina basal, por lo que dan sustento estructural al OE. Además, las células sustentaculares permiten mantener la homeostasis de las mOSNs, de tal forma que degradan moléculas basuras, mantienen el balanceo iónico adecuado, y fagocitan células muertas [2, 13]. Existen otros tipos celulares como las células microvelares (MC, del inglés Microvellar Cells) y las células glomerulares de Bowman (BGC, del inglés Glomerular basal cells) (ver figura 3) las cuales se encuentran distribuidas en todo el OE y permiten un adecuado desarrollo, regeneración y función del OE [93]. Por un lado, las MC presentan microvellosidades y extensiones citoplasmáticas hasta la lámina

propia, lo que confiere una estructura bipolar aparente [2]. Algunos estudios han mostrado que las MC estimulan la proliferación de las células progenitoras encontradas en la capa basal de forma directa a través la secreción de factores solubles [94, 95]. Por otro lado, las GBC consisten en acinos y ductos que se extienden de la lámina propia a través del epitelio permitiendo la liberación de secreciones de mucosas en la superficie apical. La capa de mucosa generada recubre el OE, lo que confiere un ambiente adecuado para la supervivencia de las imOSNs y posterior maduración a mOSN [2, 13].

Respecto a la segunda capa o capa media del epitelio olfatorio murino, se ha descrito la presencia de imOSN y mOSN, en donde la capa más basal pertenece a las imOSN, mientras que la existencia de OSN radica más en la parte apical de dicha capa [2]. Referente al paso de maduración entre una neurona inmadura a una madura, ésta consiste en la generación de proyecciones. Al ser bipolar, este tipo de neurona sensorial presenta una sola dendrita ciliada que se extiende a la superficie del epitelio, mientras que por otro lado tiene un único axón no mielinizado que se dirige al OB a través de la lámina cribiforme [13, 88]. En cuanto a su identificación, las OSN pueden detectarse mediante la expresión diferencial de ciertas proteínas (ver figuras 3 y 4); pese a que ambos tipos de neuronas expresan NCAM, existe una expresión diferencial de proteínas entre ellas, por un lado, las imOSN expresan de forma particular  $\beta$ -III-tubulina junto con GAP43, mientras que las mOSN expresan principalmente la proteína OMP [96].

Finalmente, debajo de la capa media o intermedia existe la capa basal donde se encuentran tres tipos de poblaciones celulares y que, al igual que la capa intermedia, se puede dividir en subcapas. En cuanto las poblaciones celulares, las GBC son células de núcleo redondeado con una alta actividad mitótica por lo que constantemente están en proliferación sin embargo tiene una capacidad de autorrenovación limitada. Por otro lado, existen dos subpoblaciones bien definidas de GBC; células amplificadoras transitorias (GBCt) y los precursores intermedios neuronales (GBC-INP). Para una adecuada identificación, existen marcadores asociados a estas células, algunos ejemplos son GBC-1, p75GNFR, así como la expresión secuencial de genes pro neuronales *Mash1* y *Ngn1* [13, 88, 97]. Inmediatamente debajo de este tipo celular se encuentran las HBC las cuales son células lisas, con núcleo alargado, muestran una tinción oscura con azul de toluidina y presentan una organización en monocapa encima de la lámina propia [97]. A diferencia de las GBC, estas células presentan una baja tasa de proliferación. Respecto a su identificación, algunos de los principales marcadores descritos en la literatura son la citoqueratina-5, 6 y 14, ICAM1, Pax6 y Sox2 [97]. Cabe destacar la existencia de una jerarquía de progenie entre las células HBC y las GBC, es decir, gracias a las células HBC se da como progenie inmediata a las GBC y posteriormente se continúa con el proceso de división y diferenciación hasta formar neuronas sensoriales (más adelante se describe el proceso neurogénico dado por las HBC). Sin embargo, diversos estudios ponen como principales actores a las GBC (GBCt y GBC-INP) para poblar todo el OE [2, 13, 88, 97] (Figura 4). Por último, las OEC son células de tipo glial presentes en la lámina propia donde su rol funcional es el de ser apoyo estructural para los paquetes de axones provenientes de las mOSN que se dirigen hacia el OB, por lo que estas células pueden migrar entre el CNS y PNS.



**Figura 3. Anatomía del epitelio olfatorio: región neurogénica extracraneal.** Se muestra esquema de un corte sagital de la pared media de la cavidad nasal, en ella se representa de forma ampliada la mucosa olfatoria junto con los subtipos celulares ubicados. Imagen realizada en Biorender ®[88-90, 98].

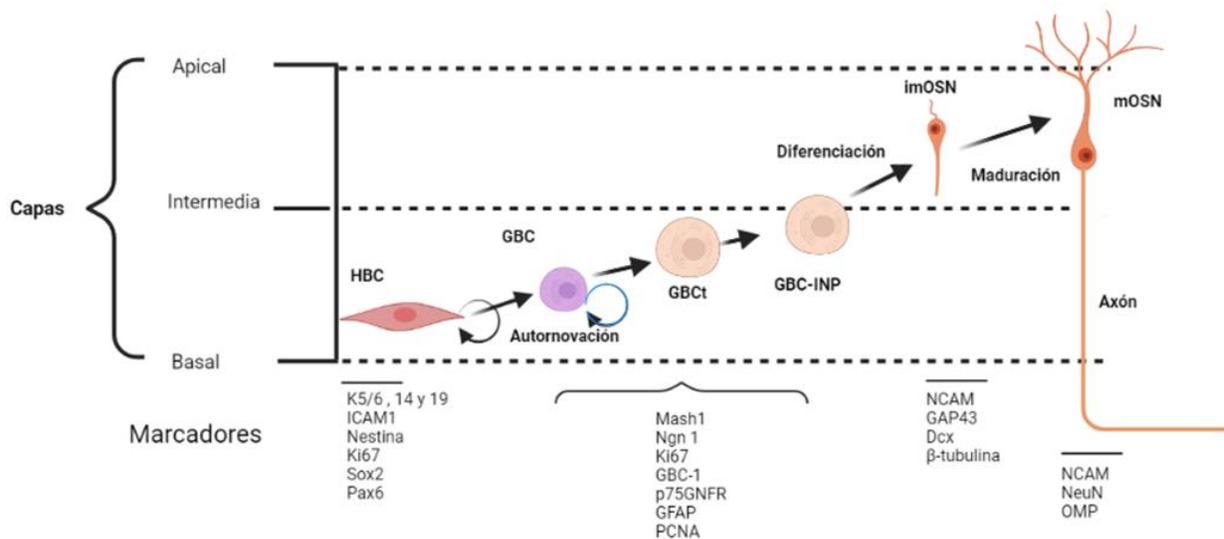
### 3.0. Neurogénesis extracraneal.

Las neuronas sensoriales olfatorias dentro del OE están expuestas tanto a los odorantes como a los patógenos y sustancias tóxicas presentes en el ambiente, por lo que su tiempo de vida puede variar y se requiere su constante reemplazo. Se estima que el tiempo de vida de una neurona sensorial va desde meses hasta un año, por lo que tienen que ser reemplazadas frecuentemente mediante la proliferación, migración y diferenciación de la estirpe troncal presente en dicha región, es decir mediante neurogénesis [97]. En este sentido, al igual que en el CNS, existen una serie de pasos altamente regulados y complejos para lograr un proceso neurogénico satisfactorio. Por lo anterior, diversos grupos de investigación han descrito detalladamente cada una de las etapas neurogénicas dentro de este epitelio pseudoestratificado. Aunado a lo anterior, también se ha descrito como la neurogénesis del OE presenta una disminución asociada a la edad [99, 100].

El estudio de la neurogénesis del OE se ha descrito a través de dos condiciones: desde el aspecto basal y a partir de alguna lesión química o mecánica. En ambas condiciones se ha determinado que dicho proceso tiene su inicio en la capa basal, en donde residen las HBC. Dicho tipo celular se ha descrito con características de multipotencialidad, ya que pueden dar origen tanto a células neuronales como no neuronales, además, recientemente se ha descrito que comparten características con otros tipos de células troncales [91]. Por otro lado, las HBC, pese a tener una división lenta, dan origen a las células GBC, tanto GBCt como GBC-INP. Ambos subtipos celulares mantienen su carácter proliferativo y de autorrenovación encendido el cual tiende a disminuir después de algunos ciclos de replicación. Siguiendo este orden de ideas, el primer subtipo de GBC muestra una alta tasa de proliferación por lo que

también se les conoce como células amplificadoras, así, las GBCt cumplen la misión de incrementar el número de células GBC producidas por cada ciclo de división de las HBC. Posteriormente algunas de las GBCt se convierten en GBC-INP, las cuales se encuentran comprometidas al linaje neuronal, por lo que comienzan con el proceso de diferenciación hacia imOSN después de algunos ciclos de replicación [2, 13, 92, 97]. A las imOSN también se les puede referir como neuroblastos, ya que se les ha detectado la expresión de la proteína ácida fibrilar glia [101]. Para lograr una maduración adecuada se requiere la generación de un axón y una dendrita, los cuales proyectan a las superficies apical y basal, respectivamente [13]. Una vez maduras, el conjunto de axones de las nuevas neuronas sensoriales sale de la parte basal del OE, forman fascículos que atraviesan la placa cribiforme y se dirigen al OB [88]. Una vez que llegan al OB, los axones dejan de formar parte de los fascículos y se dirigen hacia los glomérulos donde hacen sinapsis con axones provenientes de diversas regiones cerebrales [102]. Como se mencionaba en anteriormente, el OE, en murinos, se encuentra bien estructurado y diferenciado, sin embargo, en los humanos existen amplias diferencias que han sido estudiadas. Lo anterior ha sido demostrado mediante el análisis de biopsias de mucosas olfatorias provenientes de sujetos clínicamente sanos, en donde se observó que no existe una distinción morfológica ni tampoco una organización laminar, al igual que las dinámicas moleculares, en donde se observa una diferencia entre especies. En este sentido, las células halladas en la capa basal del OE humano presentan una morfología redondeada y simétrica por lo que no muestran ninguna característica distinguible entre las HBC y GBC descritas del OE murino. Asimismo, no existe una organización laminar definida como en el modelo murino, ya que el uso de diversos marcadores específicos para cada población celular demostró el esparcimiento de las OSN a través de todo el OE humano. Además, se detectó una diferencia en la expresión constitutiva del receptor p75NGFR en las células humanas respecto a las células murinas, lo que sugiere patrones de actividad diferentes mediados por este receptor en cada organismo vivo. Sin embargo, si se demostró la conservación de las dinámicas proliferativas dentro de la capa basal del OE humano al igual que los marcadores asociados a cada subtipo celular [13, 92].

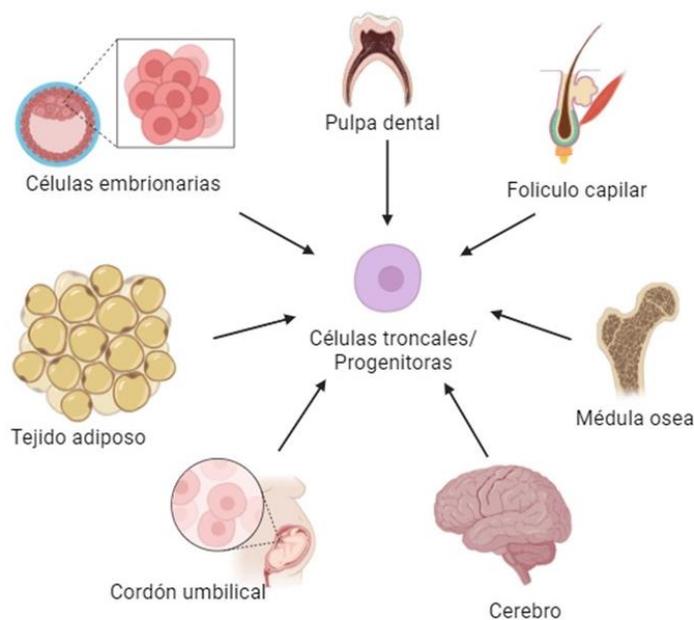
Con esto en mente se ha implementado una nomenclatura que englobe las características de estas células troncales o bien progenitoras derivadas del epitelio olfatorio (hNS/PCs-OE, human Neuronal Stem or Progenitor Cells from Olfactory Epithelium). Las diferencias mostradas entre el NS/PCs-OE de ratones y humanos muestran la necesidad y relevancia de generar modelos humanos para el estudio no sólo de neurogénesis, sino de todos aquellos procesos ya sea fisiológicos o patológicos asociados a nuestra especie. Particularmente, la obtención de biopsias de la mucosa olfatoria de sujetos tanto clínicamente sanos como con alguna patología con relación al olfato, por ejemplo, algunas neurodegeneraciones o padecimientos neurológicos, han permitido el aislamiento de células troncales de origen neural y la posterior generación de modelos que han hecho posible estudiar aquellos procesos asociados a patologías difíciles de modelar. En relación con lo anterior, se ha continuado con el aislamiento de células derivadas de OE humano para no sólo estudiar procesos celulares y moleculares presentes en diversos padecimientos, sino que además se busca un enfoque terapéutico para el tratamiento de enfermedades tanto neurodegenerativas como neurológicas.



**Figura 4. Esquema representativo de la neurogénesis adulta dentro de todas las capas pertenecientes al OE.** La neurogénesis en esta región se inicia a partir de las células HBC (color rosa), que dan origen a las GBC (en color azul) con la capacidad de generar dos poblaciones celulares GBCt (crema) y GBC-INP (crema), las cuales se diferencian para imOSN (naranja) y posteriormente maduran hacia mOSN (naranja) gracias a la migración y generación de sus proyecciones. Estos tipos celulares pueden distinguirse morfológica y fenotípicamente, en el esquema se indican, debajo de cada una de ellas, algunos marcadores fenotípicos con los que se puede caracterizar cada tipo celular. [2, 98]. Imagen realizada mediante el software Biorender ®

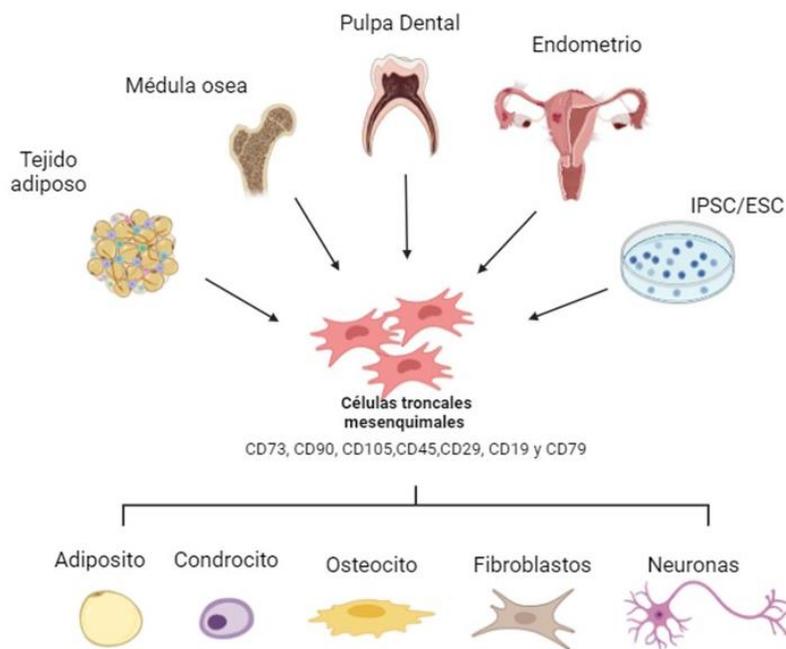
### 3.1. Medicina regenerativa. Uso de terapia con células troncales.

La medicina regenerativa es una rama de la medicina que cada vez toma mayor importancia gracias a su principal fundamento de permitir la recuperación funcional de tejidos y órganos dañados por accidentes o enfermedades crónico-degenerativas. Tanto el uso, aislamiento y crecimiento de células troncales embrionarias (ESC, del inglés Embryonic Stem Cells) así como células troncales (SC) encontradas en estadios adultos (Figura 5) ha sido muy importante ya que ha permitido implementar nuevas terapias basadas en su uso, esto gracias a su alta disponibilidad que permite aislar, proliferar y diferenciar a diversos linajes celulares, así como la regulación de las dinámicas celulares relacionadas con la proliferación y evasión inmunológica cuando son trasplantadas. Sin embargo, el uso de ESC presenta limitaciones legales y éticas tales como la destrucción de embriones para obtenerlas. Por lo que se han buscado múltiples y novedosas alternativas para obtener células troncales.



**Figura 5. Esquema representativo que indica la ubicación de las principales fuentes de células troncales halladas en diferentes regiones del cuerpo humano.** La obtención de las células troncales se puede realizar a partir de diversos tejidos, así como durante diferentes etapas del desarrollo humano, es decir desde etapas embrionarias hasta adultas. Algunas fuentes son tejido adiposo, médula ósea, tejido neuronal, pulpa dental entre otras [103]. Imagen realizada en Biorender®

Actualmente existen métodos ampliamente reconocidos y utilizados para la obtención de células troncales; uno de ellos es la generación de células troncales pluripotente inducidas (iPSCs, del inglés Induced Pluripotent Stem Cells) a partir de un proceso conocido como reprogramación celular. La reprogramación celular consiste en tomar una célula diferenciada, como un fibroblasto y, mediante la inducción de expresión de factores de transcripción encontrados durante el desarrollo embrionario, se lleva a esta célula diferenciada a un estadio no diferenciado o troncal [104-106]. Después, las iPSC generadas puede generar otro subtipo celular diferenciado, por ejemplo, una neurona madura [107]. Aunque sea reconocida y cada vez más utilizada esta forma de obtener células troncales, existen diversas limitaciones técnicas, lo que hace bastante complicado obtenerlas de manera rutinaria, por lo que la obtención y uso de iPSCs puede ser una herramienta no de primera. Sin embargo, existen otro subtipo de células troncales, las células troncales mesenquimales adultas (MSCs, *del inglés Mesenchymal Stem cells*). Este subtipo de célula troncal es de fácil aislamiento ya que pueden encontrarse en diversos tejidos como medula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, pulpa dental, entre otros (Figura 6). Además, las MSCs presentan una alta proliferación, efectos moduladores (protección), señalización autocrina y paracrina, multipotencialidad y capacidad de inmunomodulación [8, 13, 108, 109]. Por lo anterior, la terapéutica basada en MSCs es altamente prometedora para diversas patologías, por ejemplo, desde enfermedades congénitas, fallas renales y cardíacas entre otras, hasta enfoques más novedosos como la terapia de trasplante de células troncales en lesiones medulares y enfermedades neurodegenerativas.



**Figura 6. Células troncales mesenquimales: fuentes y fenotipos generados.** En la parte superior de la figura se ilustran los diversos tejidos de donde se puede aislar este subtipo troncal. En la parte central se muestra un esquema de la morfología de las MSCs, mientras que, en la parte lateral derecha, se enlistan los marcadores de superficie con los cuales se caracterizan fenotípicamente. Por último, en la parte inferior, se indican los diversos subtipos celulares a los que se pueden diferenciar y madurar las células troncales mesenquimales [110]. Imagen realizada en Biorender®.

### 3.2. Uso de las células troncales para el tratamiento de lesiones medulares

Una de las aplicaciones de las células troncales en Medicina Regenerativa es la terapia de trasplantes, esto es, a través del uso de modelos animales, a los cuales se les ha inducido desmielinización o se les ha lesionado la médula espinal, se les trasplantan dichas células buscando restablecer la función espinal. Este abordaje ha resultado bastante prometedor ya que diversos estudios realizados en humanos han llegado a Fase clínica III [1, 111]. Los resultados han mostrado que el trasplante de células troncales a pacientes con lesiones medulares permite una recuperación discreta del tacto, del dolor y la sensación [1, 10]. Dicha recuperación puede explicarse a partir del hecho de que las terapias basadas en MSCs o células troncales tienen como fundamento la modificación de las dinámicas celulares internas y el reclutamiento de diversos subtipos celulares endógenos, lo anterior con la finalidad de promover la regeneración celular, axonal y favorecer una recuperación funcional. Algunas hipótesis señalan que lo anterior se debe a las interacciones celulares junto con la modulación paracrina dada por la liberación de biomoléculas (citocinas, factores de crecimiento, neurotrofinas y exosomas) capaces de modular procesos inflamatorios, inhibir procesos de muerte celular, favorecer la proliferación, regeneración axonal, remielinización y diferenciación de células neuronales y gliales además del favorecimiento de la angiogénesis

en los sitios de lesión en donde han sido trasplantadas dichas células. Dicha modulación y enriquecimiento de procesos generados a partir del trasplante de células exógenas ha permitido una recuperación motora, sensorial y térmica en pacientes diagnosticados con paraplejia y tetraplejia [109, 111]. Sin embargo, existen algunas limitaciones que repercuten en la efectividad de esta terapia, por ejemplo, la deficiencia en la supervivencia de las MSCs implantadas en los sitios de lesión, el rechazo inmunológico en trasplantes no autólogos y, por último, la posibilidad de generar linajes tumorales dentro de los sitios de trasplante además de no presentarse una mejoría terapéutica evidente en estos pacientes, por lo que se cuestiona su efectividad [9, 109, 111].

### **3.3. Uso de las células troncales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

La prevalencia anual de las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés Alzheimer disease), la enfermedad de Parkinson (PD, del inglés Parkinson disease), esclerosis lateral amiotrófica entre otras va en aumento año con año. Estas enfermedades son caracterizadas principalmente por la pérdida de estructuras, de funciones cognitivas, motoras, sensoriales, conductuales y amnésicas, así como una desorganización cortical. Pese a que cada neurodegeneración tiene características particulares, existe una característica común en cada una de ellas, la muerte de diversas poblaciones neuronales y no neuronales dentro del CNS y PNS [112, 113]. Por otro lado, en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas no existe una cura sino un control y manejo de estas. Además de los enfoques farmacológicos y no farmacológicos, se han comenzado a implementar ciertas terapias basadas en el uso de células troncales, lo que resulta en abordajes prometedores [114]. Existe un principal interés en las terapias de reemplazo celular a partir del uso de ESCs así como iPSCs y MSCs en modelos de neurodegeneración. En este sentido, múltiples estudios han realizado trasplantes de ESCs e iPSCs en modelos murinos, primates no humanos e incluso se han hecho en humanos (ensayos clínicos Fase I). Los resultados de dichos trabajos coinciden en la existencia de una mejoría motora y amnésica. Esta mejoría se atribuye a la capacidad de diferenciación por parte de las células troncales hacia neuronas maduras junto con una integración a los circuitos sinápticos existentes [112, 115]. Por otro lado, se ha evaluado la capacidad de formación de tumores dada por los trasplantes de estos tipos celulares, además del análisis en la obtención y mantenimiento de estas células, ya que presentan elevados costos para mantenimiento además de sus limitaciones éticas y legales. Con esto en mente, la investigación con ESCs junto con iPSCs humanas resulta complicada al menos para su uso como terapia de reemplazo celular. Por lo anterior, las MSCs, al ser más accesibles, y ser más comprometidas en cuanto a su troncalidad, con menos limitaciones éticas y legales, se convierten en las células troncales de mayor uso para terapias de trasplante. Dichas células han mostrado capacidad para diferenciarse hacia subtipos neuronales como dopaminérgicas o corticales, o bien en no neuronales, además de promover la neurogénesis y sinaptogénesis junto con una capacidad de migrar través del parénquima cerebral lo que facilita su trasplante vía inyecciones intracerebrales [112, 116, 117]. Además, se ha analizado el mecanismo por el cual su uso ha

favorecido la recuperación neuronal en situaciones patológicas, los resultados de dichos análisis indican que su efecto se debe a que permite la formación de ambientes protectores debido a la liberación de factores de crecimiento y neurotrofinas que a su vez permiten el proceso de angiogénesis, así como una regulación inmune mediante la liberación de moléculas antiinflamatorias. Siguiendo con los anterior, se han realizado estudios piloto y preclínicos donde se implementó el trasplante autólogo de MSCs mediante implantación vía intraarterial demostrando que es un proceso sin riesgo respecto a la formación de tumores además de la ausencia de rechazo inmunológico [112, 118].

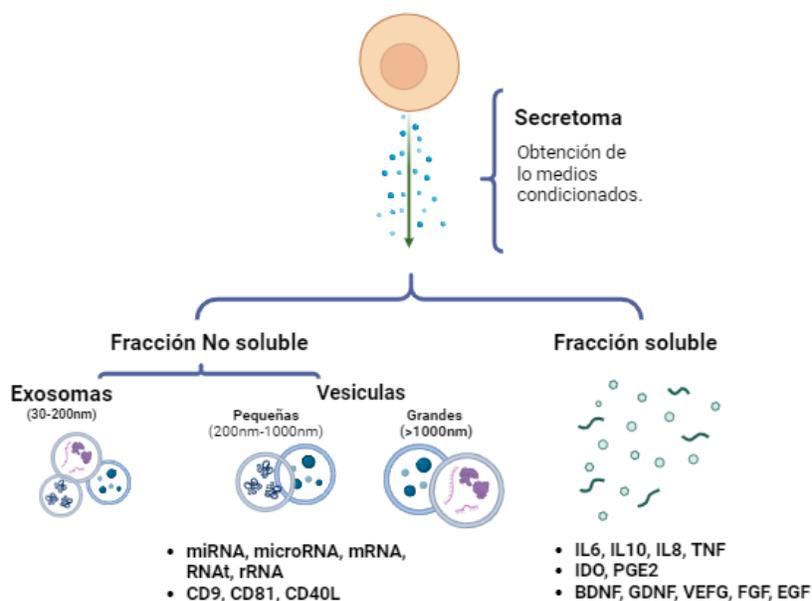
### **3.4. Limitaciones en la terapéutica utilizando células troncales.**

Como se ha descrito con anterioridad el uso de ESCs presenta limitaciones legales y éticas tales como la destrucción de embriones para obtenerlas. Por otro lado, el trasplante de este tipo de células podría generar anomalías biológicas tales como el rechazo inmunosupresor para el donante, deficiencia en la diferenciación para restablecer subtipos neuronales y la creación de linajes tumorales [13, 114]. Los enfoques terapéuticos dados de igual forma con las iPSCs presentan limitaciones, como lo es un bajo rendimiento en la generación de dichas células, lo que lleva a presentar altos costos, además de que se ha descrito la formación de tumores asociadas a este tipo celular [112]. Con las limitaciones anteriormente expuestas en las terapias basadas en células troncales es que se ha propuestos alternativas novedosas donde no involucren de forma directa las SC. La literatura muestra que hay un gran interés en la generación de ambientes específicos y enriquecidos gracias a la liberación, por parte de estas células troncales, de diversas moléculas solubles como neurotrofinas, factores de crecimientos, neurotransmisores, interleucinas entre otras, que permitan la supervivencia, proliferación, y maduración de las células progenitoras endógenas [8, 11, 114].

### **3.5. Enfoque terapéutico del secretoma.**

Se define como secretoma al conjunto de factores solubles, exosomas, vesículas extracelulares y demás moléculas biológicamente activas que son secretadas por la célula (Figura 7). Algunos autores dividen el secretoma en dos fracciones; la soluble e insoluble (también llamada fracción vesicular). En la fracción soluble se concentran diferentes moléculas como interleucinas, citocinas además de múltiples factores de crecimiento. Mientras que en la fracción vesicular se encuentran exosomas y vesículas extracelulares, las cuales son pequeñas vesículas extracelulares (EVs, del inglés extracellular vesicles) que contienen proteínas, diferentes tipos de RNA (micro-RNA, mRNA, miRNA entre otros) y lípidos, mientras que en la envoltura de estas vesículas se encuentran diversas glicoproteínas transmembranales. Estas moléculas encontradas en ambas fracciones están altamente relacionadas a procesos celulares, por ejemplo, transcripción, neurogénesis, angiogénesis, regulación inmune, modulación inflamatoria, remodelación del citoesqueleto entre otros [113, 119-122].

Como se describió en el apartado anterior, existen diversas limitaciones para el uso de las células troncales como terapia de reemplazo celular, por lo que se han propuesto enfoques alternativos novedosos para su uso en la terapéutica de enfermedades neurodegenerativas. Uno de los enfoques propone la creación de ambientes controlados que favorezcan la recuperación neuronal y funcional [113, 120]. Para cumplir este enfoque, se han implementado estrategias que implican la recolección y almacenamiento del medio de cultivo donde se asume se encuentran todas las moléculas secretadas por las células troncales, a este medio se le conoce como condicionado (CM, del inglés Conditioned Medium) [123]. Una vez recolectado el medio condicionado derivado, por ejemplo, de células troncales mesenquimales (MSC-CM del inglés Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium), se evaluó su efecto en el proceso neurogénico de las células progenitoras neurales, demostrando como se favorecía la proliferación y maduración de dichas células a partir de los factores secretados en el medio condicionado y no de las células trasplantadas. [124-126]. Estudios complementarios han demostrado la regulación que tiene el MSC-CM sobre el sistema inmune; es decir, el uso del medio condicionado favorece la proliferación y maduración de linfocitos T y macrófagos mientras que inhibe la maduración y proliferación de las células dendríticas, además de permitir el control entre estados proinflamatorios y antiinflamatorios gracias a la presencia de múltiples interleucinas [119]. Con todo lo descrito anteriormente se ha propuesto estudiar el impacto del MSC-CM en diversas enfermedades neurodegenerativas y de esta manera proponer una terapia libre de células [113, 121, 124, 127].



**Figura 7. Descripción del secretoma.** El esquema muestra el secretoma; es decir el conjunto de moléculas biológicamente activas liberadas por las células troncales. Del lado izquierdo la fracción no soluble del secretoma la cual se divide en dos subtipos de acuerdo con el tamaño de la fracción: exosomas y EVs, los cuales se caracterizan a partir de la expresión de una amplia familia glicoproteínas transmembranales (CD9, CD81 entre otros) asimismo, dichas fracciones permiten el transporte de diversos subtipos de RNA. Del lado derecho

del esquema se representa la fracción soluble del secretoma, el cual se compone de diferentes moléculas biológicamente activas. Algunos ejemplos de estas moléculas son la familia de las interleucinas (ILs), algunas moléculas reguladoras de la respuesta inflamatoria comoIDO (idolamina 2-3 dioxigenasa) y PGE2 (prostanglandina2), así como algunos factores neurotróficos tales como BDNF, GDNF, VEGF [119, 120, 122]. Imagen realizada mediante el software Biorender®.

### **3.6. Implementación del secretoma para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

Además de los trabajos publicados en donde se determina el efecto terapéutico que tiene el MSC-CM sobre lesiones medulares y enfermedades inmunes [119, 122, 128, 129], diversos grupos de investigación también apuntan al uso del secretoma para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, de las cuales destacan la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson; sin embargo, también se ha discutido este abordaje para enfermedades como esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiples y enfermedad de Huntington [120, 130]. Respecto a la enfermedad de Alzheimer, el uso de MSC-CM ha demostrado mejorías funcionales significativas, lo anterior debido a una evidente disminución en la activación de estados proinflamatorios de los macrófagos a través de una reducción en la expresión de múltiples interleucinas proinflamatorias, lo que conduce a una menor reactividad de ciertos subtipos gliales como los astrocitos y la microglía. Por otro lado, se ha visto como el MSC-CM promueve la expresión de neurotrofinas o factores de crecimiento tales como el BDNF, VEGF y FGF-2, lo que permite controlar procesos neuronales, vascularización además de la autofagia y la apoptosis. Toda esta regulación ha influido de forma positiva para el control en la formación de los agregados proteicos como las placas A $\beta$ , además de demostrar un efecto de supervivencia neuronal [120, 131, 132].

Por otro lado, en la enfermedad de Parkinson, el uso de MSC-CM ha permitido mejorar los síntomas motores a través del aumento en la secreción o bien mediante el acarreamiento de múltiples factores provenientes tanto de la fracción soluble como de la no soluble del secretoma, por ejemplo, el GDNF, NGF, y BDNF y FGF-2. Además, la presencia de pequeñas moléculas de RNA en conjunto regulan múltiples procesos celulares, tal es el caso del proceso neurogénico (proliferación, diferenciación y maduración), crecimiento dendrítico, angiogénesis, así como el control de procesos relacionados a la síntesis y degradación de proteínas y muerte neuronal [120, 122]. En otro orden de ideas, se ha reportado que la ausencia de BDNF en estadios tempranos de la enfermedad de Parkinson, así como en la enfermedad de Alzheimer se asocia con la neurodegeneración [49, 124, 133]. Por lo anterior se evalúa si proporcionar BDNF de forma exógena a través del MSC-CM podría controlar esta pérdida neuronal y así mismo permitir una recuperación neuronal. Además, se ha propuesto una sinergia entre el trasplante celular con el uso de MSC-CM, ya que por un lado el trasplante podría el surgimiento de neuronas dopaminérgicas mientras que el medio condicionado permite que exista un ambiente estable para garantizar la supervivencia de las nuevas neuronas [120]. Varios estudios que buscan validar el enfoque terapéutico del MSC-CM siguen en etapa preclínica o bien en fase I. Sin embargo, los resultados previos muestran

una recuperación neuronal al agregar los medios condicionados, así como una mejoría funcional, por lo que resulta ser altamente prometedor como una opción terapéutica en enfermedades neurodegenerativas [9, 109, 111].

### **3.7. Enfoque terapéutico del secretoma asociado a la edad.**

Existen factores que influyen en el aislamiento exitoso de las células troncales además de la obtención del CM, una de esas variables es la edad, debido a que esta variable influye en las capacidades de proliferación, de diferenciación, regulación inmunológica, supervivencia neuronal entre otras implicaciones terapéuticas que tienen las células troncales, además de que influye en la composición y calidad del secretoma de múltiples linajes celulares [123, 134]. De acuerdo con diversos trabajos, existe una homogeneidad respecto a la presencia de ciertas moléculas encontradas en el MSC-CM; sin embargo, se presenta un cambio en la expresión o cantidad de dichas moléculas asociado a la edad [135]. Por un lado, se ha descrito el cambio en los niveles de secreción de EVs, al igual que la composición y niveles de los distintos mi-RNA hallados dentro de estas vesículas, lo que conlleva a cambios en las propiedades y funciones inmunoregulatoras por parte del MSC-CM [136, 137]. Mientras que, existe una mayor proporción de interleucinas proinflamatorias tales como IL-6 e IL-8 cuando el MSC-CM proviene de sujetos envejecidos. Finalmente, estudios *in vitro* en los que se han sometido a las MSC a un envejecimiento acelerado, se demostró la presencia del mismo perfil de secreción característico de una población donadora envejecida [138].

Por otro lado, se ha determinado el efecto que tiene el CM envejecido en la biología de las MSC. Se demostró que el cultivo con este CM conducía a las células hacia la senescencia lo que abatía la proliferación además de mostrar un fenotipo envejecido [138, 139]. Por el contrario, diversos estudios han evaluado el papel *in vitro* de un MSC-CM proveniente de sujetos jóvenes, demostrando que este medio podría rejuvenecer fenotípicamente a las MSC envejecidas, además de restablecer su potencial de diferenciación y disminuir el estrés oxidativo asociado a la edad [6]. Por otra parte, también se ha estudiado *in vivo* las implicaciones que tiene el CM asociado a la edad en la recuperación funcional de modelos asociados al envejecimiento. En este sentido, se demostró que el tratamiento con CM proveniente de sujetos jóvenes mostraba una mejoría en la consolidación de memoria y cognición de ratones envejecidos. Esta mejoría se daba a partir de la regulación de procesos celulares tales como oligodendrogénesis, transporte de lípidos, exocitosis y activación de la microglía a través de la liberación de factores neurotróficos específicos como el FGF [7, 140]. Recientemente Gómez-Virgilio et al., aislaron los CM derivados de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano además de identificar las diversas biomoléculas liberadas por este subtipo celular; dentro de las proteínas detectadas se encontraron interleucinas, metaloproteasas, proteínas de unión a ligando, así como factores de crecimiento. Por otro lado, se determinó la implicación de estas moléculas, previamente identificadas, en el mantenimiento de la proliferación, así como el favorecimiento de la diferenciación astrogliar de las células troncales neuronales provenientes del hipocampo adulto murino [13, 141]. Con lo anteriormente descrito, se concluye que el secretoma ejerce un control regulatorio de múltiples procesos celulares a través de distintas vías de

señalización, así mismo el uso de las células progenitoras del epitelio olfatorio resulta ser un modelo adecuado para la obtención de CM. Por último, las biomoléculas halladas en el CM están íntimamente asociadas a la edad, y a su vez este modelo de estudio de los efectos del secretoma tiene un importante enfoque terapéutico potencial para el tratamiento de las enfermedades degenerativas.

#### **4.0. Justificación**

Durante la última década, diversos grupos de investigación se han enfocado en la identificación de las biomoléculas liberadas por las células troncales y su efecto en diferentes procesos celulares, así como en modelos asociados a neuropatologías, con el objetivo de establecer una terapia libre de células para el tratamiento de dichas patologías. Aunque el avance ha sido significativo, todavía quedan cuestionamientos por resolver y factores a tomar en cuenta. Desde un modelo *in vitro* de fácil acceso y de bajo costo en su mantenimiento, además del factor edad de los donantes, una variable importante pues rige en gran medida parte del potencial terapéutico. Por lo tanto, este trabajo busca estudiar el medio condicionado obtenido a partir de un modelo de células troncales para la caracterización y comparación en la secreción de diversas biomoléculas asociadas a la edad. Para lo cual se propone el uso de las células precursoras del epitelio olfatorio como modelo de células troncales de estirpe neural, gracias a su estrecha relación con el sistema nervioso, así como la caracterización de su medio condicionado, para el análisis de las biomoléculas liberadas y su relación con la edad de los donadores, lo que en un futuro podría proponerse como un abordaje para una terapia libre de células en enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson,

#### **5.0. Hipótesis**

El perfil de liberación de la fracción soluble del secretoma proveniente de las células progenitoras neuronales aisladas del epitelio olfatorio de sujetos pertenecientes a dos grupos de edad (Grupo Joven vs Grupo Adulto) clínicamente sanos será diferente.

#### **6.0. Objetivo general**

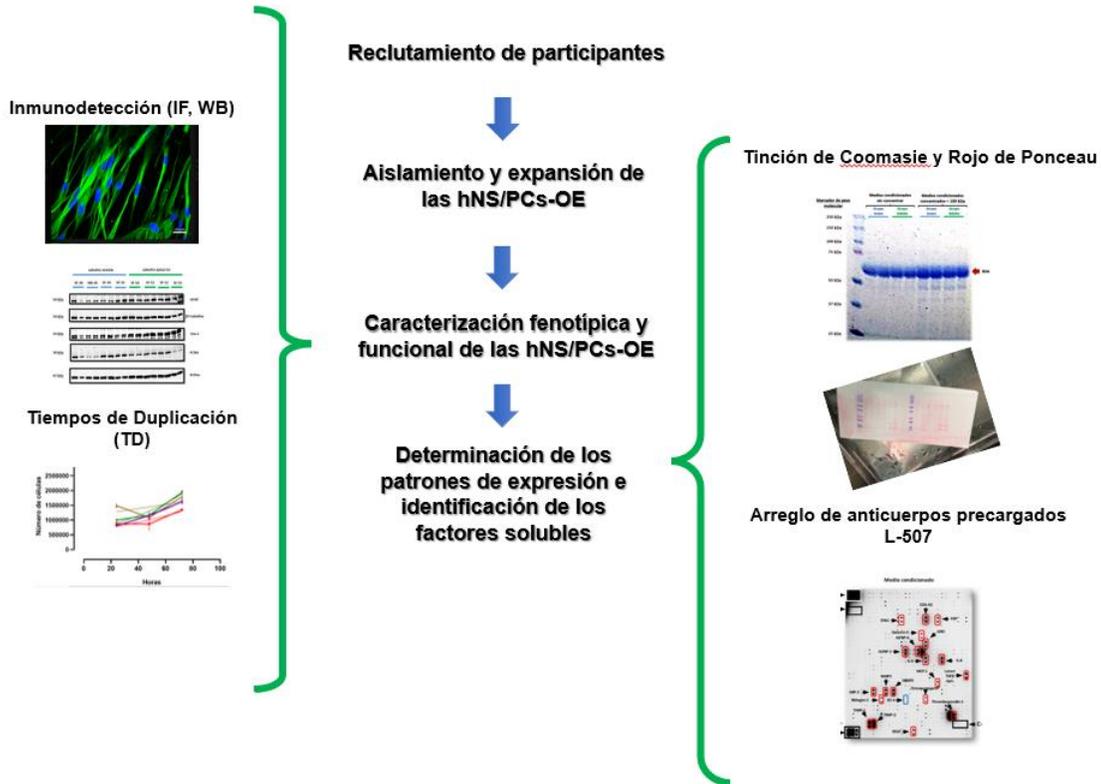
Determinar y caracterizar el perfil de liberación de los factores solubles obtenidos a partir de los medios condicionados provenientes de células progenitoras aisladas del epitelio olfatorio de sujetos clínicamente sanos pertenecientes a dos grupos de edad (Grupo Joven vs Grupo Adulto).

#### **6.1. Objetivos específicos**

1. Obtención, aislamiento y caracterización inmunofenotípica de las células precursoras del epitelio olfatorio
2. Caracterización funcional de las células precursoras del epitelio olfatorio
3. Obtención de los medios condicionados provenientes de las células precursoras del epitelio olfatorio.
4. Determinación de los perfiles de expresión provenientes del medio condicionado de cada grupo de edad (Grupo Joven vs Grupo Adulto).
5. Identificación de los factores solubles provenientes del medio condicionado de cada grupo de edad

## 7.0. Diseño Experimental

A continuación, se presenta el diseño experimental que se siguió para cumplir los objetivos descritos anteriormente, en la Figura 8, se detalla esquemáticamente dicho diseño. El diseño experimental se dividió en cuatro apartados, comenzando con el reclutamiento de los participantes seguido de la obtención de la muestra y posterior expansión de las células donadas. Posteriormente se realizó una caracterización fenotípica-funcional de los cultivos primarios y, finalmente, se realizó la determinación de los factores solubles encontrados en los medios condicionados de las hNS/PCs-OE.



**Figura 8. Diseño experimental general.** A la izquierda se muestra el flujo de trabajo para la caracterización de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio de humanos; de un lado la parte fenotípica mientras que del otro la caracterización funcional. De lado derecho se muestra el flujo de trabajo para determinar los perfiles de expresión, así como la identificación de las moléculas solubles presentes en el medio condicionado de estas células.

## **8.0. Materiales y Métodos**

### **8.1. Reclutamiento de sujetos.**

Para este estudio se utilizó una muestra de ocho sujetos, divididos en dos grupos edad (Grupo Joven vs Grupo Adulto). Todos los participantes firmaron un consentimiento informado. Asimismo, a los participantes se les realizó una historia clínica. La diferencia media entre cada grupo es de 20 años. Para el Grupo Joven (GJ) se reclutaron individuos de 30 a 35 años, sin enfermedades psiquiátricas, neurodegenerativas, y metabólicas clínicamente diagnosticadas, también los participantes no presentaron deterioro cognitivo de ningún tipo (subjetivo, leve, moderado y severo). Mientras que para el Grupo Adulto (GA) se solicitaron participantes de 50 a 55 años, sin diagnóstico de enfermedades psiquiátricas, neurodegenerativas, y metabólicas además de no presentar deterioro cognitivo de ningún tipo (subjetivo, leve, moderado y severo).

### **8.2. Aislamiento y caracterización de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano.**

#### **8.2.1. Obtención de células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano**

La obtención de la muestra se hizo a través de un exfoliado nasal, el cual consistió un raspado de la región anterior del cornete medial lateral utilizando un cepillo cilíndrico de 2.4 cm de largo y 3 mm de ancho. Una vez tomada la muestra, se incubó durante una hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para después disociar mecánicamente las células que pudieran estar formando agregados. Para sembrar las células aisladas se prepararon cajas Petri P35 tratadas previamente con Poli D-lisina (Sigma no. de catálogo P6407-5MG) con dos horas de anticipación. Continuando con el protocolo, las células exfoliadas se sembraron en medio de cultivo DMEM/F12, suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-Glutamina 4 mM 2%, Estreptomina 100 µg/ml, Penicilina 100 UI/Anfotericina B al 1%. A los 7 días se revisó el cultivo, se realizó el cambio de medio y se retiró el antimicótico del medio, dejando únicamente el antibiótico. Una vez conseguido el aislamiento de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio se procedió a realizar los cambios de medio cada tercer día. Se revisaron hasta un máximo de 14 días después del exfoliado para determinar si hubo éxito en el aislamiento. El protocolo es una modificación del reportado por Benítez-King, 2011. Al conseguir la confluencia celular requerida se realizó un subcultivo, el cual consistió en retirar el medio mediante absorción, se procedió a lavar con DMEM/F12 sin suplementar, sin glutamina y sin antibiótico para posteriormente adicionar tripsina 0.25% - EDTA e incubar de 3 a 5 minutos a 37°C. Al finalizar este tiempo, las células se desprendieron y se añadió en relación 1:2 el medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino para inactivar el efecto de la tripsina. Se recolectó la mezcla de tripsina, medio y células para

proceder a centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos. Una vez finalizado el tiempo, se retiró el sobrenadante cuidando la integridad de la pastilla y se homogenizó en un 1 ml de medio suplementando con suero fetal bovino. De esa solución se tomó una alícuota de la suspensión celular para realizar el conteo correspondiente, haciendo una dilución 1:10. Se usó el hemocitómetro y el microscopio óptico (Olympus modelo CK40) para realizar el conteo correspondiente. Todos los experimentos que se describen a continuación se realizaron con hNS/PCs-OE en pases 3 al 7.

### **8.3. Inmunofluorescencia**

A una placa de 96 pozos se le añadieron cubreobjetos de vidrio además del sustrato Poli-D-Lisina (Sigma no. de catálogo P6407-5MG) el cual fue incubado durante toda la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente se retiró el reactivo y se lavó dos veces con agua estéril, para proceder a sembrar una densidad de 30,000 células/ $cm^2$  por pozo. Posteriormente, se siguió el tratamiento correspondiente de acuerdo con lo indicado en la Figura 9. Al finalizar los tratamientos se retiró el medio y se colocaron 100  $\mu$ l de Paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se realizaron tres lavados usando 100  $\mu$ l de PBS 1X. Después del último lavado se agregaron 100  $\mu$ l de PBS 1X – Tritón 0.2% durante 30 minutos, permitiendo la permeabilización de las células. Una vez permeabilizadas, se realizó una incubación con albúmina sérica bovina a una concentración de 10 mg/ml (BSA, por sus siglas en inglés, Biopharm Laboratories, no. de catálogo 71-010) durante una hora, con el objetivo de bloquear las uniones inespecíficas. Concluida la incubación, los anticuerpos primarios fueron preparados, a diferentes diluciones, en la solución de PBS 1X - Tritón 0.2%, posteriormente se le agregaron a las células fijadas y fueron incubadas en refrigeración durante toda la noche. A continuación, se enlistan los anticuerpos primarios utilizados y sus respectivas diluciones: anti-Nestina con una dilución de 1:250 (Genetex, no. de catálogo GTX30671), anti-OMP diluido a 1:500 (Biorbyt no. de catálogo Orb638656), anti- $\beta$ III-tubulina diluido a 1:250 (Promega, no. de catálogo G7121), anti-Ki67 diluido a 1:250 (GeneTex no. de catálogo 16667), anti-GFAP diluido a 1:500 (Abcam no. de catálogo Ab10062), anti Sox -2 diluido 1:1500 (Santa Cruz no. de catálogo SC-200080) y anti DCX diluido 1:250 (GeneTex no. de catálogo. 107133). Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBS 1X – Tritón 0.2% para, posteriormente, adicionar los anticuerpos secundarios preparados en PBS 1X – Tritón 0.2%, e incubar durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios utilizados, así como sus diluciones, fueron los siguientes: anti-ratón Alexa 594 dilución a 1:500 (Invitrogen, no. de catálogo A11032) y anti-conejo Alexa 488 dilución 1:500 (Invitrogen, no. de catálogo A11034). Una vez incubados los anticuerpos secundarios, se realizaron tres lavados usando PBS 1X – Tritón 0.2%. Siguiendo con el protocolo, las muestras fueron incubadas con DAPI a una concentración de 10  $\mu$ g/mL durante 10 minutos, con el fin de teñir los núcleos. Al finalizar el tiempo se realizaron tres lavados con PBS 1x. Posteriormente, se retiró cada cubreobjeto de cada pozo, se colocó sobre una laminilla de vidrio, se le añadió medio de montaje

(Fluorogel, Electron Microscopy Science no. de catálogo 17985-10) y se dejó durante una noche a temperatura ambiente, para finalmente almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio de confocal de la casa comercial Zeiss, modelo LSM 880. Mientras que para el análisis de las imágenes obtenidas por el microscopio confocal se utilizó el software ZenCore en su versión 3.8.

#### **8.4. Extracción, preparación y cuantificación de proteína**

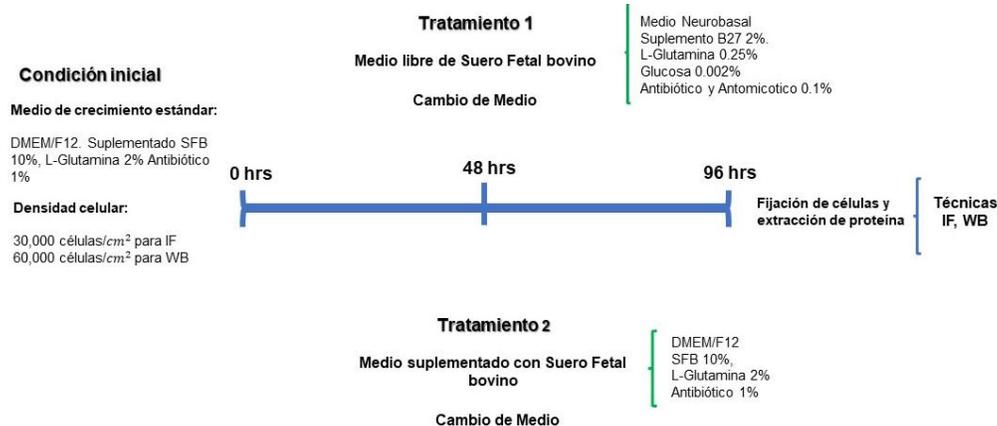
Las hNS/PCs-OE fueron sembradas a una densidad de 20,000 células/ $\text{cm}^2$  en una botella de cultivo de T25 para posteriormente aplicar el tratamiento correspondiente de acuerdo con lo indicado en la Figura 9. Al término de cada tratamiento se obtuvieron los lisados proteicos de la siguiente manera: se retiró el medio de cada pozo, se lavó con 1 ml de PBS 1X frío y se agregaron 100  $\mu\text{l}$  por pozo de solución amortiguadora de lisis con los inhibidores correspondientes (RIPA 1X (PBS 1X, SDS 0.1%, NP40 1% y Deoxicolato de sodio 0.5%) + inhibidores de proteasas y fosfatasa (AEBSF 0.24 mg/ml, Aprotinina 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Leupeptina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Pepstatina A 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Benzamidina 5 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 20 mM, NaF 10mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, EDTA (pH = 8) 1mM y EGTA (pH = 8) 1mM) en frío. Las hNS/PCs-OE se incubaron con el buffer RIPA + inhibidores en hielo durante 5 minutos, posteriormente, los lisados obtenidos se removieron de cada botella con una espátula y se colocaron en un microtubo previamente rotulado. Los microtubos con los lisados proteicos se colocaron en hielo y luego se almacenaron en congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) durante una noche. Al día siguiente, los lisados se descongelaron, se disociaron mecánicamente con la micropipeta durante al menos 10 veces y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos para posteriormente ser cuantificados. La cantidad de proteína se determinó por el método de BCA (Ácido bicínico, Thermo Scientific) adaptado a microplaca. La concentración final de cada lisado proteico utilizado se ajustó a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  preparado en una solución amortiguadora con un exceso de 2-mercaptoetanol (2  $\mu\text{l}$  de reactivo por cada 100  $\mu\text{l}$  de muestra) y hervido durante 5 minutos para poder cargarse en los geles de poliacrilamida.

#### **8.5. Western Blot**

Una vez cuantificadas las muestras, se cargaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína total de cada muestra en un gel de poliacrilamida. Las concentraciones del gel dependen del peso molecular de las proteínas de interés; para este proyecto se utilizaron porcentajes que van del 8%, 10% hasta un 15%. Ya cargadas las muestras en el gel, se corrieron a un voltaje de 110 mV durante 30 minutos y a 100 mV para el resto de la electroforesis. Las proteínas se separaron en el gel por su peso molecular y por su carga, posteriormente, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño del poro (Amersham Protan no. de catálogo A30025914) usando el buffer de transferencia (25 mM tris, 192 mM de glicina y 20% de metanol a pH de 8.4) a un Amperaje y tiempo dependientes de la concentración de la

poliacrilamida usada para el gel. Una vez realizada la transferencia, la membrana se secó a temperatura ambiente y se tiñó con una solución de Rojo de Ponceau (SIGMA P7170-1L). Comprobada la integridad de la proteína y la correcta transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa, se realizó el bloqueo de dicha membrana utilizando alguna de las siguientes opciones: una solución de leche (grado Western blot, BioRad no. de catálogo 1706404) al 5% por 60 minutos o bien una solución de caseína al 1% (Sigma no. de catálogo C3400) por 20 minutos. Previo a la incubación de los anticuerpos primarios con la membrana, éstos se diluyeron 1:1000 en leche al 5% y 2 µl de Azida de Sodio por ml de leche para su conservación. A continuación, se enlistan los anticuerpos utilizados: anti-Nestina (Genetex, no. de catálogo GTX30671), anti-OMP (Biorbyt no. de catálogo Orb638656), anti-βIII-tubulina (Promega, no. de catálogo G7121), anti-Ki67 (GeneTex no. de catálogo 16667), anti-GFAP (Abcam no. de catálogo Ab10062), anti Sox-2 (Santa Cruz no. de catálogo SC-200080) y anti DCX (GeneTex no. de catálogo. 107133). La incubación se realizó durante toda una noche a 4°C con agitación suave. A la mañana siguiente a la membrana se le realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno usando TBS- Tween 1X. A continuación, se le adicionó el anticuerpo secundario correspondiente: anti-ratón IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch, no. de catálogo 115-035-146; 1:5000) o anti-conejo IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch, no. de catálogo 111-035-144; 1:5000) preparado en una solución de TBS-Tween 1X. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante una hora. Una vez incubado el anticuerpo secundario, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno usando TBS-Tween 1X.

Para la reacción de quimioluminiscencia se utilizó una solución de revelado la cual contiene Luminol, Ácido Fosfocumarico, Peróxido de hidrogeno y buffer (0.1 M Tris pH 8.6) [142]. Para la detección de la reacción de quimioluminiscencia se usó un fotodocumentador proveniente de la casa comercial Analytik. La membrana fue sometida a diferentes tiempos de exposición según fue requerido. Para el análisis de las imágenes obtenidas se empleó el software de ImageLab BioRad versión 6.1.



**Figura 9. Diseño experimental para la caracterización fenotípica mediante inmunodetección de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano.** Se indican las condiciones iniciales y los dos posibles tratamientos a seguir. Al finalizar los cuatro días de experimento se realizaron las técnicas de inmunofluorescencia (IF) y Western blot (WB)

### 8.6. Determinación del tiempo de duplicación de las células progenitoras del epitelio olfatorio.

El protocolo de tiempo de duplicación (TD) se basó en lo reportado en el manual de ATCC Animal Cell Culture Guide con las siguientes modificaciones. Se sembraron 30,000 células/ $cm^2$  en una placa de 6 pozos y posteriormente se aplicaron los tratamientos indicados en la Figura 10. A las 72, 96, 120 y 144 hrs se realizaron los respectivos conteos celulares. Los conteos se hicieron con un hemocitómetro. Para determinar el tiempo teórico de duplicación se siguió la fórmula presentada en la Figura 11; mientras que, para determinar el tiempo de duplicación experimental, se realizó una regresión no lineal graficando la cantidad de células contra el tiempo. El presente protocolo se basó en lo descrito por Gómez-Virgilio et al., 2017 [13].



**Figura 10. Diseño experimental para la caracterización funcional de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano a través de un ensayo de tiempos de duplicación.** Al finalizar los seis días de tratamiento se obtiene de forma teórica y experimental el valor numérico del tiempo de duplicación de las células.

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

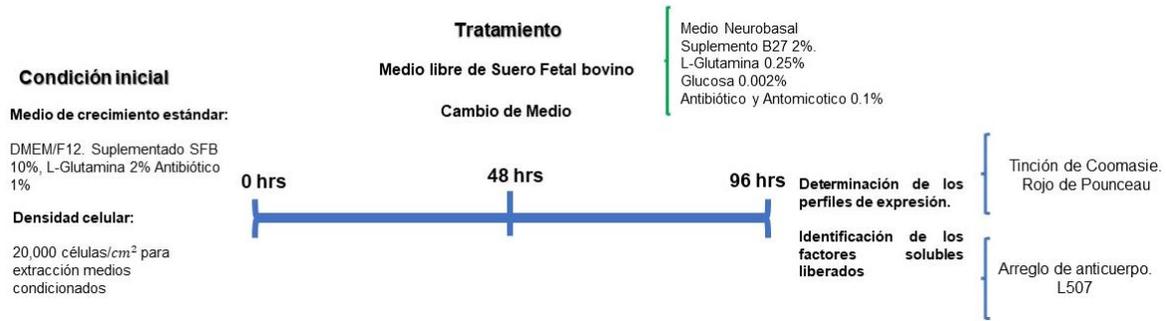
TD: Tiempo de duplicación.  
T: tiempo de duplicación.  
X<sub>b</sub>: número de células al comienzo de la incubación.  
X<sub>e</sub>: número de células al final del tiempo de incubación.

**Figura 11. Fórmula para determinar el tiempo de duplicación teórico.** Reportado en el manual de la ATCC Animal Cell Culture Guide (<https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>)

## 8.7. Determinación de los perfiles de expresión y factores solubles en los medios condicionados de las células troncales/precursoras del epitelio olfatorio humano.

### 8.7.1. Obtención de los medios condicionados de las células progenitoras del epitelio olfatorio

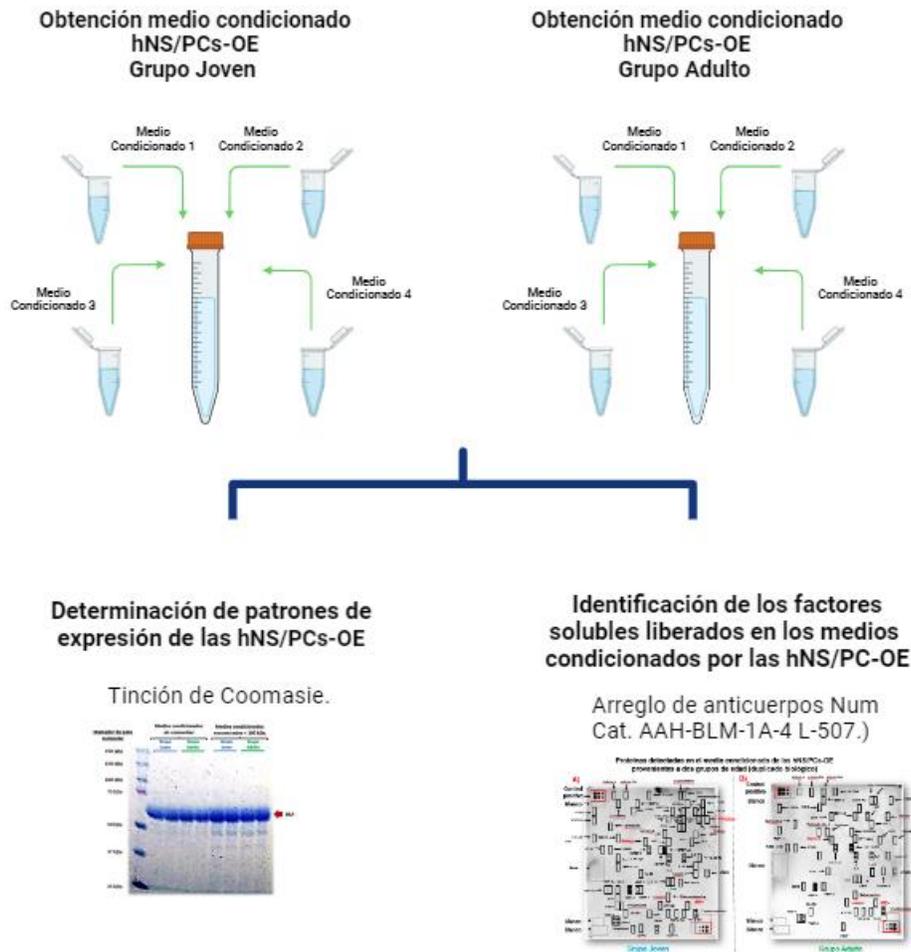
Se sembraron 20,000 células/cm<sup>2</sup> en una botella T25 y se aplicó el tratamiento de acuerdo con lo indicado en la Figura 12. Una vez concluido dicho tratamiento, se procedió a obtener el medio condicionado de las botellas T25 decantándolo en tubos de 15 ml. Luego, el medio obtenido se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se hicieron las alícuotas correspondientes de 1 ml y se almacenaron a -70°C. El uso de este medio condicionado recolectado fue para determinar los patrones de expresión de los factores solubles liberados por las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio. Un aspecto por destacar es que, para la identificación de los factores solubles liberados, el medio condicionado no se almacena, se utiliza recién obtenido de los cultivos celulares correspondientes.



**Figura 12. Diseño experimental para la obtención de los medios condicionados de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano.** Después del tratamiento, los medios condicionados se recuperan para determinar los perfiles de expresión e identificar las moléculas solubles.

### 8.7.2. Concentración y fraccionamiento de los medios condicionados provenientes de las células progenitoras del epitelio olfatorio humano obtenidos de sujetos pertenecientes a diferentes grupos de edad.

De los dos grupos de edad a partir de los cuales se obtuvieron los medios condicionados se realizó una mezcla homogénea, la cual contenía los medios condicionados obtenidos de las células aisladas pertenecientes a los cuatro sujetos que conforman cada grupo en una relación 1:1, obteniendo como volumen final 4 ml para cada grupo, generando así un conjunto de medios condicionados, tal y como se indica en la Figura 13. Por lo tanto, se trabajó con un conjunto de medios condicionados provenientes de los cuatro sujetos del grupo joven y un conjunto de medios condicionados provenientes de los cuatro sujetos del grupo adulto. Posteriormente, los dos conjuntos de muestras obtenidas fueron colocadas en su respectivo filtro, el cual tiene un punto de corte de 100 kDa y cuyo objetivo era concentrar aquellas proteínas presentes en cada medio condicionado con un peso molecular mayor a 100 kDa, para lo cual se usaron los filtros para centrifuga Amicon Ultra-15 10 K (Amicon Ultracel Lot R4HA71777). Una vez colocadas las muestras en los filtros, se procedió a centrifugarlas durante 15 minutos a 3000 rpm. Se realizó la cuantificación y posterior preparación de los medios condicionados sin concentrar y concentrados por filtración (Protocolo descrito anteriormente para la cuantificación y preparación de la proteína) para su posterior separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.



**Figura 13. Diseño experimental para la identificación de los factores solubles liberados por las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano.** En la presente figura se esquematiza un Conjunto de medio condicionado el cual es obtenido a partir de la mezcla homogénea de los medios condicionados provenientes de cada sujeto que conforma su grupo correspondiente. Al realizar el conjunto de medios condicionado se procede a continuar con la determinación de su perfil de expresión mediante tinciones o bien continuar con la identificación de los factores solubles.

### 8.7.3. Determinación cualitativa del patrón de expresión de los factores solubles de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se preparó un gel de poliacrilamida al 10 % para cargar las muestras de cada conjunto de medios condicionados pertenecientes a cada grupo previamente cuantificadas y preparadas. Posteriormente las muestras fueron separadas, colocando el gel de poliacrilamida en una cámara de electroforesis, aplicando un voltaje constante de 100 mV durante 30 minutos y

posteriormente uno de 110 mV durante 60 minutos. Al término de la corrida, el gel fue almacenado en agua destilada a una temperatura de 4°C para después teñirlo con una solución que contenía 0.1% de azul de Coomassie G-250 en 50% Metanol y 10% Ácido Acético durante 1 hora con agitación constante. Posterior al tiempo de tinción, se retiró la solución de tinción y el gel fue desteñido utilizando metanol al 40 %. Al principio fue necesario cambiar con frecuencia esta solución, cada que ésta tomaba un color azul, finalmente, cuando la solución para desteñir fue transparente, se procedió a almacenar el gel en agua a 4°C, para su posterior análisis y captura de imagen.

#### **8.7.4. Identificación y análisis semicuantitativo de los factores solubles liberados en los medios condicionados de las células troncales/precursoras del epitelio olfatoriomediante arreglo de anticuerpos (Num Cat. AAH-BLM-1A-4 L-507).**

La obtención de los medios condicionados (Figura 12 y 13) se realizó el mismo día en que se hizo este ensayo. Se procedió a utilizar los arreglos precargados con 507 anticuerpos para detectar la expresión de diversas proteínas (citocinas) presentes en estos medios, así como determinar posibles diferencias entre los grupos de estudio. Las membranas con estos arreglos provienen de la casa comercial RayBiotech® número de catalogo AAH-BLM-1A-4 L-507 (arreglo de citocinas). Se siguió el protocolo establecido en la hoja técnica, el cual se describe a continuación: Para poder hibridar las muestras con los arreglos correspondientes se requirió purificarlas. Para ello se colocaron dos columnas (incluidas en el kit) dentro de dos tubos de 15 ml y se centrifugaron a 1800 rpm durante 3 minutos. Una vez concluida la centrifugación, se desecharon los sobrenadantes y se añadió 1 ml de buffer de marcaje para cada columna. Dicho procedimiento se repitió dos veces más. Posteriormente, las columnas fueron cambiadas a dos nuevos tubos de 15 ml, se añadieron 600 µl de cada medio condicionado obtenido previamente en cada columna para posteriormente centrifugar a 1800 rpm durante 3 minutos. Los sobrenadantes obtenidos de esta última centrifugación corresponden a las muestras purificadas, dichas muestras fueron incubadas con la biotina incluida en el kit durante 30 minutos en agitación suave y constante a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se añadió una solución de paro y ambas muestras marcadas fueron purificadas en dos nuevas columnas, previamente tratadas como se indica al inicio de este procedimiento. A la par de la purificación de las muestras, los arreglos fueron incubados durante una hora con un buffer de bloqueo 1X incluido en el kit, agitando de manera suave, homogénea y a temperatura ambiente. Una vez que los arreglos han sido bloqueados, se hizo una dilución 1:12 de cada muestra marcada previamente y purificada por columna, con el buffer de bloqueo. Se añadieron 9 ml de cada muestra diluida en el arreglo correspondiente y se dejaron en incubación durante toda la noche. A la mañana siguiente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno usando el buffer I 1X proporcionado por el kit, además de otros tres lavados de 5 minutos utilizando el buffer II 1X también proporcionado por el kit. Una vez finalizados los lavados, las membranas fueron incubadas con la Estreptavidina conjugada con HRP proporcionada por el kit durante dos horas a temperatura ambiente.

Concluida la incubación se realizaron los tres lavados tanto con el buffer I como el buffer II de 5 minutos cada uno. Finalmente, se preparó una solución de revelado añadiendo ácido Fosfo-cumarico, Luminol y Peróxido de Hidrógeno a un buffer de ECL (misma solución empleada para revelar las membranas en el protocolo de Western blot para el revelado de ambos arreglos y para lo cual utilizó un fotodocumentador proveniente de la casa comercial Analytik. Los tiempos de exposición para cada arreglo fueron de 10 minutos [142]. El análisis de las imágenes obtenidas se empleó el software de ImageLab BioRad versión 6.1.

### **8.8. Softwares para el análisis de datos.**

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el GraphPad Prism en su versión 8.0.1.

## 9.0. Resultados

### 9.1. Reclutamiento de los donantes. Breve historia clínica

Para el reclutamiento de los participantes en el estudio se siguieron diversos criterios de inclusión y exclusión que se enlistan a continuación:

- Edad de entre 30 a 40 y 50 a 60 años
- No presentar enfermedades psiquiátricas
- No presentar enfermedades neurodegenerativas
- No presentar enfermedades crónicas como insuficiencia cardíaca o diabetes

Se hizo el reclutamiento de ocho participantes (Figura 14), todos fueron clínicamente sanos sin enfermedades que los excluyeran del estudio. Cuatro de los ocho participantes presentaron una edad de entre 30 a 40 años, por lo que se clasificaron en el grupo joven, mientras que el resto de los participantes estuvieron en un rango de edad de entre 50 y 60 años, integrando el grupo denominado adulto.

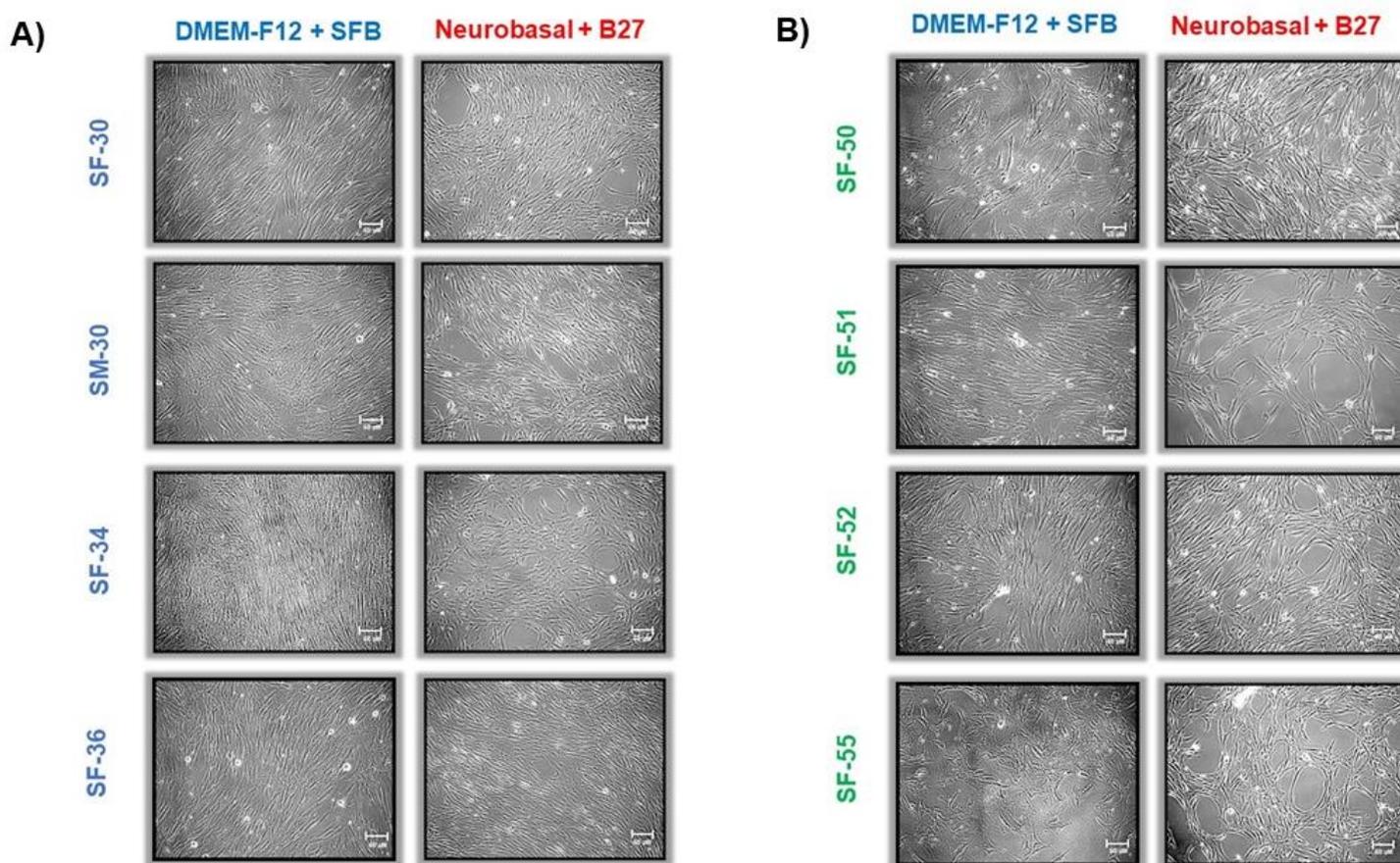
Sujetos	Nomenclatura	Edad	Sexo	
MLM	SF-30	30	Femenino	Aparentemente sano
JRPM	SM-30	30	Masculino	Aparentemente sano
NLZ	SF-34	34	Femenino	Aparentemente sano
LGV	SF-35	35	Femenino	Aparentemente sano
ANL	SF-50	50	Femenino	Aparentemente sano
MVP	SF-51	51	Femenino	Aparentemente sano
MCCA	SF-52	52	Femenino	Aparentemente sano
ACS	SF-55	55	Femenino	Aparentemente sano

**Figura 14. Datos demográficos relacionados con los sujetos participantes.** La presente tabla muestra algunos datos correspondientes a los sujetos que participaron en el estudio a través de una toma de muestra del OE. Se muestra la nomenclatura con la que son referidos, la edad al momento de la toma de muestra, el sexo y por último denotando si son clínicamente sanos.

### 9.2. Caracterización fenotípica de las hNS/PCs-OE

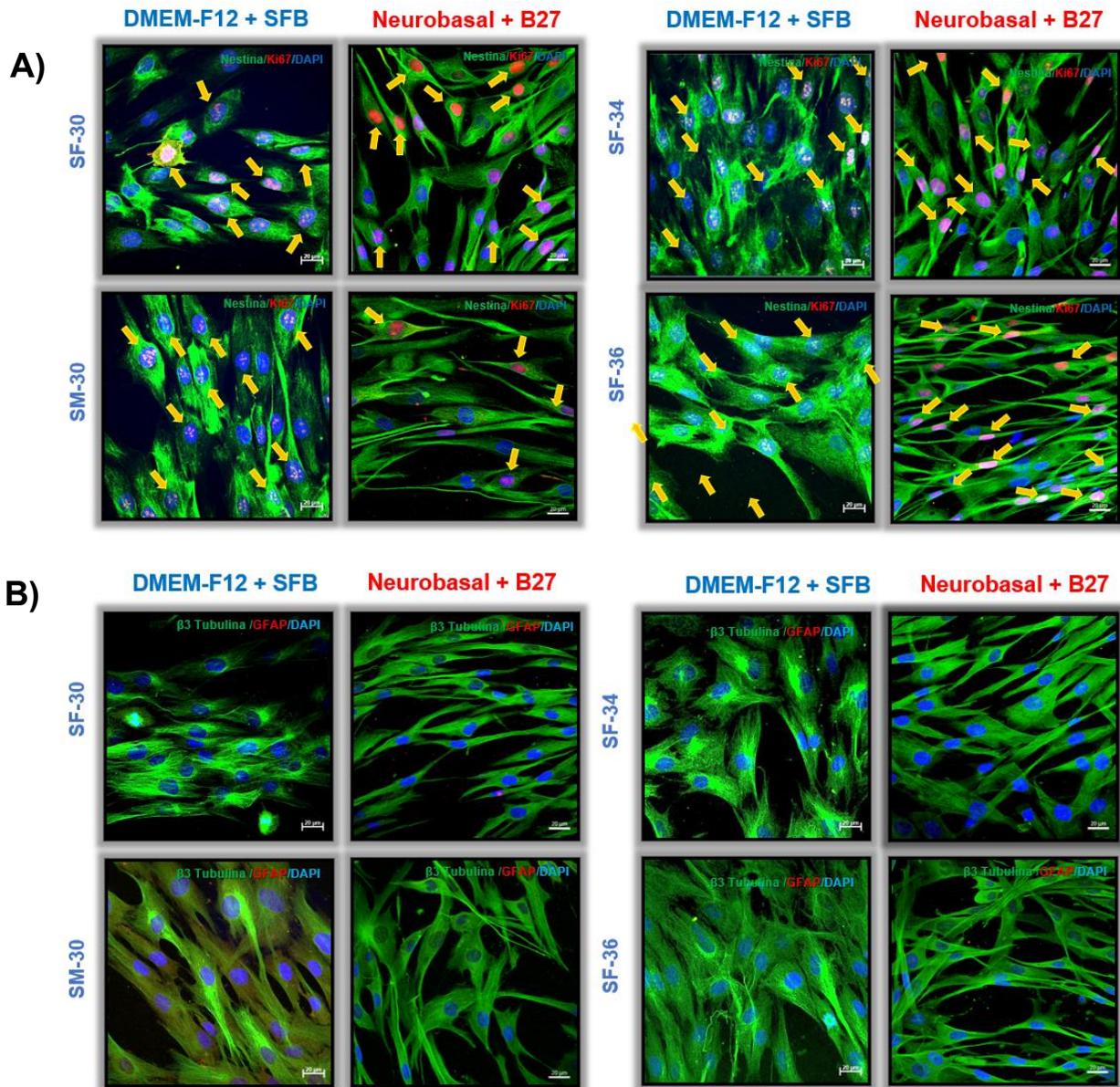
A cada participante se le realizó un exfoliado nasal, buscando la zona del epitelio olfatorio (tal y como se describió en la metodología), con el objetivo de obtener las hNS/PCs-OE. El aislamiento se hizo con DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino (DMEM-F12 + SFB). Si el aislamiento de dichas células resultaba exitoso, al mes se realizaba el primer pase

bajo las mismas condiciones. En la Figura 15, condición DMEM-F12 + SFB, se muestran imágenes tomadas en campo claro de las células aisladas, las cuales presentan una morfología fibroblastoide con proyecciones prolongadas y núcleos alargados. De acuerdo con el diseño experimental, las hNS/PCs-OE fueron sometidas a un cambio de medio utilizando medio neuronal definido, es decir, medio de cultivo Neurobasal suplementado con B27 y los factores de crecimiento EGF y bFGF. En la Figura 15, condición Neurobasal + B27, se muestran las imágenes de campo claro, en donde se aprecia la morfología de dichas células ante la presencia de un medio de cultivo libre de suero. La morfología se muestra similar en ambas condiciones.

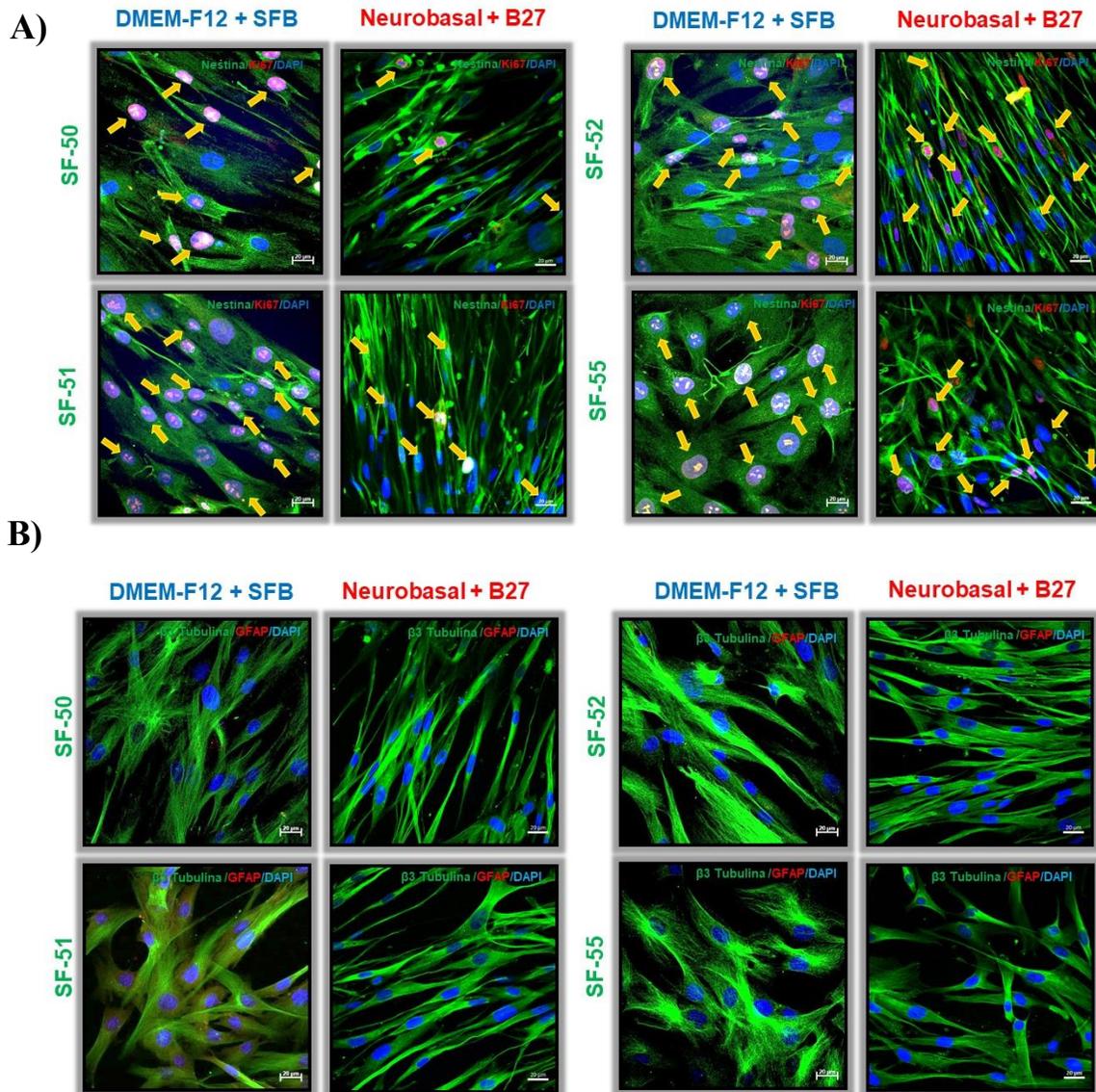


**Figura 15. Imágenes de campo claro hNS/PCs-OE provenientes de sujetos pertenecientes a dos grupos de edad.** En vertical y en color azul se muestran las etiquetas de las micrografías de contraste de fases de las células cultivadas en la condición de DMEM-F12 + SFB, mientras que en rojo se muestran las etiquetas de las micrografías de las células cultivadas en la condición Neurobasal + B27. Por otro lado, a la izquierda de las micrografías, en etiquetas color azul se señalan las imágenes de aquellos pertenecientes al grupo joven, mientras que en color verde pertenecientes al grupo adulto. Barra de escala igual a 50  $\mu$ m tomadas en un microscopio Olympus CK40 objetivo 10x.

Una vez tomadas las imágenes de campo claro, se realizó la inmunofluorescencia para cuatro marcadores relacionados a troncalidad, proliferación y compromiso celular, dichos marcadores fueron: Nestina, Ki67,  $\beta$ -III tubulina y GFAP. En la Figura 16 se muestra un panel de imágenes correspondientes a las células del grupo joven mientras que en la Figura 17 se muestra el panel de imágenes perteneciente al grupo adulto. En ambos paneles se presenta un apartado A donde se observan los marcadores de troncalidad y proliferación, mientras que en el siguiente apartado B se indican los marcadores asociados a compromiso celular.

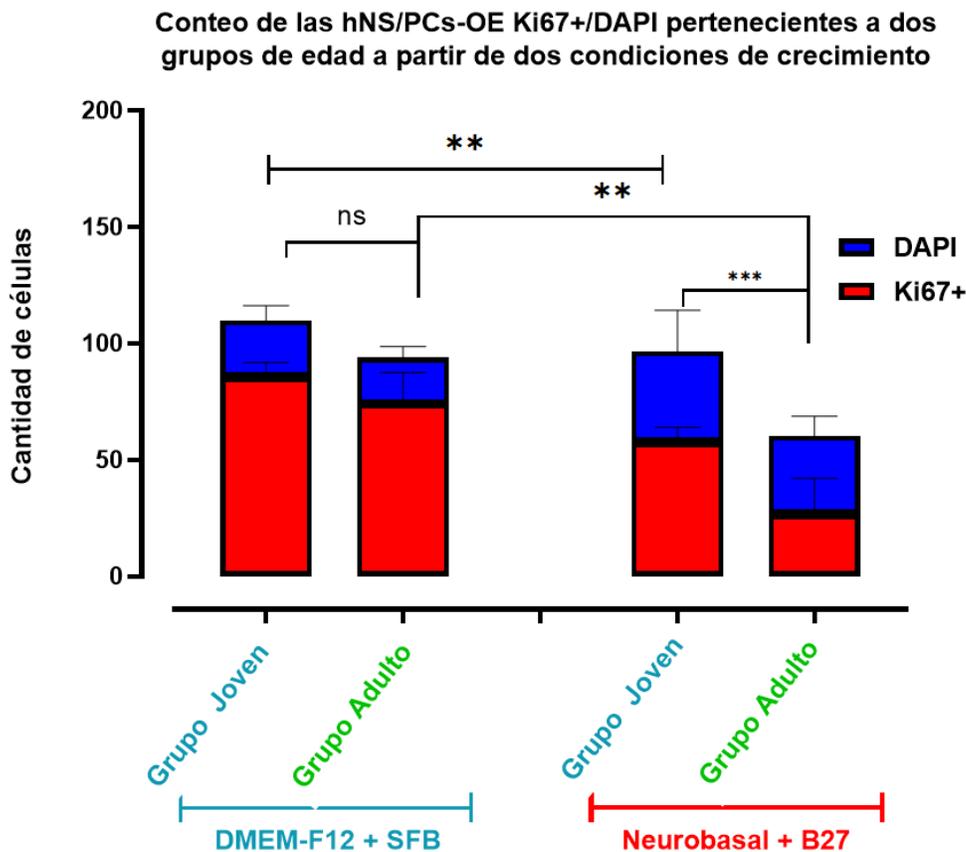


**Figura 16. Inmunofluorescencia para marcadores de troncalidad, proliferación y compromiso celular en hNS/PCs-OE pertenecientes al grupo joven.** En el inciso A) se muestra la expresión de dos marcadores asociados a troncalidad y proliferación bajo dos condiciones de crecimiento diferentes. Del lado izquierdo en un medio de crecimiento rico en suero fetal bovino, mientras que en la columna derecha la condición de crecimiento en un medio libre de suero fetal bovino. En verde se indica la presencia de Nestina (citoesqueleto), mientras que en rojo se muestra la proteína Ki67 (núcleo), además, los núcleos se encuentran teñidos con DAPI en color azul. Las flechas amarillas señalan la colocalización de 2 señales, azul y rojo (tinción nuclear), las cuales pueden verse en color rosa. En el apartado B) se muestran las imágenes con los marcadores relacionados a compromiso celular. En color verde se encuentra la expresión de la proteína  $\beta$ -III tubulina (citoesqueleto), mientras que en rojo la proteína GFAP (citoesqueleto) y en azul la tinción con DAPI para los núcleos. Imágenes obtenidas en el microscopio Confocal LSM 880, casa comercial Zeiss. Objetivos 40x.



**Figura 17. Inmunofluorescencia para marcadores de troncalidad, proliferación y compromiso celular en hNS/PCs-OE pertenecientes al grupo adulto.** En el inciso A) se muestra la expresión de dos marcadores asociados a troncalidad y proliferación bajo dos condiciones de crecimiento diferentes. Del lado izquierdo en un medio de crecimiento rico en suero fetal bovino, mientras que en la columna derecha la condición de crecimiento en un medio libre de suero fetal bovino. En verde se indica la presencia de Nestina (citoesqueleto), mientras que en rojo se muestra la proteína Ki67 (núcleo), además, los núcleos se encuentran teñidos con DAPI en color azul. Las flechas amarillas señalan la ecolocalización de 2 señales, azul y rojo (tinción nuclear), las cuales pueden verse en color rosa. En el apartado B) se muestran las imágenes con los marcadores relacionados a compromiso celular. En color verde se encuentra la expresión de la proteína  $\beta$ -III tubulina (citoesqueleto), mientras que en rojo la proteína GFAP (citoesqueleto) y en azul la tinción con DAPI para los núcleos. Imágenes obtenidas en el microscopio Confocal LSM 880, casa comercial Zeiss. Objetivos 40x.

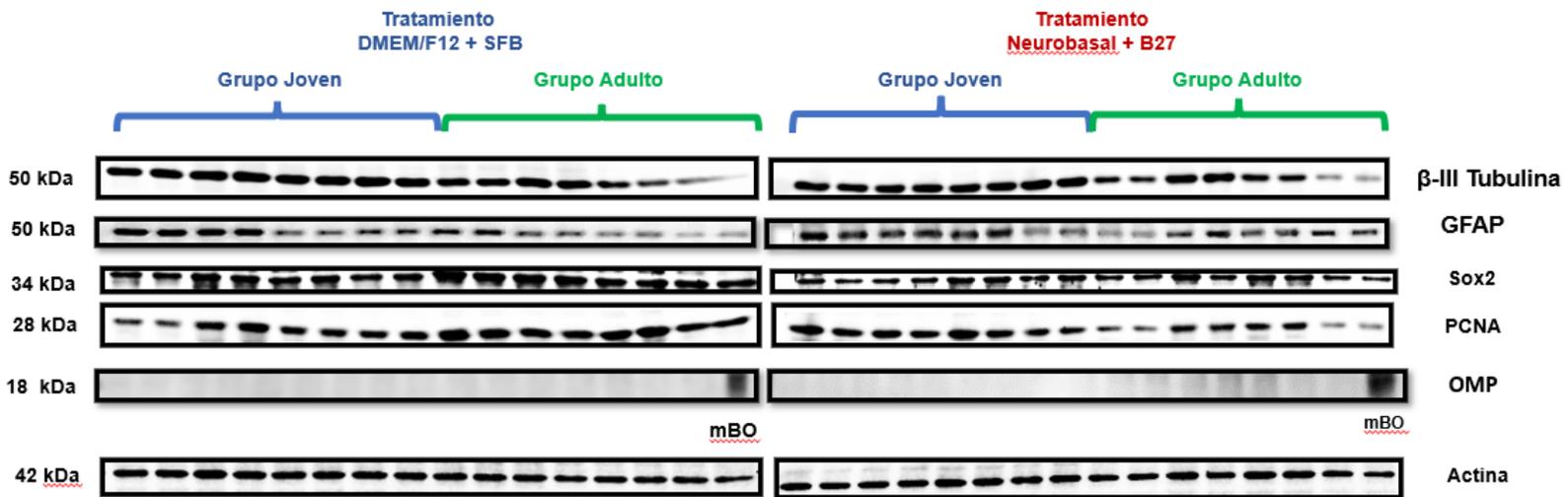
Las imágenes de microscopía confocal y epifluorescencia obtenidas se utilizaron para hacer conteos celulares de las hNS/PCs-OE Ki67+ en ambos grupos de edad. Los conteos se realizaron en ambas condiciones de crecimiento, es decir en DMEM + F12 y Neurobasal + B27 (Figura 18).



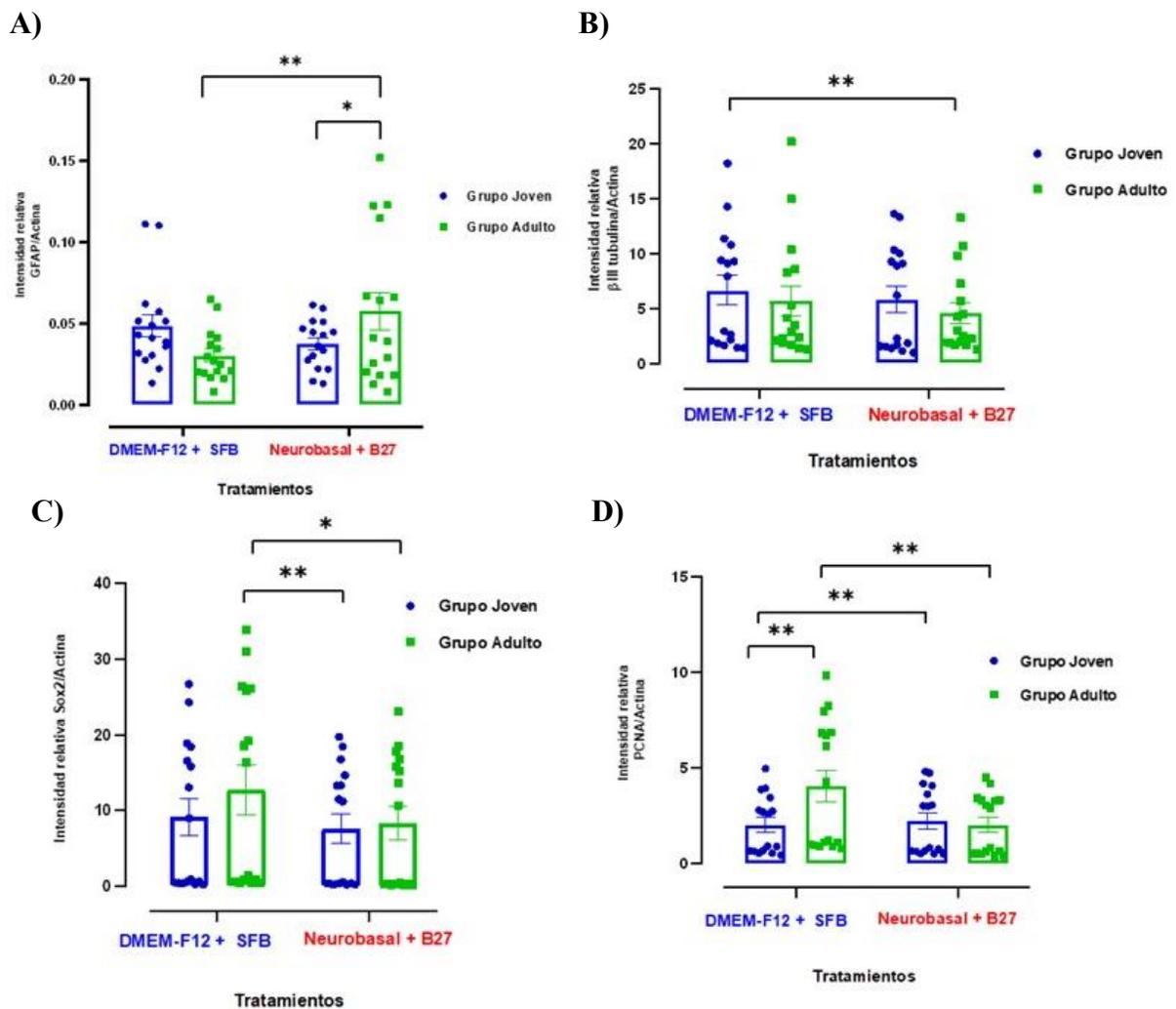
**Figura 18. Conteos celulares de Ki67+ hNS/PCs-OE provenientes de dos grupos de edad a partir de dos condiciones de crecimiento.** En la figura se muestran los conteos celulares respecto a ambos grupos de edad asociados a dos condiciones de crecimiento. En la parte inferior se muestra en letras color azul la condición de crecimiento con suero fetal bovino, mientras que, en letras rojas se indica la condición de crecimiento sin suero. Por otro lado, en letras azules se indican los conteos relacionados al grupo joven, mientras que en letras verdes se muestran los conteos asociados al grupo adulto. Por último, cabe señalar que las barras de color rojo

representan el porcentaje de células Ki67+/DAPI+, mientras que las barras en azul indican el porcentaje de células positivas solamente al marcador nuclear DAPI. La estadística que se utilizó fue la prueba Tukey de múltiples comparaciones. La obtención de \*\* indica una significancia con una  $p < 0.005$ , mientras que \*\*\* con una  $p < 0.001$ , por último, **ns** indica no significativo. El análisis de datos se realizó mediante el software GraphPad Prism 8va versión.

Finalmente, los siguientes blots muestran la expresión de diferentes proteínas asociadas a troncalidad, proliferación y compromiso celular en hNS/PCs-OE correspondientes al grupo al que pertenecen, así como a la variación de dicha expresión de acuerdo con la condición de crecimiento evaluada (Figuras 19 y 20).



**Figura 19. Caracterización de las hNS/PCs-OE mediante Western Blot.** En el parte superior izquierdo y en color azul se encuentra la condición de crecimiento con SFB, mientras que en rojo la condición con sustituyente de SFB. Por otro lado, los corchetes abarcan el grupo de edad, en color azul el grupo joven, mientras que en verde el grupo adulto. En la parte izquierda el peso de las proteínas en kDa, mientras del lado derecho el nombre de la proteína presente en el diagrama. Imagen representativa  $n=3$ .

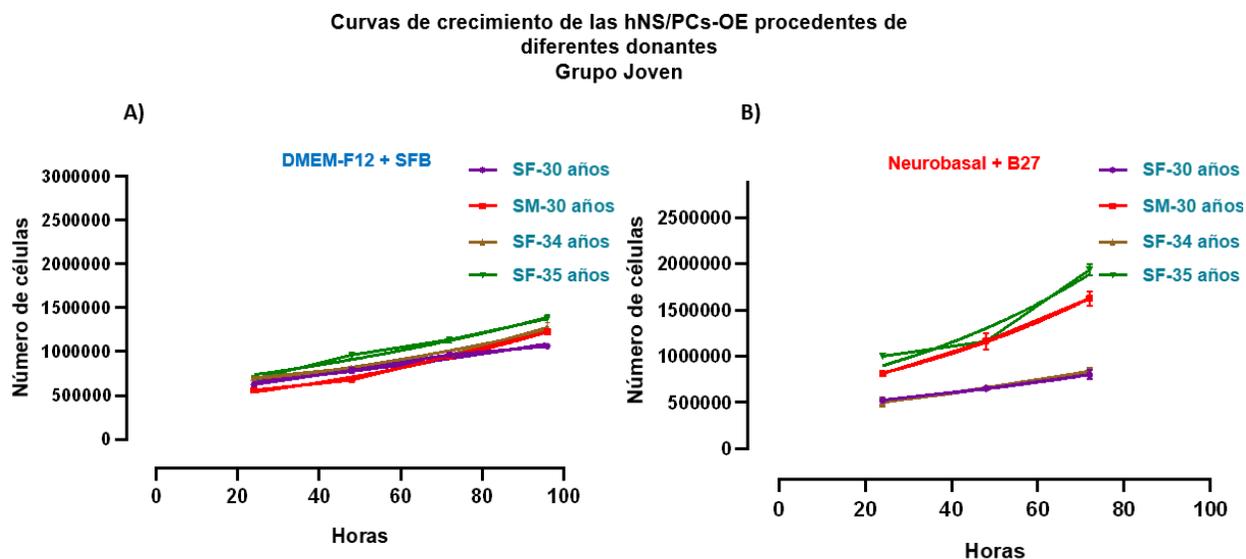


**Figura 20. Representación cuantitativa mediante densitometrías de los resultados obtenidos mediante Western Blot de las hNS/PCs-OE.** En la parte superior con el inciso A) se muestra la densitometría asociada a la expresión de GFAP, mientras que en B) la expresión de  $\beta$ -III tubulina, por otro lado, en C) para Sox2 y por último en D) la expresión de PCNA. Se realizó la prueba estadística Anova de 2 vías mediante el software GraphPad prisma en la 8va versión. \* significa  $p < 0.05$ , mientras que \*\*  $p < 0.005$  y \*\*\*  $p < 0.001$ . Densitometría de  $n=3$

### 9.3. Caracterización funcional de las células precursoras del epitelio olfatorio

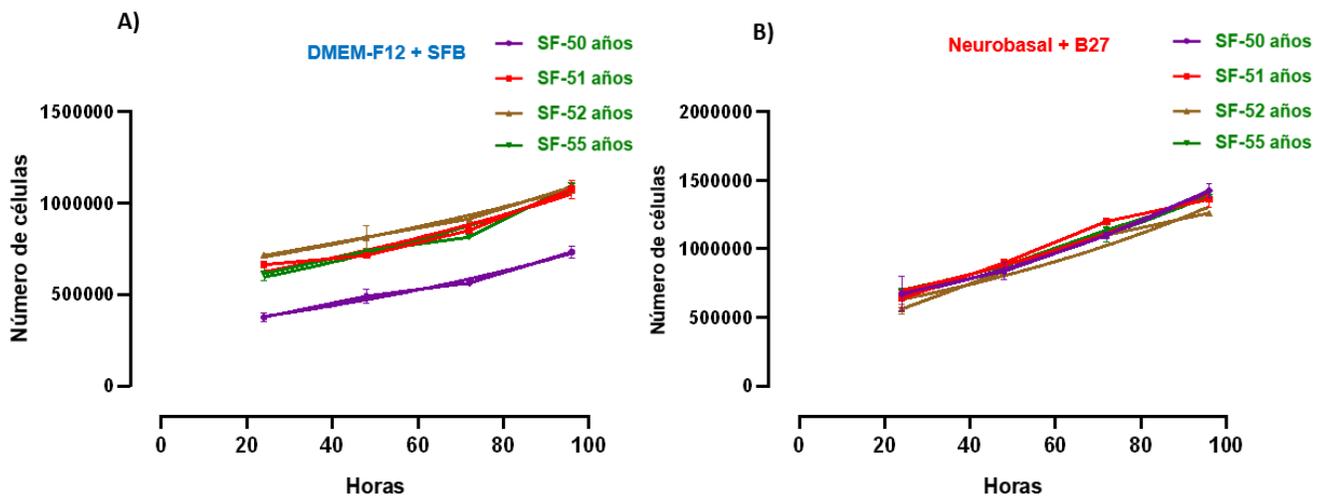
Para la caracterización funcional de las hNS/PCs-OE se obtuvieron las curvas de crecimiento, y posteriormente los tiempos de duplicación relacionados a cada individuo pertenecientes a los dos grupos de edad. En la figura 21 se muestran las curvas de crecimiento asociadas al grupo joven, mientras que en la figura 22 las asociadas al grupo adulto. En cada figura se muestran dos apartados, en el inciso A se representa la condición DMEM-F12 + SFB,

mientras que en inciso B la condición de crecimiento Neurobasal + B27. A partir de las curvas de crecimiento se obtuvieron los tiempos de duplicación experimentales mediante una regresión no lineal, mientras que los tiempos de duplicación teóricos se obtuvieron a partir de la fórmula mostrada en la figura 11. Finalmente, en la figura 23, se muestran ambos tiempos ordenados en una tabla, donde se presentan ambos grupos de edad, así como ambas condiciones de crecimiento.



**Figura 21. Curva de crecimiento de las hNS/PCs-OE pertenecientes al grupo joven.** Del lado izquierdo, en el inciso A) se encuentra la curva de crecimiento bajo la condición medio suplementado con suero fetal bovino, mientras que en el inciso B) se muestra la curva bajo la condición libre de suero. En cada condición cada sujeto es representando por un color: en azul SF-30, rojo SM-30, café SF-34 y verde SF-35. Cantidad de células contadas mediante la cámara de Neubauer

**Curvas de crecimiento de las hNS/PCs-OE procedentes de diferentes donantes**  
**Grupo Adulto**



**Figura 22. Curva de crecimiento de las hNS/PCs-OE pertenecientes al grupo adulto.** Del lado izquierdo, en el inciso A) se encuentra la curva de crecimiento bajo la condición medio suplementado con suero fetal bovino, mientras que en el inciso B) se muestra la curva bajo la condición libre de suero. En cada condición cada sujeto es representando por un color: en azul SF-50, rojo SF-51, café SF-52 y verde SF-55. Cantidad de células contadas mediante la cámara de Neubauer.

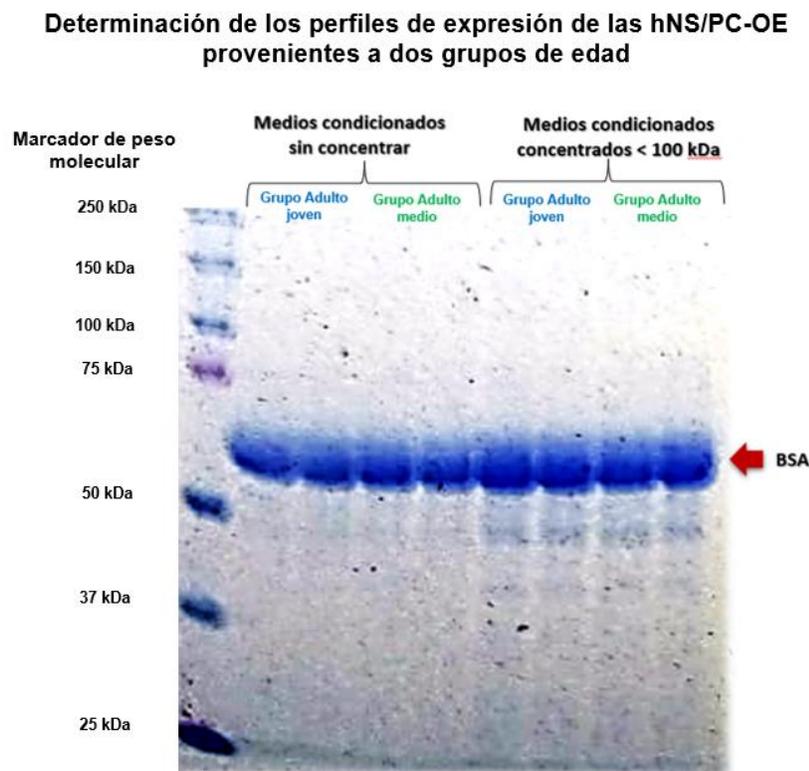
**Determinación del tiempo de duplicación de las hNS/PCs-OE procedentes a dos grupos de edad**

	DMEM-F12 + SFB		Neurobasal + B27	
	Tiempo Teórico	Tiempo experimental	Tiempo Teórico	Tiempo experimental
	<b>Grupo Joven</b>			
SF-30	94.05	77.19	118.48	79.15
SF-34	75.70	98.87	72	48.37
SF-36	83.23	117.9	96.75	62.57
SF-50	72	85.71	75.45	44.76
<b>Grupo Adulto</b>				
SF-50	74.41	77.19	66.79	68.58
SF-51	103.10	96.15	65.70	61.58
SF-52	118.02	117.9	61	67.68
SF-55	85.90	85.71	72	66.64
	Promedio		Promedio	
<b>Grupo Joven</b>	81.24	94.91	90.67	58.71
<b>Grupo Adulto</b>	95.35	94.23	66.37	66.12

**Figura 23. Determinación de los tiempos de duplicación de las hNS/PCs-OE procedentes a dos grupos de edad.** En la figura se muestran los tiempos de duplicación teóricos y experimentales a partir de dos condiciones de crecimiento diferentes asociadas a dos grupos de edad. En la parte superior se muestran las condiciones de crecimiento. En la parte superior izquierda y en color azul se indica la condición de medio con suero fetal bovino, mientras que de lado derecho y en letras color rojo se muestra la condición libre de suero. Por otro lado, en la parte superior y en color azul se presenta a los sujetos pertenecientes al grupo adulto, mientras en la parte inferior y en color verde aquellos sujetos referentes al grupo adulto. En la parte inferior se encuentra el promedio de los tiempos de duplicación teórico y experimental.

#### 9.4. Determinación de los perfiles de expresión de las hNS/PCs-OE asociados a dos grupos de edad

Para la realización de este objetivo se obtuvieron los medios condicionados provenientes de los dos grupos de edad de acuerdo con lo descrito en la metodología (Figura 13). Posteriormente, se realizó una electroforesis, así como una tinción con azul de Coomassie. De esta forma se obtuvo el perfil de expresión asociado a los medios condicionados provenientes de las hNS/PCs-OE implementando únicamente la condición de crecimiento Neurobasal + B27 (Figura 24).

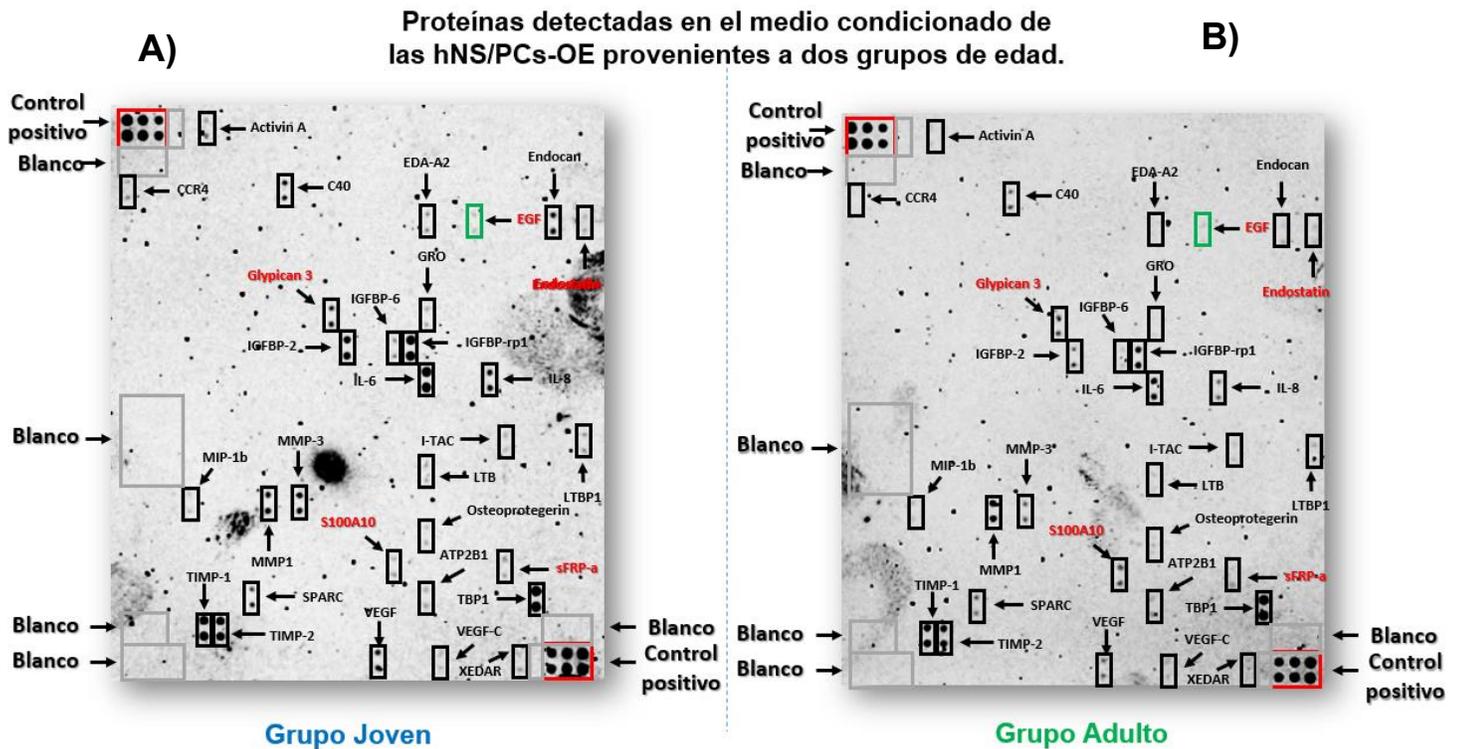


**Figura 24. Determinación de los perfiles de expresión provenientes del CM derivado de las hNS/PCs-OE a partir de dos grupos de edad.** En la columna de extrema izquierda se muestra el marcador de peso molecular de la casa comercial BioRad. En la parte central se encuentran los carriles relacionados al medio condicionado sin el uso de unidades de concentración, mientras que del lado derecho se muestran los carriles del medio condicionado concentrado con filtros Amicon Ultra-15 10 K. En color azul se encuentra representado los carriles asociados al grupo joven, mientras que en color verde para el grupo adulto. La flecha roja indica la

presencia de la proteína albumina sérica bovina encontrada en B27, suplemento utilizado en reemplazo del suero fetal bovino.

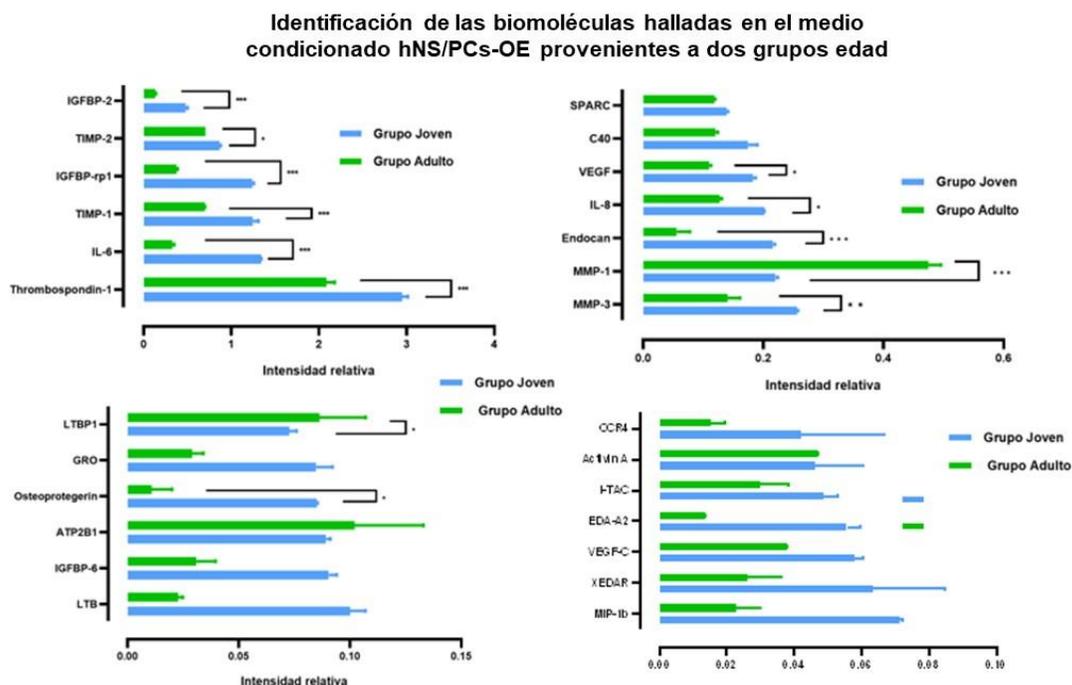
### 9.5. Caracterización y comparación de las moléculas secretadas a partir las células precursoras del epitelio olfatorio asociado a dos grupos de edad

Una vez obtenidos los perfiles de expresión de cada grupo de edad, se determinaron los factores solubles secretados existentes en el CM derivado de las hNS/PCs-OE asociados a dos grupos de edad (Figura 13). Para ello se emplearon arreglos precargados con 507 anticuerpos capaces de detectar diversas biomoléculas (citocinas). En las siguientes figuras 25 y 27, se muestran las membranas hibridadas con CM derivado de las hNS/PCs-OE. En ambas figuras se presentan dos incisos, en el apartado A, la membrana asociada al grupo joven, mientras que en el inciso B, la membrana representativa del grupo adulto.



**Figura 25. Proteínas detectadas en el medio condicionado de las hNS/PCs-OE provenientes a dos grupos de edad.** En el apartado A se muestra la membrana asociada al medio condicionado de las hNS/PCs-OE provenientes al grupo joven, mientras que en el apartado B se representa al medio condicionado de las hNS/PCs-OE del grupo adulto. Por último, en color rojo se representan las proteínas encontradas de forma endógena en el medio de crecimiento Neurobasal + B27.

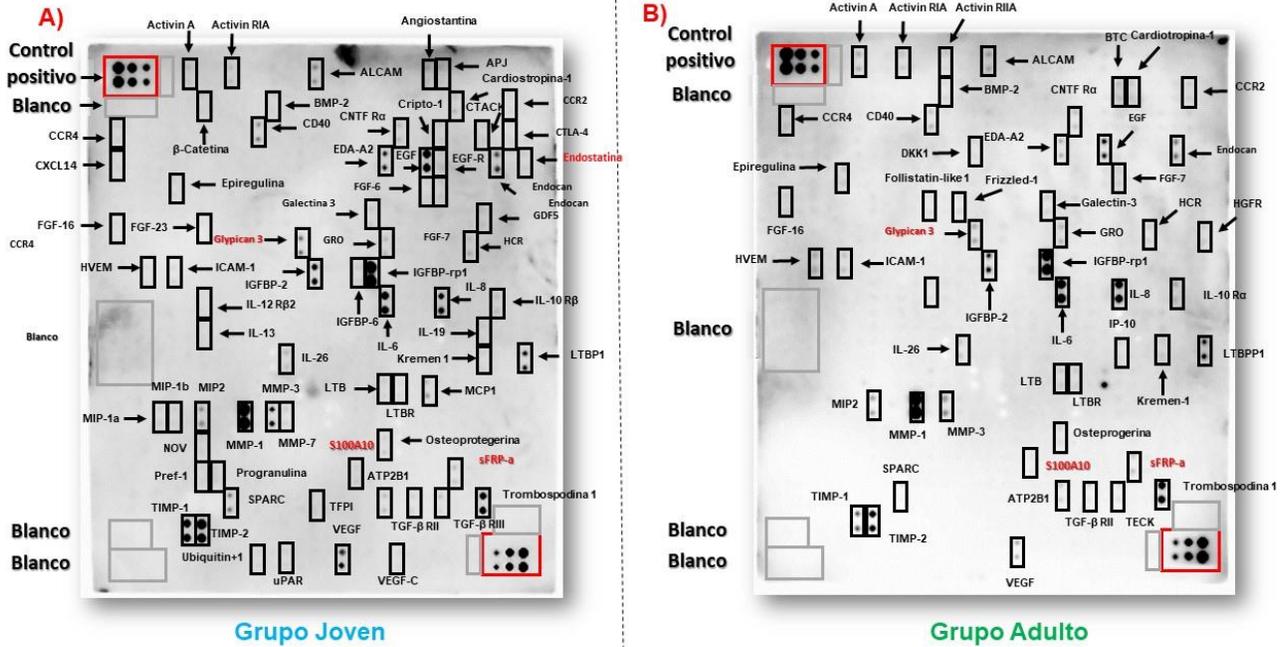
En el primer ensayo se logró la identificaron un total de 25 factores solubles presentes en el medio condicionado de las hNS/PCs-OE para ambos grupos. En la Figura 26 se destacan factores solubles en color rojo que representan las biomoléculas endógenas halladas en el medio de crecimiento Neurobasal + B27 (Figuras 25 y 26).



**Figura 26. Factores solubles hallados en el medio condicionado derivado de las hNS/PC-OE provenientes de dos grupos de edad.** En la figura, el eje y, se representa el nombre de aquellas proteínas detectadas en el arreglo, mientras que, en el eje x, se presenta el valor de intensidad relativa obtenido en la densitometría. En color azul se representan aquellas biomoléculas asociadas al grupo joven, mientras que en verde aquellas pertenecientes al grupo adulto. La significancia se simboliza por  $p < 0.05$  es \*, mientras que  $p < 0.01$  es \*\* y por último  $p < 0.001$  es \*\*\*. El análisis densitómetro realizado en ImageLab ® y GraphPad versión 8.01 ®.

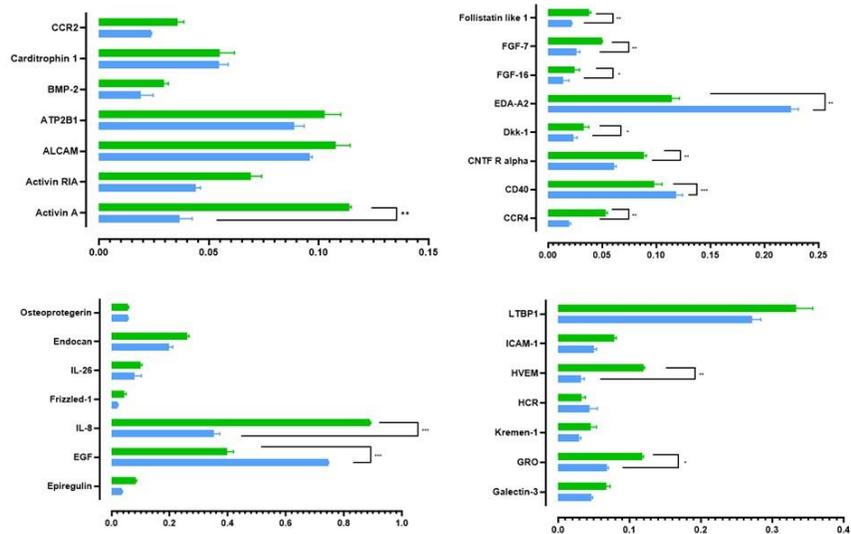
Como se describió anteriormente, se realizó un duplicado biológico para la identificación de los factores solubles presentes en el CM derivado de las hNS/PCs-OE. En este segundo ensayo se detectaron un total de 76 factores solubles en el grupo joven mientras que 53 fueron identificadas en el grupo Adulto (Ver figura 27). De los múltiples factores solubles encontrados en los arreglos L-507, se eligieron aquellos que fueran coincidentes en ambos grupos (ver figuras 28 y 29) y mantuvieran su expresión a través de los dos ensayos.

**Proteínas detectadas en el medio condicionado de las hNS/PCs-OE provenientes a dos grupos de edad (duplicado biológico)**

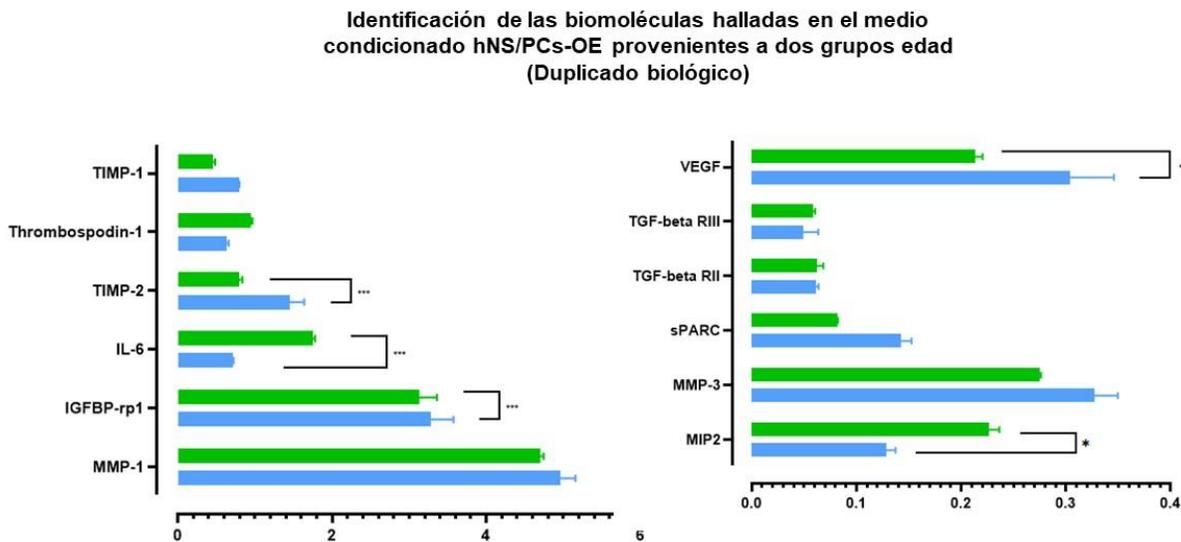


**Figura 27. Proteínas detectadas en el medio condicionado de las hNS/PCs-OE provenientes a dos grupos de edad (Duplicado biológico).** En el apartado A se muestra la membrana asociada al medio condicionado de las hNS/PCs-OE provenientes al grupo joven, mientras que en el apartado B se representa al medio condicionado de las hNS/PCs-OE del grupo adulto. Por último, en color rojo se representan las proteínas encontradas de forma endógena en el medio de crecimiento Neurobasal + B27.

**Identificación de las biomoléculas halladas en el medio condicionado hNS/PCs-OE provenientes a dos grupos edad (Duplicado biológico)**



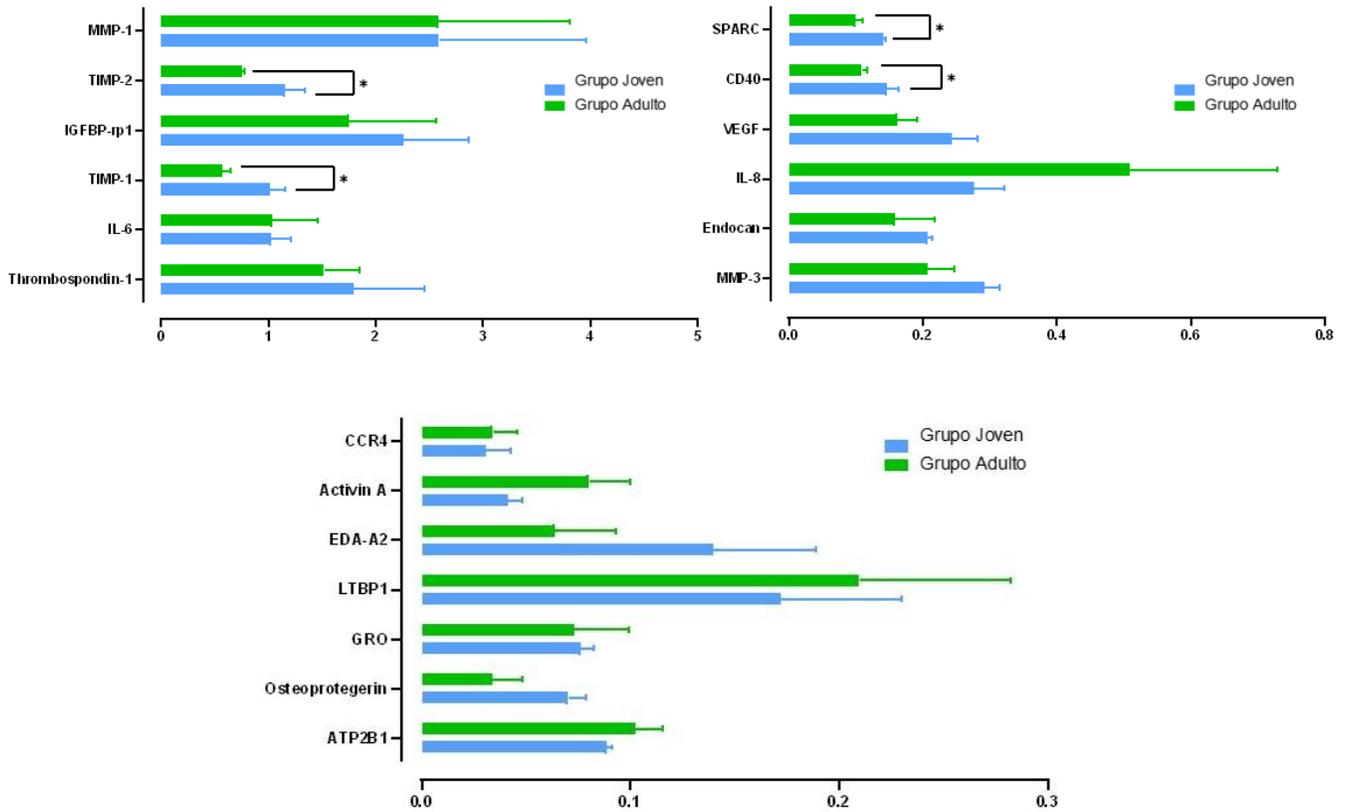
**Figura 28. Factores solubles hallados en el medio condicionado derivado de las hNS/PCs-OE provenientes a dos grupos de edad (Duplicado biológico).** En la figura, en el eje y, se representa el nombre de aquellas proteínas detectadas en el arreglo, mientras que, en el eje x, se presenta el valor de intensidad relativa obtenido en la densitometría. En color azul se representan aquellas biomoléculas asociadas al grupo joven, mientras que en verde aquellas pertenecientes al grupo adulto. La significancia se simboliza por  $p < 0.05$  es \*, mientras que  $p < 0.01$  es \*\* y por último  $p < 0.001$  es \*\*\*. El análisis densitómetro realizado en ImageLab ® y GraphPad versión 8.01 ®.



**Figura 29. Continuación. Factores solubles hallados en el medio condicionado derivado de las hNS/PCs-OE provenientes a dos grupos de edad (Duplicado biológico).** En la figura, en el eje y, se representa el nombre de aquellas proteínas detectadas en el arreglo, mientras que, en el eje x, se presenta el valor de intensidad relativa obtenido en la densitometría. En color azul se representan aquellas biomoléculas asociadas al grupo joven, mientras que en verde aquellas pertenecientes al grupo adulto. La significancia se simboliza por  $p < 0.05$  es \*, mientras que  $p < 0.01$  es \*\* y por último  $p < 0.001$  es \*\*\*. El análisis densitómetro realizado en ImageLab ® y GraphPad versión 8.01 ®.

En el comparativo entre ambos experimentos (1er y 2do ensayo biológico) se obtuvieron un total de 19 biomoléculas presentes en ambos grupos, es decir que conservaban la expresión. A estos factores solubles se les realizó una comparación a partir de los datos semicuantitativos respecto al cambio de expresión asociado a cada grupo de edad (Figura 30)

**Comparación de las biomoléculas halladas en el medio condicionado hNS/PCs-OE provenientes a dos grupos edad**



**Figura 30. Comparación de las biomoléculas halladas en el CM provenientes de las hNS/PCs-OE provenientes a dos grupos de edad.** Las barras de color azul representan los valores de intensidad relativa correspondientes al grupo joven, mientras que las barras en color verde al grupo adulto. La significancia se simboliza por  $p < 0.05$  es \*, mientras que  $p < 0.01$  es \*\* y por último  $p < 0.001$  es \*\*\*. El análisis densitométrico realizado en ImageLab ® y GraphPad versión 8.01®.

De forma clara se muestra en la Tabla 2 los factores solubles liberados por las hNS/PCs-OE, que tuvieron significancia estadística en los análisis realizados, junto a su código en la base de datos UNIPROT, implicación biológica, así como la expresión asociada a los grupos de edad.

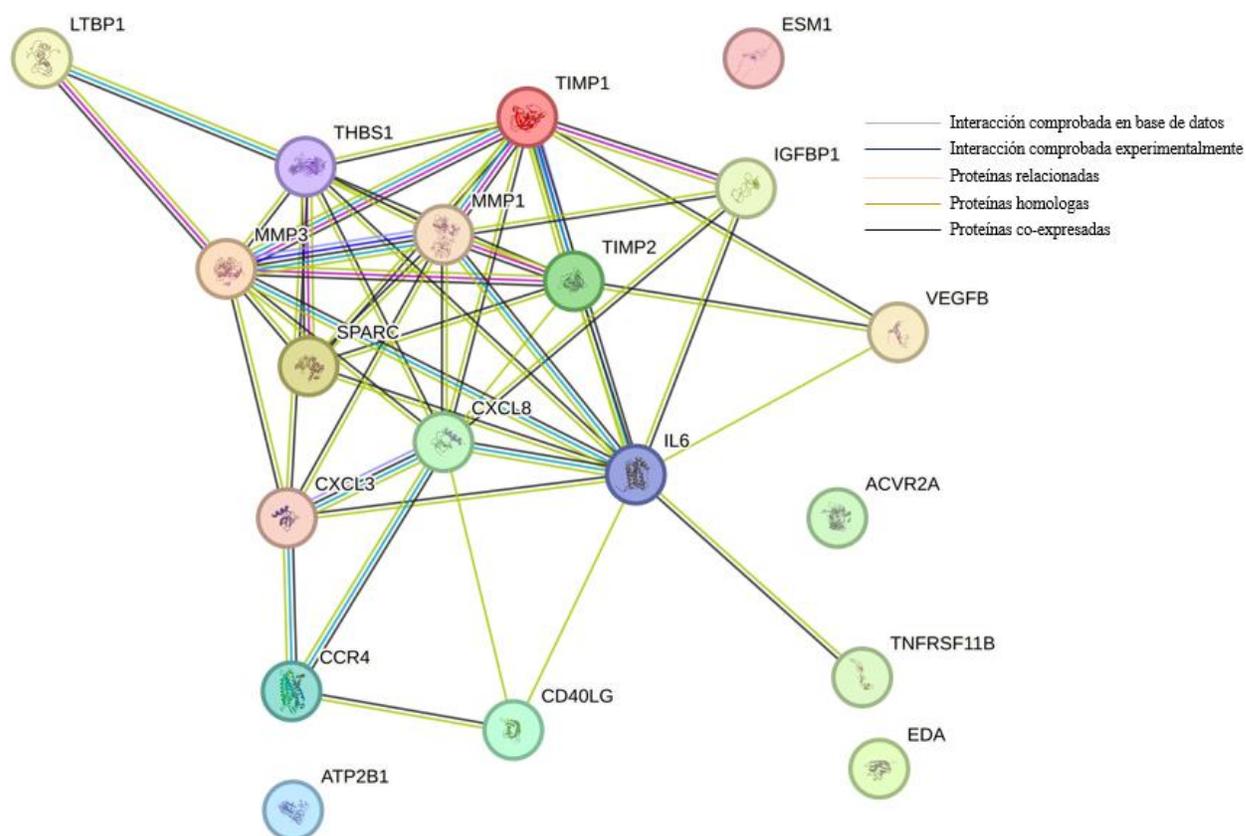
**Tabla 2. Factores solubles liberados por las hNS/PCs-OE**

Nombre	Uniprot Code	Función	Expresión
<b>TIMP-1</b>	Q5H9A7	Matrix extracelular	<b>+GJ</b>
<b>TIMP-2</b>	P16035	Matrix extracelular	<b>+GJ</b>
<b>MMP1</b>	P03956	Matrix extracelular	<b>+GJ</b>
<b>IGFBP-1</b>	P08833	Metabolismo de la insulina	<b>+GJ</b>
<b>IL-6</b>	P05231	Inmune	<b>+GA</b>
<b>Trombospodina 1</b>	A8MZG1	Metabolismo	<b>+GJ</b>
SPARC	P09486	Metabolismo	<b>+GJ</b>
CD40	P29965	Inmune	<b>+GJ</b>
<b>VEGF</b>	P15692	Angiogenesis	<b>+GJ</b>
IL-8	P10145	Inmune	<b>+GA</b>
<b>Endocan</b>	Q9NQ30	Angiogenesis	<b>+GJ</b>
<b>MMP3</b>	P08254	Matrix extracelular	<b>+GJ</b>
CCR4	A0N0Q1	Inmune	<b>+GA</b>
<b>Activina A</b>	P27037	Diferenciación	<b>+GA</b>
GRO	P19876	Transcripción	<b>+GA</b>
<b>LTBP1</b>	Q14766	Metabolismo	<b>+GA</b>
EDA-A2	Q92838	Metabolismo	<b>+GJ</b>
Osteoprotegerin	TNFRSF11B	Diferenciación/supervivencia	<b>+GJ</b>
ATP2B1	P20020	Metabolismo	<b>+GA</b>

*Nota.* En la tabla se muestra el nombre de la biomolécula, seguido del código Uniprot así como la implicación biológica que tiene y por último la expresión que tiene en el CM derivado de las hNS/PCs-OE provenientes de dos grupos de edad. Se detona con un +GJ con respecto al grupo adulto (cuando su expresión es mayor en el grupo joven). Mientras que +GA cuando es mayor en el grupo adulto con respecto al grupo joven. En rojo se encuentran aquellas biomoléculas implicadas en el proceso neurogénico

Posteriormente en la figura 26 se realizó una red de interacción entre las moléculas encontradas en el arreglo L507 de ambos experimentos.

Red de interacción entre las proteínas expresadas por las hNS/PCs-OE provenientes de dos grupos de edad



**Figura 31. Red de interacción entre las proteínas expresadas por las hNS/PCs-OE provenientes de dos grupos de edad.** Las líneas de color azul representan la relación existente comprobada por otras bases de datos entre los genes asociados a proteínas. Mientras que en color morado aquellas relaciones experimentalmente comprobadas, en la línea de color azul oscuro están los genes que se expresan de forma coexistente, en azul cielo proteínas que son homólogas y por último en líneas negras representan la expresión simultánea entre genes. Red de interacción realizado mediante el programa String ®

## 10.0. Discusión

En la presente tesis se realizó la caracterización fenotípica y funcional de las células troncales/precursoras del epitelio olfatorio aisladas a partir de sujetos de dos grupos de edad, mientras que la caracterización proteómica de las biomoléculas liberadas por dichas células se realizó en los medios condicionados obtenidos de las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio. Se demostró un cambio diferencial de perfil de liberación de biomoléculas asociado al envejecimiento en la expresión de marcadores asociados a procesos celulares como la proliferación y estadios de troncalidad, al igual que comportamientos heterogéneos en las curvas de crecimiento junto con los tiempos de duplicación.

Para la selección de los individuos participantes en este estudio, los sujetos con edades inferiores a la tercera década de vida fueron descartados. Esto es debido a que no presentan una maduración integrativa, es decir a nivel social, cognitiva y metabólica [143-145]. Se defiende la idea que esta maduración integral se alcanza más allá de los treinta años. [145-148]. Asimismo, se apunta que a partir de la quinta década de vida se inicia con el declive cognitivo y metabólico. La participación de cada voluntario se inició con la firma del consentimiento informado y, posteriormente, a cada participante se le realizó una historia clínica. Los resultados de dichas historias mostraron que todos los sujetos seleccionados eran clínicamente sanos, es decir, que no presentan ningún tipo de enfermedades crónica-degenerativa o bien psiquiátrica. Algo a destacar es que el aislamiento y manejo de células provenientes de sujetos mayores a la quinta década de vida resulta en un abordaje técnico más complejo, esto es debido a las múltiples patologías y/o comorbilidades que pudieran asociarse en los donantes. De acuerdo con el último censo publicado por el INEGI en 2023 las principales afecciones en población de 50 años o más son hipertensión, diabetes, enfermedades cardiovasculares y degenerativas. Una vez obtenidas las historias clínicas se procedió a realizar el exfoliado nasal de los participantes. En este sentido, de los múltiples sujetos masculinos a los que se les tomó muestra de OE, únicamente 1 de cada 5 se consiguió aislar y expandir, mientras que sujetos femeninos fueron 4 de cada 5. Es decir, como se refleja en la Figura 14, la mayoría de las hNS/PCs-OE provienen de sujetos femeninos. Por otro lado, si bien la toma de muestra tiene variables metodológicas (como profundidad, movimiento y procesamiento), se procuró realizar el raspado en la zona posteriodorsal dentro de la cavidad nasal de todos los sujetos analizados [149]. Al respecto, evidencia indica una relación del dimorfismo sexual y la capacidad olfatoria, es decir, diversos estudios apuntan que el sexo femenino presenta un olfato más sensible, destacando una mejor discriminación, detección e identificación de odorantes en comparación con el sexo masculino [150-152]. Se ha descrito que este dimorfismo presenta una base celular, demostrándose un incremento del 40% tanto en células neuronales, así como en no neuronales en mujeres respecto a hombres en las regiones olfatorias del sistema nervioso como es el bulbo olfatorio [150].

Por otro lado, al tener una mayor cantidad de células accesibles, las posibilidades de aislar y lograr con éxito un cultivo primario de las hNS/PCs-OE resulta altamente probables en mujeres respecto a hombres. Con esto en mente, otros trabajos previos han mostrado el aislamiento de hNS/PCs-OE a partir de biopsias, lo que resulta altamente invasivo para los donantes [91, 153], en este trabajo se buscó establecer la obtención y aislamiento de este subtipo celular sin provocar incomodidad, dolor ni molestias severas a los donantes, es decir, una toma de muestra poco invasiva a través de un exfoliado nasal. Para confirmar si se sufrieron molestias a cada donante se pidió su opinión respecto al procedimiento. La gran

mayoría comentó que sintió un ligero cosquilleo en la parte posterior de la nariz, así como ganas de estornudar al final del procedimiento, además de que, de los ocho donantes, ninguno reportó ardor, dolor, sangrado o anosmia posterior al procedimiento, todos siguieron con sus actividades cotidianas sin molestia.

Con las células aisladas se realizó una primera caracterización bajo las condiciones de crecimiento con medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (DMEM-F12 + SFB), ya que resulta ser el medio adecuado, de acuerdo con lo reportado en otros trabajos, para el cultivo de células derivadas del epitelio olfatorio [4, 92, 154]. Sin embargo, también se realizó una caracterización bajo condiciones de sustitución del suero fetal bovino y un medio de cultivo químicamente definido [155]. El medio de cultivo utilizado fue medio Neurobasal suplementado con B27, además de la adición de factores de crecimiento como EGF y bFGF. Este tipo de medios definidos son implementados para mantener condiciones particulares; principalmente su uso destaca para modelos de células troncales neuronales pues permite mantener condiciones específicas de crecimiento, así como mantenimiento de la troncalidad y proliferación [114, 141]. Este cambio en las condiciones de crecimiento tuvo como objetivo poder estudiar la proteómica asociada al secretoma de las hNS/PCs-OE ya que el SFB tiene diversos factores que pudieran enmascarar aquellas biomoléculas presentes en el secretoma, además de múltiples factores no caracterizados. En este sentido, diversos trabajos donde se realizan estudios proteómicos ya sea en diferentes condiciones y modelos celulares neuronales y no neuronales apuntan a que se requiere esta sustitución respecto al uso de SFB para el estudio del secretoma tanto para caracterización como para ensayos funcionales en condiciones de cultivo definidas [123, 132, 135, 156]. De acuerdo con las condiciones de crecimiento ya reportadas, en este trabajo se comprobó que el cultivo de las hNS/PCs-OE en medio DMEM-F12 + SFB, permite la expresión positiva o negativa de diversos marcadores asociados a troncalidad, de proliferación y compromiso celular; siendo Nestina junto con Sox2, Ki67, PCNA, GFAP,  $\beta$ -III tubulina y OMP los marcadores analizados. Algunos de estos marcadores están asociados a características de células troncales y de proliferación, tales como Nestina, Sox2 y Ki67, cuya expresión se ha reportado en cultivos primarios de NSC derivadas embriones o bien de iPSCs humanas, al igual que en otros trabajos de investigación donde se implementaron modelos similares de estudio, un ejemplo de ello involucra el uso de biopsias de la mucosa olfatoria o exfoliados del OE humano de los cuales se han aislado las hNS/PCs-OE, células de estirpe neural cuya nomenclatura difiere de acuerdo con el autor [4, 13, 141, 157, 158] y cuya expresión de estos tres marcadores se muestra en las Figuras 16, 17 y 19. Por otro lado, en nuestro modelo, de acuerdo al análisis realizado, el cambio a medio de cultivo Neurobasal + B27 también permite la expresión de estos marcadores; sin embargo, existe una tendencia a disminuir la expresión de Sox2 y PCNA. Junto con otros marcadores de troncalidad y proliferación, se ha determinado la alteración en la expresión asociada a la edad [2, 92, 99, 100, 159]. Con todo lo anterior se menciona cómo el cambio de medio también influye en la expresión de estos marcadores: troncalidad y proliferación. Sin embargo, también se discute la heterogeneidad intrínseca de las poblaciones celulares obtenidas a partir del exfoliado nasal. Dentro del OE hay un compendio de múltiples subtipos celulares, que si bien, gran parte de estas subpoblaciones son estirpe troncal/progenitor hay una diferencia en las dinámicas celulares asociadas a su ciclo celular, proliferación o bien procesos de maduración

[91]. A pesar de lo anterior, la caracterización inmunofenotípica bajo esta condición, es decir un medio de crecimiento libre de suero muestra que las hNS/PCs-OE no pierden completamente la troncalidad ni proliferación además de mantener el compromiso neuronal como se muestra en las Figuras 16 a la 20.

Dentro de la mucosa olfatoria murina, las NS/PCs-OE presentan diferencias morfológicas entre cada subtipo celular dentro del tipo troncal o precursora neuronal [3, 86], algo que en humanos no se presenta y que se manifiesta en cultivos primarios de las hNS/PCs-OE obtenidos ya sea mediante biopsia o mediante raspado, ya que no se muestran diferencias morfológicas entre células troncales y precursoras [92, 157, 160]. Las diferencias se manifiestan en las dinámicas funcionales de proliferación, tiempos de duplicación o marcadores específicos de dichas células. Con todo lo anterior es que entonces se valida la obtención, posterior cultivo y uso de las hNS/PCs-OE como modelo de troncalidad neural. Respecto a los cambios en el modelo asociados a la edad, de primera instancia las hNS/PCs-OE no presentan un cambio morfológico, sin embargo, si presentan un cambio a partir de las condiciones de crecimiento, principalmente en respuesta a la sustitución de SFB, como se muestra en la Figura 15. En las imágenes de campo claro, en la condición de crecimiento DMEM-F12 + SFB, las células muestran citoplasmas, proyecciones y somas ensanchados y extendidos, así como una organización homogénea que con el paso del tiempo cubre todos los espacios dentro de las botellas de crecimiento [4, 13, 160]. Mientras que en la condición de crecimiento Neurobasal + B27, el cambio no produce muerte celular, si bien el retirar suero del medio de cultivo representa un estímulo estresor, éste no es tan fuerte como para comprometer la viabilidad las células [161]. A nivel morfológico se sugiere un reacomodo en el citoesqueleto ya que la conformación de los somas y proyecciones se vuelven alargadas, lo cual tiene un impacto en la organización dentro de las botellas de cultivo, dando una distribución heterogénea, es decir dejando espacios sin poblar, así como patrones de distribución. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal muestran la expresión, en ambos grupos de edad, de las proteínas asociadas al citoesqueleto como Nestina y  $\beta$ -III tubulina en donde se aprecia el fenómeno de compactación y alargamiento del soma, así como de las proyecciones.

Existe evidencia previa de que la proliferación celular decrece con la edad, es decir, células obtenidas de donantes de mayor edad son menos proliferativas de aquellas células provenientes de sujetos jóvenes respecto a las SC [123, 134]. Sin embargo, con los datos obtenidos mediante el ensayo de tiempos de duplicación vemos como en la condición DMEM-F12 + SFB no existe una diferencia significativa entre ambos grupos, pero si hay una tendencia a este cambio teniendo una disminución en los tiempos de duplicación en el GA vs el GJ y una mayor cantidad de hNS/PCs-OE obtenidas en el GJ respecto al GA al término del ensayo (Figuras 21 a la 23), es decir, que los donantes de menor edad proliferan más rápido que aquellos de mayor edad. Se ha reportado que el uso del medio de cultivo DMEM-F12 + SFB favorece condiciones adecuadas para el mantenimiento y proliferación (cantidad y tiempos) en subtipos celulares troncales [162], sin embargo, de acuerdo con lo observado en este trabajo, el cambio de medio utilizando Neurobasal + B27 cambia estas condiciones basales. Por un lado, en ambos grupos los tiempos de duplicación decrecen, sin

embargo, la cantidad de células obtenidas al finalizar del ensayo resultan diferentes entre cada grupo de edad. Se observa que las células provenientes del GJ cuando se cultivan con Neurobasal + B27 manifiestan un comportamiento mixto y heterogéneo entre los individuos, mostrando variaciones en tiempos y cantidades de células, por ejemplo, aquellos individuos de mayor edad dentro del GJ (SF-35 y SF-34) son favorecidos por este cambio, ya que, al igual que sus compañeros de grupo, disminuyeron su tiempo de duplicación, pero aumentaron la cantidad de células aproximadamente a los dos millones. Por el contrario, en el GA se presenta un fenómeno armónico y homogéneo con todos los individuos que lo conforman, cuando se sustituye el SFB el tiempo de duplicación igualmente disminuye aumentando la cantidad de células; llegando casi al millón y medio en GA, aproximadamente un tercio más que la condición DMEM-F12 + SFB. La literatura menciona múltiples variables que influyen en la proliferación celular, por un lado, la edad del donante es una de las variables que más impacta en este proceso, sin embargo, existen otras como el pase y el medio en que se encuentran las células al realizar los experimentos [162]. En este trabajo la mayoría de los experimentos se hicieron entre los pases 3 y 7. Cabe mencionar que las hNS/PCs-OE provenientes del GJ se utilizaron pases entre 4 y 7 mientras que para el GA se usaron pases del 3 al 5. Inicialmente el aumento en los tiempos de duplicación podría deberse al pase en que las hNS/PCs-OE del GJ se encuentran; debido al proceso de envejecimiento y estrés al que son sometidas antes y durante la realización del experimento, mientras que, en las hNS/PCs-OE del GA, al estar en pases más tempranos, no tienen este estrés previamente inducido. Otra variable para considerar sería el estadio dentro del ciclo celular en que se encuentran las células o bien si entran a procesos de diferenciación. Se ha reportado una heterogeneidad en la actividad con respecto al ciclo celular en estas subpoblaciones celulares [91]. Los conteos celulares del marcador de proliferación Ki67<sup>+</sup> son congruentes en el GJ, esto es porque en la condición DMEM-F12 + SFB se mantiene un comportamiento creciente que es homogéneo entre los sujetos, por lo que el número total de Ki67<sup>+</sup> es alto, ya que están en constante proliferación. Algo que en la condición de Neurobasal + B27 en los tiempos iniciales parece estresar a las células lo que afectaría la viabilidad y proliferación [161]. Sin embargo, no a todos los sujetos afecta este cambio de medio, o bien, tiene una adaptación rápida al cambio, por lo que estas dinámicas de adaptación generan un número menor de Ki67<sup>+</sup> en todo el grupo. Con respecto al grupo adulto los conteos celulares de Ki67<sup>+</sup> en la condición con SFB es mayor que la condición de Neurobasal + B27. Pero de forma contrastante existe una diferencia respecto a la cantidad de células asociada al experimento de tiempos de duplicación en ambas condiciones. Como se mencionó anteriormente, procesos de diferenciación influirían en el ensayo, esto reflejaría una mayor cantidad de células en condición de Neurobasal + B27. Ya que a partir de las 60 horas (tiempo de duplicación medio) comienza a aumentar la pendiente de crecimiento. Es posible que antes de las 60 hrs la proliferación se encuentre alta y exacerbada y al cumplir ese tiempo las hNS/PCs-OE entrarían a procesos de diferenciación, lo que explicaría la cantidad mayor de células posiblemente de linaje comprometido y en proceso de maduración, en tiempos mayores a 60 hrs. Sería adecuado probar marcadores de compromiso celular como NeuN, MAP2, GFAP y OMP [91, 163, 164].

La idea de un abordaje proteómico para estudiar el secretoma consiste en caracterizar de forma clara y eficiente a las dinámicas propias de estas células, tales como la expresión y posterior liberación de las biomoléculas halladas en los CM de las hNS/PCs-OE, así como discutir la implicación que tienen en la comunicación paracrina intracelular. El uso de microarreglos de anticuerpos (membranas precargadas con diversos anticuerpos (507 para este caso) permite realizar un abordaje semicuantitativo en la abundancia de moléculas, posibles modificaciones estructurales, determinar las implicaciones funcionales que tuvieran dichas biomoléculas a partir de conocer la expresión de moléculas secundarias y también como método de caracterización [165]. Para estudiar el secretoma se requieren condiciones de crecimiento y modelos celulares particulares, tal y como se ha analizado en secretomas provenientes de ESC, SC o bien MSC [120, 126, 135] . En este trabajo se implementó un modelo del tipo troncal/progenitor como son las hNS/PCs-OE con una condición de crecimiento en medio químicamente definido a partir del medio Neurobasal + B27, enriquecido con dos factores de crecimiento que permiten mantener la troncalidad y proliferación. La elección de las membranas L507 fue gracias a su fácil manejo, reproducibilidad, así como detección a bajas concentraciones de proteínas (cercasas a los picogramos) [13, 141, 165]. Para garantizar la mayor calidad y cantidad posible de medio condicionado se utilizaron células entre los pases 3 al 5, junto con una confluencia del 70 % al 90 %, dejando pasar un total de 48 horas después de haber cambiado al medio libre de SFB. Ya que variables como el pase, la confluencia y el tiempo de crecimiento tienen un papel importante respecto a la producción y eficiencia del medio condicionado [123].

Es importante señalar que no todos los factores solubles encontrados pertenecen al secretoma de las hNS/PCs-OE, algunas de ellas se encuentran ya en los medios de cultivo utilizados. De las biomoléculas pertenecientes a los medios de cultivo identificadas en las membranas L507 se descartaron EGF, bFGF, Glipican-3, Endostatina, S100A10 y sFRP-a (indicadas en color rojo en las Figuras 26 y 28) ya que forman parte del suplemento B27, así como los factores de crecimiento previamente agregados [141].

Si bien el sexo, la raza y ocupación no son factores que influyan en el secretoma, la edad sí lo es [123]. Con los resultados obtenidos podemos denotar la existencia de un cambio en la expresión de estas proteínas en un grupo de edad respecto al otro (Tabla 2). Cabe señalar que las biomoléculas encontradas en el secretoma de las hNS/PCs-OE de ambos grupos de donantes coinciden con lo reportado previamente en la literatura, además de observar un cambio en la expresión de las distintas proteínas, esto es a partir de variaciones en la edad de los donantes como se reporta en dichos estudios previos del secretoma de células mesenquimales de sujetos menores a 20 años, así como de células del OE de un individuo de 40 años [135, 141], demostrando un cambio en la expresión asociado a la edad del donador.

Algunas de las biomoléculas encontradas en el presente trabajo dentro del secretoma de las hNS/PCs-OE de ambos grupos de edad son VEGF, IGFBP, TIMP-1, TIMP-2, OPG , Endocan (también llamada ESM1) IL6, I8 y GRO las cuales han sido reportadas previamente en múltiples artículos en donde se caracterizó el secretoma liberado por células troncales de estirpe neural, así como mesenquimal además de células diferenciadas a partir de NSC provenientes de distintas zonas anatómica, incluyendo tejido epitelial [135, 165-170]. Por

otro lado, existe una alta y compleja red de interacción entre las múltiples proteínas detectadas en el medio condicionado de las hNS/PCs-OE (Figura 32). Esta interacción permitiría regular la actividad biológica de dichas proteínas, trabajos previos señalan como esta regulación es mediada a partir de la activación o inhibición que una biomolécula ejerce sobre otra. De forma general estas proteínas se encuentran involucradas en el mantenimiento y remodelación de la matriz extracelular, uniones célula-célula, mantenimiento y regulación de diversos factores tróficos y por último regulación de la respuesta inmune [171-173]. Sin embargo, de forma particular, algunas de estas proteínas tienen roles importantes en procesos como angiogénesis y neurogénesis, ya sea proliferación, diferenciación y migración. Biomoléculas como la trombospodina 1, TIMP-1, TIMP-2 junto con las MMP se encuentran involucradas en la migración glial y neuronal a través de la RMS durante el desarrollo embrionario, así como en la sinaptogénesis y plasticidad sináptica [173-175]. Mientras que moléculas como Endocan y VEGF favorecen la angiogénesis, y LTBP1 junto con Activina A favorece la proliferación de precursores neuronales [176]. Por el contrario, IL-6 tiende a favorecer la diferenciación hacia fenotipos gliales [141, 176, 177]. Estas moléculas implicadas en dichos procesos se encuentran mayormente expresadas en el secretoma asociado al grupo joven (Tabla 2).

Además del secretoma y la proliferación, también procesos metabólicos, el potencial de diferencial así mismo el aumento en especies reactivas de oxígeno y el aumento en el estrés oxidativo junto con la senescencia celular son alteraciones ocurridas durante el envejecimiento [137]. En este sentido, diversos trabajos señalan que el enfoque terapéutico dado por el secretoma proveniente de donadores jóvenes permite restablecer muchas de estas funciones celulares. Cabe destacar que estos abordajes se realizaron a partir de diversos modelos, tanto murinos como humanos y que mediante estos efectos paracrinos se determinó, por ejemplo, la mejoría en el potencial de diferenciación, así como una disminución del estrés oxidativo en células mesenquimales humana de donadores envejecidos [6], restableciendo la oligodendrogénesis junto con la consolidación de la memoria en modelos murinos de envejecimiento [140]. Como se abordó en el marco teórico, diversas enfermedades neurodegenerativas son tratadas con terapias novedosas, tal es el caso del potencial uso del secretoma (CM). En diversos artículos no se toma en cuenta la edad de los donantes para la obtención del secretoma, observándose efectos discretos en la recuperación terapéutica. Sin embargo, con lo expuesto en este trabajo, se puede afirmar que la edad es una variable de alta importancia para la obtención de un medio condicionado, y si bien la presencia de factores tróficos se mantiene, es la expresión lo que hace este cambio en la calidad del secretoma y de esta manera se podría mejorar el enfoque terapéutico que se quiere dar. Si bien una terapia celular dada a partir de un CM obtenido de hNS/PCs-OE del grupo adulto, no sería, ni tampoco favorecería a procesos patológicos, únicamente tendría efectos terapéuticos discretos en comparación con un medio derivado de hNS/PCs-OE jóvenes, además de que las implicaciones celulares que tendría un CM derivado de esta población de edad son heterogéneas, ya que depende de otras variables como la subpoblación celular objetivo, así como la condición existente. En células troncales, precursores o progenitoras favorecería la

proliferación, así como favorecería el restablecimiento del potencial de diferenciación, mientras que, en células diferenciadas, induciría la migración, neovascularización, maduración e integración a circuitos celulares, así como su supervivencia. Para el caso de modelos neuronales, el CM obtenido de hNS/PCs-OE joven mostraría su efecto sobre la remodelación de la matriz extracelular, permitiendo un aumento en la migración celular, así como el establecimiento de nuevas conexiones sinápticas y su posterior maduración para una funcionalidad correcta.

## **11.0. Conclusión**

Las células hNS/PCs-OE son un modelo de estirpe neural de fácil aislamiento y bajo costo en mantenimiento que permite estudiar las dinámicas poblacionales de las células troncales y progenitoras. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la edad es un variable de alta importancia para la obtención de estos cultivos primarios, ya que existen cambios en múltiples dinámicas celulares que están asociados al envejecimiento se destaca principalmente el mantenimiento de la troncalidad en células troncales/precursoras, también la proliferación, el compromiso y maduración celular. Mientras que, los estudios proteómicos cuya base principal es el uso membranas precargadas de múltiples baterías de anticuerpos permiten un abordaje semicuantitativo, confiable y reproducible para detectar las múltiples biomoléculas liberadas por diversos subtipos celulares. Con esto en mente la composición del secretoma se mantiene en las hNS/PCs-OE en los distintos grupos de edad estudiados, sin embargo, es la expresión de estos factores lo que muestra un cambio significativo durante el envejecimiento, disminuyendo aquellas biomoléculas participantes en procesos metabólicos, de migración, proliferativos, angiogénicos y en la remodelación de la matriz extracelular celular. Hasta el momento no se tiene conocimiento de un trabajo previo donde se caracterice el cambio de expresión asociado al envejecimiento que presenta el secretoma de un modelo celular de estirpe neuronal humano.

## **12.0. Perspectivas**

Si bien en este trabajo se caracterizó de forma general la presencia de las biomoléculas encontradas en el secretoma perteneciente a dos grupos de edad. Se requiere centrar un análisis particular en el grupo más joven y determinar la expresión de aquellos factores asociados a los procesos celulares descritos, así como aquellos factores que también tuviera una implicación terapéutica. La principal perspectiva es el uso de este medio condicionado para estudiar el proceso neurogénico en condiciones clínicamente sanas y posteriormente el efecto terapéutico durante la neurodegeneración. Por lo que se realizarían ensayos de viabilidad implementando medio condicionado como medio de crecimiento en un modelo neuronal (humano de células reprogramadas y diferenciadas hacia precursores neurales) y con ello estudiar el proceso neurogénico clínicamente sano, seguido de estudiarlo durante la neurodegeneración para ello, de igual forma, se sugiere realizar ensayos de viabilidad celular utilizando tanto medio condicionado como medio de crecimiento.

### 13.0. Referencias

1. Mackay-Sim, A., et al., *Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial*. Brain, 2008. **131**(Pt 9): p. 2376-86.
2. Sokpor, G., et al., *Transcriptional and Epigenetic Control of Mammalian Olfactory Epithelium Development*. Mol Neurobiol, 2018. **55**(11): p. 8306-8327.
3. Graziadei, G.A. and P.P. Graziadei, *Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy*. J Neurocytol, 1979. **8**(2): p. 197-213.
4. Benitez-King, G., et al., *A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases*. J Neurosci Methods, 2011. **201**(1): p. 35-45.
5. Riquelme, P.A., E. Drapeau, and F. Doetsch, *Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008. **363**(1489): p. 123-37.
6. Das, M., et al., *Secretome of Young Mesenchymal Stromal Cells Rejuvenates Aged Mesenchymal Stromal Cells by Normalizing Their Phenotype and Restoring Their Differentiation Profile*. Stem Cells Dev, 2023. **32**(1-2): p. 12-24.
7. Fitz, N.F., et al., *Extracellular Vesicles in Young Serum Contribute to the Restoration of Age-Related Brain Transcriptomes and Cognition in Old Mice*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(16).
8. Kimbrel, E.A. and R. Lanza, *Next-generation stem cells - ushering in a new era of cell-based therapies*. Nat Rev Drug Discov, 2020. **19**(7): p. 463-479.
9. Cofano, F., et al., *Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(11).
10. Feron, F., et al., *Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury*. Brain, 2005. **128**(Pt 12): p. 2951-60.
11. Drapeau, E. and D. Nora Abrous, *Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders*. Aging Cell, 2008. **7**(4): p. 569-89.
12. Lie, D.C., et al., *Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004. **44**: p. 399-421.
13. Laura, G.V., *Identificación de las proteínas secretadas por las células troncales/progenitoras del epitelio olfatorio humano y la evaluación de su efecto en el proceso neurogénico de las células precursoras de hipocampo adulto* in BIOMEDICINA MOLECULAR 2017, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL CINVESTAV. p. 123.
14. Suh, H., W. Deng, and F.H. Gage, *Signaling in adult neurogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. **25**: p. 253-75.
15. Bottes, S., et al., *Long-term self-renewing stem cells in the adult mouse hippocampus identified by intravital imaging*. Nat Neurosci, 2021. **24**(2): p. 225-233.
16. Wu, Y., et al., *Long-term self-renewal of naive neural stem cells in a defined condition*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019. **1866**(6): p. 971-977.
17. Oudega, M. and E. Marani, *Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in the developing rat spinal cord: an immunocytochemical study of the spinal cord glial system*. J Anat, 1991. **179**: p. 97-114.
18. Luo, H., et al., *Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in central nervous system development of rats*. Asian Pac J Trop Med, 2017. **10**(12): p. 1185-1189.
19. Doetsch, F., et al., *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. Cell, 1999. **97**(6): p. 703-16.

20. van Praag, H., et al., *Functional neurogenesis in the adult hippocampus*. Nature, 2002. **415**(6875): p. 1030-4.
21. Alvarez-Buylla, A. and J.M. Garcia-Verdugo, *Neurogenesis in adult subventricular zone*. J Neurosci, 2002. **22**(3): p. 629-34.
22. Kempermann, G. and F.H. Gage, *Neurogenesis in the adult hippocampus*. Novartis Found Symp, 2000. **231**: p. 220-35; discussion 235-41, 302-6.
23. Moreno-Jimenez, E.P., et al., *Evidences for Adult Hippocampal Neurogenesis in Humans*. J Neurosci, 2021. **41**(12): p. 2541-2553.
24. Moreno-Jimenez, E.P., et al., *Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease*. Nat Med, 2019. **25**(4): p. 554-560.
25. Miyashita, Y., *Operating principles of the cerebral cortex as a six-layered network in primates: beyond the classic canonical circuit model*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2022. **98**(3): p. 93-111.
26. Garcia, A.D., et al., *GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain*. Nat Neurosci, 2004. **7**(11): p. 1233-41.
27. Seri, B., et al., *Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus*. J Comp Neurol, 2004. **478**(4): p. 359-78.
28. Stanfield, B.B. and J.E. Trice, *Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections*. Exp Brain Res, 1988. **72**(2): p. 399-406.
29. Cope, E.C. and E. Gould, *Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix*. Cell Stem Cell, 2019. **24**(5): p. 690-705.
30. Bordey, A., *Adult neurogenesis: basic concepts of signaling*. Cell Cycle, 2006. **5**(7): p. 722-8.
31. Mercier, F., J.T. Kitasako, and G.I. Hatton, *Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network*. J Comp Neurol, 2002. **451**(2): p. 170-88.
32. Gates, M.A., et al., *Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres*. J Comp Neurol, 1995. **361**(2): p. 249-66.
33. Karumbaiah, L., et al., *Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan Hydrogels Create Endogenous Niches for Neural Stem Cells*. Bioconjug Chem, 2015. **26**(12): p. 2336-49.
34. Sirko, S., et al., *Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells*. Development, 2007. **134**(15): p. 2727-38.
35. Hack, I., et al., *Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis*. Nat Neurosci, 2002. **5**(10): p. 939-45.
36. Won, S.J., et al., *Reelin-deficient mice show impaired neurogenesis and increased stroke size*. Exp Neurol, 2006. **198**(1): p. 250-9.
37. Wojcik-Stanaszek, L., et al., *The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22465.
38. Verslegers, M., et al., *Identification of MMP-2 as a novel enhancer of cerebellar granule cell proliferation*. Mol Cell Neurosci, 2013. **57**: p. 63-72.
39. Sirbulescu, R.F., I. Ilies, and G.K. Zupanc, *Matrix metalloproteinase-2 and -9 in the cerebellum of teleost fish: Functional implications for adult neurogenesis*. Mol Cell Neurosci, 2015. **68**: p. 9-23.
40. Zhou, B., Y.X. Zuo, and R.T. Jiang, *Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases*. CNS Neurosci Ther, 2019. **25**(6): p. 665-673.
41. Pixley, S.K., *CNS glial cells support in vitro survival, division, and differentiation of dissociated olfactory neuronal progenitor cells*. Neuron, 1992. **8**(6): p. 1191-204.

42. Klapper, S.D., et al., *Astrocyte lineage cells are essential for functional neuronal differentiation and synapse maturation in human iPSC-derived neural networks*. *Glia*, 2019. **67**(10): p. 1893-1909.
43. Del Bigio, M.R., *Ependymal cells: biology and pathology*. *Acta Neuropathol*, 2010. **119**(1): p. 55-73.
44. Palmer, T.D., A.R. Willhoite, and F.H. Gage, *Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis*. *J Comp Neurol*, 2000. **425**(4): p. 479-94.
45. Shen, Q., et al., *Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells*. *Science*, 2004. **304**(5675): p. 1338-40.
46. Wurmser, A.E., T.D. Palmer, and F.H. Gage, *Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche*. *Science*, 2004. **304**(5675): p. 1253-5.
47. Leventhal, C., et al., *Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma*. *Mol Cell Neurosci*, 1999. **13**(6): p. 450-64.
48. Jin, K., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(18): p. 11946-50.
49. Cardenas-Aguayo Mdel, C., et al., *Neurogenic and neurotrophic effects of BDNF peptides in mouse hippocampal primary neuronal cell cultures*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53596.
50. Brion, C., S.G. Miller, and H.P. Moore, *Regulated and constitutive secretion. Differential effects of protein synthesis arrest on transport of glycosaminoglycan chains to the two secretory pathways*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(3): p. 1477-83.
51. Owens, D.F. and A.R. Kriegstein, *Is there more to GABA than synaptic inhibition?* *Nat Rev Neurosci*, 2002. **3**(9): p. 715-27.
52. LoTurco, J.J., et al., *GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis*. *Neuron*, 1995. **15**(6): p. 1287-98.
53. Tozuka, Y., et al., *GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells*. *Neuron*, 2005. **47**(6): p. 803-15.
54. Ge, S., et al., *GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain*. *Nature*, 2006. **439**(7076): p. 589-93.
55. Liu, X., et al., *Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors*. *Nat Neurosci*, 2005. **8**(9): p. 1179-87.
56. Bolteus, A.J. and A. Bordey, *GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone*. *J Neurosci*, 2004. **24**(35): p. 7623-31.
57. Nacher, J., et al., *N-methyl-D-aspartate receptor expression during adult neurogenesis in the rat dentate gyrus*. *Neuroscience*, 2007. **144**(3): p. 855-64.
58. Bernabeu, R. and F.R. Sharp, *NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000. **20**(12): p. 1669-80.
59. Kitayama, T., et al., *Regulation of neuronal differentiation by N-methyl-D-aspartate receptors expressed in neural progenitor cells isolated from adult mouse hippocampus*. *J Neurosci Res*, 2004. **76**(5): p. 599-612.
60. Brezun, J.M. and A. Daszuta, *Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats*. *Neuroscience*, 1999. **89**(4): p. 999-1002.
61. Brezun, J.M. and A. Daszuta, *Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons*. *Eur J Neurosci*, 2000. **12**(1): p. 391-6.
62. Pigué, P. and M. Galvan, *Transient and long-lasting actions of 5-HT on rat dentate gyrus neurones in vitro*. *J Physiol*, 1994. **481 ( Pt 3)**(Pt 3): p. 629-39.

63. Takamura, N., et al., *The effect of dopamine on adult hippocampal neurogenesis*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2014. **50**: p. 116-24.
64. Gepshtein, S., et al., *Dopamine function and the efficiency of human movement*. J Cogn Neurosci, 2014. **26**(3): p. 645-57.
65. Hoglinger, G.U., et al., *Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease*. Nat Neurosci, 2004. **7**(7): p. 726-35.
66. Gasbarri, A., A. Sulli, and M.G. Packard, *The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 1997. **21**(1): p. 1-22.
67. Borta, A. and G.U. Hoglinger, *Dopamine and adult neurogenesis*. J Neurochem, 2007. **100**(3): p. 587-95.
68. Vilar, M. and H. Mira, *Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles*. Front Neurosci, 2016. **10**: p. 26.
69. Snappyan, M., et al., *Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling*. J Neurosci, 2009. **29**(13): p. 4172-88.
70. Waterhouse, E.G., et al., *BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission*. J Neurosci, 2012. **32**(41): p. 14318-30.
71. Palmer, T.D., J. Ray, and F.H. Gage, *FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain*. Mol Cell Neurosci, 1995. **6**(5): p. 474-86.
72. Kuhn, H.G., et al., *Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain*. J Neurosci, 1997. **17**(15): p. 5820-9.
73. Craig, C.G., et al., *In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain*. J Neurosci, 1996. **16**(8): p. 2649-58.
74. Gronska-Peski, M., J.T. Goncalves, and J.M. Hebert, *Enriched Environment Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis through FGFRs*. J Neurosci, 2021. **41**(13): p. 2899-2910.
75. Justiz Vaillant, A.A. and A. Qurie, *Interleukin*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
76. Nakanishi, M., et al., *Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(3): p. 649-58.
77. Bowen, K.K., R.J. Dempsey, and R. Vemuganti, *Adult interleukin-6 knockout mice show compromised neurogenesis*. Neuroreport, 2011. **22**(3): p. 126-30.
78. Perez-Asensio, F.J., et al., *Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 18): p. 4208-19.
79. Nakashima, K., et al., *Astrocyte differentiation mediated by LIF in cooperation with BMP2*. FEBS Lett, 1999. **457**(1): p. 43-6.
80. Lim, D.A., et al., *Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis*. Neuron, 2000. **28**(3): p. 713-26.
81. Bonaguidi, M.A., et al., *Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus*. J Neurosci, 2008. **28**(37): p. 9194-204.
82. Gaiano, N. and G. Fishell, *The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates*. Annu Rev Neurosci, 2002. **25**: p. 471-90.
83. Conover, J.C., et al., *Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone*. Nat Neurosci, 2000. **3**(11): p. 1091-7.
84. Ricard, J., et al., *EphrinB3 regulates cell proliferation and survival in adult neurogenesis*. Mol Cell Neurosci, 2006. **31**(4): p. 713-22.

85. Holmberg, J., et al., *Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis*. Genes Dev, 2005. **19**(4): p. 462-71.
86. Graziadei, P.P. and G.A. Graziadei, *Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons*. J Neurocytol, 1979. **8**(1): p. 1-18.
87. Chen, C.R., et al., *Anatomy and cellular constituents of the human olfactory mucosa: a review*. J Neurol Surg B Skull Base, 2014. **75**(5): p. 293-300.
88. Salazar, I., et al., *Anatomy of the olfactory mucosa*. Handb Clin Neurol, 2019. **164**: p. 47-65.
89. Cervený, K., et al., *Olfactory Evaluation in Clinical Medical Practice*. J Clin Med, 2022. **11**(22).
90. Escada, P.A., C. Lima, and J.M. da Silva, *The human olfactory mucosa*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2009. **266**(11): p. 1675-80.
91. Lampinen, R., et al., *Single-Cell RNA-Seq Analysis of Olfactory Mucosal Cells of Alzheimer's Disease Patients*. Cells, 2022. **11**(4).
92. Hahn, C.G., et al., *In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium*. J Comp Neurol, 2005. **483**(2): p. 154-63.
93. Weng, P.L., M. Vinjamuri, and C.E. Ovitt, *Ascl3 transcription factor marks a distinct progenitor lineage for non-neuronal support cells in the olfactory epithelium*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38199.
94. Hansel, D.E., B.A. Eipper, and G.V. Ronnett, *Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 940-4.
95. Doyle, K.L., et al., *Y1 receptors are critical for the proliferation of adult mouse precursor cells in the olfactory neuroepithelium*. J Neurochem, 2008. **105**(3): p. 641-52.
96. Weiler, E. and A. Benali, *Olfactory epithelia differentially express neuronal markers*. J Neurocytol, 2005. **34**(3-5): p. 217-40.
97. Brann, J.H. and S.J. Firestein, *A lifetime of neurogenesis in the olfactory system*. Front Neurosci, 2014. **8**: p. 182.
98. Gomez-Virgilio, L., et al., *Analyzing Olfactory Neuron Precursors Non-Invasively Isolated through NADH FLIM as a Potential Tool to Study Oxidative Stress in Alzheimer's Disease*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(12).
99. Loo, A.T., et al., *The aging olfactory epithelium: neurogenesis, response to damage, and odorant-induced activity*. Int J Dev Neurosci, 1996. **14**(7-8): p. 881-900.
100. Nakamura, H., et al., *Age-related changes in dividing cells of the olfactory epithelium of the maturing guinea pig*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 1998. **255**(6): p. 289-92.
101. Wolozin, B., et al., *Continuous culture of neuronal cells from adult human olfactory epithelium*. J Mol Neurosci, 1992. **3**(3): p. 137-46.
102. Bear, M.F.a., *Neuroscience : exploring the brain*. 2016: Fourth edition. Philadelphia : Wolters Kluwer, [2016] ©2016.
103. Fairbairn, N.G., et al., *Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion*. World J Stem Cells, 2015. **7**(1): p. 11-26.
104. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
105. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
106. Yamanaka, S., *Induced pluripotent stem cells: past, present, and future*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(6): p. 678-684.
107. Kwon, J., et al., *Neuronal Differentiation of a Human Induced Pluripotent Stem Cell Line (FS-1) Derived from Newborn Foreskin Fibroblasts*. Int J Stem Cells, 2012. **5**(2): p. 140-5.
108. Liu, S., et al., *Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(6).

109. Dasari, V.R., K.K. Veeravalli, and D.H. Dinh, *Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review*. World J Stem Cells, 2014. **6**(2): p. 120-33.
110. Merimi, M., et al., *The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine: Current Knowledge and Future Understandings*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 661532.
111. Xia, Y., et al., *Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injury: Mechanisms, current advances and future challenges*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1141601.
112. Sivandzade, F. and L. Cucullo, *Regenerative Stem Cell Therapy for Neurodegenerative Diseases: An Overview*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(4).
113. Palanisamy, C.P., et al., *New strategies of neurodegenerative disease treatment with extracellular vesicles (EVs) derived from mesenchymal stem cells (MSCs)*. Theranostics, 2023. **13**(12): p. 4138-4165.
114. Ford, E., et al., *Human Pluripotent Stem Cells-Based Therapies for Neurodegenerative Diseases: Current Status and Challenges*. Cells, 2020. **9**(11).
115. Kefalopoulou, Z., et al., *Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports*. JAMA Neurol, 2014. **71**(1): p. 83-7.
116. Moayeri, A., et al., *Transdifferentiation of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Dopaminergic Neurons in a Three-Dimensional Culture*. Basic Clin Neurosci, 2022. **13**(5): p. 625-636.
117. Hamedi, H., et al., *Intravenous Transplantation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promoted The Production of Dopaminergic Neurons and Improved Spatial Memory in A Rat Model of Parkinson's Disease*. Cell J, 2023. **25**(5): p. 317-326.
118. Venkataramana, N.K., et al., *Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease*. Transl Res, 2010. **155**(2): p. 62-70.
119. Muzes, G. and F. Sipos, *Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases*. Cells, 2022. **11**(15).
120. Ghasemi, M., et al., *Mesenchymal stromal cell-derived secretome-based therapy for neurodegenerative diseases: overview of clinical trials*. Stem Cell Res Ther, 2023. **14**(1): p. 122.
121. Wangler, S., et al., *Uncovering the secretome of mesenchymal stromal cells exposed to healthy, traumatic, and degenerative intervertebral discs: a proteomic analysis*. Stem Cell Res Ther, 2021. **12**(1): p. 11.
122. Vilaca-Faria, H., A.J. Salgado, and F.G. Teixeira, *Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes: A New Possible Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease?* Cells, 2019. **8**(2).
123. Chouaib, B., et al., *Towards the Standardization of Mesenchymal Stem Cell Secretome-Derived Product Manufacturing for Tissue Regeneration*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(16).
124. Teixeira, F.G., et al., *Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration?* Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(20): p. 3871-82.
125. Kan, I., et al., *Mesenchymal stem cells stimulate endogenous neurogenesis in the subventricular zone of adult mice*. Stem Cell Rev Rep, 2011. **7**(2): p. 404-12.
126. Teixeira, F.G., et al., *Secretome of mesenchymal progenitors from the umbilical cord acts as modulator of neural/glial proliferation and differentiation*. Stem Cell Rev Rep, 2015. **11**(2): p. 288-97.
127. Gnecci, M., et al., *Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells*. Nat Med, 2005. **11**(4): p. 367-8.
128. Pajer, K., T. Bellak, and A. Nogradi, *Stem Cell Secretome for Spinal Cord Repair: Is It More than Just a Random Baseline Set of Factors?* Cells, 2021. **10**(11).

129. Liau, L.L., et al., *Treatment of spinal cord injury with mesenchymal stem cells*. Cell Biosci, 2020. **10**: p. 112.
130. Tanna, T. and V. Sachan, *Mesenchymal stem cells: potential in treatment of neurodegenerative diseases*. Curr Stem Cell Res Ther, 2014. **9**(6): p. 513-21.
131. Cristiano, C., et al., *Neutralization of IL-17 rescues amyloid-beta-induced neuroinflammation and memory impairment*. Br J Pharmacol, 2019. **176**(18): p. 3544-3557.
132. Santamaria, G., et al., *Intranasal delivery of mesenchymal stem cell secretome repairs the brain of Alzheimer's mice*. Cell Death Differ, 2021. **28**(1): p. 203-218.
133. Baquet, Z.C., P.C. Bickford, and K.R. Jones, *Brain-derived neurotrophic factor is required for the establishment of the proper number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta*. J Neurosci, 2005. **25**(26): p. 6251-9.
134. Kretlow, J.D., et al., *Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells*. BMC Cell Biol, 2008. **9**: p. 60.
135. Park, C.W., et al., *Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array*. Int J Stem Cells, 2009. **2**(1): p. 59-68.
136. Davis, C., et al., *MicroRNA-183-5p Increases with Age in Bone-Derived Extracellular Vesicles, Suppresses Bone Marrow Stromal (Stem) Cell Proliferation, and Induces Stem Cell Senescence*. Tissue Eng Part A, 2017. **23**(21-22): p. 1231-1240.
137. Peffers, M.J., et al., *Age-related changes in mesenchymal stem cells identified using a multi-omics approach*. Eur Cell Mater, 2016. **31**: p. 136-59.
138. Zhang, Y., et al., *Age-Related Changes in the Inflammatory Status of Human Mesenchymal Stem Cells: Implications for Cell Therapy*. Stem Cell Reports, 2021. **16**(4): p. 694-707.
139. Sepulveda, J.C., et al., *Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model*. Stem Cells, 2014. **32**(7): p. 1865-77.
140. Iram, T., et al., *Young CSF restores oligodendrogenesis and memory in aged mice via Fgf17*. Nature, 2022. **605**(7910): p. 509-515.
141. Gomez-Virgilio, L., et al., *Soluble Factors from Human Olfactory Neural Stem/Progenitor Cells Influence the Fate Decisions of Hippocampal Neural Precursor Cells*. Mol Neurobiol, 2018. **55**(10): p. 8014-8037.
142. Mruk, D.D. and C.Y. Cheng, *Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits*. Spermatogenesis, 2011. **1**(2): p. 121-122.
143. Zhang, K., et al., *Metabolic diseases and healthy aging: identifying environmental and behavioral risk factors and promoting public health*. Front Public Health, 2023. **11**: p. 1253506.
144. Palmer, A.K. and M.D. Jensen, *Metabolic changes in aging humans: current evidence and therapeutic strategies*. J Clin Invest, 2022. **132**(16).
145. Schulenberg, J. and I. Schoon, *The Transition to Adulthood across Time and Space: Overview of Special Section*. Longit Life Course Stud, 2012. **3**(2): p. 164-172.
146. Johnson, S.B., R.W. Blum, and J.N. Giedd, *Adolescent maturity and the brain: the promise and pitfalls of neuroscience research in adolescent health policy*. J Adolesc Health, 2009. **45**(3): p. 216-21.
147. Luong, G., S.T. Charles, and K.L. Fingerman, *Better With Age: Social Relationships Across Adulthood*. J Soc Pers Relat, 2011. **28**(1): p. 9-23.
148. Zhaoyang, R., et al., *Age differences in adults' daily social interactions: An ecological momentary assessment study*. Psychol Aging, 2018. **33**(4): p. 607-618.

149. Feron, F., et al., *New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1998. **124**(8): p. 861-6.
150. Oliveira-Pinto, A.V., et al., *Sexual dimorphism in the human olfactory bulb: females have more neurons and glial cells than males*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111733.
151. Sorokowski, P., et al., *Sex Differences in Human Olfaction: A Meta-Analysis*. Front Psychol, 2019. **10**: p. 242.
152. Brand, G. and J.L. Millot, *Sex differences in human olfaction: between evidence and enigma*. Q J Exp Psychol B, 2001. **54**(3): p. 259-70.
153. Durante, M.A., et al., *Single-cell analysis of olfactory neurogenesis and differentiation in adult humans*. Nat Neurosci, 2020. **23**(3): p. 323-326.
154. Murrell, W., et al., *Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa*. Dev Dyn, 2005. **233**(2): p. 496-515.
155. Price, P. and G. Brewer, *Serum-Free Media for Neural Cell Cultures*. 2008. p. 255-264.
156. Lopez-Toledo, G., et al., *Patient-Derived Fibroblasts With Presenilin-1 Mutations, That Model Aspects of Alzheimer's Disease Pathology, Constitute a Potential Object for Early Diagnosis*. Front Aging Neurosci, 2022. **14**: p. 921573.
157. Jimenez-Vaca, A.L., et al., *Exfoliated Human Olfactory Neuroepithelium: A Source of Neural Progenitor Cells*. Mol Neurobiol, 2018. **55**(3): p. 2516-2523.
158. Duan, D. and M. Lu, *Olfactory mucosa: a rich source of cell therapy for central nervous system repair*. Rev Neurosci, 2015. **26**(3): p. 281-93.
159. Stevanovic, M., et al., *The Role of SOX Transcription Factors in Ageing and Age-Related Diseases*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(1).
160. Betsabe, F.E.I., *Efecto de la inhibición de la ADN metiltransferasa 1 en el proceso de diferenciación neuronal en células del epitelio olfatorio de ratón y humano*, in *Departamento de Farmacobiología*. 2017, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. p. 129.
161. Hogins, J., et al., *Excitotoxicity triggered by Neurobasal culture medium*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25633.
162. Yang, Y.K., et al., *Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro*. Stem Cell Res Ther, 2018. **9**(1): p. 131.
163. Roisen, F.J., et al., *Adult human olfactory stem cells*. Brain Res, 2001. **890**(1): p. 11-22.
164. Rochin-Hernandez, L.J., et al., *The Proteome Profile of Olfactory Ecto-Mesenchymal Stem Cells-Derived from Patients with Familial Alzheimer's Disease Reveals New Insights for AD Study*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(16).
165. Mustafa, S.A., J.D. Hoheisel, and M.S. Alhamdani, *Secretome profiling with antibody microarrays*. Mol Biosyst, 2011. **7**(6): p. 1795-801.
166. Dause, T.J., et al., *The neural stem cell secretome across neurodevelopment*. Exp Neurol, 2022. **355**: p. 114142.
167. Yin, L., et al., *Label-free separation of mesenchymal stem cell subpopulations with distinct differentiation potencies and paracrine effects*. Biomaterials, 2020. **240**: p. 119881.
168. Kim, W.K., et al., *Secretome analysis of human oligodendrocytes derived from neural stem cells*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e84292.
169. Sze, S.K., et al., *Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(10): p. 1680-9.
170. LAURA, G.V., *EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS FACTORES SECRETADOS POR LAS CÉLULAS PRECURSORAS, AISLADAS DEL HIPOCAMPO, SOBRE EL PROCESO NEUROGÉNICO DE LAS*

CELULAS PRECURSORAS OLFATORIAS HUMANAS, in DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

UNIDAD ZACATENCO. 2013, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL: CIUDAD DE MEXICO p. 74.

171. Isenberg, J.S. and D.D. Roberts, *THBS1 (thrombospondin-1)*. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, 2020. **24**(8): p. 291-299.
172. Bradshaw, A.D. and E.H. Sage, *SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury*. J Clin Invest, 2001. **107**(9): p. 1049-54.
173. Gardner, J. and A. Ghorpade, *Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMPed balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system*. J Neurosci Res, 2003. **74**(6): p. 801-6.
174. Agrawal, S.M., L. Lau, and V.W. Yong, *MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(1): p. 42-51.
175. Blake, S.M., et al., *Thrombospondin-1 binds to ApoER2 and VLDL receptor and functions in postnatal neuronal migration*. EMBO J, 2008. **27**(22): p. 3069-80.
176. Rodriguez-Martinez, G., A. Molina-Hernandez, and I. Velasco, *Activin A promotes neuronal differentiation of cerebrocortical neural progenitor cells*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43797.
177. Vila-Gonzalez, M., et al., *Enhanced Function of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells Through ESM1 Signaling*. Stem Cells, 2019. **37**(2): p. 226-239.

## **14.0. Anexos**

### **14.1. Congresos Nacionales e Internacionales donde se presentaron los resultados derivados de esta Tesis.**

#### **Congresos Internacionales**

- Silva-Lucero Maria del Carmen, Gómez-Virgilio Laura, Gutiérrez-Malacara Andrés Ivan, Lora Marín Obed Ricardo, Cardenas-Aguayo María del Carmen. Validation of neurodegeneration biomarkers in olfactory neuroepithelial cells from Mexican patients with Mild Cognitive Impairment, selected by bioinformatic analysis. Society for Neuroscience (SFN), Congreso presencial y virtual noviembre 11-15 de 2023, Washington D.C., E.U.A.

- Lora-Marín, Obed; Gómez-Virgilio, Laura, Silva-Lucero, María del Carmen; Cárdenas-Aguayo, María del Carmen. Analysis of Secreted Profiles in Olfactory Epithelium Neuronal Progenitors Across Two Age Groups. Society for Neuroscience (SFN), Congreso presencial y virtual noviembre 11-15 de 2023, Washington D.C., E.U.A.

- Silva-Lucero Maria del Carmen, Gómez-Virgilio Laura, Gutiérrez-Malacara Andrés Ivan, Lora Marín Obed Ricardo, Cardenas-Aguayo María del Carmen. Validation of neurodegeneration biomarkers in olfactory neuroepithelial cells from Mexican patients with Mild Cognitive Impairment, selected by bioinformatic analysis. Society for Neuroscience (SFN), Congreso presencial y virtual noviembre 11-15 de 2023, Washington D.C., E.U.A.

- Lora-Marín, Obed; Gómez-Virgilio, Laura, Silva-Lucero, María del Carmen; Cárdenas-Aguayo, María del Carmen. Analysis of Secreted Profiles in Olfactory Epithelium Neuronal Progenitors Across Two Age Groups. Society for Neuroscience (SFN), Congreso presencial y virtual noviembre 11-15 de 2023, Washington D.C., E.U.A.

#### **Congresos Nacionales**

-Gutiérrez Malacara Andrés Iván, Gómez Virgilio Laura, Silva Lucero María del Carmen, Lora Marín Obed Ricardo, Cárdenas Aguayo María del Carmen. El déficit olfatorio y su relación con la Enfermedad de Alzheimer y la Diabetes Mellitus tipo 2. Laboratorio de Reprogramación Celular y Enfermedades Crónico-Degenerativas, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. 2º Coloquio de Investigación, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. 1º de Junio de 2023.

-Lora-Marín, Obed; Gómez-Virgilio, Laura, Silva-Lucero, María del Carmen; Cárdenas-Aguayo, María del Carmen. Caracterización de los perfiles de liberación de factores solubles secretados por los progenitores neuronales del epitelio olfatorio obtenidos a partir de sujetos pertenecientes a dos grupos de edad. Laboratorio de Reprogramación Celular y Enfermedades Crónico-Degenerativas, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. 2º Coloquio de Investigación, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. 1º de Junio de 2023.

## 15.0. Agradecimientos extendidos

Después de esta aventura de dos años lo logramos. Somos todos unos *audaces*. Cada *audaz* escrito aquí significa demasiado en mi vida que un par de letras no cubren lo que siento por cada persona.

No tengo palabras para describir la gratitud hacia mis abuelos, a mi papá Lalo, y mi mamá Susana, mis hermanos María, Abraham y Daniel, a mis tías Yola y Sonia. A cada uno de mis primos. Han sido los mejores ejemplos de vida que he tenido. Me han enseñado el significado de la determinación, el coraje, la valentía, el fruto del éxito, pero también el esfuerzo que enmascara la victoria. Me han mostrado el camino que debía de seguir y me impulsaron en cada etapa a ser más y desarrollarme de forma integrativa. De cada uno aprendí lo mejor y lo llevo conmigo día a día.

Algo que me marcó toda mi vida fueron aquellos veranos llenos de ajedrez, aquellas tardes llenas de *carpinteada* y las noches de tendero. No necesito alguien que me señale el camino, me repruebe y me elogie. No en virtud de su poder, sino de su amor, autoridad y bonanza. Tengo a mi señor padre que él ha hecho todo eso por mí con una sonrisa y una frase desde lo más profundo de su corazón. Me mostró que uno debe ser generoso, amoroso, así como esforzarse y ser valiente. Me dió todo lo que nunca pudo él tener. Gracias, papá.

A mi hermana María quien me mostro el camino de la academia, de seguir mis pasiones con convicción y siempre ser una persona de bien. Me introdujo al camino de la literatura, de la poesía y del hambre por saber y conocer.

Hay gente que no es consanguínea mía, pero no hace menos el amor, cariño y respeto que les guardo. A ti Victoria que quisiste hacer de mí, lo que la primavera con los cerezos. Gracias por casi un lustro de romance, aventuras, enojos y amor. Sin embargo, no te amé como debí y no supe conservarte en mi vida. Yo fui él que te perdió.

Eres parte de esto mi Baam, que tu constante motivación me mantuvo en *Momentum*. Desde la preparatoria donde éramos adolescentes conflictuados con nuestra vida. Nos mantuvimos con fuerza. Quien diría que el tiempo pasa tan rápido y de ser aquellos dolientes jóvenes ambos nos volvimos perros viejos. Agradezco infinitamente cada minuto contigo y por este camino que ambos hemos tomado de hacer ciencia. Me siento orgullo de ti y espero que tú de mí. Mi buen amigo Miguel Toledo muchas gracias porque con tus regaños me mantuviste siempre en sintonía y con tus experiencias me abriste la puerta a tu vida.

Estimados Angel, Pau y Santiago; mis amigos dentro y fuera de la academia; han sido piedra sólida para mí en estos años lleno de travesuras, subidas y bajadas. Genuinamente les agradezco enormemente el tacto, cariño y la acogida como un igual que recibí de su parte. Me gustaría poder pagarles, pero es algo que jamás podré. Lo único que tengo para darles como pago es mi genuino amor, amistad y lealtad.

Mis primeros amigos dentro de las neurociencias y algo más; Sam, CSG, MSC, ARG, JC, Apo y BGJ. Cada uno de ustedes ha sido fuente de inspiración para mí, de motivación, dedicación y hasta de competencia en algunos casos. Gracias por haber elegido ser parte de mi grupo de aliados y amigo en esta vida. Nunca duden que tendrán siempre un amigo para ustedes en cualquier momento.

A cada miembro del laboratorio de Reprogramación y Enfermedades crónicas-degenerativas han sido pieza clave en mi desarrollo y formación dentro y por supuesto que también fuera de la academia. Compartimos mañanas, tardes y noches llenas de frustración, pero también llenas de alegría, júbilo, emoción y fútbol. Gracias Carmelita, Mireya, Norma, Sra. Paty, Oscar, Miguel, Andy, Tamara y Jared. Destaco también a quienes recién se incorporaron en mi vida, pero los quiero como si los conociera desde hace años; JRPM, DEGR y ABM. ¡Nos la hemos pasado bomba estos últimos meses!

Es justo nombrar y reconocer a otros miembros de la academia que sin ellos tampoco sería posible esto. A todo el equipo en la coordinación de la licenciatura en Neurociencias Facultad de Medicina UNAM por el apoyo para llevar con éxito el proceso de titulación. Al igual que a todo un laboratorio que siempre extendió su mano en tiempos complicados. Un fuerte abrazo a cada miembro del laboratorio de Canales iónicos de la Facultad de Medicina. Gracias Dr. Daniel, Dra. Zinaelli y Dra. Escobar.

Después de todo, *Jalim* ha sido un orgullo estos dos años de trabajo titánico y de malabares con todo. Cada día intenté sin éxito descifrar como es que piensa, que sigue en su plan y conocer también el *as* que siempre guarda debajo de la bata. Me ha preparado para el mundo académico fuera de la zona de confort. Me gustaría seguir sus pasos, volverme casi tan bueno como usted. Ser un gran posdoctoral que lleva sobre sus hombros a los demás proyectos sin pedir nada a cambio. Le agradezco cada minuto que pasamos trabajando codo a codo, cada regaño que me dió y sobre todo su participación en esta tesis. Sabe bien que sin usted esto no sería ni imaginable.

Siento un profundo cariño y agradecimiento por todo a la Dra. Cárdenas. Gracias por haberme acogido dentro del laboratorio, recibirme y volverme uno de sus estudiantes, darme la confianza y sobre todo la libertad creativa en mi quehacer científico. Hubo muchas veces que me dotó de ideas nuevas que no podía concebir y de esta forma mostrándome el camino científico. Muchas veces me dio ánimos cuando estaba decaído, frustrado, siempre unas palabras tuyas me alegraban las tardes. *Gracias por ser mi tutora.*

***Soy todo lo que ustedes han hecho conmigo. Soy el secreto que ustedes guardan de mí.  
Gracias a todos. Sin todos ustedes yo ya hubiera muerto hace muchos años.***