



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*  
DE CÉLULAS EPIDERMALES BAJO CONDICIONES NEURALIZANTES.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Andrea Tenorio Mina

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosa Estela Navarro González  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia  
[Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

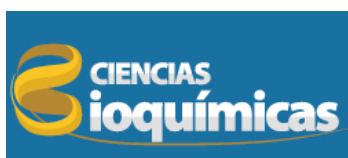
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

## FINANCIAMIENTO



**UNAM**



### EL PRESENTE PROYECTO FUE REALIZADO EN:

La División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular (IFC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el Laboratorio de Reprogramación Celular IFC/UNAM en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".

Se agradece el apoyo a través de los donativos de CONACYT (131281, 256092 y Red Temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Papiit IN208713/IN213716).



## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que nada gracias al Dr. Iván Velasco por haberme aceptado en su laboratorio y darme la oportunidad de realizar mi tesis de maestría como la continuación de mi tesis de licenciatura. De esta manera, también quiero agradecer al Dr. Jesús Santa Olalla por confiar en mí y ser el mediador para que pudiera darse esta colaboración.

Gracias a la Dra. Rosa Navarro y al Dr. Jesús Santa Olalla por formar parte de mi comité tutorial. Así como a la Dra. Denhi Schnabel, Dra. Susana Castro, Dra. Leonor Pérez, Dr. Jesús Chimal y al Dr. Fernando López y por fungir como sinodales en mi examen de grado.

Gracias al Hospital del Niño y el Adolescente Morelense (HNAM) por proporcionar las muestras de tejido humano a partir de las cuales se generó este proyecto, así como a los integrantes de la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular del HNAM y la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Gracias a Itzel Escobedo y Fernanda Vargas por su ayuda en la técnica de microinyección por ultrasonido, a Jessica Marín por su apoyo en la parte de enriquecimiento celular mediante FACS en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB). A mis compañeros de laboratorio AL-101 del Instituto de Fisiología Celular, Karla M., Yolanda R., Andrea S., Xóchitl F., Óscar C., Rolando L., Adolfo L., José Luis R., Alejandro C. y en especial a Daniel Cortés por su apoyo y asesoría durante toda mi estancia en el laboratorio.

Gracias a mis padres y hermanos por su apoyo incondicional y la motivación que me dieron para poder lograr esta meta en mi vida. Gracias a mis amigos Kevin, Alissa, Arleth, Vicente y Eduardo por su apoyo, así como por los momentos de dispersión que pasamos durante estos años y sobre todo por la amistad incondicional que me brindaron. Finalmente gracias a mi compañero de aventuras, mi cómplice y mi gran amor Javier Sandoval, gracias por estar conmigo siempre y sobre todo en los momentos más difíciles, sin ti no estaría donde estoy ahora.

Por último quisiera hacer una dedicatoria especial a un gran amigo al cual extraño mucho y el cual también me brindó su apoyo incondicional. Emmanuel Nava, gracias por las risas y por todo el cariño que compartiste conmigo durante los doce años de amistad que estuviste con nosotros. Sé que no cure el cáncer como tú esperabas, pero quiero dedicarte este logro, ya que según tus locuras, contribuiste en pagar mis estudios jaja. Te mando un fuerte abrazo y sé que ahora estás conmigo a donde quiera que vaya.

A todos ustedes, muchas gracias.



## RESUMEN

En la medicina regenerativa se han buscado alternativas terapéuticas que permitan obtener poblaciones neurogénicas, a partir de células de tejidos diferenciados distintos al cerebro. Actualmente existen diferentes estrategias para lograr este objetivo, como la reprogramación celular mediante factores de transcripción en células humanas. Sin embargo, también se han obtenido células neurales empleando únicamente medios de cultivo libres de suero, con factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF2). Bajo esta perspectiva, el presente trabajo busca conocer la posible obtención de células con fenotipo neural, partiendo de queratinocitos humanos, utilizando un medio de inducción neural *in vitro* con factores de crecimiento. Al crecer a los queratinocitos en suspensión en un medio neural, observamos un cambio morfológico, produciéndose células de menor tamaño y con morfología de precursor neural. Sin embargo, estas células no presentaron expresión de marcadores neurales. Adicionalmente, evaluamos la capacidad de diferenciación de estas células *in vivo*, mediante su inyección en el Sistema Nervioso Central de embriones de rata de 12 días de gestación. Los embriones se dejaron desarrollar cuatro días más, y posteriormente fueron recuperados para la caracterización de las células trasplantadas, las cuales fueron previamente transducidas con la proteína verde fluorescente (GFP). El resultado de este ensayo fue la detección de células GFP<sup>+</sup>, que además fueron positivas al anticuerpo Tuj1, el cual reconoce neuronas. Con base en estos resultados podemos concluir que las células epidermales humanas sí poseen un potencial de diferenciación hacia linaje neural, pero que las condiciones empleadas *in vitro* no tienen los requerimientos necesarios para dicha conversión de fenotipo.

## CONTENIDO

<b>Financiamiento</b> .....	<b>2</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>4</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>6</b>
<b>Índice</b> .....	<b>7</b>
<b>Índice de figuras y tablas</b> .....	<b>8</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>10</b>
<b>I. Introducción</b> .....	<b>11</b>
I.I Enfermedades neurológicas .....	<b>11</b>
I.II Terapia celular .....	<b>12</b>
I.III Células troncales .....	<b>13</b>
I.IV Plasticidad celular .....	<b>16</b>
I.V Piel, epidermis y la célula troncal epidermal .....	<b>18</b>
I.VI Desarrollo del sistema nervioso central de mamíferos .....	<b>21</b>
<b>II. Antecedentes</b> .....	<b>24</b>
II.I Diferenciación hacia linaje neural .....	<b>24</b>
<b>III. Hipótesis</b> .....	<b>25</b>
<b>IV. Objetivos</b> .....	<b>25</b>
<b>V. Materiales y métodos</b> .....	<b>26</b>
<b>VI. Resultados</b> .....	<b>33</b>
VI.I Cultivo celular .....	<b>33</b>
VI.II Inducción neural .....	<b>37</b>
VI.III Caracterización de agregados celulares .....	<b>41</b>
VI.IV Diferenciación y caracterización de agregados celulares <i>in vitro</i> .....	<b>44</b>
VI.V Detección cuali y cuantitativa de marcadores epidermales y neurales .....	<b>50</b>
VI.VI Células epidermales son capaces de expresar marcadores neurales tras su trasplante en el cerebro en desarrollo .....	<b>58</b>
<b>VII. Discusión</b> .....	<b>66</b>
<b>VIII. Conclusiones</b> .....	<b>71</b>
<b>IX. Perspectivas</b> .....	<b>72</b>
<b>X. Bibliografía</b> .....	<b>73</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Características principales de las células troncales .....	13
Figura 2. Modelos de plasticidad celular .....	17
Figura 3. Estructura celular de la epidermis .....	19
Figura 4. Esquema del linaje de células troncales epiteliales .....	20
Figura 5. Esquema del linaje de la célula troncal neural .....	23
Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para PCR .....	32
Figura 6. Presencia de micoplasma en queratinocitos humanos tras su propagación .....	34
Figura 7. Cambio morfológico de queratinocitos humanos durante su propagación .....	35
Figura 8. Los cultivos de queratinocitos expresan exclusivamente marcadores de células precursoras epidermales .....	36
Tabla 2. Composición de los tres diferentes medios utilizados para la inducción neural .....	37
Figura 9. El medio NBF promueve la formación de agregados celulares .....	38
Figura 10. El medio NBF en condiciones de ultra baja adherencia promueve la formación de agregados celulares de manera más eficiente .....	40
Figura 11. La formación de agregados celulares en medio EPI y en medio NBF permanece en queratinocitos de distintos países .....	41
Figura 12. Detección de Nestina en esferas generadas a partir de queratinocitos pase 5 en medio NBF .....	43
Figura 13. El cultivo en medio NBF y NB promueve un cambio morfológico en células P5 procedentes de agregados celulares .....	45
Figura 14. Los anticuerpos epidermales utilizados para la caracterización por inmunofluorescencia son funcionales .....	46
Figura 15. Los anticuerpos neurales utilizados para la caracterización por inmunofluorescencia son funcionales .....	47
Figura 16. No hay detección de marcadores de linaje neural en células diferenciadas (medio NB) provenientes de esferas generadas en medio NBF .....	49
Figura 17. Estandarización de GAPDH y $\beta$ -actina .....	50

Figura 18. Detección de marcadores neurales y epidermales en muestras control.....	<b>51</b>
Figura 19. Detección de Nestina .....	<b>52</b>
Figura 20. Curva de concentración de MgCl <sub>2</sub> para la detección de K5 .....	<b>54</b>
Figura 21. Vimentina se expresa en E1-P5, E2-P5, E3-P5.....	<b>55</b>
Figura 22. Sox2 no presenta expresión en E1-P5, E2-P5, E3-P5.....	<b>56</b>
Figura 23. Nestina se expresa en E1-P5, E2-P5, E3-P5.....	<b>56</b>
Figura 24. Análisis cuantitativo de los niveles de expresión de Nestina .....	<b>57</b>
Figura 25. Transfección de células HEK293 <sub>T</sub> para la expresión de GFP .....	<b>59</b>
Figura 26. Titulación viral en queratinocitos humanos .....	<b>59</b>
Figura 27. Enriquecimiento de queratinocitos GFP <sup>+</sup> mediante FACS .....	<b>61</b>
Figura 28. La expresión de GFP en queratinocitos no altera la formación de agregados tras la inducción neural.....	<b>62</b>
Figura 29. Células GFP <sup>+</sup> de la condición epidermal, son capaces de integrarse en el SN de ratas y expresar el marcador neural Tuj1 .....	<b>64</b>
Figura 30. Células GFP <sup>+</sup> de la condición neuralizante, son capaces de integrarse en el SN de ratas expresando el marcador Tuj1 y además con una morfología de tipo neural.....	<b>65</b>

## ABREVIATURAS

<b>cDNA</b>	ADN complementario (Del inglés, <i>complementary DNA</i> )
<b>CP</b>	Cultivo Primario
<b>CT</b>	Célula Troncal
<b>CTE</b>	Célula Troncal Embrionaria
<b>CTN</b>	Célula Troncal Neural
<b>FACS</b>	Separación Celular Activada por Fluorescencia (Del inglés, <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> )
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
<b>GFAP</b>	Proteína Ácida Fibrilar Glial (Del inglés, <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> )
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente (Del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>hESC</b>	Células Troncales Embrionarias Humanas (Del inglés, <i>Human Embryonic Stem Cell</i> )
<b>K1</b>	Citoqueratina uno
<b>K5</b>	Citoqueratina cinco
<b>K10</b>	Citoqueratina diez
<b>K14</b>	Citoqueratina catorce
<b>MCI</b>	Masa Celular Interna
<b>MPM</b>	Marcador de Peso Molecular
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAT</b>	Progenitor de Amplificación Transitoria
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (Del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>rNPC</b>	Células Precursoras Neuronales de rata (Del inglés, <i>Rat Neural Precursor Cells</i> )
<b>SKPs</b>	Células Precursoras derivadas de la piel (Del inglés, <i>Skin derived Precursor cells</i> )
<b>SN</b>	Sistema Nervioso

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1 Enfermedades neurológicas**

Según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), los trastornos neurológicos afectan a millones de personas en todo el mundo. Entre estos desordenes neurológicos figuran la demencia, epilepsia, trastornos del dolor de cabeza, neuroinfecciones, Parkinson, golpes y daños traumáticos en el cerebro. La muerte por enfermedades neurológicas representa un 12 % del total de casos de muerte a nivel global. Dentro de este porcentaje en primer lugar se encuentran las enfermedades cerebro vasculares con un 85 % y en segundo lugar los desórdenes neurodegenerativos con 7-8 % [1].

Las enfermedades neurodegenerativas son aquellas en las que se presenta una afectación de la estructura y/o función de células del sistema nervioso (SN), este deterioro se manifiesta con un inicio tardío y de carácter progresivo, teniendo un aumento de prevalencia con el envejecimiento. Dentro de estas enfermedades se encuentran el Alzheimer, con afectación principal en la corteza cerebral; la enfermedad de Parkinson y el Huntington con alteraciones en los ganglios basales, mientras que las ataxias del cerebelo y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) presentan deterioro en motoneuronas cerebrales o espinales [2]. Todos estos desórdenes neurodegenerativos eventualmente llevan a una atrofia de regiones particulares del sistema nervioso, ocasionando la pérdida de funciones cognitivas y/o motoras [3].

En el caso de enfermedades cerebro vasculares, éstas ocurren cuando existe una obstrucción arterial que ocasiona una interrupción o pérdida repentina del flujo sanguíneo cerebral, o bien debido a la ruptura de un vaso, dando lugar a un derrame; provocando efectos como parálisis, problemas de raciocinio o habla, problemas en la visión y en la coordinación motora [4].

Las estrategias que se han desarrollado para el tratamiento de las enfermedades neurológicas que presentan una pérdida en la población neuronal, o una alteración de su función, implican el uso de medicamentos que ayudan principalmente en revertir la sintomatología de la enfermedad. La farmacología busca encontrar nuevos principios activos que interfieran con el proceso degenerativo, a partir de dos líneas de investigación. La primera tiene como objetivo retardar o paliar los síntomas ocasionados por alteraciones en los niveles de neurotransmisores, mientras que la segunda se enfoca en los procesos de muerte celular [5]. Puesto que estos tratamientos actúan principalmente sobre la sintomatología, y no sobre la enfermedad como tal, en la actualidad se están buscando alternativas terapéuticas para su tratamiento. Ya que el papel de estos fármacos consiste en retrasar la enfermedad, sin evitar la presencia de efectos secundarios, terminan siendo una alternativa de alto costo. Es aquí cuando la medicina basada en la terapia celular tiene un mayor impacto a comparación del uso a largo plazo de fármacos moleculares para estas condiciones crónicas.

## **I.II Terapia celular**

La terapia celular es un área de la medicina regenerativa que se define como un procedimiento terapéutico que involucra la transferencia de poblaciones celulares a un hospedero, con la finalidad de corregir algún defecto funcional o introducir nuevas funciones en éste [6]. Desde hace algunas décadas, ya existen en la clínica diferentes procedimientos que hacen uso de poblaciones celulares, entre los cuales destacan las transfusiones sanguíneas para el tratamiento de anemias [7] y el trasplante de médula ósea para el caso de leucemias [8]. Lo novedoso de la terapia celular desarrollada en los últimos años se ve reflejado en el hecho de que las células introducidas pueden ser manipuladas *ex vivo*, tanto a nivel celular como molecular, en caso de que se requiera hacerlas más eficientes [9]. En la actualidad, una fuente alternativa para la obtención de diferentes estirpes celulares, es el uso de células troncales debido a su potencial de diferenciación y alta capacidad proliferativa [10].

### I.III Células troncales

Las células troncales (CT) son células indiferenciadas capaces de generar distintas estirpes celulares, y presentan dos características principales, a) la capacidad de autorrenovarse, y b) la capacidad de diferenciación [11] (Fig. 1).

La autorrenovación es el proceso que lleva a cabo la célula para renovarse a sí misma mediante la mitosis. Esta división celular puede suceder de manera simétrica y/o asimétrica. En el primer caso la CT se divide para formar dos células troncales, y esto ocurre principalmente en circunstancias donde se tiende a expandir esta población, como lo es durante el desarrollo y tras haber ocurrido una lesión; mientras que en la división asimétrica se genera una célula troncal y una célula progenitora con linaje restringido, lo que permite mantener un balance entre la población de CT y la generación de estirpes celulares diferenciadas [12].

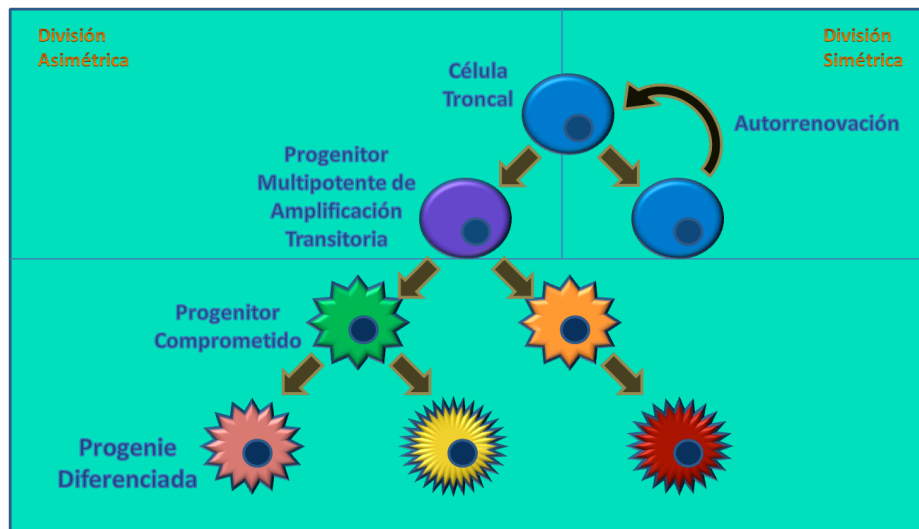


Figura 1. Características principales de las células troncales. La autorrenovación sucede cuando una CT presenta una división celular de tipo simétrica (esquina superior derecha), y su capacidad de diferenciación comienza con una división asimétrica (esquina superior izquierda) que da lugar a un progenitor que ya no es capaz de autorrenovarse y cuenta con un linaje restringido.

La definición de célula troncal toma en consideración tanto criterios funcionales, como algunas características morfológicas o biomarcadores específicos, que puedan distinguirlas con certeza del resto de las células del tejido en que se encuentran [11]. En la actualidad la manera en que se identifica a la CT, implica el uso de análisis por inmunofenotipo, el cual consiste en un análisis de la expresión de diversos genes que pueden actuar como marcadores [13]. Sin embargo, los ensayos funcionales tanto *in vivo* como *in vitro*, son los que determinan la identidad de toda CT. Dentro de estos ensayos se encuentran los ensayos de diferenciación por la formación de cuerpos embrioides *in vitro* y la generación de teratomas *in vivo*, para el caso de CT pluripotentes, seguidos de un análisis por RT-PCR e inmunocitoquímica, para medir la expresión de genes y proteínas asociados a las tres capas germinales. De esta manera se logra evaluar el potencial diferenciativo, la segunda característica importante de una CT. Un análisis de la generación de clonas en cultivo celular permite evaluar tanto el potencial de diferenciación como la capacidad de autorrenovación [14].

La viabilidad, proliferación, autorrenovación y diferenciación de las células troncales son procesos celulares de alta complejidad que dependen de diversos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Los factores intrínsecos involucran una gran variedad de moléculas reguladoras, que se encuentran presentes en la célula dependiendo del tejido o linaje al que ésta pertenece. Por otro lado, los factores extrínsecos incluyen a las diferentes estirpes celulares, así como sus productos, que forman parte del microambiente en el que la célula se desarrolla, es decir, su nicho. De esta manera podemos decir, que la función de las CT depende de factores reguladores intrínsecos que a su vez pueden ser modulados por señales extrínsecas [12].

El nicho de la CT es considerado como un subconjunto de células residentes de los tejidos y sustratos extracelulares, que pueden albergar de forma indefinida una o más células troncales, participando en controlar su autorrenovación y producción de progenie *in vivo* [15]. Se piensa que si las CT son removidas del nicho, éstas pierden su identidad de célula troncal, la capacidad de autorrenovación y comienzan su diferenciación. Por lo tanto, el nicho de la célula troncal no se define sólo como el sitio donde se encuentran las CT, sino también por su capacidad para regular el comportamiento de estas células [16].

Existen diferentes tipos de células, si las clasificamos de acuerdo a su potencial de diferenciación es posible tener células totipotentes, CT pluripotenciales y CT multipotentes [17].

- Las *células totipotentes* son aquellas capaces de generar cualquier linaje celular presente en el organismo, es decir, aquellas células que pertenecen a tejidos propios del embrión, así como aquellas del tejido extraembrionario.
- Las *CT pluripotentes* dan lugar a los distintos tipos celulares que se generan de las tres capas germinales, el ectodermo, endodermo y mesodermo.
- Las *CT multipotentes* sólo pueden diferenciarse a fenotipos propios del tejido o sitio en donde se encuentran.

Las células troncales embrionarias (CTE) son aquellas que se derivan de la masa celular interna (MCI), la cual se genera en la etapa de blastocisto durante el desarrollo temprano embrionario, y que por lo tanto son de carácter pluripotente [18, 19]. Estas células presentan una autorrenovación indefinida y su plasticidad les permite generar todos los tipos celulares intraembrionarios. Sin embargo, se ha reportado que este tipo de CT presentan el riesgo de formar teratomas si no se diferencian antes de ser utilizadas *in vivo*, además de que el uso de las mismas se ve restringido por cuestiones bioéticas al utilizar embriones humanos para su derivación [20].



Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas fuentes que proporcionen células que puedan emplearse en terapia celular, con la finalidad de utilizarlas en la medicina regenerativa del sistema nervioso de manera exitosa.

Cabe mencionar que también existen CT que han sido aisladas a partir de tejidos de un organismo post-natal o adulto. El primer tejido donde se describió la presencia de células troncales fue el sistema hematopoyético [21], posteriormente se identificaron también en tejidos como la epidermis [22], músculo [23], hígado [24] e inclusive en el sistema nervioso [25]. Al poder contar con la capacidad de aislar poblaciones indiferenciadas, amplificarlas *in vitro* y dirigirlas hacia fenotipos terminales, se abrió un nuevo campo de investigación. Mediante un proceso conocido como plasticidad, estos tipos de CT multipotentes son capaces de generar una estirpe celular especializada diferente a la de su origen [26]. Esto sucede principalmente cuando estas células son colocadas en un tejido diferente o sometidas a condiciones experimentales particulares.

#### **I.IV Plasticidad celular**

La plasticidad celular se define como la capacidad que posee una célula dentro de un linaje específico, para generar células de otro linaje de origen embrionario distinto. Algunas CT pueden presentar un mayor potencial de diferenciación, por lo que dan lugar a células de linajes diferentes si son transferidas a otro ambiente. En estas nuevas condiciones, la CT puede responder a las señales presentes, generando la progenie idónea o necesaria en este ambiente distinto. Se han establecido algunos modelos para explicar los eventos responsables de redireccionar el destino de una célula [26] (Fig. 2):

- *Transdiferenciación*.- Consiste en favorecer la diferenciación de un tipo celular terminalmente diferenciado a otro con origen diferente, es decir de otra estirpe celular [27, 28].
- *Transdeterminación*.- Sucede cuando un precursor ya comprometido hacia determinado linaje, pueda convertirse en un progenitor de otra estirpe, al ser reubicado en un sitio diferente al de su origen [29].

- *Desdiferenciación.*- Ocurre cuando un progenitor celular ya comprometido puede revertir su condición, y convertirse en una célula con un estado más indiferenciado, generando un progenitor que dará origen a fenotipos terminales distintos [30-32].
- *Fusión celular.*- Implica que dos células se unen generando una célula tetraploide, adquiriendo las características de ambas poblaciones [33, 34].

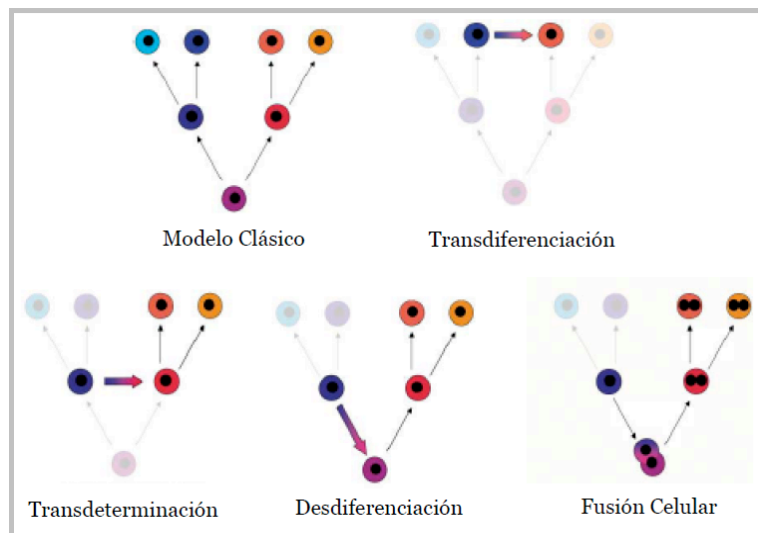


Figura 2. Modelos de plasticidad celular. El modelo clásico es el proceso normal en que una célula troncal origina precursores comprometidos hacia un fenotipo terminal. Los modelos de plasticidad son la transdiferenciación (de un fenotipo terminal a otro), la transdeterminación (de un progenitor determinado a un progenitor de otra estirpe), la desdiferenciación (un progenitor regresa a un estado más indiferenciado generando otro progenitor) y la fusión celular (dos células se fusionan). [26].

Esta capacidad permite a una célula de cierto linaje específico cambiar su destino de diferenciación hacia otra estirpe celular diferente, respondiendo a señales de un nuevo microambiente que propicie uno de estos cuatro modelos alternos de diferenciación. Para este proyecto el modelo de desdiferenciación es de gran importancia, ya que puede permitir la generación de células de linaje neural a partir de células epidermales cultivadas en condiciones neuralizantes.

## **I.V Piel, epidermis y la célula troncal epidermal**

La piel, al igual que el sistema nervioso central (SNC) se origina del ectodermo, lo que podría ser considerado como una ventaja para la obtención de precursores neurales a partir de células epidermales, ya que parten de un mismo origen. También es una fuente celular importante para la obtención de CT, ya que su obtención es relativamente fácil y puede ser del mismo paciente, lo que evita el rechazo inmune, además de que ya se ha demostrado su potencial diferenciativo hacia el linaje neural [35, 36].

La piel es el órgano que recubre al cuerpo en su totalidad, siendo éste el más grande en cuanto a peso y superficie. Principalmente está compuesta por dos tejidos diferentes: la epidermis y la dermis. La dermis es el estrato compuesto principalmente por fibroblastos que brinda soporte a la epidermis, además de producir los elementos estructurales de la piel como el colágeno y la elastina, combinándose con otras proteínas como los glicosaminoglicanos, para formar la matriz extracelular que da soporte a la membrana basal [37]. En cuanto a la epidermis, esta es la capa más externa de la piel y principalmente está compuesta por queratinocitos. La epidermis presenta una estructura estratificada, partiendo de la parte más profunda se encuentra el estrato basal, el estrato espinoso, el estrato granuloso y el estrato córneo (Fig. 3A).

Los queratinocitos son producidos en el estrato basal, donde proliferan para posteriormente migrar hacia la superficie, proceso conocido como diferenciación epidérmica [38]. Las células proliferantes de la capa basal, se encuentran en contacto con la dermis por medio de integrinas de adhesión, hemidesmosomas, desmosomas, lamininas y anclaje fibrilar. Por otro lado, el contacto célula-célula presente entre las células de la misma capa o entre células de los diferentes estratos se da mediante uniones adherentes, uniones tipo GAP, uniones estrechas y desmosomas (Fig. 3B).

El grado de distribución de componentes específicos de citoesqueleto y de las uniones, incluyendo desmogleinas, cadherinas y citoqueratinas, es crucial para conducir la morfogénesis epidérmica. Las queratinas son proteínas específicas de citoesqueleto que caracterizan los distintos estratos de la piel. En el estrato basal los queratinocitos proliferativos que se encuentran unidos a la membrana basal, expresan la queratina 5 (K5) y la queratina 14 (K14). Estos queratinocitos maduran y se transforman en queratinocitos suprabasales. Esta transición se distingue por pérdida de contacto con la membrana basal, interrupción de la proliferación, y la ausencia de expresión de las queratinas K5 y K14, para finalmente ganar la expresión de queratinas K1 y K10 [39] (Fig. 3B).

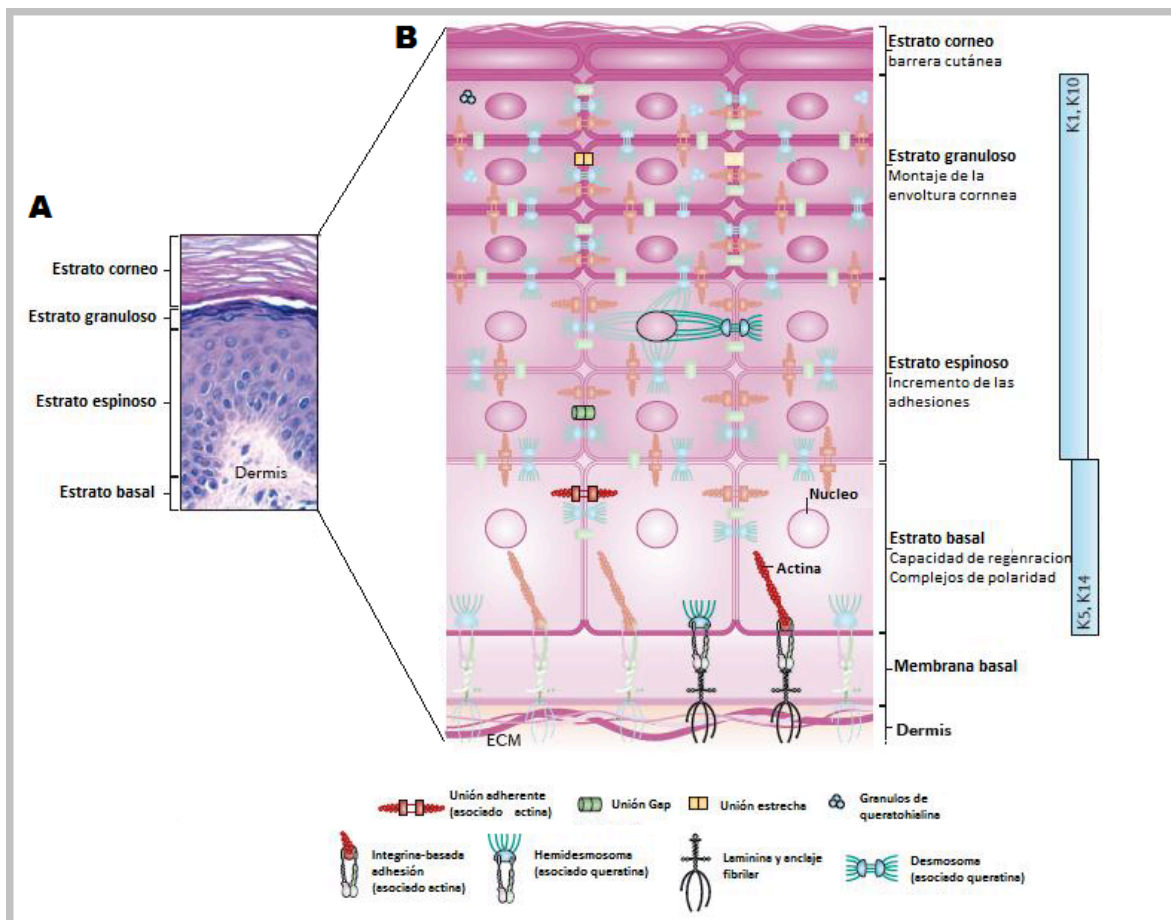


Figura 3. Estructura celular de la epidermis. A) Tinción de hematoxilina-eosina en una muestra de piel humana, donde se muestran los estratos de la piel. B) Esquema de células estratificadas que conforman la epidermis, donde se muestran las diferentes uniones célula-célula en los diferentes estratos, así como la distribución gradual de citoqueratinas [37].

A lo largo de la vida, la epidermis presenta regeneración, proceso que se lleva a cabo por una población bien definida y especializada de células de la capa basal, en donde se ubican las células troncales epidermales. Estas células se generan de otras CT ubicadas en la región del folículo conocida como protuberancia, región que es reconocida por el sitio en donde se inserta el músculo piloerector [40]. La conversión que existe entre célula troncal epidermal y folicular, puede ser bidireccional durante la cicatrización de heridas, de esta manera pueden originarse folículos pilosos *de novo* desde la capa basal de la epidermis afectada (Fig. 4).

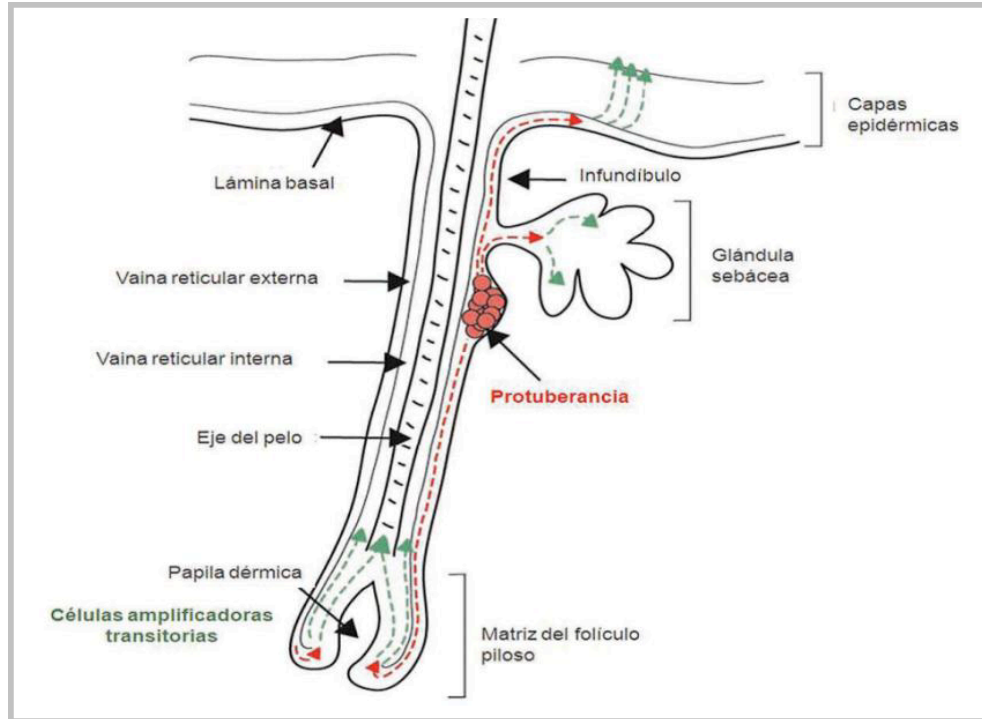


Figura 4. Esquema del linaje de células troncales epiteliales. Las CT multipotentes que se encuentran en la protuberancia contribuyen a la formación del folículo piloso, glándula sebácea y la epidermis (líneas rojas). Los progenitores de amplificación transitoria generados de las CTs de la protuberancia en cada una de estas regiones, diferencia hacia los linajes indicados (líneas verdes) [41].

La diferenciación de células epidermales hacia linaje neural puede llevarse a cabo mediante ensayos *in vitro* o *in vivo*. En el caso de ensayos *in vitro* se cuenta con la formación de agregados tipo neuroesferas, obtenidos mediante el uso de ciertos inductores, como lo son factores de crecimiento específicos [42]. Mientras que para la diferenciación *in vivo* podría realizarse el trasplante de los agregados disociados en regiones del SNC de embriones de rata, que cuenten con los requerimientos necesarios para su conversión de fenotipo, siendo así un nicho neurogénico para estas células epiteliales.

De esta manera, la piel puede ser utilizada como una fuente celular alternativa exitosa en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, al poder ser sometidas a un tratamiento de diferenciación con la finalidad de generar precursores neurales o neuronas maduras.

#### **I.VI Desarrollo del sistema nervioso central de mamíferos**

Durante el desarrollo embrionario la fuente primaria de células específicas del sistema nervioso es una lámina germinal proliferativa conocida como neuroepitelio, el cual posterior a la gastrulación, se diferencia a una lámina de células proliferativas en la superficie dorsal del embrión, denominada placa neural. La formación del sistema nervioso y la piel a partir del ectodermo, inician con el proceso de neurulación primaria, el cual consiste en el plegamiento de la placa neural para generar a tres grupos de células: 1) el ectodermo superficial, del que se deriva la epidermis; 2) la cresta neural que da lugar al sistema nervioso periférico y 3) el tubo neural que formará el cerebro y la médula espinal [43].

El tubo neural temprano de mamíferos presenta una estructura laminar, sin embargo antes de que se forme la porción posterior del tubo, la porción más anterior sufre de cambios estructurales que llevan a la generación de tres vesículas primarias: el cerebro anterior (prosencefalo), el cerebro medio (mesencefalo) y el cerebro posterior (romboencefalo).

Conforme avanza el desarrollo estas tres vesículas primarias dan lugar a cinco vesículas secundarias. El prosencéfalo se divide en telencéfalo y diencefalo, el mesencéfalo se mantiene, mientras que el romboencéfalo da lugar al metencéfalo y mielencéfalo. A partir del telencéfalo se desarrollan los lóbulos olfatorios, el hipocampo y la corteza cerebral. En el caso del diencefalo, éste da lugar a la retina, el epitálamo, tálamo e hipotálamo. Por otro lado, el mesencéfalo corresponde al cerebro medio, el cual conecta mediante fibras lo que es el cerebro anterior con el cerebro posterior. Y finalmente del metencéfalo se desarrolla el cerebelo y del mielencéfalo el bulbo raquídeo [43].

Las células que se diferencian en el neuroepitelio pueden tener tres destinos diferentes: 1) convertirse en células postmitóticas diferenciadas, como las neuronas; 2) células gliales o precursores gliales, y 3) células que retienen su capacidad proliferativa para formar láminas germinales secundarias, como la capa germinal externa del cerebelo o la zona subventricular de la corteza cerebral [44]. Estas células conforman lo que conocemos como el linaje neural, y se ha descrito que las Células Troncales Neurales (CTN) son la primera población del linaje. A partir de esta CTN se genera una célula precursora que posee el mismo potencial que la célula troncal, ya que también genera a todos los constituyentes celulares del tejido neural, pero no posee la capacidad de autorrenovación, ésta población recibe el nombre de progenitor de amplificación transitoria (PAT) multipotente. Estas células presentan la mayor parte de los marcadores de la CTN, sin embargo, cuentan con una alta tasa de proliferación, por lo que son importantes para la expansión celular que se lleva a cabo durante el desarrollo o bajo situaciones de daño. Posteriormente, son generados progenitores que adquieren el compromiso de diferenciar a sólo algunos o un fenotipo específico, como lo es el neuroblasto y el glioblasto, a partir de los cuales se generan los fenotipos terminales, como las neuronas y las células gliales, respectivamente (Fig. 5).

En ratas el inicio del desarrollo del cerebro prenatal, comienza con la expansión del neuroepitelio. La primera fase comienza en el día embrionario 11 (E11) y termina durante el día 14 (E14). Para E14 ya existen regiones cerebrales diferenciadas, con la presencia de neuronas postmitóticas presentes en la región caudal y ventral. El estadio intermedio comienza en E15 hasta E18, donde el neuroepitelio se mantiene pero comienza la expansión de láminas germinales secundarias. Y finalmente en el estadio tres que va de E20 a E22, se aprecia la disolución del neuroepitelio y el rápido crecimiento del parénquima cerebral. Para el final de esta etapa la mayoría de las estructuras cerebrales son identificables en sus posiciones finales. Sin embargo, la neurogénesis en la rata continúa después del nacimiento, como resultado de la generación de neuroblastos en láminas secundarias germinales de regiones específicas del cerebro como la corteza cerebelar y el giro dentado del hipocampo [45].

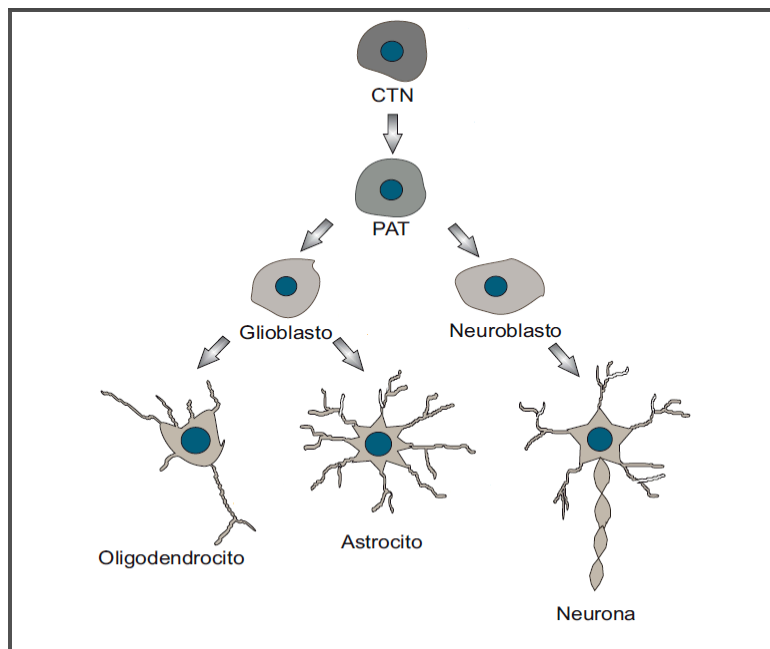


Figura 5. Esquema del linaje de la célula troncal neural. Las células que conforman al linaje neural se derivan de la célula troncal neural (CTN), a partir de la cual se generan los progenitores de amplificación transitoria (PAT), los cuales comparten algunos marcadores con la CTN pero ya no cuentan con la misma capacidad proliferativa. A partir del PAT, en el desarrollo neural primero se generan los neuroblastos, células capaces de dar lugar a neuronas. Más tarde surgen los glioblastos, células de las que deriva el linaje glial, las cuales pueden diferenciar a astrocitos u oligodendrocitos. Cada una de estas poblaciones se encuentra definida por los marcadores que se presentan en el esquema [46].



## II. ANTECEDENTES

### II.I Diferenciación hacia linaje neural

En ratón ha sido posible generar células de linaje neural a partir de células precursoras de la piel [47-49]. También se ha logrado obtener células neurales a partir de células epidermales de humano, sin embargo en bajas proporciones [50]. Estas células precursoras derivadas de la piel (SKPs) pueden diferenciarse en células de Schwann *in vivo*, cuando se inyectan en tejido periférico dañado [35] o en la médula espinal [47].

Si bien ya se han obtenido células de linaje neural a partir de células de la piel, cabe mencionar que los trabajos realizados hasta el momento se han enfocado en generar células neurales terminalmente diferenciadas [35, 36, 50], además de que estas células neurales obtenidas en estudios previos han sido generadas a partir de células epidermales recién aisladas [36, 50].

El antecedente más relevante para este proyecto, proviene del trabajo realizado previamente en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, que constituyó mi tesis de licenciatura [51]. Se llevó a cabo la generación de esferas flotantes a partir de células epidermales, las cuales dejaron de expresar proteínas de citoesqueleto propias de queratinocitos humanos (K5, K10 y K14) y comenzaron a expresar Nestina, un marcador de células precursoras neurales. Sin embargo, para poder conocer el potencial neural con el que cuentan estas células, es necesario evaluar su capacidad para diferenciar a neuronas tanto *in vitro* como *in vivo*.

### III. HIPÓTESIS

Los agregados celulares derivados de células epidermales, con fenotipo Nestina<sup>+</sup>/Vimentina<sup>+</sup>, poseen el potencial para generar células de linaje neural en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

### IV. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es la evaluación del potencial diferenciativo de células epidermales humanas para generar fenotipos neurales, tanto *in vitro*, como *in vivo*.

#### Objetivos particulares:

- Utilizar diferentes condiciones de cultivo para inducir la diferenciación de queratinocitos humanos a células neurales.
- Realizar la evaluación *in vitro* de la diferenciación neural utilizando marcadores moleculares.
- Transducir los queratinocitos con la proteína verde fluorescente (GFP, *del inglés Green Fluorescent Protein*) para su identificación en el SNC de la rata en desarrollo, al ser trasplantados para su diferenciación *in vivo*.
- Caracterizar los fenotipos resultantes en las células trasplantadas marcadas con GFP en los embriones de rata.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cultivo celular de queratinocitos humanos

Las células empleadas en este trabajo provienen de muestras de prepucio humano donadas por pacientes del Hospital del Niño y el Adolescente Morelense, mediante consentimiento informado. Las células son cultivadas en medio epidermal (EPI), constituido por DMEM-F12 sin Hepes (Gibco), suplementado con Suero Fetal de Bovino (SFB) al 10 % (Multicell), antibiótico-antimicótico [Penicilina, 100 U/μl; Estreptomina, 100 μg/μl; Fungizona, 0.25 μg/ml] (Gibco), Hepes [7.92 mM] (Sigma), adenina [0.18 mM] (Sigma), hidrocortisona [0.1 μg/ml] (Sigma), glutamax [0.4 mM] (Gibco), Factor de Crecimiento Epidermal [20 ng/ml] (Peprotech) e Insulina [4 μg/ml] (Gibco). Se siembran a una densidad de  $1 \times 10^6$  células en 55 cm<sup>2</sup>, alcanzando un 80-90 % de confluencia en aproximadamente 4 días de cultivo.

### 2. Transducción lentiviral de GFP en queratinocitos humanos

#### 2.1 Plásmidos utilizados para la producción de partículas virales

Se empleó el plásmido pLL3.7, el cual contiene la proteína verde fluorescente (GFP). Además, se realizaron co-transfecciones con el plásmido pMD2.G, que contiene la proteína de la cápside viral *env*, el pRSV-Rev, que contiene el elemento regulador Rev y finalmente el plásmido pMDLg/pRRE, el cual contiene las proteínas estructurales Gag y Pol, además de RRE un sitio de unión a Rev. Todos los plásmidos fueron obtenidos de Addgene.

## *2.2 Transfección de células HEK293T para producir lentivirus*

Las células HEK293T son cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB y 1 % de antibiótico (penicilina [100 mg/ml]), incubadas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se siembra una densidad de 5x10<sup>6</sup> células en una caja petri de 55 cm<sup>2</sup>, tratadas previamente con poli-ornitina (PLO) [10 µl/ml] para incrementar su adhesión a la superficie de cultivo. Se dejan 24 horas para alcanzar una confluencia de 80-100 %, teniendo una monocapa homogénea en toda la superficie.

La transfección se lleva a cabo mediante una mezcla de CaCl<sub>2</sub> 0.3 M, y 5 µg de los plásmidos pMD2.G, pRSV-Rev, pMDLg/pRRE, además de 10 µg del plásmido pLL3.7, el cual tiene la secuencia para la expresión de GFP.

Las células con esta solución se dejan 7 horas a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub> y transcurrido el tiempo de incubación se lavan las células 2 veces con PBS 1X estéril. Finalmente se agregan 10 ml de medio DMEM y se incuban hasta 72 horas a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. La cosecha de los lentivirus se realiza a las 48 y 72 horas.

## *2.3 Cosecha del lentivirus*

Se recupera el sobrenadante a las 48 horas y se almacena a 4°C, se añaden de nuevo 10 ml de medio DMEM para realizar la segunda colecta de virus a las 72 horas. Se junta el sobrenadante de las 48 y 72 horas para que se centrifugue a 27000 rpm durante 90 minutos a 4 °C para concentrar el virus. Después se reconstituye la pastilla viral en 200 µl de PBS 1X estéril, se realizan alícuotas y se almacena el concentrado viral a -70 °C.

## *2.4 Titulación viral en queratinocitos humanos*

Se siembra una densidad de 2.5x10<sup>4</sup> queratinocitos en 1.9 cm<sup>2</sup> en medio EPI, para alcanzar una confluencia del 80-90 % al momento de la transducción lentiviral. En cuanto se alcanza la confluencia se realizan las siguientes diluciones seriadas de 1:1, 1:5, 1:25, 1:125 y 1:625.

Para estas diluciones se prepara medio EPI con polibreno al [1X], y se incuban las células a 37 °C/5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Se hace cambio de medio a las 24 horas y se coloca medio EPI fresco, incubando las células por 1 día más para realizar la cuantificación de células GFP positivas a las 48 horas de ser transducidas mediante análisis por microscopia de epifluorescencia.

### *2.5 Transducción lentiviral en queratinocitos humanos*

Una vez determinado el título viral se siembran queratinocitos humanos a una densidad de  $4 \times 10^6$  células en 55 cm<sup>2</sup> los cuales se incuban sólo 12 horas para permitir su adherencia a la superficie de cultivo previamente tratada con PLO (Sigma). Una vez que las células conforman una monocapa en la caja de cultivo se lleva a cabo la transducción lentiviral, empleando una concentración de 4200 virus/ µl por 24 horas en medio EPI con polibreno.

Se realiza cambio de medio a las 48 horas de haber iniciado la transducción lentiviral. Pasadas 72 horas de haber iniciado la transducción, las células son llevadas al citómetro de flujo para realizar separación celular mediante FACS (Del inglés, *Fluorescence Activated Cell Sorting*).

### *2.6 Enriquecimiento celular mediante FACS*

A las 48 horas de haber realizado la transducción lentiviral de GFP en queratinocitos humanos, las células son colectadas y resuspendidas en PBS 1X con 2 % de SFB. Se llevan al citómetro para realizar la separación únicamente de aquellas células positivas para GFP que presenten una mayor intensidad de fluorescencia ( $>10^4$ ). Las células se recuperan en medio EPI con 1 % de antibiótico (Sigma).

### 3. Inducción neural

Se realizó el cultivo de queratinocitos humanos en tres diferentes medios empleados para la formación de agregados: 1) Medio N2F (*Torres, 2010*) el cual contiene DMEM-F12 sin Hepes, suplemento N2 [1X] (Gibco), EGF [20 ng/ml] y bFGF [40 ng/ml] (PeproTech); 2) Medio MIN (*Guo, et al., 2009*) compuesto por DMEM-F12 sin Hepes, EGF [20 ng/ml], bFGF [40 ng/ml] y suplemento B27 [1%] (Gibco); 3) Medio NBF el cual mezcla los componentes de los dos medios anteriores, con DMEM-F12 sin Hepes, suplemento N2 [1X], EGF [20 ng/ml], bFGF [40 ng/ml] y suplemento B27 [1%].

Se emplearon además tres diferentes cajas de cultivo: 1) cajas de cultivo celular (Corning); 2) cajas de crecimiento bacteriano (Phoenix Biomedical) y cajas de ultra baja adherencia (Corning). Se siembran las células a una densidad de  $2.65 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Se deja incubar a 37 °C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 5 días. Cada dos días se realiza un registro fotográfico y cambio de medio.

### 4. Diferenciación neural *in vitro*

Los agregados obtenidos tras la inducción neural son disgregados con tripsina al 2.5 %, incubándolos 5 minutos a 37 °C. Para el caso de los agregados generados en medio NBF, después de ser disgregados, las células provenientes de estas esferas se cultivan en el medio NB, el cual es una versión modificada del medio de inducción neural NBF, donde se mantiene el suplemento B27 pero se retiran los factores de crecimiento EGF y bFGF. Para el caso de los agregados generados en medio epidermal, las células provenientes de estas esferas se cultivan en medio EPI. Ambas condiciones son sembradas sobre una superficie adherente tratada 24 horas antes con PLO, y 2 horas antes con laminina [1 µg/ml] (Sigma) y fibronectina [5 µg/ml] (Sigma) en PBS 1X.

## 5. Diferenciación neural *in vivo*

Se utilizan ratas gestantes Wistar, con embriones de 12 días de edad gestacional (E12) a los cuales se les realiza micro-inyecciones guiadas por una sonda de ultrasonido, utilizando un sistema de ultrasonido MHF-1 Ultraview (E-Technologies). Las ratas son anestesiadas en una cámara de inducción y se mantienen con una máscara facial para la administración inhalada de Sevoflurano (5 % para la inducción y 1 % durante el procedimiento). Una vez anestesiadas las ratas, son rasuradas en la región donde se hará la incisión, se limpia la piel con antiséptico para evitar infecciones y finalmente se realiza una laparotomía abdominal media, para exponer de manera cuidadosa los cuernos uterinos y registrar el número de embriones.

La micro-inyección para depositar las células GFP<sup>+</sup> provenientes de agregados disociados, se realiza en el lumen de las vesículas telencéfalias, a través de la pared uterina mediante el uso de micro capilares hechos de borosilicato, los cuales son pulidos para obtener un menor diámetro en la punta. Se inyectan células provenientes de agregados en medio EPI y en medio NBF resuspendidas en DMEM, en diferentes embriones de la misma rata gestante, introduciendo una cantidad de  $4.5 \times 10^5$  células en un volumen total de 3  $\mu$ l mediante un inyector automático (Quintessential, Stoelting). Como control se inyectan embriones únicamente con DMEM, ya que es el medio vehículo de las células. Las inyecciones se realizan por duplicado o triplicado en diferentes embriones para cada una de las condiciones (EPI, NBF y DMEM), y en la misma rata gestante, con una repetición de 3 ratas gestantes diferentes. Una vez que se termina de inyectar el número de embriones deseado para cada experimento, el útero se regresa a su posición anatómica usual y se procede a suturar las incisiones realizadas en músculo y piel con suturas independientes. Al finalizar se administra una dosis de 0.1 mg/kg de Buprenorfina como analgésico (Pisa) y los animales son monitoreados mientras se recuperan de la cirugía.

Cuatro días después de la inyección, las ratas gestantes son sacrificadas por una sobredosis intracardiaca de Pentobarbital sódico (Pfizer), y los embriones son identificados y recuperados para su posterior análisis mediante inmunohistofluorescencia.

## *6. Inmunofluorescencia*

Para el caso de inmunofluorescencia en células, las células disociadas son fijadas con metanol por 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las esferas completas y los embriones recuperados que serán cortados mediante criostato son fijados con paraformaldehído al 4% durante 24 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las células fijadas se permeabilizan con Tritón X-100 al 0.1% en PBS con 10% de suero normal de cabra. Los anticuerpos primarios se adicionan e PBS con 10% de suero normal de cabra durante una noche.

Para el linaje epidermal se utilizaron las citoqueratinas K5, K10 y K14 (Abcam). Para los linajes neurales se usaron Nestina (Covance) y Sox2 (Abcam) para precursores neurales, Tuj1 para neuronas (Covance) y GFAP para astrocitos (Invitrogen). Además, se detectó la proteína de citoesqueleto Vimentina (Thermo y Dako), presente en precursores ectodérmicos. Los anticuerpos secundarios acoplados a fluorescencia que se emplean fueron Alexa 488 (ratón) y Alexa 568 (conejo), ambos de Covance.

## *7. RT-PCR y q-PCR*

Se lleva a cabo la extracción de RNA de las células mediante el uso de TRIzol. A partir del RNA total que se ha purificado, se toman de 1 a 5  $\mu\text{g}$  para realizar la síntesis de cDNA utilizando la enzima Transcriptasa Reversa. Se emplean secuencias específicas para los oligonucleótidos de la queratina 5 (K5), Vimentina, Nestina, Sox2, Beta-actina y GAPDH como control de carga (Tabla 1).



Los oligonucleótidos iniciadores se colocaron en una concentración 10  $\mu$ M, añadiendo a cada reacción 100 ng aproximadamente de cDNA, todo en un volumen final de 25  $\mu$ L. La enzima utilizada para la reacción fue Tac DNA polimerasa (Invitrogen).

El programa que se utilizó para los todos los oligonucleótido iniciadores en la PCR punto final fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos; seguido de 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95 °C durante 1 minuto, una temperatura de alineamiento de 66 °C durante 1 minuto y una temperatura de síntesis a 72 °C durante 1 minuto; con una etapa de síntesis final a 72 °C durante 10 minutos y un posterior mantenimiento de las reacción a 4 °C.

Las condiciones de amplificación para la q-PCR fueron las siguientes: para el caso de los oligonucleótidos iniciadores Nes, Sox2 y  $\beta$ -actina: un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95 °C por 10 segundos, una temperatura de alineamiento a 60 °C durante 30 segundos, y una temperatura de síntesis a 95 °C durante 15 segundos. Se utilizó Syber Green como revelador de reacción y se utilizó el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies, Thermo Scientific) y para analizar los datos se utilizó el software StepOnePlus Software v2.3.

GEN	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido
K5	F: 5'-TCTGACACCTCAGTGGTCCT-3'	R: 5'-CTGCTGCTGGAGTAGTAGCTT-3'
VIMENTINA	F: 5'-CAGGCAAAGCAGGAGTCCAC-3'	R: 5'-GCAGCTTCAACGGCAAAGTTC-3'
NESTINA	F: 5'-AGCCCTGACCACTCCAGTTTAG-3'	R: 5'-CCCTCTATGGCTGTTTCTTCTCT-3'
SOX2	F: 5'-TCAGGAGTTGTCAAGGCAGAGAAG-3'	R: 5'-CTCAGTCCTAGTCTTAAAGAGGCAGC-3'
$\beta$ -actina	F: 5'-TGAGGTAGTCAGTCAGGTCC-3'	R: 5'-GCTATCCAGGCTGTGCTATC-3'
GAPDH	F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para PCR.

## **VI. RESULTADOS**

### **VI.I Cultivo celular**

En un inicio se descongelaron diferentes lotes de células, con la finalidad de evaluar contaminación con micoplasma en los queratinocitos humanos. Los micoplasmas son bacterias carentes de pared celular, ocasionando que éstas sean resistentes a los antibióticos de tipo betalactámicos. Además son parásitos que presentan un tamaño menor a 1  $\mu\text{m}$ , dificultando su detección al microscopio. La presencia de estas bacterias en los cultivos celulares puede llevar a un cambio en el crecimiento y metabolismo de las células.

Para la detección de este microorganismo se utilizó el Kit Venor<sup>TM</sup>GeM, el cual hace uso de la técnica de PCR para la detección de la región codificante de la subunidad 16S del RNA ribosomal en el genoma de micoplasma. Las muestras a analizar fueron viales de queratinocitos propagados en la Unidad de Diagnostico y Medicina Molecular (UDMM) en Cuernavaca, así como viales de los mismos lotes sin ser propagados, es decir, células que fueron aisladas del tejido y congeladas inmediatamente, las cuales fueron descongeladas en el Instituto de Fisiología Celular (IFC) en la Cd. de México (Fig.6).

Se pudo observar que las muestras provenientes de la UDMM presentaron positividad para micoplasma. Por otro lado las células provenientes del mismo lote, pero sin ser propagadas no presentaron contaminación de este microorganismo, lo que significa que estas células por sí mismas no son portadoras de micoplasma, sino que adquirieron esta contaminación al ser propagadas. A partir de este resultado, se decidió propagar únicamente el lote JJ7 para ser utilizado en experimentos posteriores, ya que se contaba con una mayor cantidad de viales de este lote.

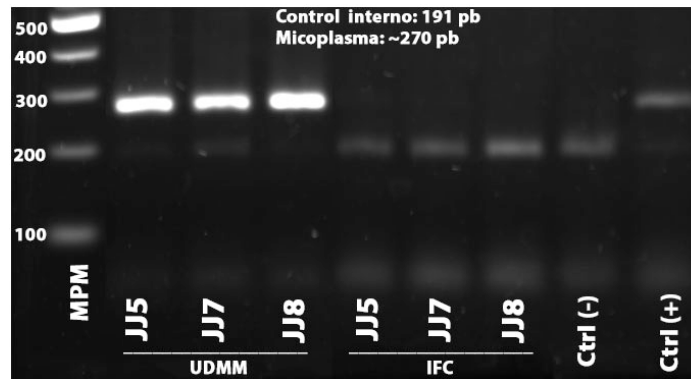


Figura 6. Presencia de micoplasma en queratinocitos humanos tras su propagación. En la primera columna se observa el marcador de peso molecular (MPM) que va de 100 a 500 pares de bases (pb). Se analizan tres diferentes lotes de queratinocitos el JJ5, JJ7 y JJ8. Las tres primeras columnas corresponden a células pase 1 (P1) que ya fueron cultivadas en la UDMM, mientras que las siguientes tres columnas son los mismos lotes pero desde el cultivo primario (CP), propagados por primera vez en el IFC.

Durante la propagación de los queratinocitos JJ7 se realizó un monitoreo de los cultivos celulares mediante registro fotográfico, observando que la morfología típica de queratinocitos se mantuviera a lo largo del pasaje celular (Fig. 7). Como podemos observar, la morfología normal de los queratinocitos se mantuvo durante la propagación. Sin embargo, mientras se avanza en el pasaje celular, las células comienzan a presentar una morfología más alargada, con finas prolongaciones y un mayor tamaño.

De manera adicional, antes de realizar la inducción neural se llevó a cabo un análisis de los marcadores presentes en queratinocitos, para conocer que fenotipo presentan las células antes de realizar la formación de agregados. Estas células cultivadas en medio EPI fueron positivas exclusivamente para la citoqueratina 5 (K5) y Vimentina (Vim), marcadores de células precursoras epidermales. Mientras que no mostraron la expresión de la queratina presente en queratinocitos terminalmente diferenciados, la citoqueratina 10 (K10), ni de marcadores de células precursoras neurales Nestina y Sox2 (Fig. 8).

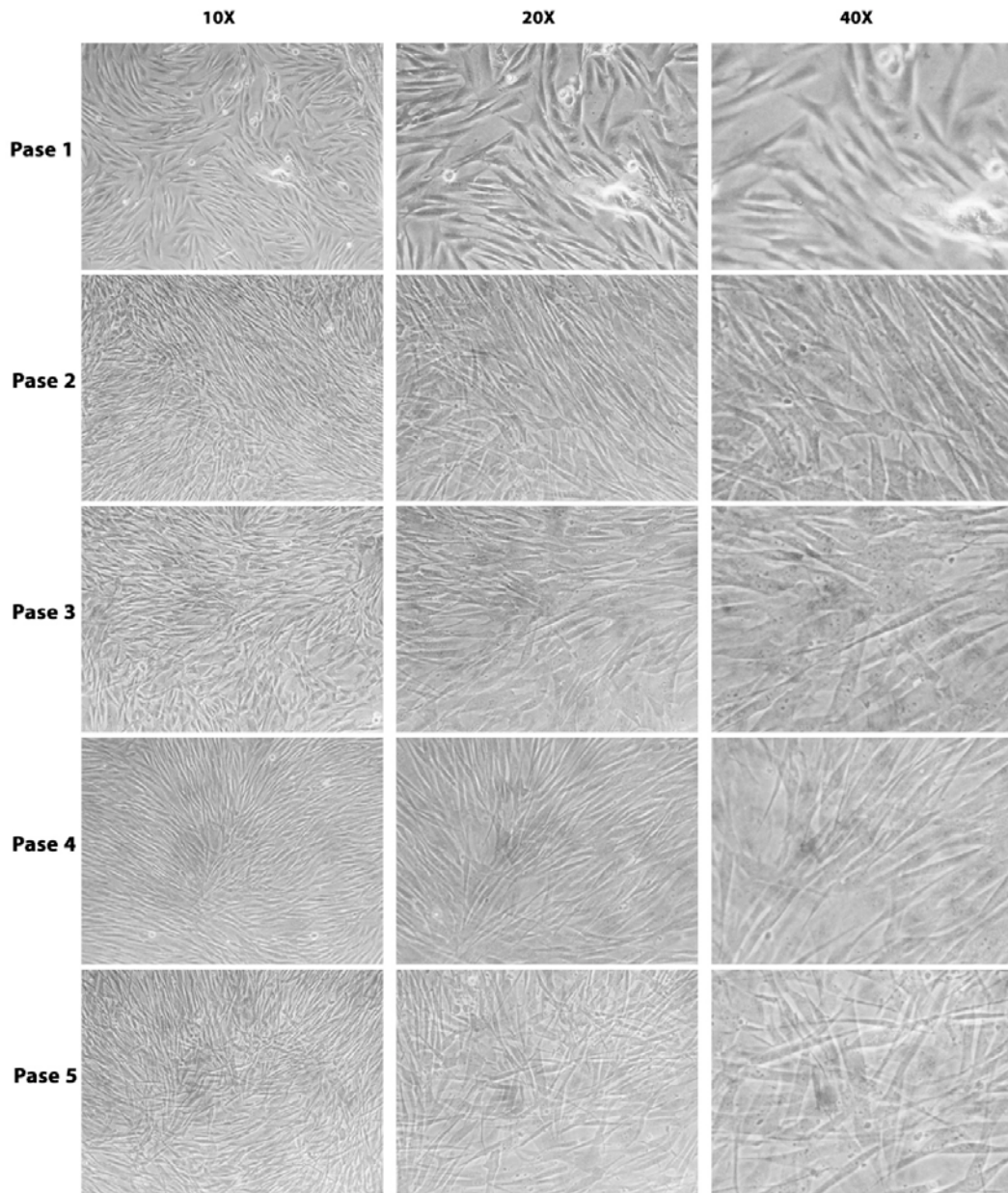


Figura 7. Cambio morfológico de queratinocitos humanos durante su propagación. Se realizaron registros fotográficos de queratinocitos JJ7 provenientes de diferentes pases celulares en medio EPI al día 4 de cultivo.

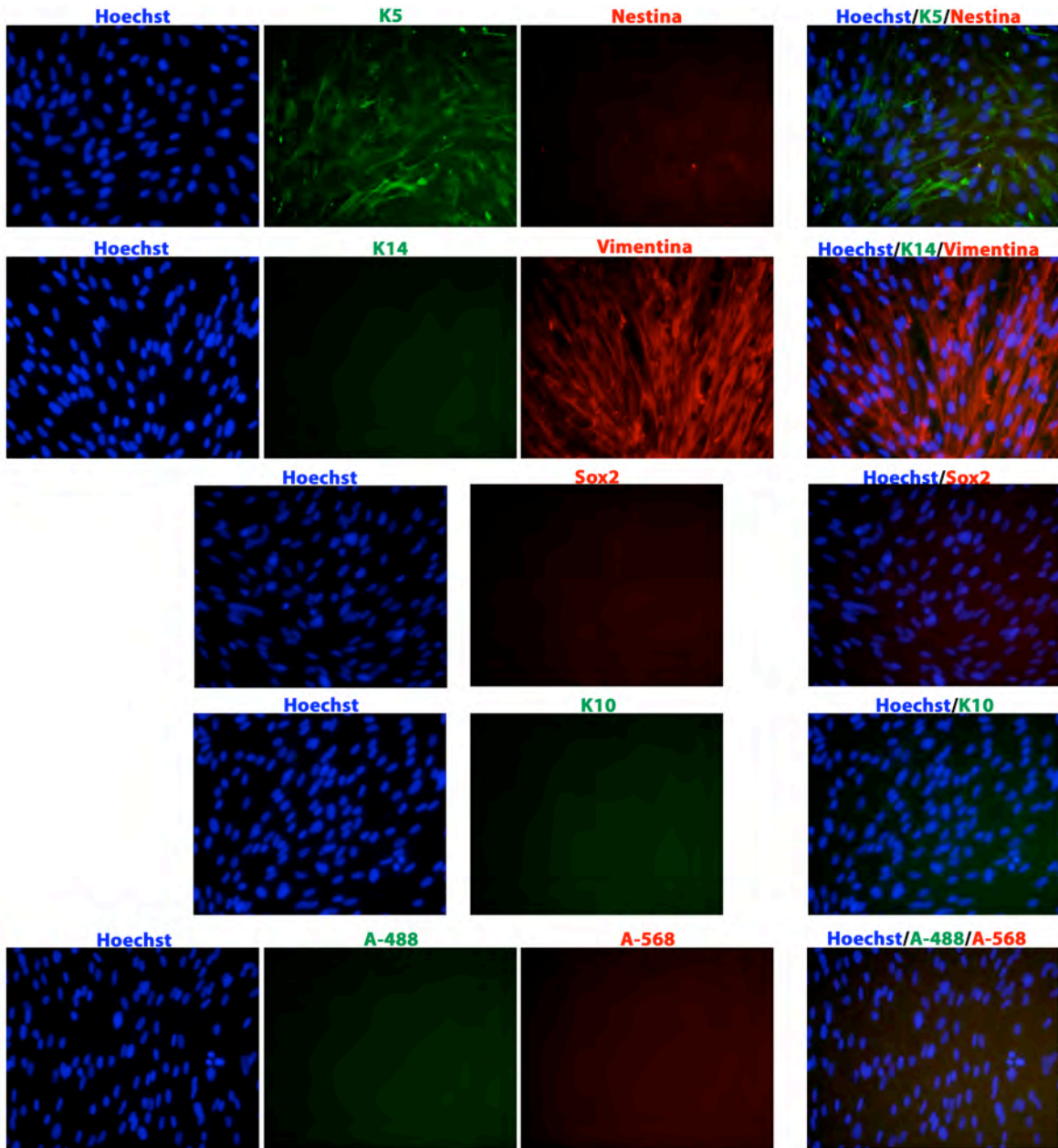


Figura 8. Los cultivos de queratinocitos expresan exclusivamente marcadores de células precursoras epidermales. Las células fueron cultivadas en medio EPI previo a la inducción neural. En la parte inferior de la imagen se muestran los controles negativos, correspondiente a células únicamente tratadas con la combinación de anticuerpos secundarios (Alexa 488 y Alexa 568) sin anticuerpos primarios.

## VI.II Inducción neural

En un inicio se presentaron algunos problemas de reproducibilidad con la generación de agregados utilizando el medio MIN, el cual había sido el medio utilizado en mi trabajo previo de licenciatura que se realizó en la Cd. de Cuernavaca. Por lo tanto, se decidió hacer una prueba con tres diferentes medios (N2F, MIN y NBF) empleados para la formación de agregados a partir de células epidermales (Tabla 2), y también se comparo el uso de estos tres medios en condiciones de adherencia y de no-adherencia.

Medio N2F	Medio MIN	Medio NBF
DMEM-F12	DMEM-F12	DMEM-F12
N2	---	N2
EGF (20 ng/ml)	EGF (20 ng/ml)	EGF (20 ng/ml)
bFGF (40 ng/ml)	bFGF (40 ng/ml)	bFGF (40 ng/ml)
---	B27 (1 %)	B27 (1 %)

Tabla 2. Composición de los tres diferentes medios utilizados para la inducción neural.

Bajo la condición de adherencia, en los tres distintos medios se observó que las células mantenían una morfología de tipo queratinocitos, y que a pesar de mantenerse durante 6 días en este medio inductivo, no se llevaba a cabo la formación de agregados celulares. Sin embargo, cuando se cultivaron las células en la condición sin adherencia, pudo observarse que las células en el medio NBF presentaban una mayor tendencia a formar agregados o cúmulos de células en suspensión, en comparación con las células en medio N2F o en medio MIN, ya que estas células aún presentaron adhesión a la caja de cultivo (Fig. 9).

Sin embargo tras seis días de cultivo en el medio de inducción neural, y aún en condiciones sin adherencia, no se logró una formación de agregados eficiente, comparando la eficiencia obtenida con los medios N2F y MIN en los estudios anteriormente realizados, ya que al utilizar estos medios se había logrado obtener la formación de agregados desde las primeras 24 horas de inducción neural. Por lo tanto, se decidió que el medio NBF funcionaba como la condición que promueve la formación de agregados celulares, bajo condiciones sin adherencia, pero que aún en estas condiciones no se lograba obtener una eficiencia igual a la obtenida en estudios previos.

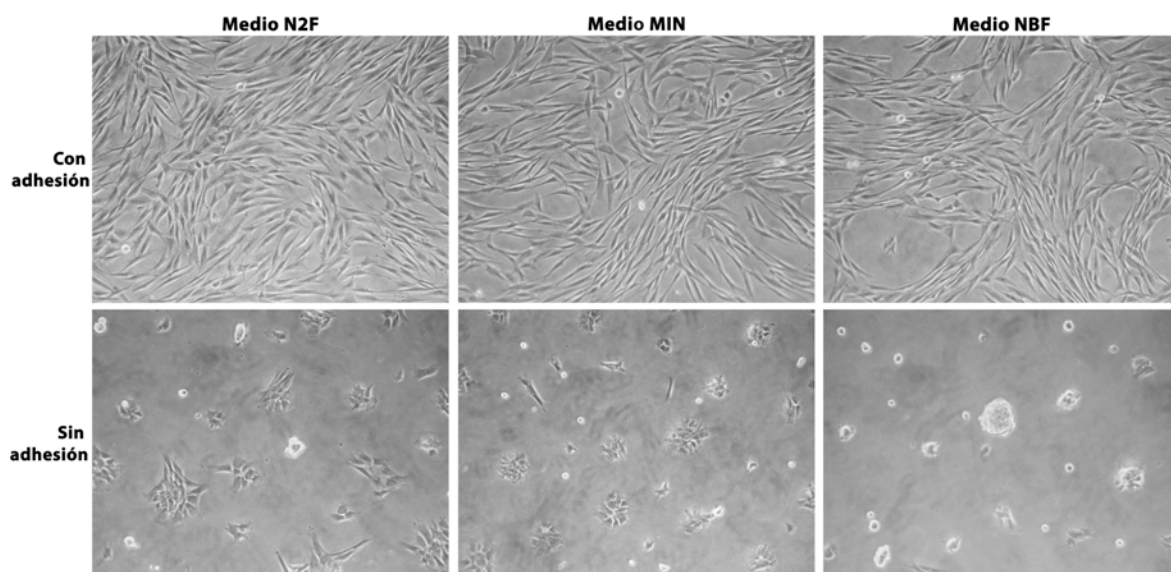


Figura 9. El medio NBF promueve la formación de agregados celulares. Se realizó la comparación de los tres diferentes medios inductivos tanto en condiciones de adherencia (fila superior), como de no adherencia (fila inferior).

Al ver que la condición carente de adhesión favorece la formación de agregados en el medio NBF, pero no de manera eficiente, se decidió realizar una prueba para la generación de agregados en cajas de cultivo de ultra baja adherencia, cajas utilizadas rutinariamente en la formación de los cuerpos embrioides.

En estas condiciones de ultra baja adherencia se observó la formación de los agregados celulares desde el día 1 en un 100 %, es decir todas las células presentes en el cultivo formaban esferas sin presentar adhesión a la caja, hasta el día 6, en el cual se observó una menor cantidad de agregados junto con la presencia de debris celular (Fig. 10).

De esta manera, se decidió que la mejor condición para la formación de los agregados celulares, es el cultivo de queratinocitos humanos en medio NBF sobre cajas con ultra baja adherencia, dejando este medio inductivo únicamente por 5 días para evitar una disminución en el número de agregados generados.

Una vez decididas las condiciones necesarias para la formación de agregados, se realizó el registro fotográfico de los agregados obtenidos a partir de distintos pases celulares de queratinocitos humanos JJ7, con el fin de corroborar que las condiciones seleccionadas como las mejores para la formación de agregados, presentaban el mismo efecto en células de distinto pasaje. Además, como condición control se decidió evaluar el comportamiento de queratinocitos crecidos en medio EPI sobre cajas de ultra baja adherencia, además de los crecidos en medio NBF, ya que existe la posibilidad de que estas esferas celulares se estén formando sólo por efecto de agregación a falta de adherencia y no por el medio de inducción neural NBF, el cual al contener los factores de crecimiento promueve una alta proliferación celular de las células precursoras presentes en el cultivo de queratinocitos.



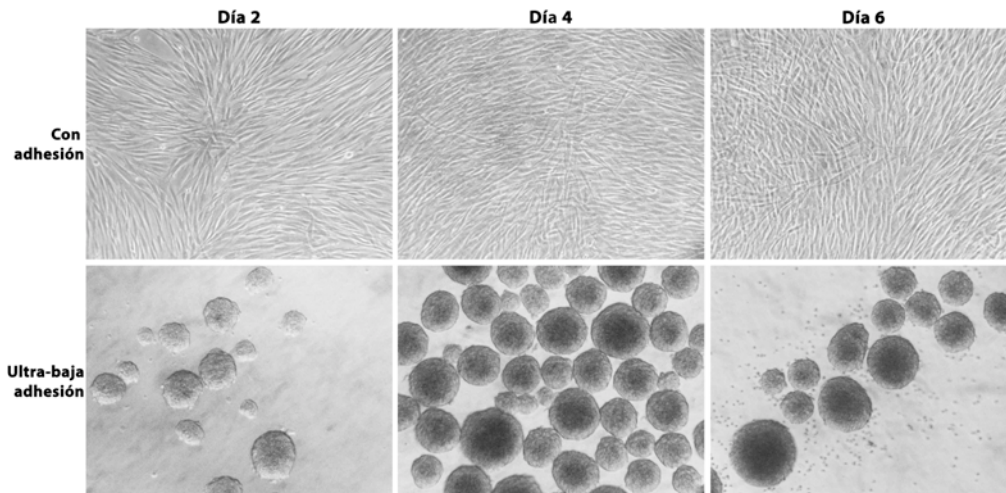


Figura 10. El medio NBF en condiciones de ultra baja adherencia promueve la formación de agregados celulares de manera más eficiente. Se realizó registro fotográfico de la morfología de los agregados obtenidos desde el día 2 de inducción hasta el día 6.

Lo que logramos observar fue que tanto en medio NBF como en medio EPI se llevó a cabo la formación de agregados celulares, sin embargo cabe resaltar, que los agregados generados en medio NBF presentaron una morfología esférica y delimitada, mientras que los agregados formados en medio EPI mostraron un mayor tamaño y una morfología menos delimitada en comparación a los agregados en medio NBF (Fig. 11).

En vista de que tanto en medio EPI como en medio NBF se observó la formación de agregados celulares, aunque presentando ciertas diferencias morfológicas que ya se mencionaron previamente, nos dimos cuenta que era necesario realizar la caracterización de las células presentes en estos dos tipos de agregados, para determinar si las células que los conforman presentan un fenotipo igual al de los queratinocitos antes de la inducción neural o si han adquirido la expresión de marcadores de linaje neural temprano.

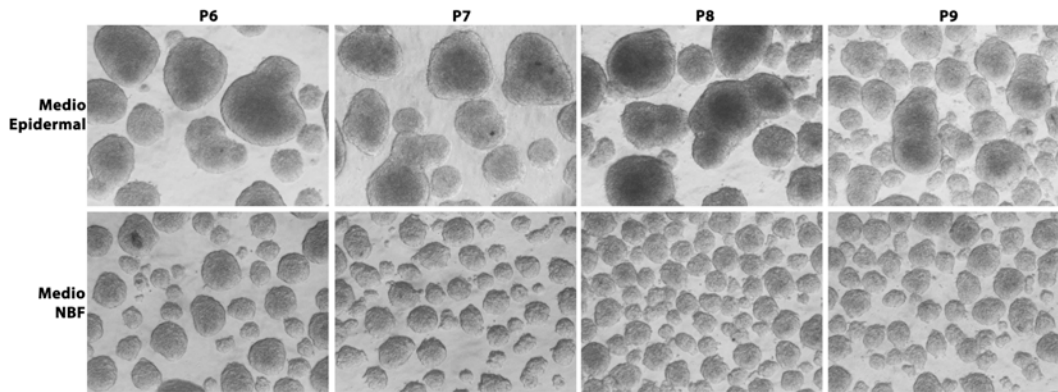


Figura 11. La formación de agregados celulares en medio EPI y en medio NBF permanece en queratinocitos de distintos pases. En la fila superior se observan los agregados obtenidos a partir del medio EPI utilizando queratinocitos pase 6 (P6), hasta pase 9 (P9). La fila inferior muestra los agregados generados en el medio NBF, de igual manera desde P6 hasta P9. Las fotografías fueron tomadas al día 4 de la inducción neural (10X).

### VI.III Caracterización de agregados celulares

En un primer intento se realizó la detección de marcadores de precursores neurales y epidermales en células provenientes de las esferas obtenidas tanto en medio NBF como en medio EPI, tras ser disgregadas con tripsina. Sin embargo, fue difícil la identificación de células positivas para estos marcadores debido a que estas células se desprendían con facilidad, y tras los diferentes lavados que se realizan en el procedimiento de la inmunofluorescencia, muchas células se perdían. Para tratar de resolver este inconveniente, se decidió llevar a cabo la detección de los marcadores epidermales y neurales en cortes histológicos de las esferas generadas, en lugar de disgregarlas.

En total se realizaron tres experimentos independientes (E1, E2 y E3) para la caracterización de los agregados obtenidos tanto en medio EPI como en el medio NBF. En un primer experimento (E1), la formación de esferas en ambas condiciones se llevó a cabo de manera secuencial, partiendo de queratinocitos pase 3 hasta queratinocitos pase 7.

En cada una de estas rondas de esferas generadas de distinto pase celular, se llevó a cabo la caracterización mediante inmunofluorescencia evaluándose los marcadores K5 junto con Vimentina para precursores epidermales, y por otro lado Nestina y Sox2 para precursores neurales.

Tras la caracterización de este primer experimento E1, observamos que la expresión de K5 se mantiene a lo largo de los diferentes pases, pero delimitada sólo en la periferia de los cortes tanto en medio EPI como en medio NBF. Mientras tanto, Vimentina presentó una fuerte señal en todas las esferas desde P3 hasta P7, en ambas condiciones, siendo la señal homogénea en toda el área del corte. Con respecto a los marcadores neurales, Nestina se logró detectar desde P3 hasta P7 en la condición neural, siendo más fuerte la señal en esferas P4 y P5, y en la condición epidermal sólo las esferas de estos dos pases mostraron señal pero localizándose las células positivas únicamente en la periferia. Para el caso de Sox2, la condición epidermal no mostró señal de este marcador en ningún pase celular, mientras que en la condición neural parecía haber señal, pero no se encontró localizada en el núcleo, sino en el citoplasma.

En vista de los resultados obtenidos en este primer experimento E1, se decidió utilizar únicamente queratinocitos de P4 y P5, debido a que las esferas obtenidas a partir de los queratinocitos de estos pases presentaron una mayor señal de Nestina. Por lo tanto se realizaron dos réplicas más (E2 y E3), y en vista de que no hubo diferencia entre aquellas de P4 y P5, se muestra únicamente la caracterización de agregados obtenidos a partir de queratinocitos P5, siendo una imagen representativa de lo que se encontró en los tres experimentos independientes.

Lo que observamos tras la larga caracterización de estos agregados fue que sólo aquellos que se obtuvieron en el medio NBF, adquirieron la expresión de Nestina y mantuvieron el fenotipo de queratinocitos siendo positivos para K5 y Vimentina ( $K5^+Vim^+Nes^+$ ). Por su parte, los agregados obtenidos en el medio EPI mantuvieron también el fenotipo de queratinocitos  $K5^+Vim^+$  sin la expresión de Nestina (Fig. 12).

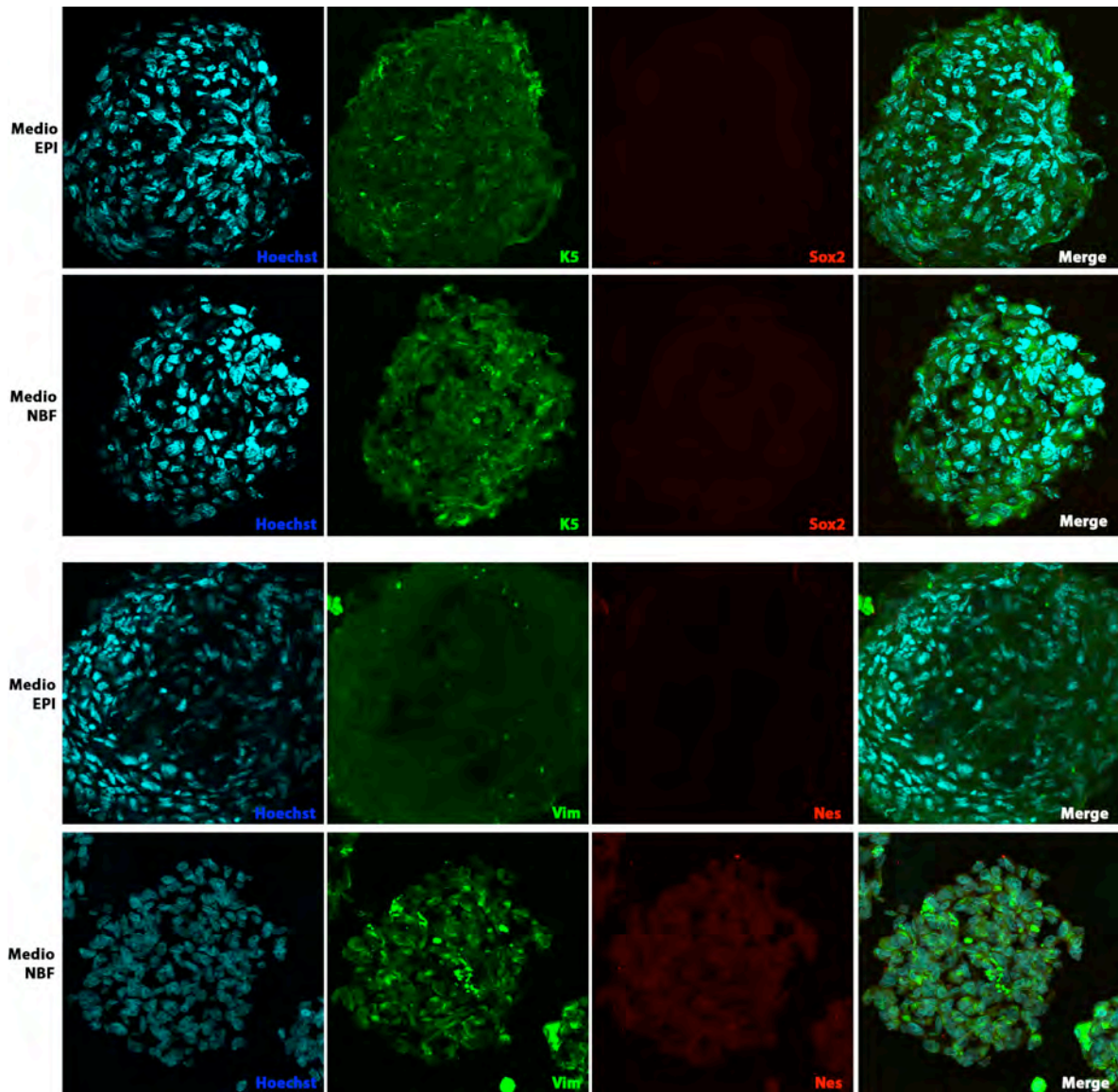


Figura 12. Detección de Nestina en esferas generadas a partir de queratinocitos pase 5 en medio NBF. Se llevo a cabo la inmunodetección de K5, Vimentina, Nestina y Sox2. Las fotografías fueron tomadas con un objetivo de 60X mediante microscopía confocal en una reconstrucción 3D (n=3).

Además de la inmunofluorescencia en cortes, decidimos disociar las esferas obtenidas en ambas condiciones, para poder observar si existe un cambio morfológico en las células que conforman estos agregados. Lo que observamos cuando se disocian las esferas generadas en medio EPI, y se colocan en una superficie adherente en el mismo medio, fue que las células que conformaban los agregados vuelven a presentar una morfología de tipo queratinocito (Fig.13A).

Sin embargo, las células procedentes de los agregados en medio NBF al ser disociadas presentan un cambio en su morfología, siendo ahora de menor tamaño, más ovaladas y con menor capacidad de adhesión a la superficie de cultivo (Fig. 13C).

Los resultados arrojados por las inmunotinciones y el cambio morfológico que se observa en los queratinocitos tratados con el medio NBF, sugieren que si se está llevando a cabo un cambio en la identidad de las células, sin embargo no se está pasando de un fenotipo epidermal a uno neural de manera completa ya que siguen presentes los marcadores epidermales tras la inducción neural.

#### **VI.IV Diferenciación y caracterización de agregados celulares *in vitro***

Después de realizar la formación de esferas con el medio NBF y el medio EPI, una porción de los agregados obtenidos son puestos a diferenciar en condiciones adherentes durante 4 días. Para el caso de la condición neural, las células se colocan en un medio libre de factores de crecimiento, el cual sólo contiene el medio N2 junto con el suplemento B27 (medio NB), y en la condición epidermal las células fueron igualmente disgregadas y sembradas en adherencia, pero mantenidas en el medio EPI. Antes de realizar la caracterización por inmunofluorescencia de estas células diferenciadas, decidimos verificar la morfología, para determinar si existía algún cambio como ocurrió con los agregados al ser solamente disociados y sembrados en adhesión.

Lo que observamos fue que al disgregar las esferas con ayuda de tripsina, y sembrar las células en una superficie adherente con el medio NB, hubo un cambio notable en la morfología de las células, estas son más pequeñas, ovaladas, algunas con pequeñas prolongaciones apicales y con una distribución de tipo ramificada (Fig. 13D). Sin embargo en las células provenientes de agregados en medio EPI no se observó cambio en la morfología celular, de hecho las células presentan la misma morfología de queratinocitos cultivados en monocapa con medio EPI (Fig.13 B).

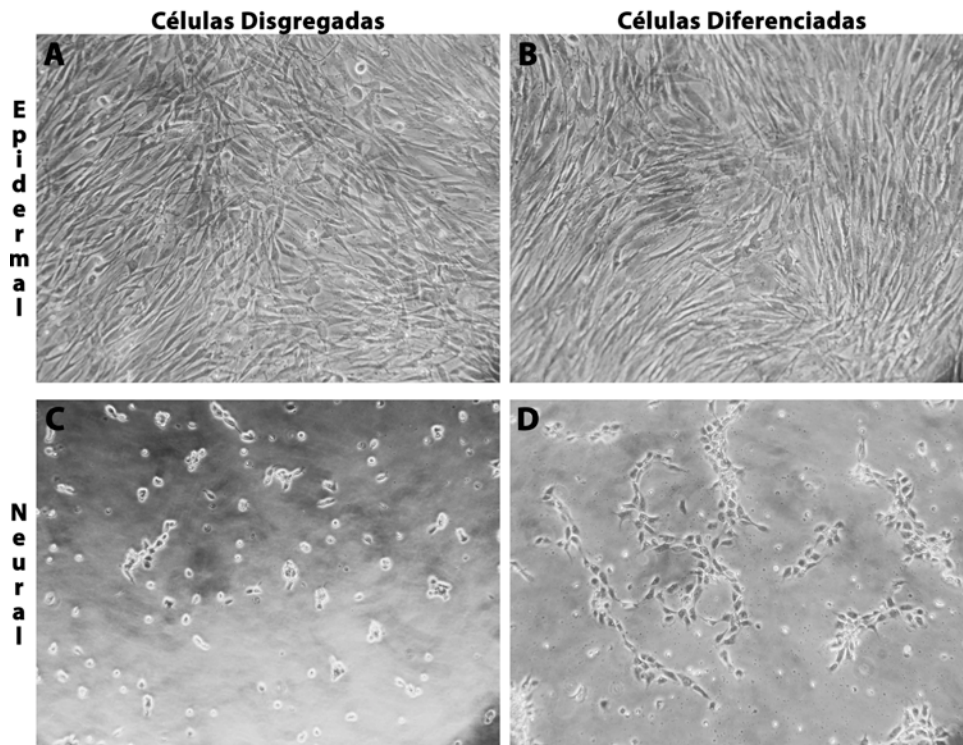


Figura 13. El cultivo en medio NBF y NB promueve un cambio morfológico en células P5 procedentes de agregados celulares. En la columna de la izquierda se observan células provenientes de agregados disociados, sembradas en el mismo medio en que se generaron, y en superficie de adhesión. En medio EPI (A) y en medio NBF (C). En la columna derecha se encuentran células de agregados disociados, sembradas en medio de diferenciación: medio EPI para la condición epidermal (control) y medio NB para la condición neural (sin factores de crecimiento) que además fueron colocadas en superficie de adhesión durante 4 días. Condición epidermal de diferenciación (B), condición neural de diferenciación (D). Las fotografías fueron tomadas al día 4 de diferenciación (objetivo 10X, n=3).

Previo al análisis de los marcadores moleculares por inmunofluorescencia se determinó la funcionalidad de los anticuerpos que serán utilizados para la caracterización de estas células, así como de los agregados, con el objetivo de descartar la posibilidad de una señal inespecífica. Para ello, se realizó un análisis de todos los anticuerpos a utilizar, cada uno en células o tejido que previamente se ha reportado que expresan estas proteínas (Fig.14 y 15).

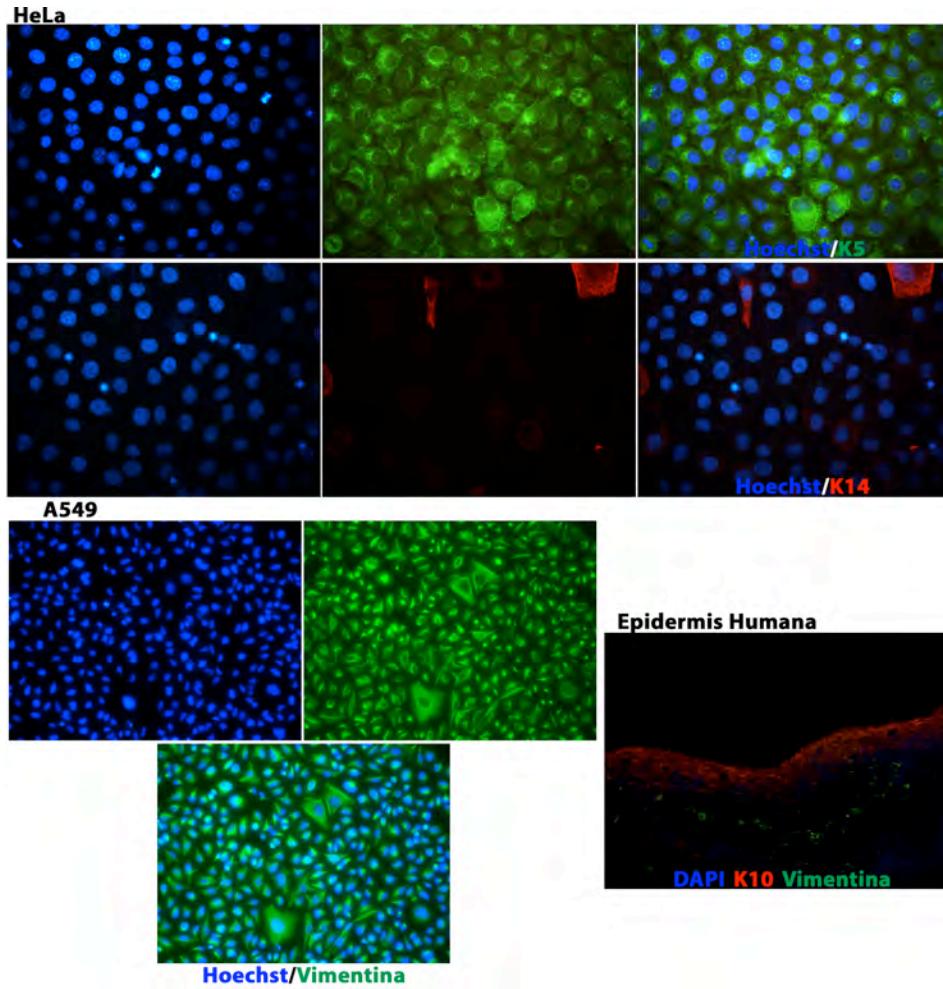


Figura 14. Los anticuerpos epidermales utilizados para la caracterización por inmunofluorescencia son funcionales. Detección de marcadores de linaje epidermal: K5 y K14 en células de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa); Vimentina en células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) y K10 en tejido epidermal humano.

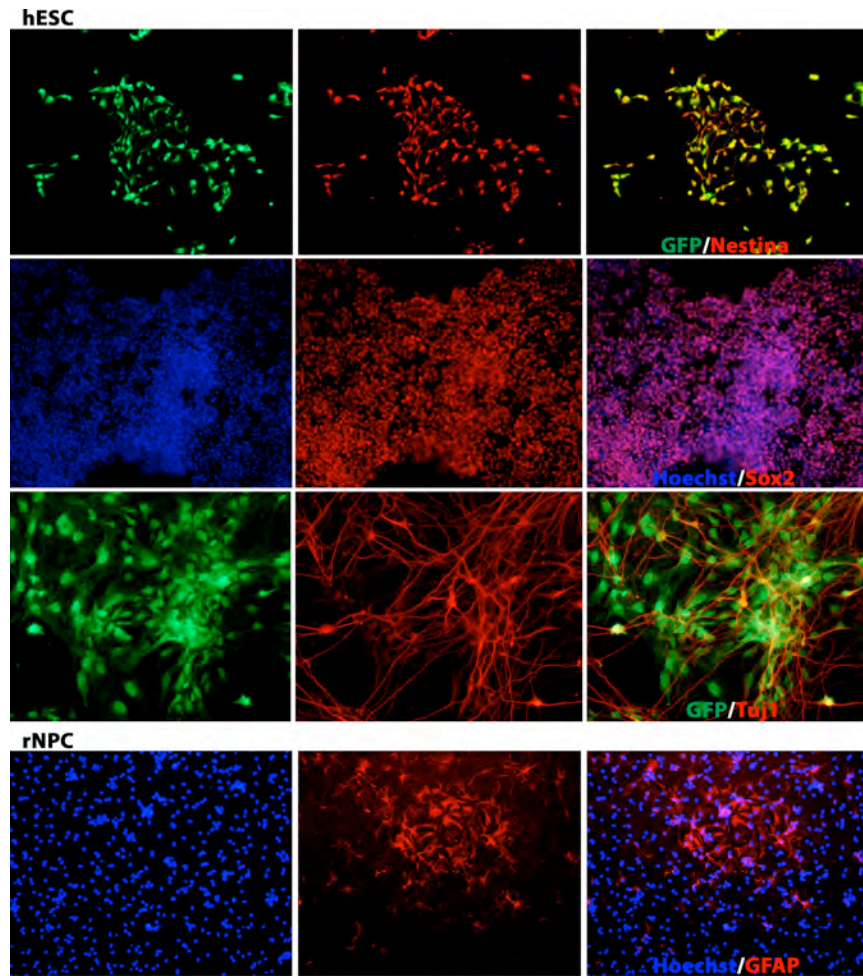


Figura 15. Los anticuerpos neurales utilizados para la caracterización por inmunofluorescencia son funcionales. Detección de marcadores de linaje neural: Nestina, Sox2 y Tuj1 en células troncales embrionarias humanas H9 (*hESC*, del inglés *Human Embryonic Stem Cells*) sometidas a un protocolo de diferenciación hacia linaje neural dopaminérgico; mientras que GFAP se observa en un cultivo primario de precursores neurales de rata (rNPC).

Como podemos observar todos los anticuerpos utilizados reconocen de manera específica su antígeno. Teniendo ya la certeza de que los anticuerpos son funcionales, se pudo continuar con la caracterización mediante inmunofluorescencia.



Al realizar la caracterización por inmunofluorescencia de las células provenientes de estos agregados disociados en el medio de diferenciación NB, observamos que no se detectó la expresión de ninguno de los marcadores de células diferenciadas de linaje neural, GFAP para astrocitos y Tuj1 para neuronas. Aún cuando se observó un cambio morfológico en las células provenientes de los agregados en la condición neural. Además, se evaluó la presencia de marcadores de células epidermales terminalmente diferenciadas, esto mediante la detección de K10, sin embargo tampoco hubo células positivas para este marcador.

Lo que sí se observó fue que se mantuvo la expresión de K5 y Vimentina tras el protocolo de diferenciación (Fig. 16). Por su parte la condición epidermal de diferenciación tampoco mostró expresión de ninguno de los marcadores de linaje neural, y de igual manera se mantuvo la expresión de K5 y Vimentina, marcadores que presentan los queratinocitos desde un inicio.

Por lo tanto, las células diferenciadas en ambas condiciones mantienen el fenotipo  $K5^{+}Vim^{+}$ , al igual que los queratinocitos cultivados en condiciones normales de propagación. Con esto podemos decir que no se está obteniendo un fenotipo neural maduro tras la diferenciación *in vitro*, a pesar de la ganancia de expresión de Nestina en los agregados en medio NBF, y que la expresión de K5 y Vimentina es constante durante la propagación de queratinocitos, la inducción neural en suspensión de los mismos y al final de la diferenciación neural *in vitro*.

En cuanto a los marcadores de precursores neurales, podemos ver que los queratinocitos humanos ganan la expresión de Nestina tras la inducción neural según lo observado en la caracterización de las esferas generadas de queratinocitos P5 en los tres experimentos independientes (Fig. 12). Sin embargo, se esperaba que al adquirir la expresión de Nestina, marcador de células precursoras neurales, las células obtuvieran marcadores de células neurales o gliales maduras tras el protocolo de diferenciación, y lo que en realidad ocurre es que mantienen el fenotipo inicial de los queratinocitos (Fig. 16).

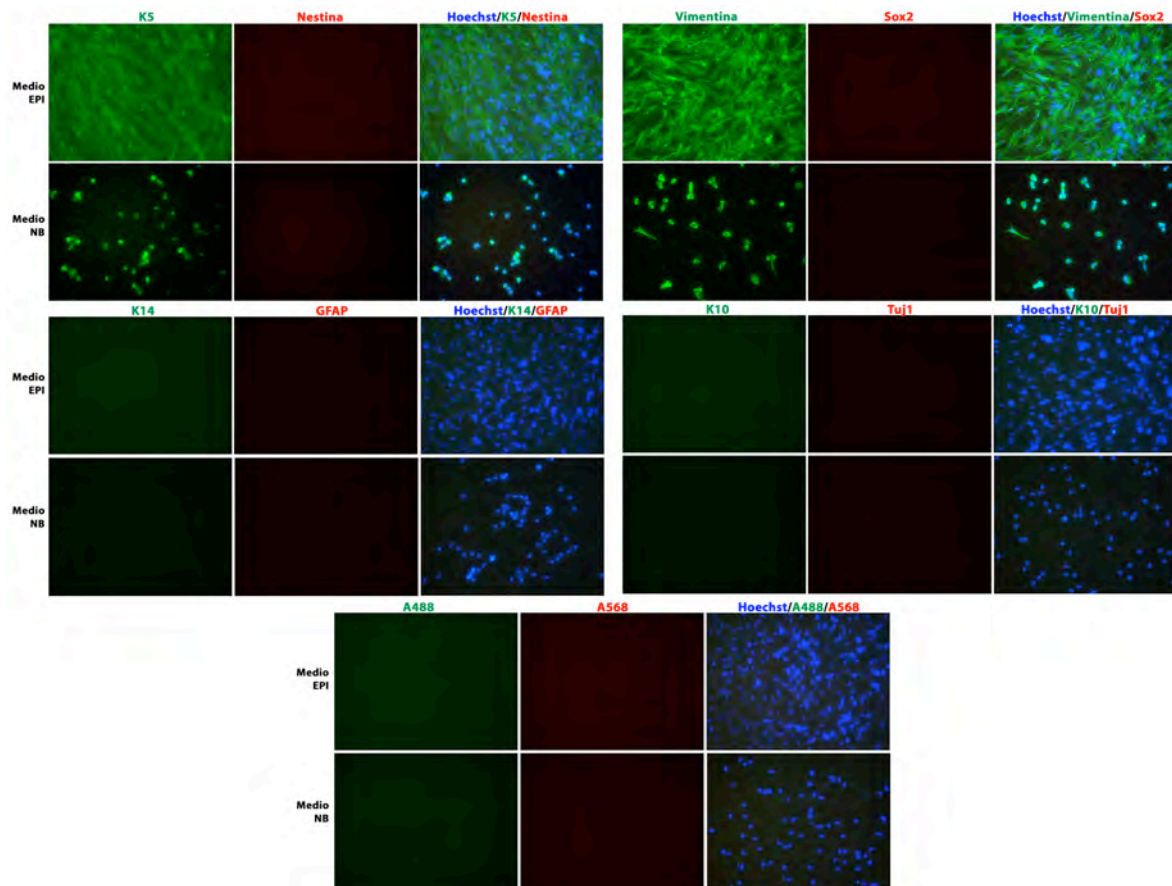


Figura 16. No hay detección de marcadores de linaje neural en células diferenciadas (medio NB) provenientes de esferas generadas en medio NBF. Se llevó a cabo la detección de K5, K10, K14, Vimentina, Nestina, Sox2, Tuj1 y GFAP. En el panel inferior central, se observan A-488 y A-568, controles negativos sin anticuerpo primario para Alexa 488 y Alexa 568, respectivamente, para cada condición (Objetivo 20X, n=3).

Debido a la falta de claridad en estos resultados, necesitamos conocer de manera más certera los niveles de expresión de Nestina en el proceso de inducción neural, así como después de la diferenciación, por lo que se recurre el análisis de expresión génica mediante PCR.

## VI.V Detección cuali y cuantitativa de marcadores epidermales y neurales

En primer lugar se realizó la detección de dos diferentes marcadores constitutivos, GAPDH y  $\beta$ -actina, utilizando como control positivo dos muestras obtenidas de la diferenciación de células troncales embrionarias humanas (CTE) hacia linaje dopaminérgico, las cuales pertenecían a diferente etapa de diferenciación, una era de 14 días (D14) y la otra de 38 días (D38). Además, se realizó la detección en una muestra de queratinocitos pase 5 (Q-P5).

Podemos observar que se amplificó el producto esperado de GAPDH en las dos muestras control D14 y D38, aunque no se observa banda en la muestra de Q-P5, lo cual es muy probable que se deba a una falla en el pipeteo del cDNA de esta muestra al momento de hacer la mezcla, ya que este gen control se expresa de manera constitutiva en todas las células de mamífero (Fig.17). Para el caso de la detección de  $\beta$ -actina, ocurrió lo mismo que en GAPDH pero esta vez la ausencia de banda se dio en la muestra D38, y al ser también un gen constitutivo, la explicación más probable es un error al momento de poner el cDNA de la muestra.

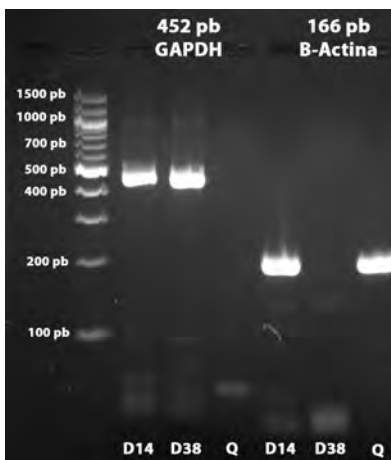


Figura 17. Estandarización de GAPDH y  $\beta$ -actina. Se detectaron estos marcadores en tres diferentes muestras, D14, D38 y queratinocitos pase 5 (Q-P5), todas provenientes de humano. La condición de amplificación fue con una  $T_m = 66^\circ\text{C}$ , por 30 ciclos.

También se realizó la detección de marcadores neurales y epidermales en muestras utilizadas como control positivo. Para el caso de los marcadores neurales Nestina y Sox2, se utilizaron las muestras D14. Mientras que para los marcadores epidermales K5 y Vimentina, se utilizaron muestras de diferentes líneas celulares como HeLa, MCF-7 y A549, las cuales ya se ha reportado que expresan estos marcadores, además de la muestra de queratinocitos pase 5 (Q-P5).

Nestina no pudo ser amplificada en la muestra D14, por lo que se buscó en días más tempranos de la diferenciación. Sox2 sí se amplificó en la muestra D14, por lo que de aquí en adelante se utiliza esta muestra como el control positivo para este marcador. K5 presentó varios productos de amplificación en todas las muestras utilizadas, aunque sólo en las líneas celulares HeLa y MCF-7 se observó el fragmento esperado de 656 pb. Vimentina pudo ser detectada en todas las muestras, tanto en las líneas control como en los queratinocitos. Y finalmente GAPDH se logró amplificar en todas las líneas control para marcadores epidermales con el producto esperado de 452 pb (Fig. 18).

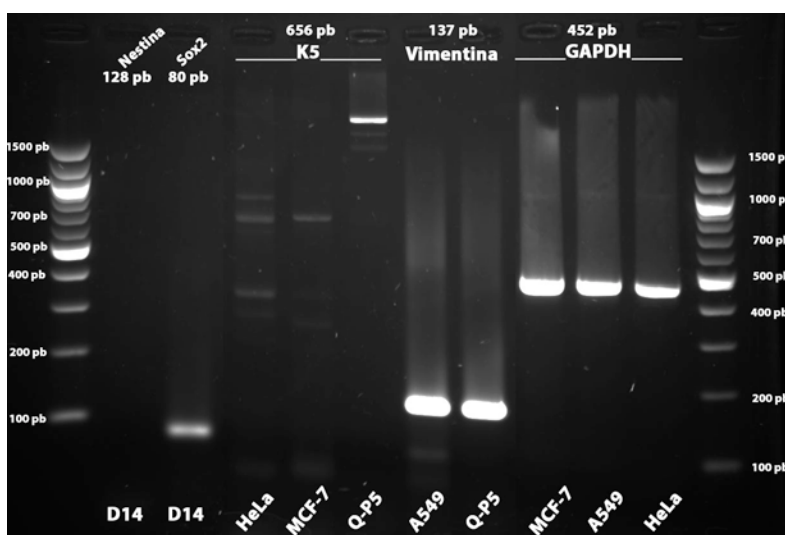


Figura 18. Detección de marcadores neurales y epidermales en muestras control. Detección de GAPDH como control de carga. La condición de amplificación fue con una  $T_m = 66^\circ\text{C}$ , por 30 ciclos.

Con base a esta estandarización se decidió que la muestra D14 fuese el control positivo para Sox2, y la muestra de A549 fuera el control positivo de Vimentina. Además, se requiere buscar Nestina en muestras más tempranas del protocolo de diferenciación y se necesita realizar una curva de temperatura y concentración de  $MgCl_2$  para la detección de K5.

Ya que Nestina no se observó en la muestra D14, se realizó otra PCR utilizando muestras de tres días diferentes, día 7 (D7), D14 y D38. En esta ocasión si se amplificó Nestina en la muestra D14. Sin embargo también se obtuvo el producto esperado en muestras D7 y D38 (Fig. 19). Por lo tanto se decidió utilizar la muestra D7 como control positivo para Nestina.

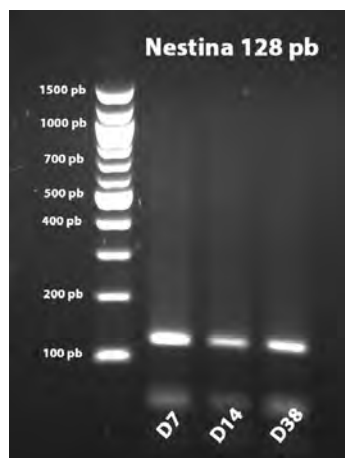


Figura 19. Detección de Nestina. Se llevó a cabo la amplificación de Nestina en muestras de diferentes días, provenientes del protocolo de diferenciación dopaminérgico en la línea de CTE H9. La condición de amplificación fue con una  $T_m = 66^\circ C$ , por 30 ciclos.

En vista de que no se obtuvo la detección de K5 en las muestras control que debían ser positivas a este marcador (con base a lo observado en inmunotinciones), se realizó la curva de temperatura y  $[MgCl_2]$ , con el fin de encontrar las condiciones óptimas de amplificación de este gen.

Se evaluaron 6 concentraciones de  $MgCl_2$ , las cuales fueron 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM y 3mM. Estas concentraciones fueron probadas en 12 temperaturas diferentes, que van desde los 55 °C hasta los 65.5 °C, ya que la  $T_m$  de los oligos son 57.6 y 56.8 °C (Fig. 20). Lo que observamos fue que no se obtuvo la amplificación del producto esperado en ninguna de las condiciones, ni de temperatura ni de  $[MgCl_2]$ . Por lo tanto es necesario buscar otro par de oligos para esta citoqueratina, sin embargo en la literatura no se ha logrado encontrar reportadas las secuencias de oligos utilizadas para K5 que si funcionen de manera apropiada para amplificar este gen.

Finalmente se realizó la detección únicamente de Vimentina, Nestina y Sox2, los cuales se pudieron estandarizar exitosamente en sus células control, por lo que se continuó con la detección de estos genes en muestras del experimento E1, E2 y E3 para el pase 5. Previo a la detección de estos marcadores en las muestras de P5 de los tres diferentes experimentos, se realizó un tratamiento con DNasa, en todas las muestras experimentales que serán analizadas (E=Esferas epidermales, N=Esferas neurales, ED=Células diferenciadas de esferas epidermales, ND= Células diferenciadas de esferas neurales, Q-1=Queratinocitos del E1, Q-2=Queratinocitos del E2, Q-3=Queratinocitos del E3), y en las muestras control de cada gen. Tras el tratamiento con DNasa se realizó un PCR para la amplificación de GAPDH, con el fin de corroborar que no hubiera contaminación con DNA genómico. Esto se hizo tanto en muestras con retro transcripción (RT) y sin RT, de todas las condiciones experimentales que se evaluaron, así como de las muestras usadas como control positivo para los diferentes marcadores. Una vez que ya corroboramos que no existe contaminación con DNA genómico en las muestras experimentales, se realizó el PCR para la detección de Vimentina, Nestina y Sox2 en los tres experimentos independientes.

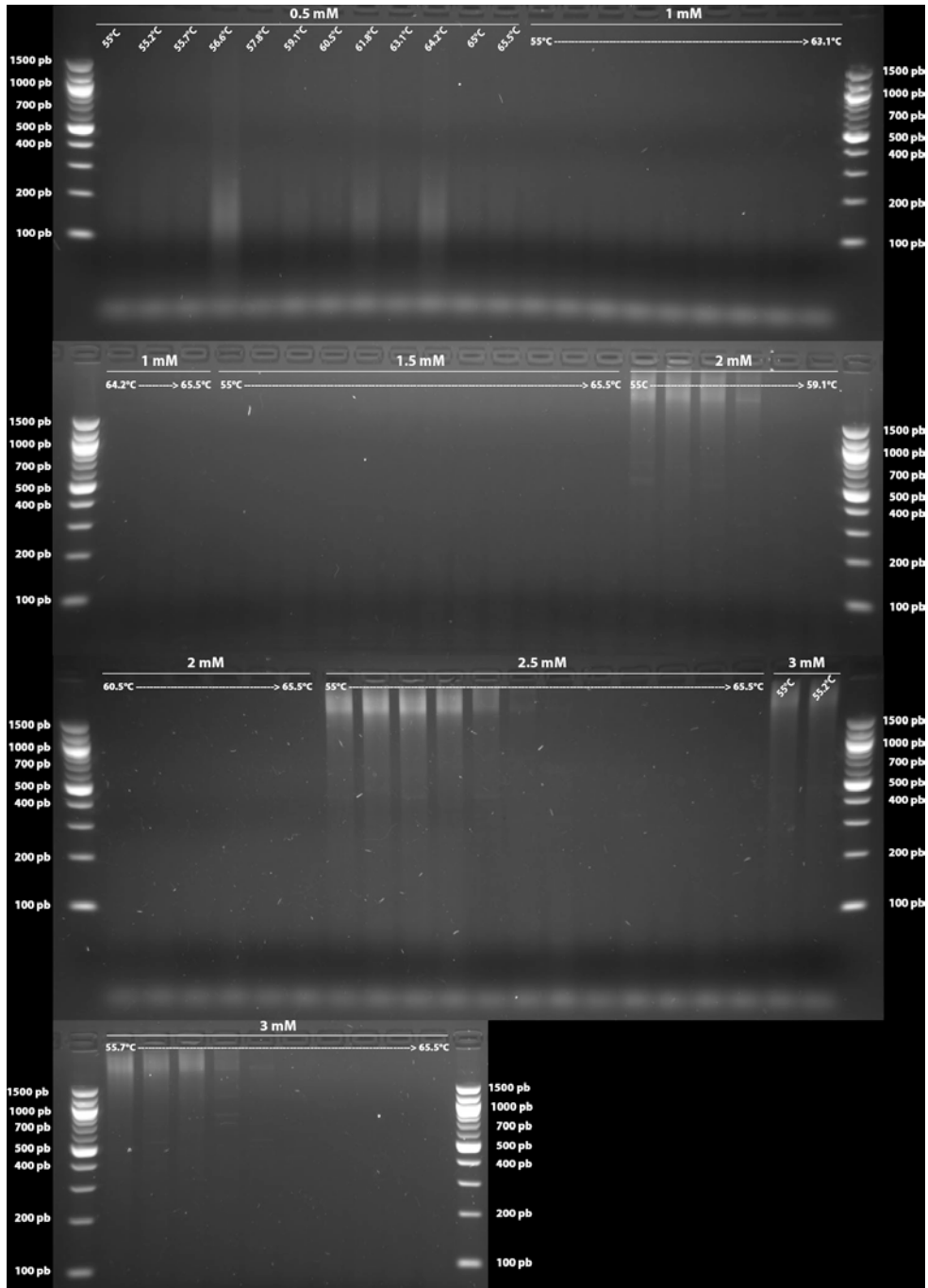


Figura 20. Curva de concentración de  $MgCl_2$  para la detección de K5. La detección de la citoqueratina 5 se realizó utilizando cDNA de células MCF-7.

Lo que se observó para la amplificación de Vimentina en el E1, fue que se amplificó este cDNA en esferas de medio neural y epidermal. Se detectó también en células diferenciadas de esferas en medio EPI, pero no en células diferenciadas de esferas en medio NB. Los queratinocitos sí expresaron Vimentina pero aparentemente en menor nivel. En cuanto a Vimentina en los experimentos E2 y E3, se observó la expresión del gen en todas las condiciones, es decir, en esferas de medio EPI y medio NBF, en células diferenciadas de esferas EPI y de esferas NB, así como en los distintos pases de queratinocitos (Fig. 21).

Para el caso de Sox2, no se logró la amplificación en ninguna de las condiciones, en tres experimentos independientes (Fig. 22). Y finalmente Nestina, en lo que respecta al E1, se observó un nivel bajo de expresión en esferas epidermales y neurales (E1 y N1). Se detectó también en células diferenciadas de esferas epidermales (ED1) pero no en las células diferenciadas de la condición neural (ND1), lo cual es de esperarse si las células están diferenciando. Sin embargo, los queratinocitos mostraron expresión de Nestina, marcador de linaje neural, que no se había detectado en estas células mediante inmunofluorescencia.

Se observó la expresión de Nestina en E2 y E3 en todas las condiciones: esferas en medio EPI y en medio NBF; en células diferenciadas de esferas en medio EPI y en medio NBF e incluso en queratinocitos (Fig. 23).

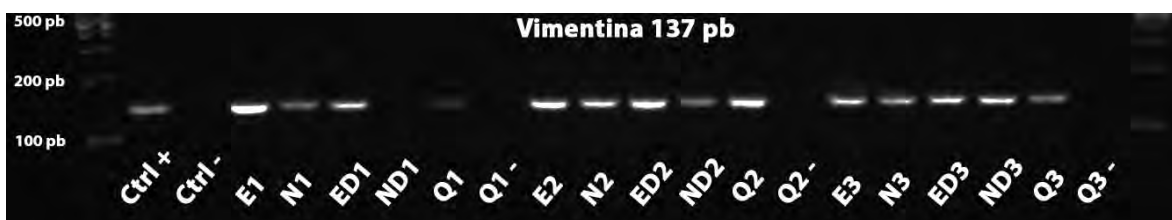


Figura 21. Vimentina se expresa en E1-P5, E2-P5, E3-P5. En el primer carril se observa el control positivo, el cual es la línea celular A549. El segundo carril, contiene la muestra blanco del PCR. E=Esferas epidermales, N=Esferas neurales, ED=Células diferenciadas de esferas epidermales, ND= Células diferenciadas de esferas neurales, Q=Queratinocitos antes de la inducción; Q1-, Q2- y Q3- =Queratinocitos de cada experimento sin RT. 1, 2 y 3 hacen referencia a experimentos independientes.





Figura 22. Sox2 no presenta expresión en E1-P5, E2-P5, E3-P5. En el primer carril se observa el control positivo, el cual es la muestra D14. El segundo carril, contiene la muestra blanco del PCR. E=Esferas epidermales, N=Esferas neurales, ED=Células diferenciadas de esferas epidermales, ND= Células diferenciadas de esferas neurales, Q=Queratinocitos antes de la inducción; Q1-, Q2- y Q3- =Queratinocitos de cada experimento sin RT. 1, 2 y 3 hacen referencia a experimentos independientes.

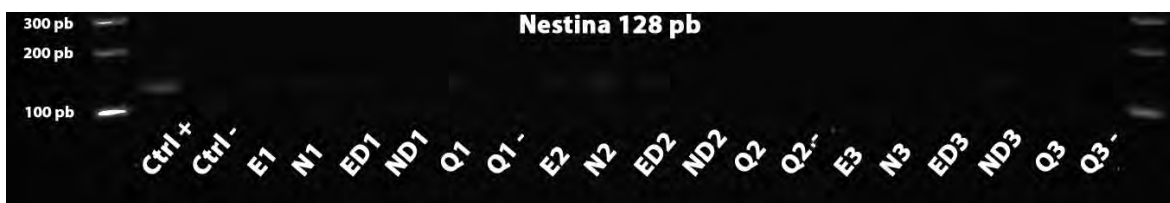


Figura 23. Nestina se expresa en E1-P5, E2-P5, E3-P5. En el primer carril se observa el control positivo, el cual es la muestra D7. El segundo carril, contiene la muestra blanco del PCR. E=Esferas epidermales, N=Esferas neurales, ED=Células diferenciadas de esferas epidermales, ND= Células diferenciadas de esferas neurales, Q=Queratinocitos antes de la inducción; Q1-, Q2- y Q3- =Queratinocitos de cada experimento sin RT. 1, 2 y 3 hacen referencia a experimentos independientes.

Dados los resultados anteriores, es necesario realizar la detección de Nestina mediante PCR en tiempo real, para detectar de manera concreta un aumento o disminución en los niveles de expresión de este marcador, entre las condiciones neurales y epidermales. Para ello, se realizó un análisis cuantitativo de los niveles de expresión de Nestina en las diferentes condiciones experimentales, mediante q-PCR, incluyendo los queratinocitos cultivados en monocapa y en medio epidermal antes de someterse a la inducción neural. Los niveles de expresión de Nestina fueron normalizados con la expresión del gen  $\beta$ -actina, el cual es un gen constitutivo de células de mamífero.

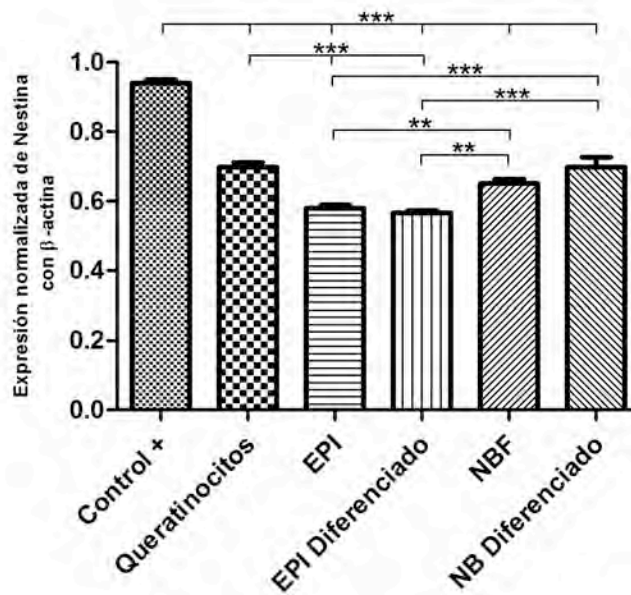


Figura 24. Análisis cuantitativo de los niveles de expresión de Nestina. *Control +*, muestra D7 del protocolo de diferenciación de CTE H9. *Queratinocitos*, células cultivadas en condiciones de propagación antes de la inducción neural. *EPI*, esferas obtenidas en medio epidermal. *NBF*, esferas obtenidas en medio de inducción neural NBF. *EPI Diferenciado*, células procedentes de agregados en medio EPI, puestas en condiciones de diferenciación. *NBF Diferenciado*, células procedentes de agregados en medio NBF, puestas en condiciones de diferenciación en medio NB. Los niveles de expresión del gen Nestina fueron normalizados con la expresión del gen constitutivo -Actina. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía, con el test de Newman-Keuls. \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

Observamos de manera inesperada que los queratinocitos expresan Nestina en condiciones de propagación, lo cual no se había observado en los análisis de inmunofluorescencia. Por otro lado, la expresión de este gen en las diferentes condiciones evaluadas se mantuvo sin un aumento significativo comparado con el valor obtenido en los queratinocitos, aún cuando previamente la expresión de Nestina sólo se había logrado detectar en esferas de medio NBF por medio de inmunotinciones (Fig. 24).

Finalmente tras la caracterización realizada mediante inmunofluorescencia, RT-PCR y q-PCR podemos concluir de la parte experimental *in vitro*, que las condiciones empleadas para la diferenciación neural no propician la maduración hacia linajes neurales terminalmente diferenciados.

Además, la inducción neural que pareciera lograr una ganancia de la expresión de Nestina en las células epidermales humanas, en realidad no es significativa, ya que se descubrió que los queratinocitos expresan este gen antes de ser sometidas al cultivo en suspensión en el medio NBF. Es por ello que se decidió analizar la capacidad de diferenciar a linaje neural de estas células en un nicho neurogénico, que permita llevar a cabo una desdiferenciación de células epidermales hacia células neurales al presentarse las señales neurales necesarias para este cambio de identidad.

## **VI.VI Células epidermales son capaces de expresar marcadores neurales tras su trasplante en el cerebro en desarrollo**

El hecho de que los queratinocitos humanos no pudieron diferenciarse de manera in vitro hacia linaje neural, sugiere que estas condiciones no contaban con las señales celulares adecuadas para la inducción neural. Por lo tanto, se decidió probar la diferenciación hacia células neurales de manera in vivo, esto mediante la el implante de células epidermales en el sistema nervioso de rata, justo en el momento del desarrollo embrionario donde se lleva a cabo la neurogénesis.

Para poder llevar a cabo la detección de las células trasplantadas en el SNC de los embriones de rata, fue necesario marcar previamente con un gen reportero las células que se inyectarían en el cerebro de estos embriones. Para ello se decidió efectuar una transducción lentiviral de la proteína GFP en los queratinocitos humanos.

Lo primero que se realizó para la transducción de los queratinocitos fue la producción de los lentivirus en células HEK<sub>293T</sub> mediante la transfección de éstos. La eficiencia de la transfección fue de aproximadamente 80 % de células GFP<sup>+</sup> (Fig. 25).

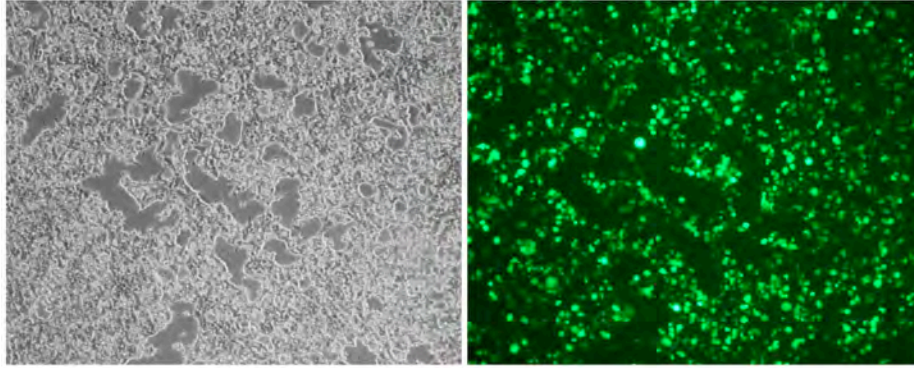


Figura 25. Transfección de células HEK293<sub>T</sub> para la expresión de GFP. En el panel de la izquierda se muestra una micrografía en campo claro de las células HEK293<sub>T</sub> en monocapa, mientras que en la micrografía de la derecha se observa el mismo campo celular pero con fluorescencia para detectar la GFP expresada en las células que incorporaron los plásmidos para generar las partículas lentivirales a las 72 horas post-transfección.

Una vez que se llevó a cabo la recolección de los virus, se procedió a realizar la determinación del título viral sobre los queratinocitos humanos. En términos de porcentaje obtuvimos un 26.8 % de células transducidas con la dilución inicial 1:1, 9.1 % en la dilución 1:5 y un 2.2 % con la dilución 1:25 (Fig. 26).

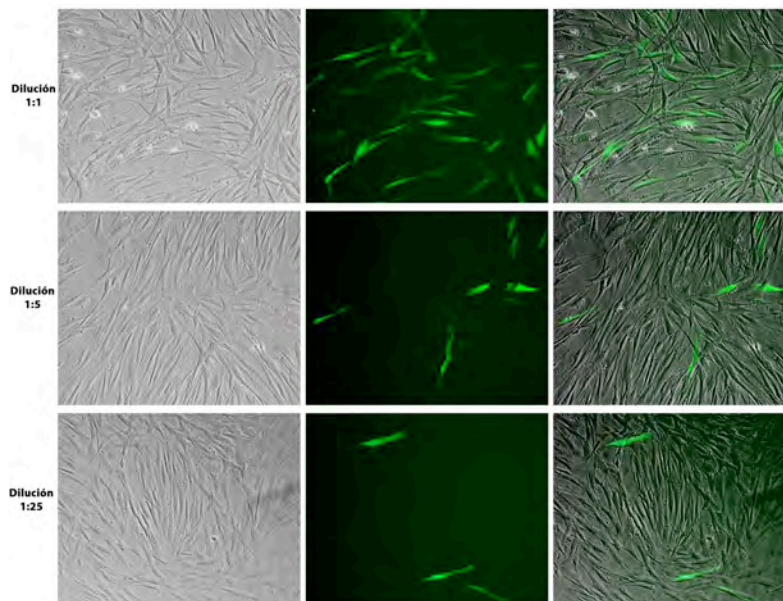


Figura 26. Titulación viral en queratinocitos humanos. Se muestran diferentes diluciones seriadas. Objetivo 20X.

Este lote de virus se utilizó para llevar a cabo la transducción de queratinocitos humanos, los cuales posterior a su transducción fueron cultivados en condiciones neuralizantes para luego ser trasplantados en el SN de embriones de rata, y así lograr evaluar si en condiciones in vivo estas células son capaces de diferenciar a fenotipos neurales. Antes de someter las células epidermales a las condiciones neurales se analizó su morfología después del proceso de transducción lentiviral, y observamos que las células presentaron una morfología más alargada y filamentosa a comparación de queratinocitos sin transducir, y el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> fue de aproximadamente el 30 % (Fig. 27A).

En vista de que el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> resultó por debajo del 50 % se decidió llevar a cabo un enriquecimiento celular mediante citometría de flujo utilizando la separación celular activada por fluorescencia (FACS, del inglés *Fluorescence Activated Cell Sorting*). De esta manera primero se separaron las células individuales (P1) para así descartar dobletes y cúmulos celulares (Fig. 27 B). Después se grafica esta población P1 en términos de complejidad y tamaño (SSC-A vs FSC-A) para seleccionar los eventos que corresponden a los queratinocitos (P2), excluyendo la debris celular (Fig. 27 C). Finalmente, dentro de la población de queratinocitos P2 únicamente se recolectan las células que son GFP<sup>+</sup> y que presentaron una intensidad de fluorescencia con valores arriba de  $10^4$  (Fig. 27D).

Como se observa en la figura 27E, la porción de células recuperadas de la separación por FACS nos dio una población de queratinocitos humanos 100 % positivos para GFP, aunque se observa una heterogeneidad en la intensidad de fluorescencia presente en las células.

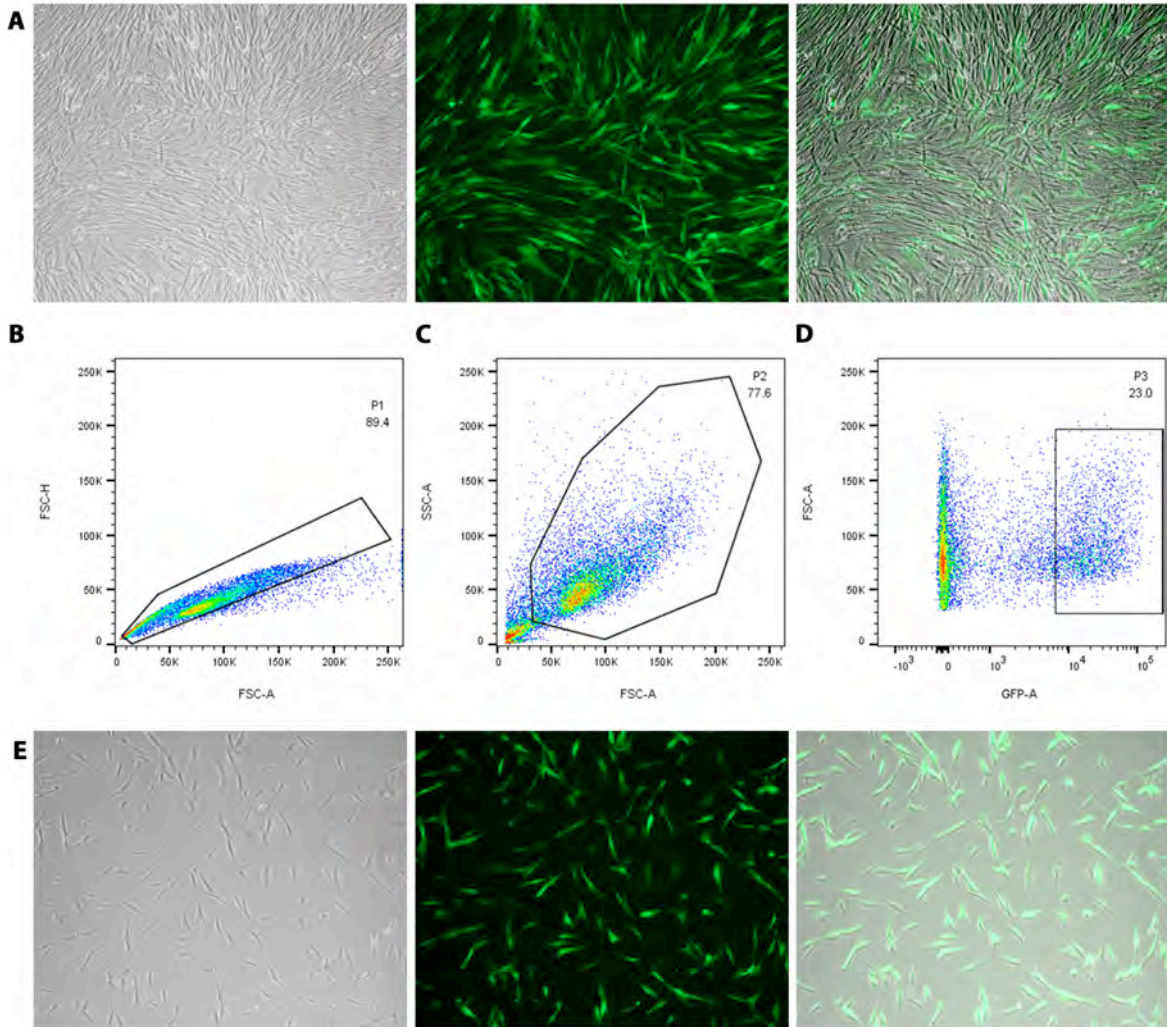


Figura 27. Enriquecimiento de queratinocitos GFP<sup>+</sup> mediante FACS. A, queratinocitos transducidos con GFP mediante lentivirus antes de ser sometidos a separación celular por FACS. B, exclusión de dobletes y cúmulos celulares en un plot de tamaño (FSC-H vs FSC-A), para aislar células individuales. C, exclusión de debris celular en un plot de complejidad vs tamaño (SSC-A vs FSC-A). D, selección de células GFP<sup>+</sup> con valores arriba de 10<sup>4</sup> para la intensidad de fluorescencia. E, queratinocitos transducidos con GFP mediante lentivirus a las 24 horas después de ser sometidos a separación celular por FACS.

Una vez que se logró enriquecer la población de queratinocitos positivos a GFP, pasando de un 30 % (Fig. 27A) a un 90 % de células GFP<sup>+</sup> (Fig. 28A), se realizó la inducción neural de estas células en suspensión, de la misma manera que ya se había hecho en los experimentos anteriores. De igual manera que en los experimentos E1, E2 y E3, se realizó el cultivo de los queratinocitos GFP<sup>+</sup> tanto en medio EPI como en medio NBF (Fig. 28B).

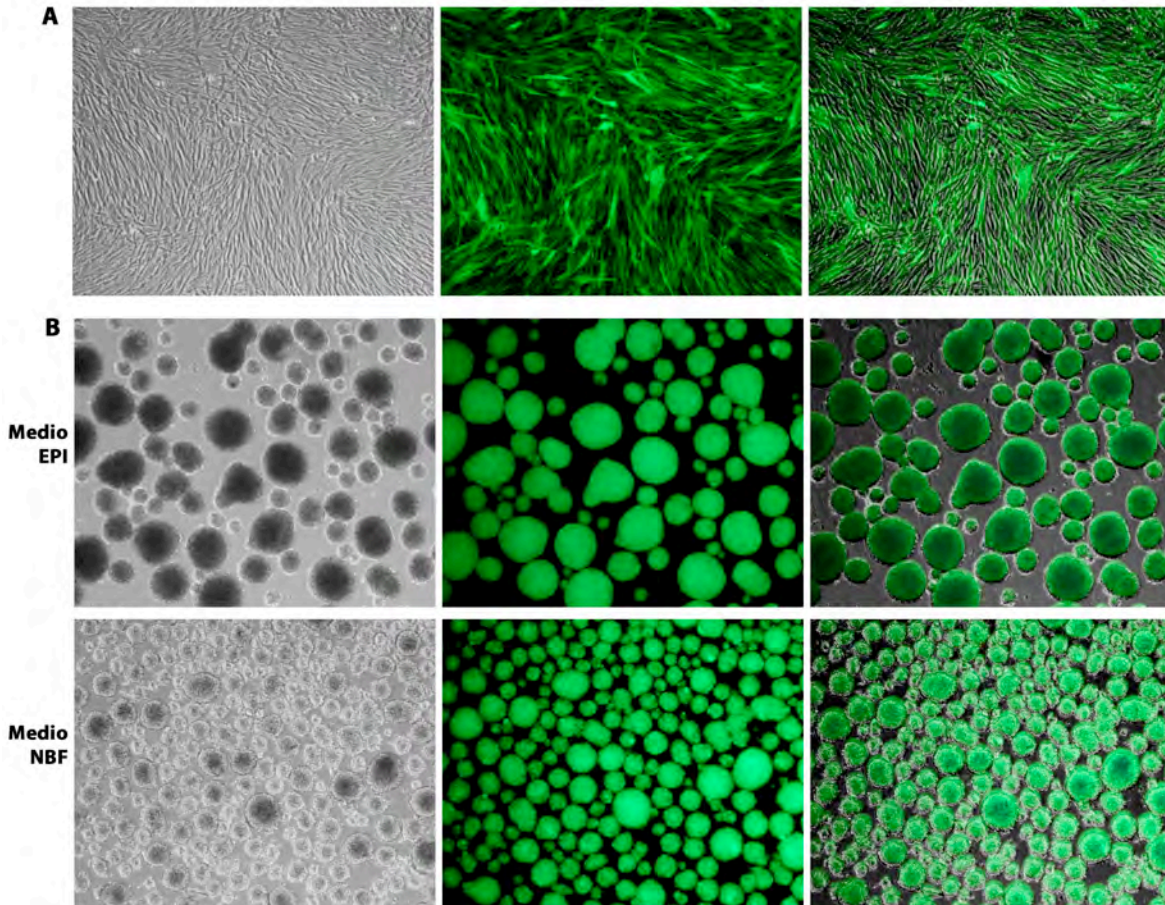


Figura 28. La expresión de GFP en queratinocitos no altera la formación de agregados tras la inducción neural. A, cultivo en monocapa de queratinocitos GFP+ (sometidos a FACS) al 90 % de confluencia, previo a la inducción neural en suspensión. B, se observan agregados obtenidos de queratinocitos GFP<sup>+</sup> en medio EPI (condición control) en el panel superior, y agregados en medio NBF en el panel inferior.

Podemos notar que la diferencia de tamaño, siendo mayores las esferas en medio EPI que aquellas en medio NBF, así como la morfología de los agregados en estas dos condiciones se mantiene aun después de la transducción de GFP en los queratinocitos.

Después de 4 días en el cultivo en suspensión, estos agregados celulares son disociados mecánicamente con tripsina para obtener una suspensión celular que fue trasplantada en el SN de embriones de edad gestacional E12. A cada embrión se le inyectaron  $4.5 \times 10^5$  células, y como vehículo control se utiliza medio DMEM-F12.

Se realizaron un total de 3 cirugías, en cada rata gestante se realizó el trasplante en 2 a 3 embriones por condición, las cuales son: 1) Epidermal (medio EPI), 2) neural (medio NBF) y 3) vehículo (medio DMEM-F12). Se dejó que continuara su desarrollo gestacional 4 días más, para después recuperar los embriones y poder llevar a cabo la detección por inmunofluorescencia de marcadores neurales presentes en las células GFP<sup>+</sup> trasplantadas.

Lo que observamos en los cortes del SN de embriones de rata E16, fue que tanto en las condiciones epidermales (Fig. 29) como en las condiciones neuralizantes (Fig. 30) se logró detectar células positivas para GFP, que además expresaron al mismo tiempo el marcador de linaje neural Tuj1, el cual detecta neuronas tempranas.



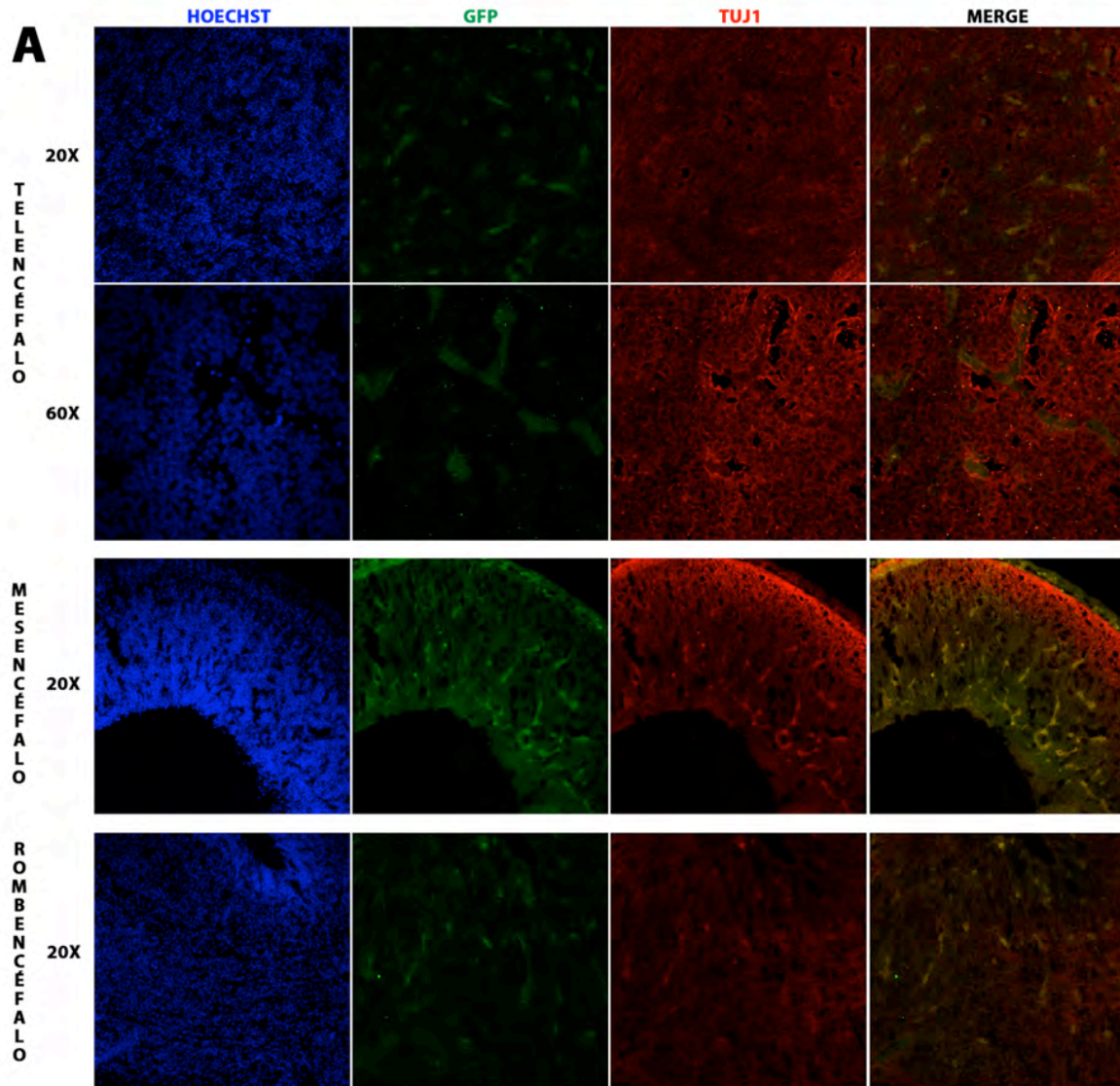


Figura 29. Células GFP<sup>+</sup> de la condición epidermal, son capaces de integrarse en el SN de ratas y expresar el marcador neural Tuj1. Caracterización de células obtenida de agregados en medio EPI tras la diferenciación *in vivo* en el SN de embriones de rata.

A pesar de que en ambas condiciones se detectaron células positivas tanto para GFP como para Tuj1, existen diferencias en las dos condiciones. Para empezar la condición epidermal, mostró prevalentemente estas células GFP<sup>+</sup>/Tuj1<sup>+</sup> ubicadas en la región más anterior del cerebro, es decir tanto en telencéfalo como en mesencéfalo, mientras que en la condición neural las células con este fenotipo se encontraron principalmente en regiones del rombencéfalo.

Otra diferencia que encontramos entre las dos condiciones, epidermal y neural, fue que únicamente las células provenientes de agregados en la condición de medio NBF presentaron una morfología de tipo neuronal, la cual consiste en un soma redondeado con prolongaciones de tipo axonal, además de tener el fenotipo GFP<sup>+</sup>/Tuj1<sup>+</sup> (Fig. 30, región del rombencéfalo).

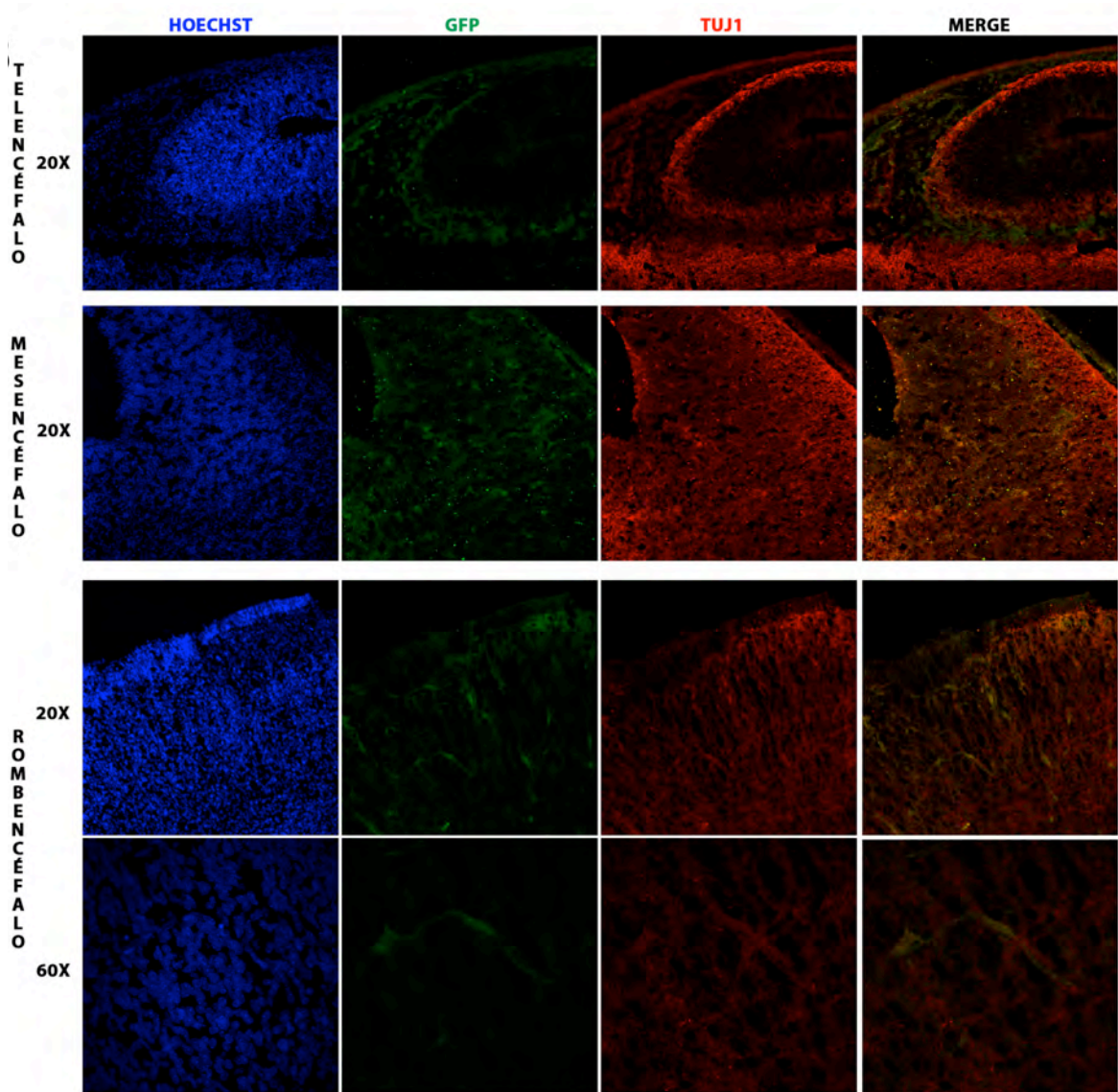


Figura 30. Células GFP<sup>+</sup> de la condición neuralizante, son capaces de integrarse en el SN de ratas expresando el marcador Tuj1 y además con una morfología de tipo neuronal. Caracterización de células obtenida de agregados en medio NBF tras la diferenciación *in vivo* en el SN de embriones de rata.

## VII.- DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de diferenciación hacia linaje neural que poseen las células epidermales obtenidas de muestras de prepucio humano, las cuales son sometidas a condiciones neuralizantes. Estas condiciones consistieron en el cultivo celular en suspensión con un medio proliferante, cuyos componentes principales son el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). Otros grupos de trabajo, previamente han reportado el uso de medios de cultivo con estos dos factores de crecimiento para la propagación de precursores neurales [52-54]. Sin embargo hay que mencionar que en el trabajo realizado por nosotros anteriormente, ya habíamos encontrado que además de la presencia de estos dos mitógenos, es necesaria la adición del suplemento B27 para poder lograr una inducción a la formación de agregados celulares [49].

A pesar de utilizar un medio que contiene B27, EGF y bFGF, en este trabajo estas condiciones no fueron suficientes para la formación de agregados, por lo que se tuvo que modificar el protocolo para la formación de estas esferas celulares. La condición que logró la formación eficiente de estos agregados fue el cultivar las células en este medio denominado NBF, pero esta vez empleando cajas que permitieran el cultivo en suspensión de las células.

Observamos que las condiciones de suspensión ayudan a la formación de agregados de manera más eficiente que un cultivo en monocapa, ya que permiten un mayor contacto célula-célula, lo cual lleva a una señalización paracrina entre las células presentes en el cultivo, las cuales pueden encontrarse en distintos niveles de diferenciación o poseer diferentes capacidades de respuesta a los factores de crecimiento. De esta manera, células que no son tan responsivas a los factores de crecimiento, pueden ser inducidas a una mayor proliferación por células vecinas que si respondan a ese estímulo [42, 55].

Algo que observamos tras el cultivo en suspensión de los queratinocitos humanos, fue que únicamente en las células provenientes de agregados obtenidos en el medio de inducción neural NBF, se llevó a cabo un cambio morfológico en las células que los conformaban, el cual consistió en una disminución de tamaño y un parecido a células precursoras neurales.

Este cambio de fenotipo se evaluó mediante inmunofluorescencia en cortes de las esferas obtenidas, y lo que observamos fue que únicamente aquellas que se encontraban en medio NBF lograron expresar el marcador de precursores neurales Nestina. Las esferas del medio EPI no expresaron Nestina y mantuvieron la expresión de la citoqueratina 5 y Vimentina, lo cual correlaciona con el hecho de que aquellas células provenientes de agregados en medio EPI mantienen la morfología de los queratinocitos iniciales.

A pesar de que pareciera estarse dando un cambio de identidad celular tras el cultivo en suspensión de los queratinocitos en medio NBF, reflejado en la ganancia de expresión de Nestina en los agregados y en el cambio morfológico al disociarlos, cuando estas células disociadas se someten a condiciones de diferenciación, no cambia su fenotipo más allá del cambio morfológico y de manera inesperada pierden la expresión del marcador de Nestina que ya se había detectado en los cortes de las esferas. Esto lo corroboramos al evaluar la presencia de marcadores de linaje neural temprano y tardío, y lo que obtuvimos fue que no hubo células que expresaran ninguno de los marcadores neurales tempranos ni maduros, en las células disociadas.

Estos resultados hacen pensar que el simple hecho de crecer las células de los agregados en condiciones de adhesión lleva a la pérdida de expresión de Nestina, marcador de precursores neurales. Esto puede ser una prueba de que ciertamente sólo en la condición de cultivo en suspensión, la activación de vías de señalización que se da entre las células que los conforman permite activar la expresión de ciertos genes, y al perderse ese contacto célula-célula que se tiene en ese microambiente generado en la estructura tridimensional del agregado, las células ya no son capaces de llevar a cabo esta expresión [56].

Sin embargo, al realizar el análisis de expresión de Nestina, observamos que los queratinocitos humanos antes de ser sometidos a la inducción neural cuentan con la expresión de este gen, lo cual no se había detectado mediante inmunofluorescencia. De igual manera, tanto en las esferas de medio NBF como en las de medio EPI, así como en las células diferenciadas de ambas condiciones, también se encontró la expresión de Nestina. Aunque Nestina comúnmente se considera marcador de células progenitoras del SNC [57], algunos otros autores consideran a este gen como marcador de células indiferenciadas (CT y PAT) de otros linajes específicos [58-60].

En cuanto al tejido de la piel, ya se ha reportado la existencia de células epidermales positivas a Nestina, sin embargo la población que presenta este marcador se encuentra en la vaina reticular externa del folículo piloso [61]. Estas células Nes<sup>+</sup> son consideradas como CT epidermales del folículo piloso que presentan un fenotipo CD34<sup>+</sup>Nestina<sup>+</sup>K15<sup>-</sup>, lo que sugiere que se encuentran en un estado indiferenciado y pluripotente, siendo capaces de generar células de diferentes linajes, incluyendo células neurales, tanto *in vitro* como *in vivo* [62]. Algunos autores mencionan que las CT epidermales del folículo piloso son CD34<sup>+</sup>Nestina<sup>+</sup>K15<sup>-</sup>, mientras que aquellas que se encuentran en la membrana basal de la epidermis son K15<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>Nestina<sup>-</sup> [63]. Sin embargo, por otro lado se ha demostrado que en la capa basal de la epidermis se cuenta con dos tipos de CT epidermales Nes<sup>+</sup>, unas presentan una señal de tipo granular y son K14<sup>+</sup>, mientras que las otras son K14<sup>-</sup> y la expresión de Nestina es de tipo fibrilar [64]. Este grupo de trabajo menciona que es posible que durante el proceso de diferenciación celular, todas aquellas células progenitoras de diferentes tejidos disminuyan de manera gradual la expresión de Nestina para ser sustituida por aquellos filamentos intermedios específicos de cada tejido, además de que el cultivo celular puede estar cambiando el fenotipo de las células.

Una manera de tratar de explicar los resultados obtenidos *in vitro* es que a pesar de que se realiza la separación de la epidermis y la dermis para la obtención de los queratinocitos humanos, quizás en un inicio se cuenta con una población en su mayoría de queratinocitos con un fenotipo K5<sup>+</sup>Vim<sup>+</sup> pero que a su vez también exista un número menor de CT Epidermales derivadas del folículo piloso, que son capaces de expresar Nestina. Sin embargo las condiciones de propagación *in vitro* que empleamos para los queratinocitos no son propicias para llevar a cabo la síntesis de dicha proteína y sólo se encuentra el RNA mensajero. De esta manera, al momento de realizar la inducción neural en el medio NBF y en suspensión, se dan las condiciones necesarias para que la comunicación célula-célula presente en este microambiente permita no sólo la expresión del gen de Nestina, sino también la síntesis de la proteína. Y así, cuando los agregados son disociados y sembrados en un medio sin los factores de crecimiento, que además también carece de señales neurogénicas, las células no son capaces de mantener ese “estado neural transitorio” obtenido por la expresión de Nestina en un cultivo en suspensión y al mismo tiempo tampoco son capaces de madurar a fenotipos neurales terminalmente diferenciados.

Por lo tanto, las condiciones de diferenciación *in vitro* carecen de los requerimientos necesarios no sólo para alcanzar un fenotipo neural maduro, sino también para retener la expresión de marcadores de precursores neurales a nivel de proteína que se logra adquirir al cultivar estos queratinocitos en suspensión y en un medio con EGF y bFGF. El hecho de que sólo tras la inducción neural se obtenga la síntesis de Nestina, puede explicar el cambio morfológico que se presenta en las células derivadas de estos agregados en medio neural, ya que la presencia de esta proteína de citoesqueleto puede ser la responsable de que ahora las células presenten un menor tamaño.

Por otro lado, en vista de que se parte de una población capaz de expresar Nestina a nivel de mensajero, no era de extrañarse que al momento de trasplantar en el SN en desarrollo de un embrión de rata, las células derivadas de ambas condiciones tanto neural como epidermal, lograrán su integración en el tejido neural, así como la expresión de un marcador de linaje neural maduro, como lo fue Tuj1. Esto se debe a que las células que son trasplantadas parecen poseer esta capacidad de cambiar de un fenotipo epidermal a un fenotipo neural siempre y cuando cuenten con las señales inductoras específicas hacia este linaje, las cuales en este ensayo, son obtenidas del nicho en el que son depositadas al momento de ser trasplantadas, pues justo en esa etapa gestacional del embrión de rata es cuando se está llevando a cabo la neurogénesis [45]. Sin embargo, sería interesante evaluar la capacidad de diferenciación a linaje neural *in vivo* de los queratinocitos cultivados en monocapa en el medio epidermal que se usa para su propagación, ya que como vimos por q-PCR, estas células poseen la expresión génica de Nestina desde un inicio, lo que pudiera reflejar que son una población de células progenitoras epidermales, y cabría la posibilidad de que no se requiera del cultivo en condiciones neuralizantes para poder lograr la expresión de Tuj1 en estas células epidermales antes de ser trasplantadas.

Finalmente podemos decir que los queratinocitos presentan un potencial neural que sólo se logra apreciar cuando se encuentran presentes en un nicho neurogénico que promueve la activación de vías de señalización implicadas en la expresión de genes de linaje neural. Estas condiciones *in vivo* las hace capaces de comenzar a expresar marcadores de neuronas, pero es necesario realizar una caracterización más completa de estas células epidermales GFP<sup>+</sup> que cuentan con la expresión de Tuj1, para poder decir que además de presentar un cambio de fenotipo, también son células neurales funcionales.

## VIII.- CONCLUSIONES

- La condición ideal para la formación de agregados es el cultivo en suspensión en medio NBF.
- Las esferas obtenidas en medio NBF son K5<sup>+</sup>Vim<sup>+</sup>Nes<sup>+</sup> en cualquier pasaje celular.
- Los queratinocitos humanos presentan un cambio morfológico tras la inducción en medio NBF, y tras la diferenciación *in vitro*.
- Las condiciones de diferenciación empleadas *in vitro* no promovieron la presencia de fenotipos neurales maduros.
- En el trasplante de agregados disociados se obtuvieron células GFP<sup>+</sup>Tuj<sup>+</sup> tanto en condición epidermal como en condición neural.
- Las condiciones *in vitro* no cuentan con los requerimientos necesarios para lograr un fenotipo neural maduro, mientras que en condiciones *in vivo* se logra la integración de células provenientes de piel humana en el SN de rata, junto con la expresión de al menos un marcador neural.



## IX.- PERSPECTIVAS

- Realizar una caracterización mediante PCR de los marcadores epidermales en queratinocitos humanos a lo largo de su propagación *in vitro*, con la finalidad de conocer si la expresión de Nestina se encuentra desde la población inicial o se adquiere en las condiciones de propagación.
- Llevar a cabo ensayos de proliferación y análisis clonales en queratinocitos cultivados en suspensión en el medio neuralizante, para corroborar que la agregación es un efecto del medio proliferante y no de una simple adhesión célula-célula causada por la falta de una superficie adherente.
- Realizar trasplantes de queratinocitos humanos cultivados en monocapa, para dilucidar si son las condiciones de cultivo en suspensión o las células por sí mismas, lo que las hace capaces de expresar marcadores de linaje neural.
- Realizar una mayor caracterización de las células GFP<sup>+</sup>Tuj1<sup>+</sup> para determinar si se ha dado un cambio de fenotipo completo o parcial, además de evaluar características funcionales típicas de células neurales.

## X. BIBLIOGRAFÍA.

1. Organización Mundial de la Salud, *Neurological Disorders Public health challenges*. WHO Press, 2006.
2. Fernández, E.B., *Fundamentos moleculares de la medicina*. 2005, Madrid.
3. Kim, S.U. and de Vellis, J., *Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review*. J Neurosci Res, 2009. 87(10): p. 2183-200.
4. Popa-Wagner, A., et al., *Cerebrovascular disorders: role of aging*. J Aging Res, 2012. 2012: p. 128-46.
5. Jordan, J., *Avances en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas*. Offarm, 2003. 22(3): p. 102-12.
6. Rosenberg, S.A., *Cellular therapy: an introduction*. Cancer J, 2001. 7 Suppl 2: p. S51-2.
7. Mollison, P.L. and Engelfriet, P., *Blood transfusion*. Semin Hematol, 1999. 36 (4 Suppl 7): p. 48-58.
8. Bozdech, M.J., *Bone marrow transplantation as primary treatment of leukemia*. West J Med, 1987. 147 (3): p. 327-8.
9. Mason, C. and Dunnill, P., *A brief definition of regenerative medicine*. Regen Med, 2008. 3(1): p. 1-5.
10. Daniels, J.T., *Stem cells: moving the biology towards the clinic*. Regen Med, 2007. 2(3): p. 313-5.
11. Mayani, H., *A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance*. Arch Med Res, 2003. 34(1): p. 3-15.
12. He, S., Nakada, D., and Morrison, S.J., *Mechanisms of stem cell self-renewal*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. 25: p. 377-406.
13. Beltrán, O., Quintero, L.O., and Chaparro, O., *Plasticity and transdifferentiation in adult stem cells - review*. Med, 2005.
14. Pera, M.F., Reubinoff, B., and Trounson, A., *Human embryonic stem cells*. J Cell Sci, 2000. 113 ( Pt 1): p. 5-10.
15. Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T., *Stem cells find their niche*. Nature, 2001. 414(6859): p. 98-104.
16. Voog, J. and Jones, D.L., *Stem cells and the niche: a dynamic duo*. Cell Stem Cell, 2010. 6(2): p. 103-15.
17. Baizabal, J.M., et al., *Neural stem cells in development and regenerative medicine*. Arch Med Res, 2003. 34(6): p. 572-88.
18. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(12): p. 7634-8.
19. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. 282(5391): p. 1145-7.
20. Isacson, O. and Kordower, J.H., *Future of cell and gene therapies for Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2008. 64 Suppl 2: p. S122-38.
21. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. 81(11): p. 2844-53.

22. Watt, F.M., *Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1998. 353(1370): p. 831-7.
23. Deasy, B.M., Jankowski, R.J., and Huard, J., *Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy*. Blood Cells Mol Dis, 2001. 27(5): p. 924-33.
24. Oh, S.H., Hatch, H.M., and Petersen, B.E., *Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration*. Semin Cell Dev Biol, 2002. 13(6): p. 405-9.
25. Kennea, N.L. and Mehmet, H., *Neural stem cells*. J Pathol, 2002. 197(4): p. 536-50.
26. Frisen, J., *Stem cell plasticity?* Neuron, 2002. 35(3): p. 415-8.
27. Fischer, A.J. and Reh, T.A., *Transdifferentiation of pigmented epithelial cells: a source of retinal stem cells?* Dev Neurosci, 2001. 23(4-5): p. 268-76.
28. Patapoutian, A., Wold, B.J., and Wagner, R.A., *Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle*. Science, 1995. 270(5243): p. 1818-21.
29. Johnston, L.A., *Regeneration and transdetermination: new tricks from old cells*. Cell, 2005. 120(3): p. 288-90.
30. Brockes, J.P., *Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure*. Science, 1997. 276(5309): p. 81-7.
31. Echeverri, K., Clarke, J.D., and Tanaka, E.M., *In vivo imaging indicates muscle fiber dedifferentiation is a major contributor to the regenerating tail blastema*. Dev Biol, 2001. 236(1): p. 151-64.
32. McGann, C.J., Odelberg, S.J., and Keating, M.T., *Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(24): p. 13699-704.
33. Terada, N., et al., *Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion*. Nature, 2002. 416(6880): p. 542-5.
34. Alvarez-Dolado, M., et al., *Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes*. Nature, 2003. 425(6961): p. 968-73.
35. McKenzie, I.A., et al., *Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system*. J Neurosci, 2006. 26(24): p. 6651-60.
36. Toma, J.G., et al., *Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin*. Stem Cells, 2005. 23(6): p. 727-37.
37. Haake, A.R., and Holbrook, K., *The structure and development of skin*. *Dermatology in General Medicine*. 1999. p. 70-114 .
38. Fuchs, E. and Raghavan, S., *Getting under the skin of epidermal morphogenesis*. Nat Rev Genet, 2002. 3(3): p. 199-209.
39. Simpson, C.L., Patel, D.M., and Green, K.J., *Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. 12(9): p. 565-80.
40. Yu, B.D., Mukhopadhyay, A., and Wong, C., *Skin and hair: models for exploring organ regeneration*. Hum Mol Genet, 2008. 17(R1): p. R54-9.
41. Alonso, L. and Fuchs, E., *Stem cells of the skin epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. Sep 30;100 Suppl 1:11830-5.

42. Campos, L.S., *Neurospheres: Insights into neural stem cell biology*. J Neurosci Res, 2004. 78(6): p. 761-9.
43. Gilbert, S.F., *Developmental biology*. Editorial Medica Panamericana, 2005.
44. Paxinos, G., *The rat nervous system*. Elsevier Academic Press, 2004.
45. Altman, J., and Bayer S.A., *Atlas of prenatal rat brain development*. CRC Press, 1995.
46. Pelayo, R., Santa-Olalla, J. and Velasco, I. *Células Troncales y medicina regenerativa*. UNAM, Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, 2011.
47. Biernaskie, J., et al., *Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury*. J Neurosci, 2007. 27(36): p. 9545-59.
48. Amoh, Y., et al., *Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005. 102(15): p. 5530-4.
49. Fernandes, K.J., et al., *Analysis of the neurogenic potential of multipotent skin-derived precursors*. Exp Neurol, 2006. 201(1): p. 32-48.
50. Lebonvallet, N., et al., *Characterization of neurons from adult human skin-derived precursors in serum-free medium : a PCR array and immunocytological analysis*. Exp Dermatol, 2012. 21(3): p. 195-200.
51. Tenorio, A., *Generación de precursores neurales a partir de células de la piel*. Facultad de Ciencias UAEM, 2013.
52. 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.
53. Reynolds, B.A., et al., *A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes*. J Neurosci, 1992. 12(11): p. 4565-4574.
54. Santa-Olalla, J. and L. Covarrubias, *Basic fibroblast growth factor promotes epidermal growth factor responsiveness and survival of mesencephalic neural precursor cells*. J Neurobiol, 1999. 40(1): p. 14-27.
55. Tumber, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W.E., Rendl, M., and Fuchs, E. *Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin*. Science, 2004. 303, 359–363.
56. Fuchs, E., et al., *Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche*. Cell, March 2004. Vol. 116, 769–778.
57. Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D.G., *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell, 1990, vol. 60, pp. 585–595.
58. Wroblewski, J., et al., *Distribution of nestin in the developing mouse limb bud in vivo and in micro-mass cultures of cells isolated from limb buds*. Differentiation. 1997 Feb;61(3):151-9.
59. Kachinsky, A.M., et al., *Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart*. J Histochem Cytochem. 1995 Aug; 43(8):843-7.

60. Zulewski, H., et al., Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 2001 Mar; 50(3):521-33.
61. Amoh, Y., Li, L., Yang, M., Moossa, A.R., Katsuoka, K., Penman, S., et al., *Nascent blood vessels in the skin arise from nestin expressing hair-follicle cells*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 13291–13295.
62. Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K., Penman, S., and Hoffman, R.M. *Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 5530–5534.
63. Watarai, A., Amoh, Y., Maejima, H., Hamada, Y., and Katsuoka, K. *Nestin expression is increased in the suprabasal epidermal layer in psoriasis vulgaris*. *Acta Derm Venereol*. 2013 Jan;93(1):39-43.
64. Vasil'ev, A.V., et. al., *Nestin-positive cells of cultured basal layer of human epidermis*. *Dokl Biol Sci*. 2004. Jan-Feb; 394:87-9.