



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO DEL β -HIDROXIBUTIRATO EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS
TRONCALES EMBRIONARIAS HUMANAS A NEURONAS DOPAMINÉRGICAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

MARGAREHT REYES ALDANA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. J. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ

(CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2024)

Facultad de Medicina





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.

Agradecimientos institucionales

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección y mentoría del Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez, en el Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, UNAM.

También se realizó bajo la co-dirección del Mtro. Juan Jair Santillán Cigales, reconociendo su participación en el proceso inventivo y apoyo práctico para la realización de este proyecto.

Agradezco el apoyo brindado por la Dra. Itzel Escobedo Ávila, técnico académico del laboratorio.

También agradezco a la Dra. Ruth Rincón Heredia, jefa de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular por su apoyo técnico en el manejo del microscopio confocal.

Este proyecto se realizó con el financiamiento de PAPIIT IN219122.

Durante la realización de este proyecto recibí una beca de ayudante de investigador nivel III del SNI del CONAHCYT.

Agradezco a los miembros de mi jurado de tesis

Dr. Jesús Chimal Monroy Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. J. Iván Velasco Velázquez Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Violeta Gisselle López Huerta Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Angélica Zepeda Rivera Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo Facultad de Medicina, UNAM

Abreviaturas

AA	Ácido ascórbico
AcAc	Acetoacetato
BDH	β -hidroxibutirato deshidrogenasa
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHB	β -hidroxibutirato
BHE	Barrera hematoencefálica
DA	Dopamina
EB	Cuerpo embrioide
EP	Enfermedad de Parkinson
FT	Factor de transcripción
FP	Placa del piso
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GR	Glía radial
H3K27ac	Acetilación de la lisina 27 de la histona 3
H3K27me3	Trimetilación de la lisina 27 de la histona 3
hESC	Células troncales embrionarias humanas
HDAC	Deacetilasa de histonas
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HMGCS2	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa mitocondrial
hPSC	Células troncales pluripotenciales humanas
iROCK	Inhibidor de ROCK
IsO	Organizador ístmico

KB	Cuerpos cetónicos
KD	Dieta cetogénica
MCI	Masa celular interna
MCT	Transportadores de ácidos monocarboxílicos
mDA	Neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo
mfNPC	Células progenitoras neurales de la placa del piso del mesencéfalo
MGFR	Matrigel reducido en factores de crecimiento
MV	Mesencéfalo ventral
NPC	Células progenitoras neurales
PFA	Paraformaldehído
PLO	Poli-ornitina
RrF	Campo retrorubral
SG	Semana gestacional
Shh	Sonic hedgehog
SNC	Sistema nervioso central
SNpc	Sustancia nigra pars compacta
VTA	Área tegmental ventral
ZV	Zona ventral
ZI	Zona intermedia
ZM	Zona del manto

ÍNDICE

1. RESUMEN
2. INTRODUCCIÓN
 - 2.1 Desarrollo del Sistema Nervioso Central
 - 2.1.1 Desarrollo embrionario humano temprano
 - 2.1.2 Desarrollo del cerebro humano en el periodo embrionario
 - 2.1.3 Neurogénesis humana
 - 2.1.4 Desarrollo del mesencéfalo ventral humano
 - 2.1.5 Células pluripotenciales humanas en el estudio del neurodesarrollo
 - 2.2 Metabolismo durante el neurodesarrollo
 - 2.2.1 La importancia del metabolismo energético en el cerebro
 - 2.2.2 Las vías metabólicas cambian durante el neurodesarrollo
 - 2.3 Los cuerpos cetónicos
 - 2.3.1 Cetogénesis
 - 2.3.2 Metabolismo y transportadores del BHB en el cerebro
 - 2.3.3 Los KB y sus transportadores durante el neurodesarrollo
 - 2.3.4 Los KB en el embarazo
 - 2.3.5 Los KB en el cerebro más allá del metabolismo
3. ANTECEDENTES
4. JUSTIFICACIÓN
5. HIPÓTESIS
6. OBJETIVOS
 - 6.1 Objetivo general
 - 6.2 Objetivos particulares
7. MATERIALES Y MÉTODOS
 - 7.1 Cultivo de células troncales embrionarias humanas (hESC)
 - 7.2 Generación de progenitores del mesencéfalo ventral de la placa del piso (mfNPC) a partir de hESC
 - 7.3 Expansión de mfNPC
 - 7.4 Diferenciación de neuronas dopaminérgicas (mDA) a partir de mfNPC

- 7.5 Tratamiento con BHB
- 7.6 Inmunocitoquímica
- 7.7 Microscopía y cuantificación
- 7.8 Análisis estadístico
- 8. RESULTADOS
 - 8.1 Generación y caracterización de mfNPC a partir de hESC
 - 8.2 Diferenciación de mDA a partir de mfNPC
 - 8.3 Caracterización de mDA a partir de mfNPC
- 9. DISCUSIÓN
- 10. CONCLUSIÓN
- 11. PERSPECTIVAS
- 12. REFERENCIAS

1. Resumen

La glucosa es la principal fuente de energía para el cerebro adulto, sin embargo, durante las primeras semanas del neurodesarrollo, la alta demanda de energía y la alta tasa de biosíntesis de macromoléculas superan en gran medida la disponibilidad de glucosa en sangre. Por lo tanto, se ha propuesto que existe un cambio en la utilización de sustratos metabólicos, siendo los cuerpos cetónicos (KB, *ketone bodies*) una fuente de energía indispensable en la etapa fetal. Particularmente, el KB presente en mayor proporción en el cerebro en desarrollo y adulto es el β -hidroxibutirato (BHB), el cual se ha demostrado que tiene efectos neuroprotectores, ya que puede restaurar las reservas energéticas y proteger contra el daño oxidativo en modelos de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, el papel de los KB durante el neurodesarrollo no está descrito, debido a que los estudios en el cerebro fetal humano tienen muchas limitaciones. Existen diferentes protocolos de diferenciación *in vitro* de células troncales embrionarias humanas (hESC), pero en ninguno de estos protocolos se ha considerado el uso de KB para estudiar su efecto durante la diferenciación de neuronas dopaminérgicas (mDA), lo cual podría ser de utilidad para su eventual aplicación como terapia de reemplazo celular en la Enfermedad de Parkinson. En el presente trabajo se generaron mDA a partir de hESC expuestas a diferentes concentraciones de BHB; los análisis de inmunocitoquímica muestran que hay una mayor expresión del marcador neuronal temprano β -III-Tubulina, junto con el marcador específico del mesencéfalo ventral FOXA2 en las neuronas tratadas con BHB en comparación con el control. Asimismo, la exposición al BHB indujo una mayor proporción de células positivas para MAP2, marcador de neuronas maduras y Tirosina Hidroxilasa, marcador específico de mDA. En paralelo, se evaluó la expresión de dos marcas epigenéticas asociadas con activación (H3K27ac) y represión (H3K27me3) de la transcripción, observándose cambios significativos en ambas. Esto sugiere que el BHB podría tener un efecto positivo sobre los procesos involucrados en el neurodesarrollo, al aumentar la expresión de marcadores relacionados con el linaje dopaminérgico y modificar marcas epigenéticas.

2. Introducción

2.1 Desarrollo del Sistema Nervioso Central

2.1.1 Desarrollo embrionario humano temprano

Tras la fertilización, el embrión lleva a cabo una serie de divisiones graduales generando células hijas o blastómeros. En la etapa de 8 a 16 células, los embriones humanos pasan por el proceso de compactación, en la que los blastómeros se adhieren firmemente entre sí, maximizando su área de contacto, lo que lleva al embrión a adquirir una morfología compacta. Concomitantemente a este proceso, las células adquieren polaridad apicobasal (Fig. 1) (1).

Posteriormente los embriones alcanzan la etapa de blastocisto en el día embrionario E5. La formación de blastocistos implica un proceso de cavitación para formar el blastocele, el cual está compuesto por una masa celular interna (MCI), que da lugar al embrión, y el trofoblasto, células situadas periféricamente, que darán origen a la placenta (Fig.1) (1,2).

Una vez que el embrión alcanza la etapa de blastocisto, está listo para implantarse en el útero materno. En esta etapa, los embriones experimentan un segundo evento de especificación del destino celular: la MCI se segrega en epiblasto e hipoblasto extraembrionario (1).

La implantación se da en el día embrionario E7, etapa en la que el embrión lleva a cabo una transformación morfológica global. El trofoblasto se diferencia en citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto situado más periféricamente que invade el endometrio. Entre el epiblasto y el citotrofoblasto aparece la cavidad amniótica. Como resultado, el embrión toma una forma circular y constituye el disco embrionario bilaminar (Fig. 1) (1,2)

Tiempo del desarrollo humano (días)

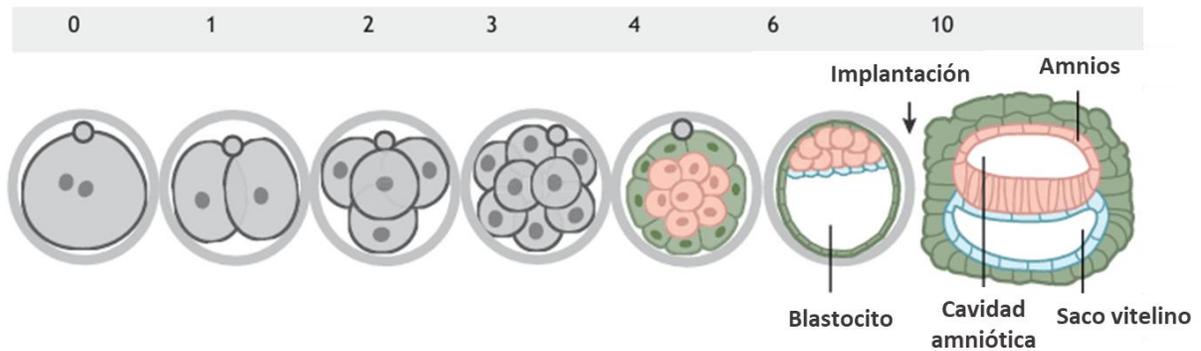


Figura 1. Descripción general del desarrollo de embriones humanos. Los tejidos derivados del epiblasto se muestran en rosa, los tejidos derivados del hipoblasto se muestran en azul y los tejidos derivados de trocotodermos se muestran en verde. Modificado de referencia 1.

Al final de la segunda semana de gestación (E14), el embrión se transforma a través de una serie de procesos que se denominan colectivamente gastrulación. En esta etapa las células epiblasticas darán origen a todas las estructuras del embrión en desarrollo, mientras que las células hipoblasticas formarán los tejidos extraembrionarios como el componente fetal de la placenta y el cordón umbilical (3).

El primer paso en el proceso de gastrulación está señalado por la aparición de una hendidura en la capa superior del embrión llamada línea primitiva. A continuación, un subconjunto de células epiblasticas se desprende de la capa superior del embrión y comienza a migrar hacia esta estructura. Cuando llegan a la abertura cambian de dirección y pasan a través de ella y debajo de la capa superior. Las células migratorias formarán dos nuevas capas embrionarias. Las células que forman la capa más profunda desplazarán a las células hipoblasticas y formarán el endodermo que dará lugar a estructuras del intestino y del tracto respiratorio, mientras que las células que forman la capa intermedia, denominada mesodermo, darán lugar a estructuras como músculos, huesos, cartílagos y el sistema vascular. Las células que no ingresan a través de la línea primitiva formarán la capa embrionaria más externa, denominada ectodermo, que dará origen al sistema nervioso y a la piel (1,3).

2.1.2 Desarrollo del cerebro humano en el período embrionario

El desarrollo del cerebro humano es un proceso prolongado que comienza en la tercera semana gestacional (SG) con la diferenciación de las células progenitoras neurales (NPC) y se extiende al menos hasta el final de la adolescencia, posiblemente durante toda la vida (3).

El sistema nervioso central (SNC) se deriva del ectodermo a través de un proceso conocido como inducción neural, el cual permite la divergencia del ectodermo en neuroectodermo y ectodermo superficial, precursor de la piel. La gastrulación se produce de forma concomitante a la inducción neural. La fase inmediatamente posterior a la inducción neural está representada por una serie de movimientos morfogénéticos que caracterizan la neurulación. Estos movimientos conducen desde la placa neural hasta la formación del tubo neural, los cuales ocurren entre los días embrionarios E19-29 (Fig. 2) (3,4).

El primer signo de desarrollo del tubo neural es la aparición de dos crestas que se forman a lo largo de los dos lados de la placa neural (E19-20). En el transcurso de varios días, las crestas se elevan, se pliegan hacia adentro y se fusionan para formar un tubo hueco (E22). La fusión comienza en el centro del tubo neural en desarrollo y luego continúa en dirección rostral y caudal (E23). El neuroporo anterior en el extremo más rostral del tubo neural y el neuroporo posterior en el extremo caudal son los últimos segmentos en cerrarse, en E25 y E27, respectivamente (Fig. 2) (3).

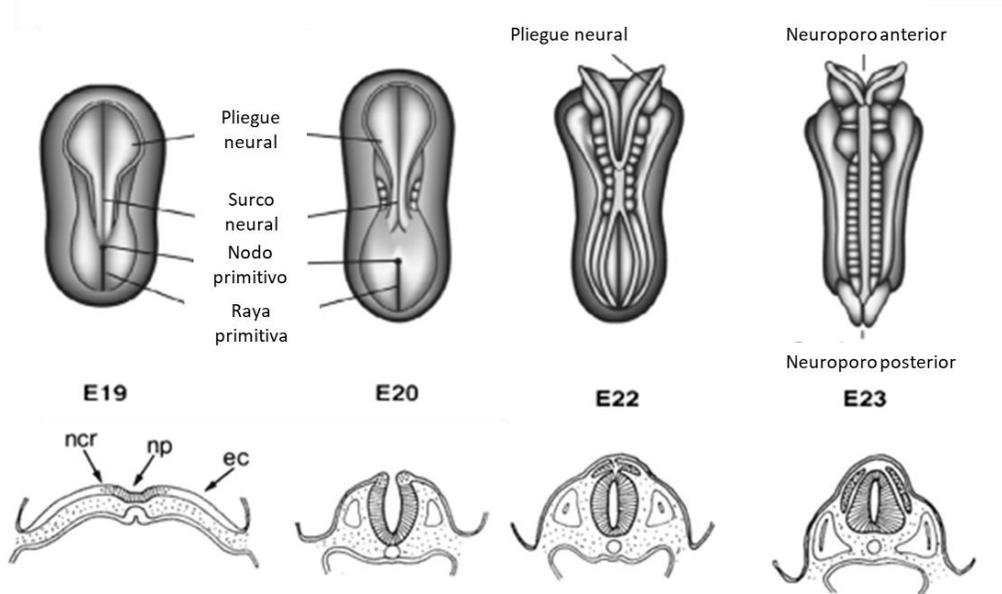


Figura 2. La formación del tubo y la cresta neural. Se muestran vistas dorsales y secciones transversales de embriones humanos. ec ectodermo, ncr cresta neural, np placa neural. Modificado de referencias 2 y 3.

Justo antes del cierre del tubo neural, el extremo anterior del tubo comienza a expandirse formando las tres vesículas cerebrales primarias (E28). La más anterior de estas vesículas cerebrales embrionarias se llama "prosencéfalo". La vesícula media es el "mesencéfalo", y la más posterior es el "rombencéfalo". Estos tres segmentos se subdividen aún más y al final del período embrionario están presentes las cinco vesículas cerebrales secundarias. El prosencéfalo se divide en "telencéfalo" y "diencéfalo", y el rombencéfalo se divide en "metencéfalo" y "mielencéfalo". El mesencéfalo no se divide más. Estas cinco subdivisiones están alineadas a lo largo del eje rostral-caudal del embrión y establecen la organización primaria del SNC (Fig. 3) (3).

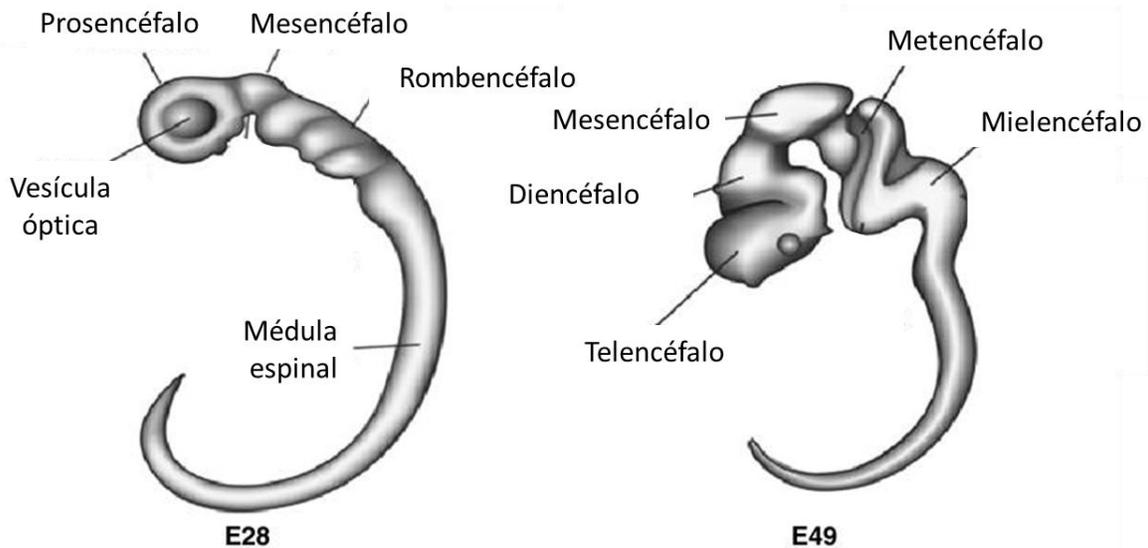


Figura 3. Cambios en la morfología del embrión en el período embrionario. Tras el cierre del tubo neural, el embrión comienza a expandirse, especialmente en las regiones anteriores. Las vesículas primarias son evidentes en E28. En E49 emergen las vesículas secundarias. Modificado de referencia 3.

2.1.3 Neurogénesis humana

La generación de nuevas neuronas, denominada neurogénesis, comienza en el período embrionario, en el día E25, y se extiende hasta la mitad de la gestación en la mayoría de las áreas cerebrales (3).

La neurogénesis clásicamente se divide en cuatro etapas consecutivas: proliferación, migración, diferenciación y maduración (5). La primera etapa consiste en aumentar el tamaño de la población de NPC, esto ocurre mediante divisiones celulares simétricas, las cuales producen dos NPC idénticas. De esta manera, a través de múltiples ciclos de división celular, se aumenta exponencialmente el número de NPC, dando como resultado un aumento del área superficial y del grosor de la zona ventricular (ZV). Alrededor de la quinta SG, las NPC comienzan a cambiar de división celular simétrica a asimétrica, generando una amplia gama de progenitores intermedios especializados denominadas células de la glía radial (GR), que continúan en división, dando lugar a una célula hija de GR y un neuroblasto que progresará a neurona inmadura. Posteriormente, las neuronas inmaduras migran a

su localización final, en donde terminan su proceso de diferenciación y maduración para formar circuitos cerebrales específicos (6).

2.1.4 Desarrollo del mesencéfalo ventral humano

La inducción de destinos neuronales específicos está coordinada por señales de morfógenos, que imponen características regionales a los NPC, de una manera dependiente de su concentración (7). Esto se logra al inducir la expresión de factores de transcripción (FT), que son proteínas que se unen a una secuencia genética específica y garantizan que la expresión del gen objetivo se regule temporal y espacialmente (8).

Las neuronas dopaminérgicas son capaces de liberar dopamina (DA), un neurotransmisor catecolaminérgico, y se encuentran presentes en todo el SNC de los mamíferos, incluido el mesencéfalo ventral (MV). Las neuronas DA del mesencéfalo (mDA) están dispuestas en tres núcleos distintos: la *sustancia negra pars compacta* (SNpc, también conocida como grupo A9), el área tegmental ventral (VTA, por sus siglas en inglés o grupo A10) y el campo retrorubral (RrF, por sus siglas en inglés o grupo A8) (Fig.4) (9).

Durante la neurulación, se forman dos centros de señalización importantes para el desarrollo de mDA: el organizador ístmico (IsO, por sus siglas en inglés), que define el límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo, y la placa del piso (FP, por sus siglas en inglés), que controla las identidades ventrales (Fig.5) (9).

La FP es una estructura glial especializada ubicada a lo largo de la línea media ventral del tubo neural en desarrollo. Esta área contiene células de la GR, que secretan morfógenos, como Sonic hedgehog (Shh), modelando el tubo neural en el eje dorsoventral, y es importante para la especificación de la región del mesencéfalo (11).

La posición de IsO está determinada por los límites de expresión de los FT Orthodenticle homeobox 2 (Otx2) y Gastrulation Brain homeobox 2 (Gbx2): el primero se expresa en el mesencéfalo y el segundo en la parte anterior del rombencéfalo (8). Otx2 y Gbx2 controlan la expresión de dos morfógenos, Wnt1

(wingless-int1) en el mesencéfalo y el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (Fgf8, por sus siglas en inglés) en el rombencéfalo (9), lo que induce la expresión de Wnt1 en la FP del MV; un paso necesario para el establecimiento del dominio progenitor del mesencéfalo y para la neurogénesis mDA (11).

Después de la especificación, los progenitores de mDA que residen en la ZV de la FP comienzan a expresar dos factores de transcripción necesarios para el desarrollo de las neuronas mDA, Foxa2 y Lmx1a (11). Estos progenitores luego se expanden y posteriormente llevan a cabo la neurogénesis, en humanos comienza entre 5-6 SG, alcanza su punto máximo en las 6-8 SG, y luego termina entre las 10-11 SG (9).

La neurogénesis mDA está controlada por dos genes proneurales de la misma familia de proteínas, Mash1 y Ngn2 (Neurog2; neurogenina 2), lo que da como resultado la generación de neuroblastos mDA posmitóticos que expresan el FT Nr4a2 (Nurr1). Después de la neurogénesis, los neuroblastos mDA migran, primero de manera radial siguiendo los procesos de la GR a través de la zona intermedia (ZI) y posteriormente de manera tangencial, hacia sus destinos finales en la zona del manto (ZM) (9,11).

Durante este proceso de migración, los neuroblastos continúan diferenciándose y adquiriendo la expresión de factores de transcripción necesarios para el desarrollo de las neuronas mDA, como Pitx3, En1/2, así como genes que las caracterizan porque son necesarios para su función, incluida la enzima limitante de la velocidad para la síntesis de dopamina, la tirosina hidroxilasa (Th), el transportador vesicular de monoaminas (Vmat2/Slc18a2) y el transportador de dopamina (Dat/Slc6a3) (Fig.4 y 5) (11, 12).

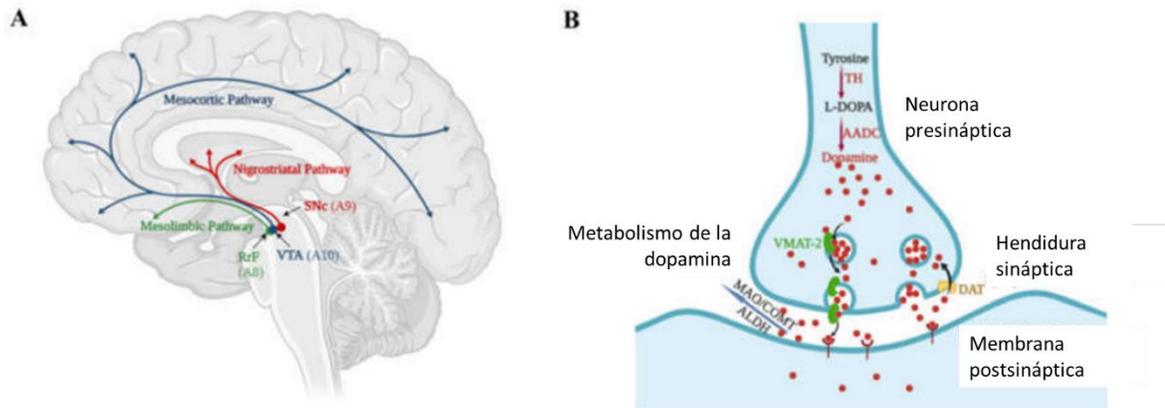


Figura 4. La dopamina en el cerebro. A) Vías de inervación dopaminérgica del mesencéfalo ventral B) Liberación del neurotransmisor de la dopamina en el cerebro. Modificado de referencia 12.

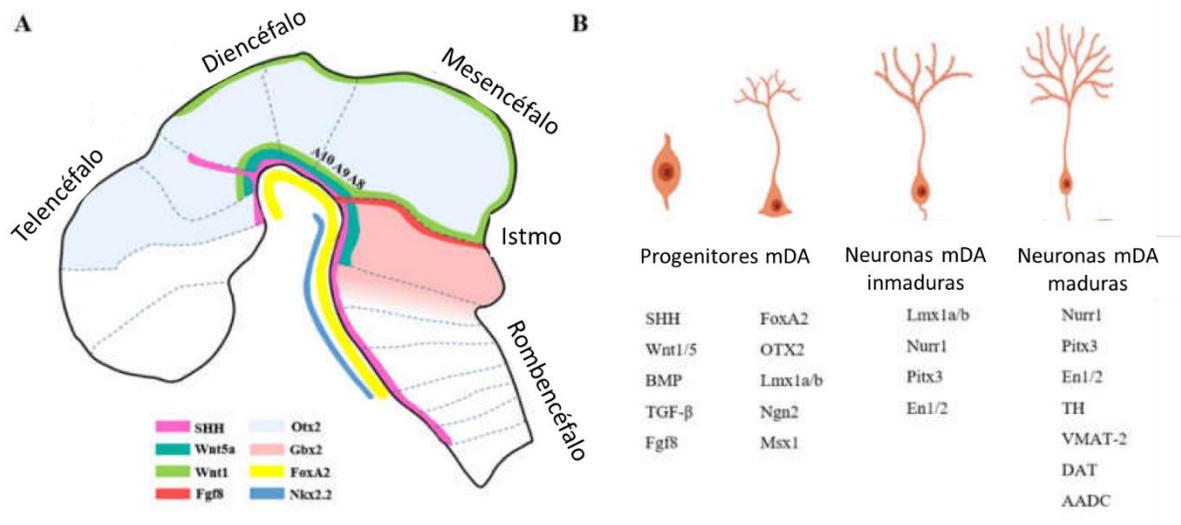


Figura 5. Señalización y morfógenos implicados en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral. (A) Plano sagital del cerebro, que ilustra la expresión de los morfógenos y factores de transcripción ubicados en el mesencéfalo y el rombencéfalo, y (B) los principales factores de transcripción expresados en las diferentes etapas del progenitor mDA o neurona mDA. Modificado de referencia 12.

2.1.5 Células pluripotenciales humanas en el estudio del neurodesarrollo

Las neuronas DA ubicadas en la SNpc se proyectan principalmente al cuerpo estriado dorsolateral, formando la llamada vía nigroestriatal, que regula predominantemente la función motora (9) a lo largo de la vida del individuo. En particular, la degeneración neuronal del grupo A9 está relacionada con la

enfermedad de Parkinson (EP) una enfermedad de tipo neurodegenerativa que ocurre asociada al envejecimiento (10). Ésta, segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer. Clínicamente, se caracteriza por una tríada clásica de síntomas motores: rigidez, temblor y bradicinesia. Sin embargo, los pacientes también pueden experimentar un amplio espectro de síntomas no motores, incluidos síntomas cognitivos y sensoriales. Debido a su gran interés clínico como posible terapia de reemplazo, el desarrollo de las mDA ha sido un área intensa de investigación durante los últimos años (8,11).

El principal tratamiento de la EP es farmacológico, siendo la L-DOPA, el fármaco más eficaz por ser el precursor de la DA (9). Sin embargo, este tratamiento solo alivia los síntomas durante un período de tiempo. Por lo tanto, la terapia de reemplazo celular ha ganado interés como opción terapéutica, ya que en modelos animales se ha logrado reconstruir la vía nigroestriatal al trasplantar mDA en estas regiones cerebrales (49).

Los primeros trasplantes que se hicieron fueron con tejido fetal humano del MV y a pesar de sus resultados positivos en ensayos clínicos, su uso como fuente celular ha sido controversial tanto por razones éticas como prácticas ya que la accesibilidad a este tejido es limitada (50). Debido a esto, en los últimos años se han explorado y desarrollado fuentes celulares alternativas de mDA, como las células pluripotenciales humanas (hPSC), las cuales pueden ser derivadas de la MCI de un embrión en la etapa de blastocisto y reciben el nombre de células troncales embrionarias humanas (hESC) (9,11,12).

La definición de célula pluripotencial se basa en dos propiedades: autorrenovación y potencialidad. La autorrenovación es la capacidad de dividirse indefinidamente, produciendo células hijas inalteradas manteniendo las mismas propiedades de la célula progenitora. En condiciones particulares o bajo señales específicas, una célula pluripotencial puede salir de la autorrenovación y activar un programa que conduce a diferenciarse en tipos de células especializadas que se derivan de las tres capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo) (13).

Durante la última década se han desarrollado numerosos protocolos que describen la diferenciación *in vitro* de las hPSC hacia mDA; esto se consigue mediante la utilización de moléculas pequeñas, que son compuestos químicos que favorecen la expresión de FT específicos del linaje dopaminérgico (14,15). Sin embargo, estos protocolos se necesitan refinar aún más, debido a que nuestro conocimiento del desarrollo del mesencéfalo humano sigue siendo limitado.

2.2 Metabolismo durante el neurodesarrollo

2.2.1 La importancia del metabolismo energético en el cerebro

Se estima que el cerebro humano contiene más de 200 mil millones de células neuronales y no neuronales, 1 cuatrillón de conexiones, 100 km de fibras nerviosas y 600 km de vasos sanguíneos (16). Por lo que, para mantener el funcionamiento de esta arquitectura compleja, se requiere un suministro de energía notable. Particularmente, el cerebro adulto representa solo el 2% del peso corporal y se estima que consume cerca del 20% de la tasa metabólica en reposo del cuerpo (16, 17).

Si bien las demandas de energía del cerebro adulto son elevadas, durante el embarazo y la infancia son aún mayores y esenciales para favorecer el rápido desarrollo del cerebro. Por ejemplo, el volumen cerebral aumenta significativamente de un 27% del volumen total al nacer llegando al 80% a los 2 años. Además de la enorme demanda energética que puede representar hasta el 60% de los requerimientos basales del cuerpo, se requieren nutrientes específicos, como lípidos, proteínas y aminoácidos, para sostener las funciones celulares del cerebro (16).

2.2.2 Las vías metabólicas cambian durante el neurodesarrollo

Las neuronas del cerebro adulto dependen principalmente de la glucosa como fuente de energía. Sin embargo, durante las etapas tempranas del desarrollo, la demanda de energía y el aumento de la tasa de biosíntesis de macromoléculas superan en gran medida la disponibilidad de glucosa. Recientemente, se ha propuesto que este requerimiento energético se resuelve mediante un cambio en la

utilización de sustratos metabólicos, siendo los cuerpos cetónicos (KB, *ketone bodies*) y el lactato, las fuentes de energía indispensables en el neurodesarrollo fetal, seguida de una combinación con glucosa en la etapa neonatal a una mayor dependencia de la glucosa en el adulto (Fig. 6) (16, 18).

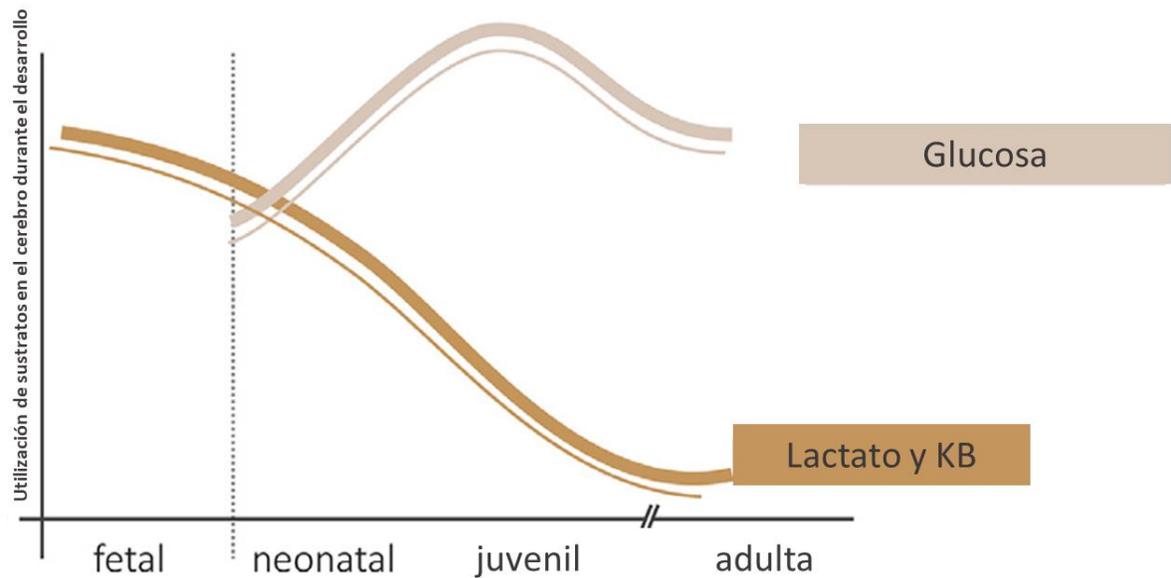


Figura 6. Metabolismo energético durante el neurodesarrollo. Dinámica de utilización de sustratos en el cerebro a lo largo del desarrollo. KB: cuerpos cetónicos. Modificado de referencia 18.

2.3 Los cuerpos cetónicos

2.3.1 Cetogénesis

Los KB son compuestos químicos de 3 o 4 carbonos, que se pueden metabolizar por fosforilación oxidativa en las mitocondrias para la generación de energía o que pueden ingresar a vías metabólicas no oxidativas como la lipogénesis o síntesis de colesterol (16). La producción de KB requiere dos procesos metabólicos independientes: la lipólisis y la cetogénesis. La lipólisis es el proceso en el cual los triglicéridos se descomponen en ácidos grasos simples y glicerol. Los ácidos grasos se transportan a la circulación sistémica y son absorbidos por el hígado, donde se metabolizan primero a acetil-CoA a través de la β -oxidación mitocondrial y posteriormente se generan los KB por medio de un proceso llamado cetogénesis. Estos procesos están regulados positivamente en condiciones de niveles bajos de

glucosa en sangre, como durante el ayuno, el ejercicio o con una dieta baja en carbohidratos (Fig. 7) (19).

La cetogénesis requiere de una serie de pasos en los que se requiere la acción de al menos tres enzimas: (I) acetoacetil-CoA tiolasa mitocondrial, (II) 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintasa mitocondrial (HMGCS2) y (III) HMG-CoA liasa. El primer paso requiere a la enzima I para la formación de acetoacetil-CoA, utilizando dos moléculas de acetil-CoA como sustratos de la reacción. Una vez producida la acetoacetil-CoA, la enzima II cataliza la reacción de adición de otra molécula de acetil-CoA, formando así HMG-CoA. Posteriormente, la enzima III elimina un acetil-CoA de la HMG-CoA para producir el primer KB denominado acetoacetato (AcAc), el cual puede descarboxilarse espontáneamente para formar acetona, un producto de desecho metabólico que se libera rápidamente a través de la orina o durante la respiración. Sin embargo, la mayor parte del AcAc se reduce mediante la acción de la D- β -hidroxibutirato deshidrogenasa (BDH) para formar β -hidroxibutirato (BHB) que es el KB presente en mayor proporción en la sangre. Debido a que el hígado carece de las enzimas necesarias para metabolizar los KB, estos se distribuyen a través de la circulación sanguínea a los tejidos metabólicamente activos, incluidos el cerebro y los músculos (Fig. 7) (20).

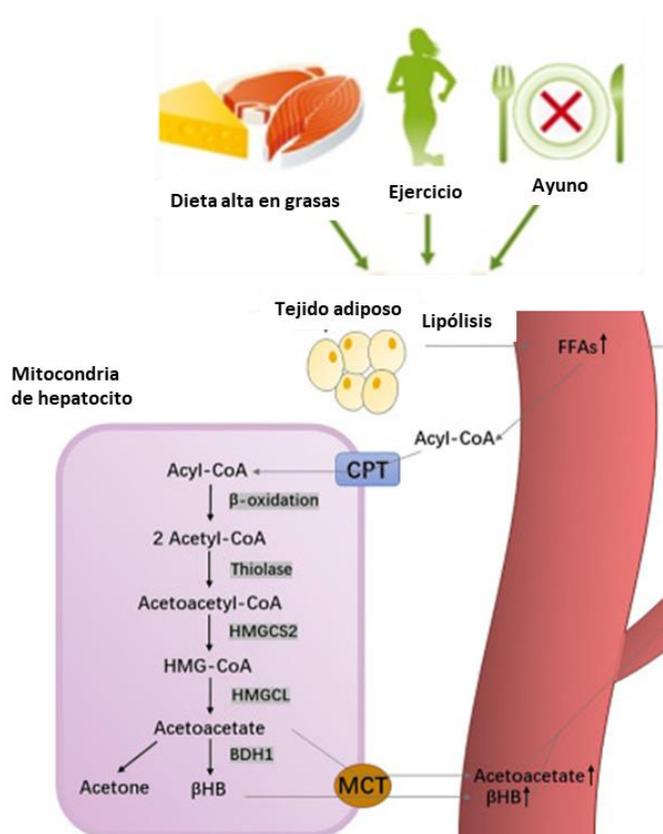


Figura 7. Metabolismo de los cuerpos cetónicos: Reacciones durante el proceso de cetogénesis. Modificado de referencias 21 y 34.

2.3.2 Metabolismo y transportadores del BHB en el cerebro

La alta demanda metabólica del cerebro se cubre gracias al transporte constante de nutrientes a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Los KB se movilizan de la sangre al cerebro por medio de proteínas transportadoras de ácidos monocarboxílicos acoplados a protones (MCT, por sus siglas en inglés) (34). Los miembros de esta familia de transportadores se distinguen por su afinidad y distribución en los diferentes tejidos que componen el SNC. El MCT1, se ubica principalmente en la BHE, con niveles más bajos en los astrocitos. Mientras que MCT2, el transportador de mayor afinidad, se ubica principalmente en las neuronas, específicamente en regiones postsinápticas ricas en mitocondrias, lo que sugiere que puede desempeñar un papel importante en la transmisión sináptica (21). Estudios en muestras de tejido cerebral humano informan que la expresión de MCT1-2 es similar a lo descrito en modelos animales. También existe un

transportador de baja afinidad localizado exclusivamente en astrocitos, el MCT4 (20).

Una vez que el BHB ha sido transportado al cerebro, dentro de las mitocondrias ocurre la conversión a AcAc por la acción de la BDH. El AcAc puede dirigirse a vías anabólicas o generar acetil-CoA, por la acción de dos enzimas (SCOT y BKD), e ingresar al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA, por sus siglas en inglés) para la generación de ATP (Fig. 8) (21).

Hasta el momento no hay evidencia de cetogénesis en neuronas. No obstante, varios estudios *in vitro* y recientemente un estudio *in vivo* en *Drosophila* han demostrado que los astrocitos pueden sintetizar KB, debido a su capacidad para oxidar ácidos grasos, existiendo también un sistema para la producción y entrega local de KB dentro del cerebro (20, 22).

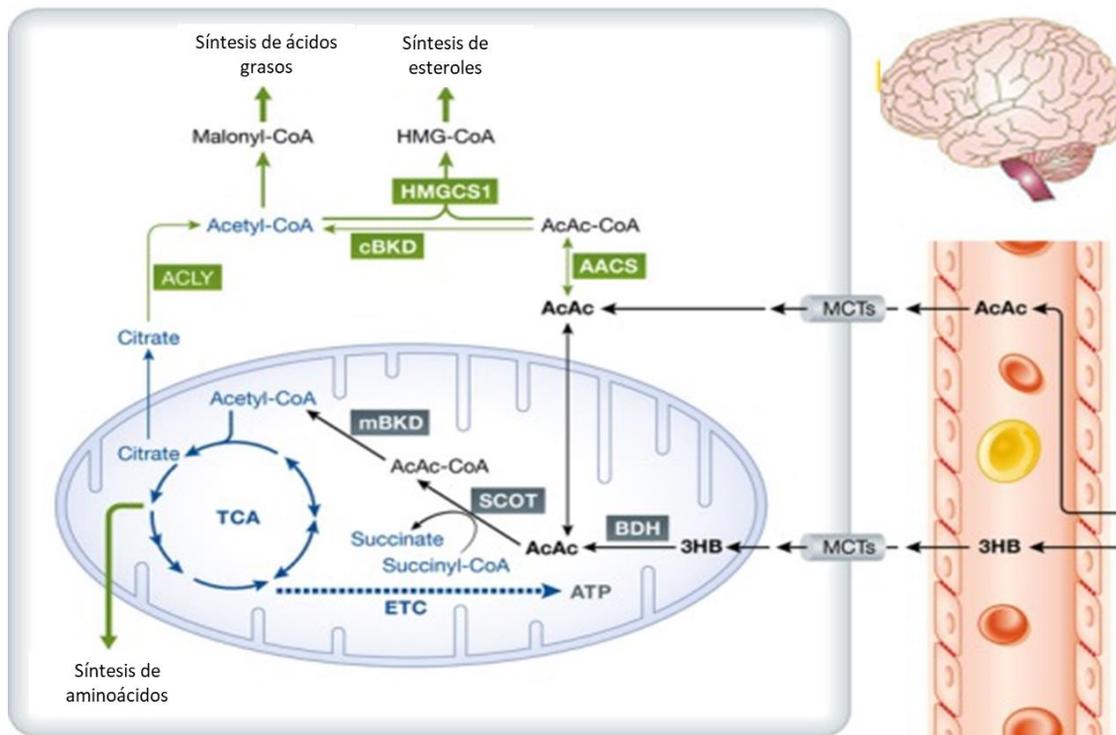


Figura 8. Transporte y metabolismo de los cuerpos cetónicos en el cerebro. 3HB: BHB Modificado de referencia 21.

2.3.3 Los cuerpos cetónicos y sus transportadores durante el neurodesarrollo

En las últimas décadas, ha quedado claro que, además de la glucosa, las neuronas pueden utilizar combustibles alternativos, como los KB. Específicamente se ha demostrado que en comparación con los adultos, los recién nacidos se encuentran en un estado de cetosis leve (1-3 mM BHB), independientemente del estado nutricional o los niveles de glicemia. Además, la captación de KB en el cerebro de neonatos y bebés es de 4 a 5 veces más rápida que en adultos; lo que significa que su metabolismo está programado para producir activamente KB y que el cerebro en desarrollo puede depender de estos sustratos para respaldar sus necesidades metabólicas (16,23).

Los KB también son la principal fuente de carbono para producir colesterol y algunos ácidos grasos de cadena larga que son lípidos estructurales importantes durante el neurodesarrollo. Estos lípidos constituyen alrededor del 45 al 50% de la materia sólida del cerebro humano y son componentes cruciales de las membranas neuronales (24). En ese sentido, los KB pueden ser suficientes para contribuir a las necesidades tanto energéticas como biosintéticas durante el desarrollo cerebral temprano.

Para estudiar el papel de los KB durante el neurodesarrollo se ha utilizado el modelo de la rata lactante, debido a que al igual que en humanos, las crías de rata exhiben un estado de cetosis (1-2 mM BHB) durante el período de lactancia, de 10 a 17 días después del nacimiento, alcanzando niveles máximos a los 14 días y luego descienden justo antes del destete. En este modelo se ha demostrado que los KB pueden representar alrededor del 30 al 70% del balance total del metabolismo energético del cerebro en desarrollo, mientras que la utilización de glucosa es relativamente baja. Además, la utilización cerebral de BHB antes del destete parece ser bastante homogénea durante las primeras etapas del neurodesarrollo, contrario a lo que ocurre con la utilización de glucosa (25, 26, 27).

Se ha observado que los niveles de expresión de los MCT son dependientes de la edad, siendo mayores en los recién nacidos y disminuyendo en la etapa adulta. Específicamente en ratas recién nacidas se encontraron niveles altos de MCT1, y a medida que incrementa el consumo de glucosa, este transportador disminuye. De

igual manera los niveles de MCT2 aumentan durante el desarrollo pero disminuyen después del destete. En particular se ha demostrado que se expresa en niveles elevados en casi todas las regiones del cerebro de las crías recién nacidas. Por ejemplo, en el día postnatal 7 se describió que aumenta su presencia en el cuerpo estriado, en el cual permanece elevado hasta el día 14 (17,27).

MCT4 también se regula durante el desarrollo, pero su expresión se retrasa en comparación con la de MCT2. Apareciendo hasta el día postnatal 14; como MCT1 se expresa en la BHE, mientras que MCT4 tiene una localización astrogliar, probablemente existe un cambio de MCT1 a MCT4 que implica que en los primeros días posnatales las neuronas se alimentan con KB de los vasos sanguíneos, mientras que en etapas posteriores gran parte de los KB son suministrados por los astrocitos (28).

2.3.4 Los cuerpos cetónicos en el embarazo

Durante el embarazo, los nutrientes de la circulación materna atraviesan la placenta hasta el feto en desarrollo, el cual es capaz de utilizar múltiples sustratos energéticos, incluidos la glucosa y los KB. Particularmente en el tercer trimestre, la síntesis de KB se acelera, esto debido a un aumento de la resistencia a la insulina materna por la secreción de la hormona de crecimiento placentaria, además de la alta demanda energética fetal, lo que conduce a un aumento de la lipólisis materna. Por esta razón, el embarazo se ha denominado un estado de inanición acelerada (19), se genera un gradiente de concentración que impulsa por difusión pasiva el transporte de KB de la madre al feto. Además, en la placenta se han encontrado enzimas capaces de convertir acetil-CoA en BHB, lo que sugiere que este tejido tiene la capacidad de llevar a cabo la cetogénesis. No obstante, en un modelo animal se demostró que la placenta también es capaz de usar KB como combustible y puede hacerlo preferentemente sobre la glucosa (19).

A pesar de esto, el papel de los KB en el SNC en desarrollo no se comprende bien. Sin embargo, se ha demostrado que el cerebro fetal entre las 8 y 10 semanas de gestación expresa enzimas capaces de metabolizar KB (19). También se ha cuantificado la tasa de consumo de BHB en tejido cerebral de embriones humanos

entre las 12 y 21 semanas de gestación, demostrando que es 1.47 veces mayor que el de la glucosa, lo que sugiere que los KB proporcionan potencialmente la mayor parte del combustible durante el neurodesarrollo (29).

Otra función importante de los KB en el cerebro es proporcionar sustratos para la síntesis de biomoléculas, particularmente lípidos como el colesterol y los ácidos grasos, que representan alrededor del 50% de la materia gris (16). Esto se ha demostrado en un estudio con ratas de 18 días de edad, en donde se encontró que los KB se habían incorporado al colesterol y los ácidos grasos del cerebro mucho más fácilmente que la glucosa, lo que sugiere que los KB contribuyen a estas vías anabólicas durante el desarrollo cerebral (30).

Por lo tanto, la información existente sugiere que los KB son esenciales para el desarrollo y la maduración del cerebro, no solo por su papel como una fuente importante de energía, sino también, para respaldar las necesidades anabólicas, las cuales están asociadas con procesos celulares como la proliferación, formación/eliminación de sinapsis y la mielinización. Sin embargo, la evidencia es limitada y aunque se ha demostrado que hay un aumento de la cetogénesis materna, se desconocen los niveles exactos de BHB en el cerebro fetal humano y su efecto directo en el desarrollo neuronal.

2.3.5 Los cuerpos cetónicos en el cerebro más allá del metabolismo

El metabolismo cerebral de los KB va más allá de la regulación de las vías catabólicas y anabólicas descritas anteriormente, ya que desde la década de 1920 se había demostrado que una dieta baja en carbohidratos, denominada dieta cetogénica (KD, por sus siglas en inglés), tenía éxito en el tratamiento de la epilepsia pediátrica. En ese sentido, en las últimas décadas se describió que específicamente el BHB ejerce efectos anticonvulsivos. Por ello, el estudio de los mecanismos neuroprotectores de los KB se ha convertido en un campo activo de investigación (31, 32, 33).

Estudios recientes tanto en humanos como en modelos animales han demostrado que la KD es beneficiosa para tratar las enfermedades neurodegenerativas,

mediante diferentes mecanismos que van desde la mejora de la función mitocondrial hasta sus efectos antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas (34, 35).

Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Parkinson, se ha demostrado que el BHB actúa como agente neuroprotector, en estudios *in vitro* e *in vivo*, mejorando tanto la actividad metabólica como mitocondrial y reduciendo la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas expuestas a sustancias que causan su muerte (35). Hasta la fecha hay pocos estudios clínicos con pacientes pero los hallazgos sugieren sobre el efecto de la KD en la reducción de los síntomas de la enfermedad (36).

3. Antecedentes

Hallazgos recientes demuestran que el BHB también está involucrado en la coordinación de las funciones celulares a través de la modificación del epigenoma. En este contexto, las histonas, que son las proteínas constituyentes del nucleosoma, juegan un papel fundamental en la modulación de la expresión génica a través de sus modificaciones postraduccionales covalentes como la acetilación y la metilación. Pero específicamente el BHB es un modificador epigenético a través de dos mecanismos (36).

Inicialmente Sleiman y colaboradores en 2016 observaron que los ratones que hacían ejercicio tenían niveles más altos del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), necesario para la supervivencia de poblaciones neuronales específicas y participa en procesos como el crecimiento axonal y dendrítico, así como en la sinaptogénesis. El aumento del BDNF ocurrió por una disminución de la actividad de las enzimas conocidas como desacetilasas de histonas (HDAC). Por lo tanto, plantearon la hipótesis de que el ejercicio podría producir un metabolito que inhibe a las HDAC. Posteriormente demostraron que el ejercicio induce la acumulación de BHB en el hipocampo, donde sirve como fuente de energía, pero igual como inhibidor de las HDAC para inducir específicamente la expresión de BDNF. Este efecto lo comprobaron de manera *in vitro* mediante el tratamiento con 5 mM de BHB en cultivos primarios de hipocampo (37).

Marosi y colaboradores también comprobaron que el ejercicio mejora los niveles de BDNF en el cerebro, además demostraron que en cultivos primarios, tanto de corteza como de hipocampo, BHB mejoraba de manera significativa los niveles de proteína de BDNF. Sin embargo, estos cambios en la expresión de BDNF no están impulsados por las propiedades inhibitoras del BHB sobre las HDAC, sino que es a través de un mecanismo que involucra el factor de transcripción NF- κ B y la histona acetiltransferasa p300 (38).

Hu y colaboradores, demostraron que la administración de BHB dentro del rango de concentración fisiológica (0.02-2 mM), tanto *in vivo* como *in vitro*, indujo la expresión de BDNF en el hipocampo con un suministro adecuado de glucosa. Esta transcripción inducida de BDNF por BHB estuvo mediada por activación de la vía AMPc/PKA/CREB y la posterior regulación positiva de la acetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27ac). Además el BHB indujo una disminución en la trimetilación de la H3K27 (H3K27me3) que generalmente se asocia con la represión de la transcripción génica y la elevación de la desmetilasa JMJD3, específica de H3K27me3. Estos hallazgos refuerzan el efecto beneficioso de BHB en el SNC y sugieren que la administración de BHB sin necesidad de restricción energética también podría ser una intervención prometedora para mejorar tanto la actividad neuronal, como para prevenir la degeneración del SNC (39).

Se ha demostrado también que el BHB puede modificar directamente los residuos de lisina de las histonas, marca epigenética denominada β -hidroxibutililación, aunque aún no se sabe si es espontánea o enzimática, pero puede ampliar la gama de mecanismos a través de los cuales los KB pueden regular la fisiología celular y respaldan un modelo en el que un cambio en la fuente de energía altera la expresión génica a través de modificaciones de histonas dirigidas por metabolitos (Fig. 9) (40, 41).

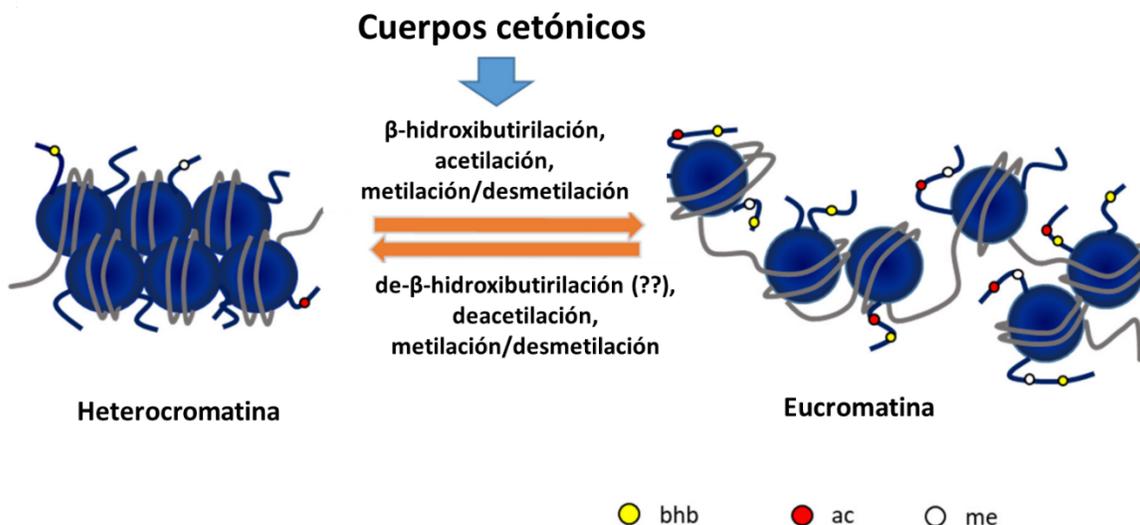


Figura 9. El efecto epigenético de los KB en el estado de la cromatina. Vías de modificación de la conformación de la cromatina por KB a través de modificaciones postraduccionales de histonas. bhb: β -hidroxibutirilación, ac: acetilación, me: metilación. Modificado de referencia 40.

4. Justificación

El metabolismo de los lípidos y los ácidos grasos que contribuyen a la neurogénesis no se ha abordado de forma experimental. Se ha sugerido que el BHB puede tener un papel muy importante en el sistema nervioso que está involucrado en procesos como plasticidad neuronal, regulación epigenética, neuroprotección y ayuda a cubrir la demanda metabólica cerebral. Debido a que el estudio del BHB se ha enfocado en su papel neuroprotector en modelos de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, existe poca información de su participación en el neurodesarrollo en modelos animales, pero se ha referido que la *sustancia nigra* es una de las regiones del cerebro que tiene una alta oxidación de BHB. Hasta el momento se desconoce si el BHB tiene algún papel en la diferenciación neuronal, particularmente del mesencéfalo ventral humano en etapa embrionaria. Ello se exploró en el presente trabajo haciendo uso de un modelo *in vitro*.

5. Hipótesis

De acuerdo con los antecedentes presentados los progenitores neurales que se exponen a BHB presentarán cambios en la expresión de marcadores de neuronas

dopaminérgicas así como cambios epigenéticos en un modelo de desarrollo del mesencéfalo ventral humano *in vitro*.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar el papel del BHB en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral humano, obtenidas de células troncales embrionarias humanas (hESC) en cultivo.

6.2 Objetivos particulares

1. Generar progenitores neurales del mesencéfalo ventral (mfNPC) a partir de la línea hESC H9.
2. Diferenciar neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral a partir de mfNPC de la línea H9 con distintas concentraciones de BHB.
3. Caracterizar mediante inmunocitoquímica la expresión de marcadores del linaje neuronal dopaminérgico en diferentes etapas del protocolo de diferenciación con las distintas concentraciones de BHB.
4. Evaluar la presencia de la expresión de los marcadores: H3K27ac y H3K27me3, en diferentes etapas del protocolo de diferenciación con las distintas concentraciones de BHB, mediante inmunocitoquímica.

7. Materiales y métodos

7.1 Cultivo de células troncales embrionarias humanas (hESC)

Se utilizó la línea celular de hESC H9 (42), cultivadas en condiciones adherentes como se describe a continuación: primero se realiza un pre-tratamiento en cajas multipozos (Costar, Corning) durante 24 h a 37°C con matriz de la membrana basal (Matrigel, Corning) diluido 1:15 con medio DMEM Knockout (DMEM KO, Gibco). Se coloca 1 mL de la dilución (Matrigel-DMEM KO) por cada pozo con una superficie de 9.5 cm². Posteriormente, se descongela el vial criogénico (Corning), en un recipiente con agua a 37 °C, el volumen se transfiere a un tubo Falcon de 15 mL con 2 mL de medio mTeSR™1 (STEMCELL Technologies), para retirar el exceso de DMSO (Sigma) que se usa como criopreservador. Los tubos Falcon se

centrifugan a 200 g durante 5 min y se retira el sobrenadante. Después, el pellet se suspende en 1 mL de medio mTeSR™1 y se distribuye en toda la superficie del pozo, al cual previamente se le retiró el Matrigel y se agregó 1 mL de medio con inhibidor de ROCK (iROCK, Tocris) a una concentración final de 10 µM, para favorecer la supervivencia de las células durante 24 h. Posteriormente no se agrega iROCK al medio de cultivo. Las condiciones se mantuvieron a 37°C, con una concentración de CO₂ al 5%, el cambio de medio mTeSR™1 se realiza diariamente de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Una vez que los cultivos alcanzan una confluencia entre el 80-90% se realiza el pasaje celular (aproximadamente cada 4 a 5 días). Para ello, se aspira el medio con una bomba de vacío y se agrega 1 mL de TrypLE™ Express (Gibco) para disociar las células del Matrigel, durante 2 min a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente se agrega 1 mL de PBS 1X para inactivar la digestión enzimática y el volumen se transfiere a un tubo Falcon de 15 mL, al cual se le agregó previamente 1 mL de PBS 1X, y se centrifuga a 200 g durante 5 min. El sobrenadante se retira y se suspende con 1 mL de mTeSR™1, se calcula el pase a una proporción 1 a 10 y se distribuye en los pozos deseados como se describió anteriormente.

Al volumen de medio con células que queda se agrega más medio mTeSR™1, tomando en cuenta el número de viales criogénicos en los que se congelarán las células, cada uno con un volumen final de 1 mL y 10% de DMSO. Los viales criogénicos se colocan en un contenedor *Mr. Frosty* con isopropanol en un REVCO a -80 °C y a las 24 h se transfieren a un contenedor de nitrógeno líquido a -196 °C.

7.2 Generación de progenitores del mesencéfalo ventral de la placa del piso (mfNPC) a partir de hESC

Se generaron mfNPC a partir de hESC, de acuerdo con el protocolo descrito en (43) (Fig. 10). La etapa inicial del protocolo es la formación de cuerpos embrioides (EB, por sus siglas en inglés). Primero las hESC se disociaron con 1 mL TrypLE™ Express durante 8 min a 37°C, 5% CO₂, después se agrega 1 mL de PBS 1X. El volumen se transfiere a un tubo Falcon de 15 mL, al cual se le agregó previamente 1 mL de PBS 1X, y se centrifuga a 200 g durante 5 min. El sobrenadante se retira y

se suspende con 1 mL de medio EB, el cual consta de DMEM-KO con 20 % de reemplazo de suero knockout (KSR, Invitrogen), 100 μ M de β -mercaptoetanol (Gibco), 1 % aminoácidos no esenciales (Gibco), 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco), 1% de Glutamax (Gibco), suplementado con moléculas pequeñas que permiten activar vías de señalización celular importantes para la inducción neural: 10 μ M SB-431542 (SB, Tocris) y 250 nM LDN-193189 (LDN, Sigma), 3 μ M CHIR99021 (CHIR, Sigma), 0.5 μ M SAG (Millipore). Durante 24 horas el medio contiene además 5 μ M iROCK. Las células se pipetea hasta obtener una suspensión sin agregados celulares visibles y posteriormente, el volumen se transfiere a placas de cultivo de ultra baja-adherencia (Costar, Corning).

Al día 2, el medio se reemplaza con medio N2B27; el cual, consta de 50:50 medio DMEM-F12 (Gibco)/Neurobasal (Gibco) con 1:200 de N2 (Gibco), 1:100 de B27 sin vitamina A (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina/glutamax. Asimismo, el medio se suplementa con 10 μ M SB, 250 nM LDN, 3 μ M CHIR y 0.5 μ M SAG. Para los días 4 y 6 se añade 200 μ M de ácido ascórbico (AA, Sigma) como antioxidante al medio N2B27 suplementado. Al día 8, se colectan los EB que presentan crecimiento neuroepitelial, se trituran con una pipeta de 1000 μ L en trozos más pequeños y se suspenden en medio N2B27 suplementado con 10 μ M SB, 150 nM LDN, 200 μ M AA, 3 μ M CHIR y 0.5 μ M SAG. Posteriormente, el volumen se transfiere a una proporción 1 a 3 en placas de 12 pozos tratadas 24 horas antes con matriz de la membrana basal reducido en factores de crecimiento (MGFR): IGF-1, TGF- β 3, EGF, PDGF, bFGF, NGF, VEGF.

Para el tratamiento de los pozos, MGFR a una dilución final de 1:100 en medio DMEM KO, se distribuye 500 μ L por cada pozo con una superficie de 3.8 cm².

7.3 Expansión de mfNPC

Dos días después de sembrar los EB, el medio se cambia a medio de expansión de mfNPC (medio N2B27 con SB 2.5 μ M, LDN 100 nM, CHIR 3 μ M, AA 200 μ M y SAG 0.5 μ M). Durante los primeros pases, es importante mantener a las células en altas densidades para favorecer la supervivencia. Después de 4 días se realiza el primer pasaje a una proporción de 1:4 en placas de 12 pozos tratadas previamente con

MGFR. En los siguientes dos pasajes se calcula a una proporción de 1:6. Los pasajes restantes se realizan en una proporción de 1:8 a 1:10 cada 5 o 6 días, cuando el cultivo alcanza una confluencia entre el 80-90%. El día que se siembran las células se agrega iROCK en el medio de expansión durante las primeras 24 horas, posteriormente el cambio de medio se realiza cada dos días. Después de cinco pasajes, los cultivos están libres de células progenitoras no neurales.

7.4 Diferenciación de neuronas dopaminérgicas a partir de mfNPC

Para la diferenciación de neuronas dopaminérgicas (mDA) se siembran 40,000 mfNPC en placas de 24 pozos tratadas previamente con poli-ornitina (PLO, sigma) en PBS 1X durante 24 h y subsecuentemente con Fibronectina/Laminina 1:1 (Sigma) en PBS 1X 24 h más. El medio de diferenciación I está compuesto de medio expansión mfNPC sin SB ni LDN. Dos días después se cambia a medio de diferenciación II, que consta de medio N2B27 con 0.5 μ M SAG, 0.7 μ M CHIR y 200 μ M AA. Después de 4 días de modelado del fenotipo de mesencéfalo ventral, se induce la maduración de las neuronas cambiando a un medio de maduración que consta de N2B27 con 10 ng/mL de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, Peprotech), 10 ng/mL de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF, Peprotech), 200 μ M AA, 500 μ M dibutilil AMPc (db-AMPC, Sigma), 1 ng/ml TGF- β 3 (Peprotech), 2.5 ng/mL Activina A (Peprotech) y 10 μ M DAPT (Tocris). Los cultivos se analizaron al día 6 y después de 8 días en condiciones de maduración.

Generación				Expansión		Diferenciación		Maduración			
D0	D2	D4	D6	D8	5-15 pasajes		D0	D2	D4	D6	Día X
Medio EB		Medio N2B27									
DMEM-KO, 20 % KSR, 100 μ M β -mercaptoetanol, 1 % NNEA/glutamax penicilina/estreptomicina		50:50 DMEM-F12/Neurobasal, 1:200 suplemento N2, 1:100 suplemento B27 svfA, 1% penicilina/estreptomicina/glutamax									
250 nM LDN			150 nM LDN		100 nM LDN		10 ng/mL BDNF/GDNF, 500 μ M db-AMPC, 1 ng/mL TGF- β 3, 2.5 ng/mL ActivinA, 10 μ M DAPT				
10 μ M SB						0.5 μ M SAG					
3 μ M CHIR						200 μ M AA		0.7 μ M CHIR			
										1, 3 y 5 mM BHB	

Figura 10. Esquema del protocolo de diferenciación de neuronas dopaminérgicas a partir de células troncales embrionarias humanas. Modificado de referencia 43.

7.5 Tratamiento con BHB

El tratamiento con β -hidroxibutirato (BHB, Sigma) se realiza a partir del D0 de la etapa de diferenciación y se mantiene después de 8 días en la etapa de maduración (Figura 11). La curva de BHB se realizó a 1, 3 y 5 mM de concentración final en los medios de cultivo fresco.

7.6 Inmunocitoquímica

Las células se fijan durante 10 min con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1X, después se retira el PFA y se agrega PBS 1X durante 5 min para retirar el exceso, se repite este procedimiento tres veces. La permeabilización y el bloqueo se realiza simultáneamente utilizando Triton X-100 al 0.2 %, BSA al 2 % y suero de cabra al 10 % en PBS 1X durante 60 minutos. Posteriormente se incuban con los anticuerpos primarios (Tabla 1) durante dos noches a 4°C en la misma solución de bloqueo (solución A). Posteriormente, se realiza el procedimiento descrito anteriormente con PBS 1X para retirar el exceso de la solución A y se incuban con los anticuerpos secundarios (anti-ratón acoplado a Alexa 488 y anti-conejo acoplado a Alexa 568) en la misma solución del primario a una dilución 1:1000 durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se retira el exceso de solución con PBS 1X + 0.05 % Tween-20 durante 5 min, después se incuban durante 10 min con Hoechst 1:1000 para teñir los núcleos y se retira el exceso con PBS 1X. Los cubreobjetos de plástico se montan sobre cubreobjetos de vidrio rectangulares usando Fluoromount (Invitrogen) y se dejan secar toda la noche.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Marca, Catálogo
FOXA2	Conejo	1:500	Millipore, 2420473
NESTINA	Conejo	1:500	Millipore, MAB5326
SOX2	Conejo	1:250	Abcam, AB97959

PAX6	Conejo	1:250	Abcam
Ki67	Conejo	1:500	Abcam, AB15580
Ki67	Ratón	1:250	Novocastra, NCL-L-Ki67-MM1
Tirosina Hidroxilasa (TH)	Conejo	1:500	PeI-freez, P40101-150
β -III-tubulina (TUJ1)	Conejo	1:500	Covance
β -III-tubulina (TUJ1)	Ratón	1:500	Biolegend, 801202
MAP2	Ratón	1:500	Sigma, M4403
H3K27ac	Conejo	1:2000	Abcam, AB4729
H3K27me3	Conejo	1:500	Millipore, 07449

Tabla 1. Lista de los anticuerpos primarios utilizados para la inmunocitoquímica, incluyendo su marca, especie y dilución.

7.7 Microscopía y cuantificación

Las imágenes de campo claro se obtuvieron utilizando un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U, mientras que las imágenes de fluorescencia se capturaron utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti y un microscopio confocal Zeiss LSM 800. Se capturaron imágenes en aumento de 20x, al menos de 5 campos, para cuantificar la expresión de los diferentes marcadores evaluados mediante el

programa de ImageJ (National Institutes of Health, NIH, EE. UU.). El procedimiento utilizado se basó en (44) para obtener los valores de área total y de densidad integrada (IntDen) para cada uno de los campos.

7.8 Análisis estadísticos

Se utilizó Prism 9 (GraphPad Software, Inc, San Diego, California, EE. UU.) para el análisis de los resultados y la generación de las gráficas. Los datos cuantitativos se presentan como media \pm SEM. Las comparaciones multigrupo se realizaron utilizando ANOVA de una vía ordinaria seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Los niveles de $p < 0.05$ se consideraron significativos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

8. Resultados

8.1 Generación y caracterización de mfNPC a partir de hESC

Para generar y expandir la población de mfNPC derivadas de hESC de la línea H9 se utilizó el protocolo de Smits et. al 2019. En este protocolo después de la disociación mecánica de los EB, hasta el quinto pase durante la etapa de expansión se puede observar que las colonias de mfNPC adoptan una morfología compacta con bordes uniformes (Fig. 11). Al realizar ensayos de inmunocitoquímica se confirmó que estas colonias después de 5 pases ya expresaban de manera uniforme los marcadores de progenitores neurales: SOX2, NESTINA y PAX6, así como el marcador de la placa del piso del mesencéfalo FOXA2. Los marcadores SOX2, PAX6 y FOXA2 son factores de transcripción que se expresan en el núcleo y por lo tanto, se puede observar la co-localización con el marcador de núcleos, HOECHST, mientras que NESTINA es una proteína de filamentos intermedios que se expresa principalmente en el citoplasma (Fig. 12).

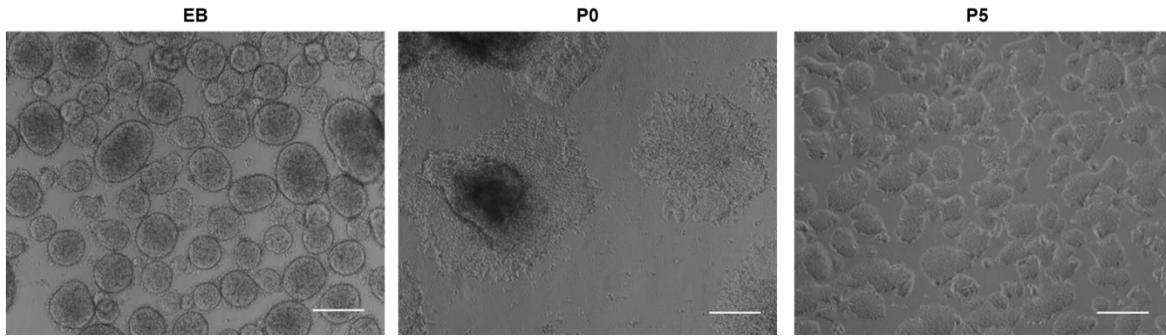


Figura 11. Generación de mfNPC a partir de hESC. Imágenes representativas de contraste de fases. EB: cuerpo embriode, P0 y P5: pase 0 y 5 respectivamente. Barra de escala 100 μ m.

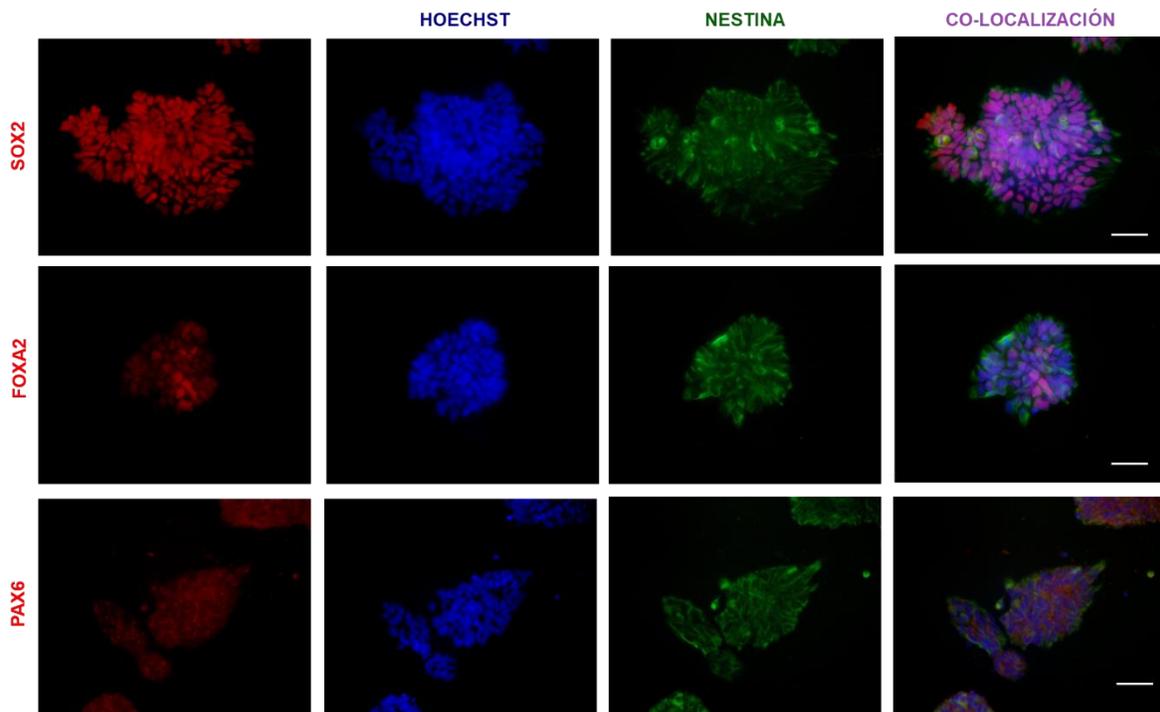


Figura 12. Caracterización de mfNPC a partir de hESC. Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica para Hoechst (azul) marcador de núcleos, NESTINA (verde), SOX2 (rojo, panel superior) y PAX6 (rojo, panel inferior) marcadores de progenitores neurales y FOXA2 (rojo, panel intermedio) marcador de la placa del piso del mesencéfalo. Barra de escala 50 μ m.

8.2 Diferenciación de mDA a partir de mfNPC

Después de la generación de mfNPC se procedió a la etapa de diferenciación y maduración dopaminérgica. Para ello, se realizó una curva de concentraciones de BHB con el objetivo de observar si el efecto era dosis-dependiente, como se mencionó en la parte de introducción y antecedentes, la concentración de BHB que reportan en el cerebro postnatal de roedores están en un rango fisiológico entre 0.1-2 mM (16, 23, 25, 26, 37) pero no se tiene información sobre los niveles de BHB en el cerebro humano en etapas fetales donde se estima que la concentración es aún mayor. Por otra parte, en estudios donde se evalúa su efecto neuroprotector las concentraciones que se utilizan están en un rango de 5-25 mM (31, 32, 33, 35, 36, 37). Por lo tanto, se determinó que las concentraciones de 1, 3 y 5 mM serían las que se utilizarían durante la etapa de diferenciación y maduración. Mediante microscopía de contraste de fases se observó la morfología de los cultivos en los diferentes días del protocolo y no se encontraron cambios morfológicos visibles en ninguna de las condiciones experimentales en comparación con el control, lo que sugiere que las concentraciones de BHB utilizadas no interfieren negativamente con el proceso de diferenciación (Fig. 13).

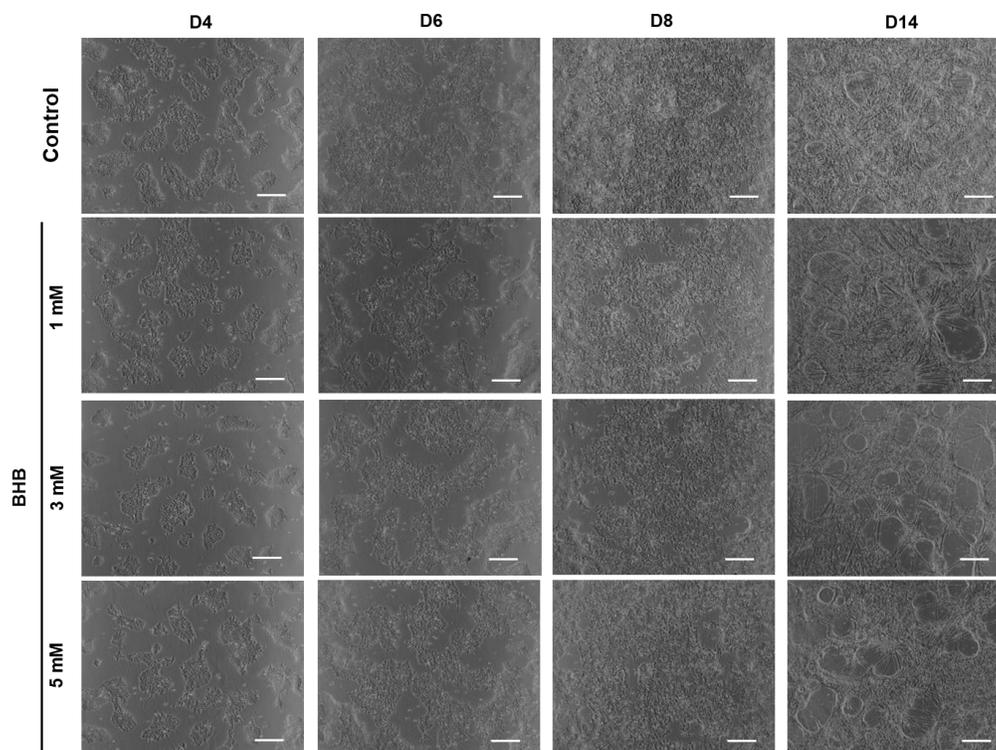


Figura 13. Diferenciación de mDA a partir de mfNPC. Imágenes representativas de contraste de fases. BHB: β -hidroxibutirato, D4, 6, 8 y 14: día del protocolo 4, 6, 8 y 14, respectivamente. Barra de escala 100 μ m.

8.3 Caracterización de mDA a partir de mfNPC

Con el objetivo de evaluar el efecto del BHB durante el proceso de diferenciación de mDA, se midió la expresión mediante análisis de inmunocitoquímica de marcadores relacionados con el desarrollo de las neuronas DA del cerebro medio, incluidos FOXA2 y TH, así como los marcadores neuronales TUJ1 y MAP2. En el caso de FOXA2 y TUJ1 se expresan principalmente en una etapa temprana del proceso de diferenciación, mientras que TH y MAP2 se expresan en la etapa de maduración.

En el día 6 del protocolo, que corresponde a la etapa temprana, se puede observar que FOXA2 co-localiza con TUJ1, lo que sugiere que se está llevando a cabo el proceso de diferenciación de mfNPC a mDA (Fig. 14A). También se cuantificó el nivel de expresión de estos marcadores con las distintas concentraciones de BHB.

Para el caso de células FOXA2+ se encontraron diferencias estadísticamente significativas con las concentraciones de 1 y 3 mM, sin embargo, solo con 3 mM se observa un aumento de 3.1 veces mayor (2027.9 ± 179.09 , $p < 0.0001$, prueba de Dunnett) en comparación con el control (654.45 ± 109.92). De igual manera, con ambas concentraciones se observa un aumento estadísticamente significativo en la proporción de células TUJ1+ pero con la condición de 3 mM se obtiene un nivel de expresión de 1.95 veces mayor (3999.16 ± 312.01 , $p < 0.0001$, prueba de Dunnett) comparado con el control (2051.76 ± 155.54). Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la concentración de 5 mM en el caso de FOXA2+ ($p = 0.0755$, prueba de Dunnett), se puede observar que la expresión de TUJ1+ con esta concentración sí aumenta 2.08 veces (4282.25 ± 269.82 , $p < 0.0001$, prueba de Dunnett) en comparación control (Fig. 14B). Juntos estos resultados sugieren que el BHB aumenta la expresión de FOXA2 y TUJ1, marcadores importantes en el proceso de diferenciación temprana de mDA.

También se midió la expresión del marcador de mfNPC, NESTINA y el marcador de proliferación, Ki67. De manera similar a lo observado con FOXA2, solo con las concentraciones de 1 y 3 mM se encontraron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, para el caso de NESTINA+ hubo una disminución de 2.62 veces (400.04 ± 73.06 , $p = 0.0001$, prueba de Dunnett) y 2.78 veces (377.02 ± 76.83 , $p < 0.0001$, prueba de Dunnett), respectivamente, comparado con el control (1046.72 ± 112.38). Por el contrario, se observó un aumento en el nivel de expresión de Ki67 con 1 mM de 1.72 veces (2065.64 ± 138.98 , $p = 0.0036$, prueba de Dunnett) y con 3 mM de 1.86 veces (2233.95 ± 229.16 , $p = 0.0008$, prueba de Dunnett) en comparación con el control (1203.10 ± 108.04) (Fig. 15B). Esto sugiere que las concentraciones de 1 y 3 mM de BHB favorecen la diferenciación, al disminuir la población de mfNPC y aumentar la proliferación celular. Junto con los resultados anteriores se puede observar que con la concentración de 3 mM se obtiene la mayor proporción de células positivas a los marcadores tempranos del linaje DA, lo que podría indicar que el BHB a esa concentración tiene un efecto positivo sobre la diferenciación dopaminérgica de mfNPC.

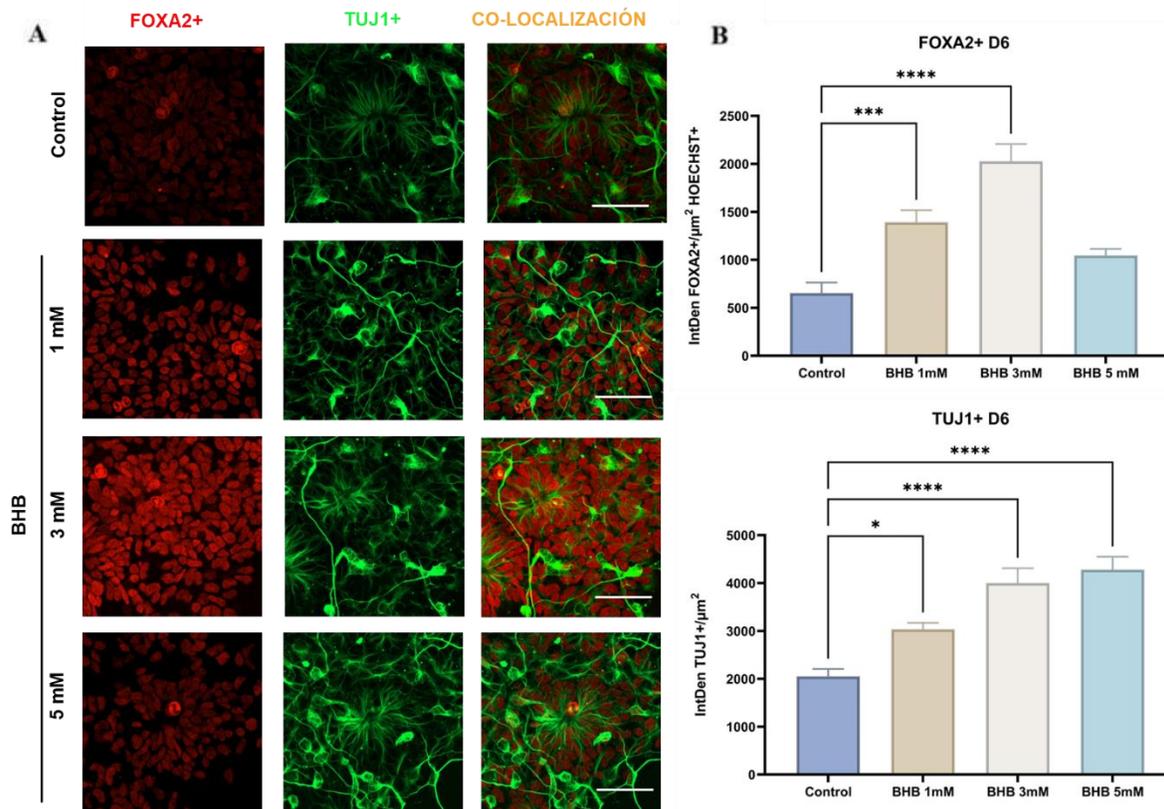


Figura 14. BHB aumenta la expresión de marcadores tempranos del linaje DA.

A) Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica en el día 6 del protocolo de diferenciación para TUJ1 (verde) marcador temprano del linaje neural y FOXA2 (rojo) marcador de la placa del piso del mesencéfalo. BHB: β -hidroxibutirato. IntDen: densidad integrada. Barra de escala 50 μ m. B) Cuantificación de los datos presentados en (a); media \pm SEM: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$ (comparado con el control, prueba de Dunnett). 3 réplicas biológicas y 4 réplicas técnicas.

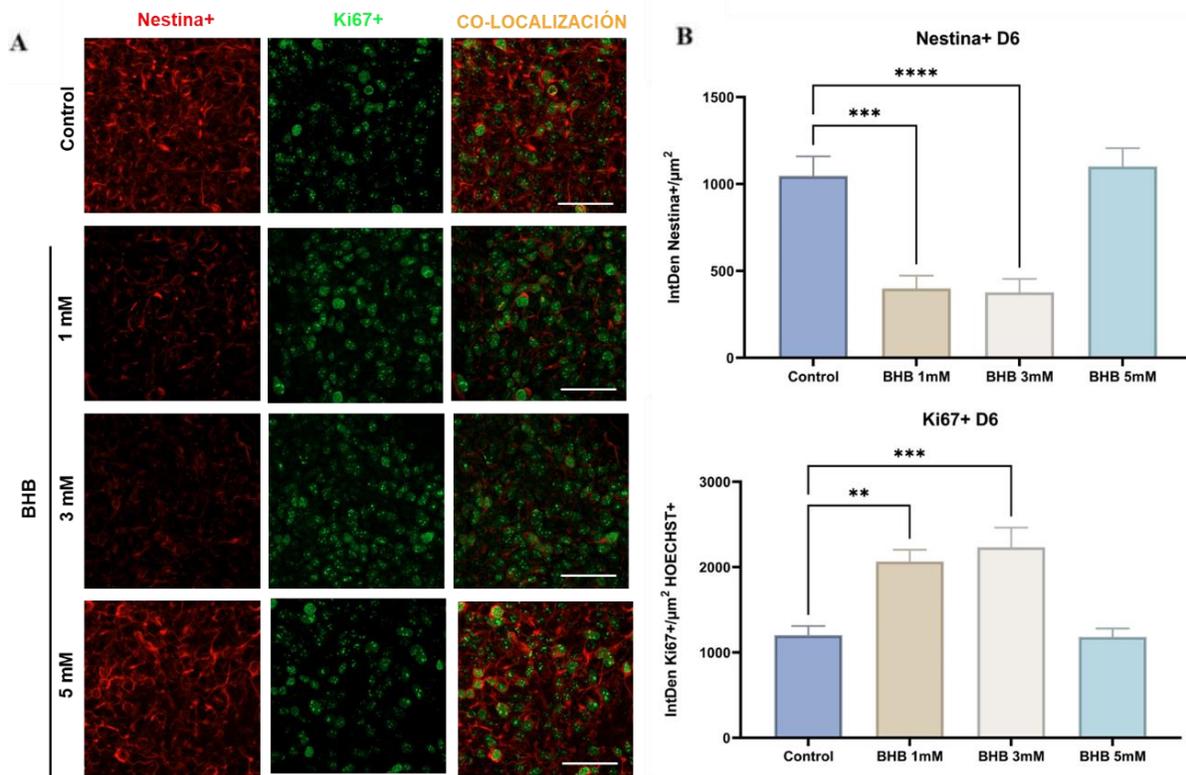


Figura 15. BHB favorece la proliferación celular y diferenciación de los mfNPC.

A) Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica en el día 6 del protocolo de diferenciación para Ki67, proteína que se expresa en células en proliferación y NESTINA, marcador de progenitores neurales. BHB: β -hidroxibutirato. IntDen: densidad integrada. Barra de escala 50 μ m. B) Cuantificación de los datos presentados en (a); media \pm SEM: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ (comparado con el control, prueba de Dunnett). 3 réplicas biológicas y 4 réplicas técnicas.

A partir del día 6 del protocolo, las células se cultivan en presencia de factores neurotróficos como BDNF y GDNF, que promueven la maduración neuronal. En esta etapa, también se midió la expresión del marcador neuronal, TUJ1. De manera similar a lo observado en la etapa temprana, al día 14 se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.0001$, prueba de Dunnett) con las concentraciones de BHB de 1 y 3 mM, en comparación con el control. También se puede observar que este aumento es gradual, debido a que no hay diferencias en el nivel de expresión de la condición control entre el día 6 vs el día 14 pero si en la

condición de 1 mM aumentando de 1.48 a 2.56 veces y con la condición de 3 mM de 1.95 a 3.22 veces. Por el contrario, con la condición de 5 mM al comparar el día 6 vs el día 14 se encontró una disminución de 2.09 a 1.42 veces (Fig. 16B). Esto sugiere que la concentración de 1 y 3 mM también favorece la diferenciación neuronal en días posteriores mientras que la concentración de 5 mM pierde su efecto positivo sobre la proporción de células TUJ1+.

En esta etapa de maduración, también se logró detectar la expresión del marcador específico de mDA posmitóticas, Tirosina hidroxilasa (TH) (Fig. 16A) y su co-localización con el marcador de neuronas maduras, MAP2 (Fig. 17A) con las distintas concentraciones de BHB. Solo con las concentraciones de 1 y 3 mM se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambos casos. En el caso de TH+ se puede observar que con la concentración de 1 mM se obtiene un aumento de 2.22 veces (38.60 ± 6.31 , $p=0.0108$, prueba de Dunnett) y con 3 mM de 2.94 veces (51.31 ± 6.00 , $p<0.0001$, prueba de Dunnett) comparado con el control (17.40 ± 6.31). Mientras que la proporción de células MAP2+, con la condición de 1 mM aumentó 3.42 veces (140.85 ± 16.61 , $p<0.0001$, prueba de Dunnett) y con 3 mM es de 4.11 veces (169.26 ± 13.39 , $p<0.0001$, prueba de Dunnett) en comparación con el control (41.18 ± 5.05) (Fig. 17B). Estos resultados indican que el BHB tiene un efecto positivo sobre el protocolo de diferenciación de mDA, no sólo en etapas tempranas, sino también en la etapa de maduración. Sin embargo, este efecto es dosis-dependiente, siendo las concentraciones que se encuentran dentro del rango fisiológico (1 y 3 mM) las que aumentan la proporción de células positivas a los marcadores relacionados con el linaje DA, lo que sugiere que el BHB puede tener un papel importante en el proceso de neurogénesis.

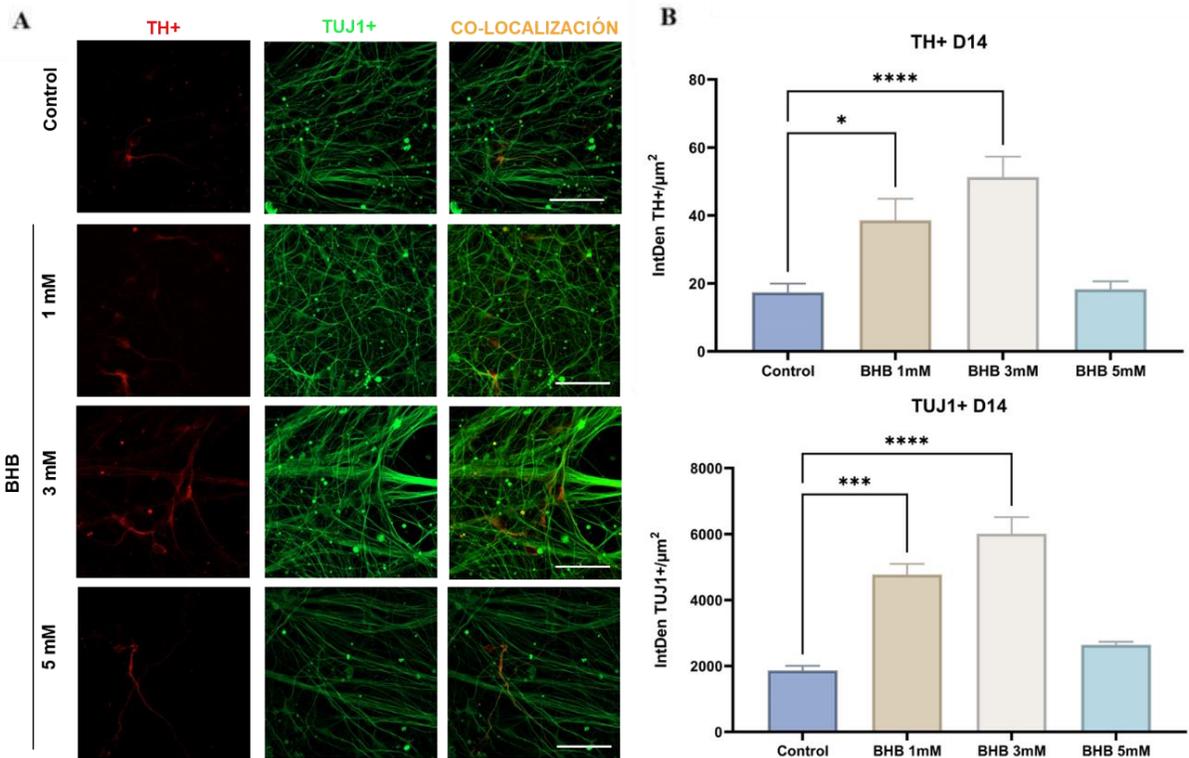


Figura 16. BHB aumenta la diferenciación neuronal y maduración de las mDA.

A) Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica en el día 14 del protocolo de diferenciación para TUJ1 marcador temprano de neuronas y Tirosina hidroxilasa (TH), marcador específico de mDA. BHB: β-hidroxibutirato. IntDen: densidad integrada. Barra de escala 50 μm. B) Cuantificación de los datos presentados en (a); media ± SEM: **** p < 0.0001; *** p < 0.001; * p < 0.05 (comparado con el control, prueba de Dunnett). 3 réplicas biológicas y 4 réplicas técnicas.

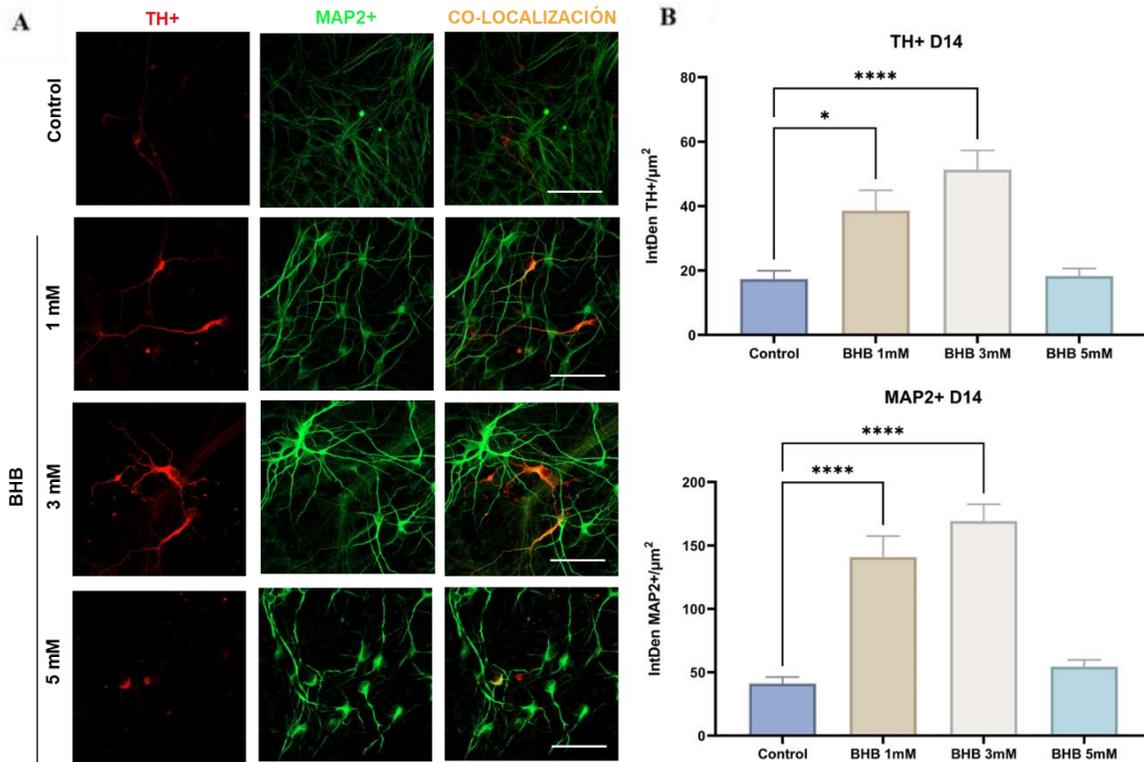


Figura 17. BHB aumenta la expresión de marcadores tardíos del linaje DA. A) Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica en el día 14 del protocolo de diferenciación para MAP2, marcador de neuronas maduras y TH, marcador específico de mDA. BHB: β -hidroxibutirato. IntDen: densidad integrada. Barra de escala 50 μm . B) Cuantificación de los datos presentados en (a); media \pm SEM: **** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$ (comparado con el control, prueba de Dunnett). 3 réplicas biológicas y 4 réplicas técnicas.

Después de evaluar la expresión de diferentes marcadores relacionados con el desarrollo de las neuronas DA del mesencéfalo ventral y comprobar que sí hay diferencias en el nivel de expresión de estos marcadores con las distintas condiciones experimentales, se quería evaluar si el BHB tiene un efecto a nivel global en dos marcas de histonas, H3K27ac y H3K27me, asociadas generalmente con activación y represión de la expresión génica, respectivamente. El nivel de expresión de ambas marcas también se midió al día 6 y 14 del protocolo de diferenciación con las cuatro condiciones experimentales mediante análisis de inmunocitoquímica.

En el caso de la marca H3K27ac se puede observar que tanto en el día 6 como en el día 14 se encontraron diferencias estadísticamente significativas con las tres concentraciones de BHB. Al día 6 con la condición de 1 mM se observó una disminución de expresión a nivel global de la H3K27ac de 4.08 veces (925.57 ± 118.34 , $p < 0.0001$, prueba de Dunnett), mientras que con 3 mM es de 3.72 veces menor (1015.73 ± 102.60 , $p < 0.0001$, prueba de Dunnett), en comparación con el control (3780.23 ± 227.27) (Fig.18B), sin embargo, al día 14 se puede observar que aunque esta tendencia se mantiene solo con la concentración de 1 mM se obtiene una disminución de 2.61 veces (2344.56 ± 525.22 , $p < 0.0001$, prueba de Dunnett) comparado con el control (6130.44 ± 413.63) (Fig. 19B). Por último, en el caso de la marca H3K27me3, al día 6 del protocolo también se observó una disminución estadísticamente significativa en el nivel de expresión con las tres concentraciones, pero solo con 1 y 3 mM se obtiene una disminución de 1.94 veces (1454.34 ± 197.97 , $p < 0.0001$, prueba de Dunnett) comparado con el control (2828.85 ± 131.33) (Fig. 20B), mientras que al día 14 solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la concentración de 1 y 3 mM, pero solo con 3 mM se obtiene una disminución de 2.29 veces (630.25 ± 101.48 , $p < 0.0001$, prueba de Dunnett), en comparación con el control (1444.91 ± 49.02) (Fig. 21B). Estos resultados indican que el BHB puede modificar el nivel de expresión de ambas marcas de histonas, y por ende, la expresión de los genes. Junto con los resultados anteriores, se puede sugerir que el BHB dentro del rango de concentración fisiológica aumenta la expresión de marcadores relacionados con el desarrollo del linaje neuronal DA, posiblemente a través de un mecanismo epigenético.

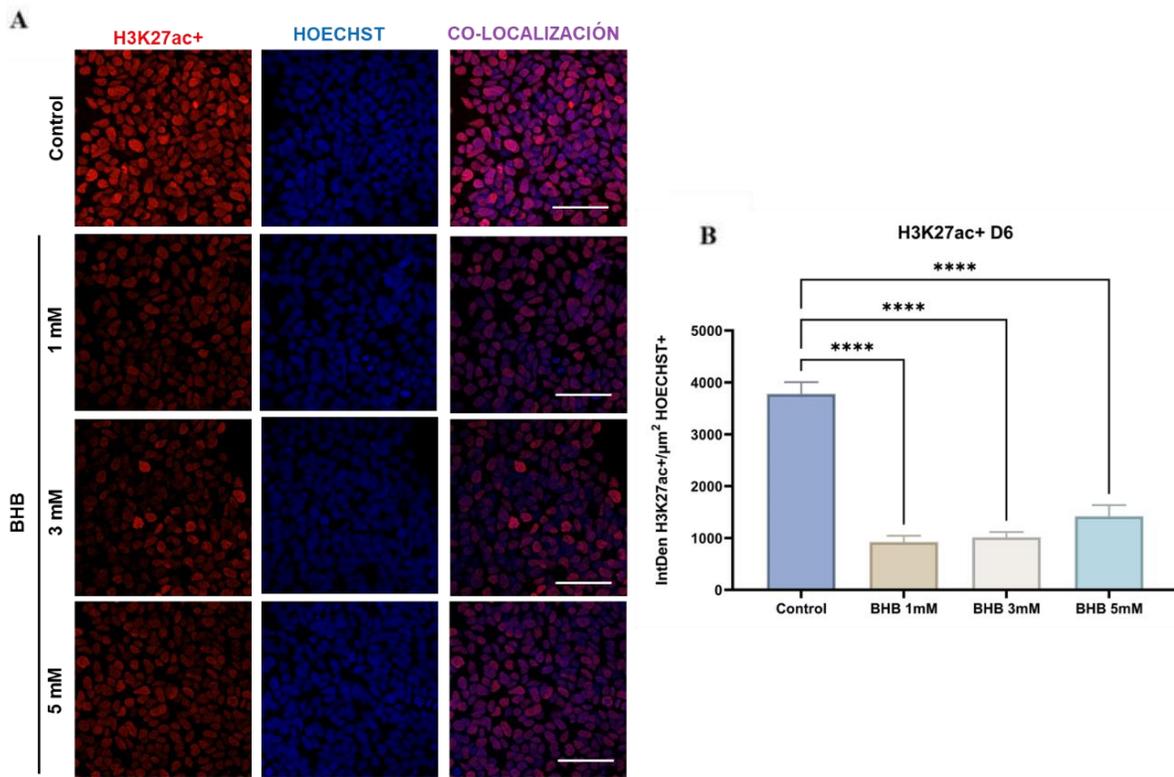


Figura 18. BHB modifica la expresión de la H3K27ac en etapas tempranas. A) Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica en el día 6 del protocolo de diferenciación para Hoechst, marcador de núcleos y H3K27ac, marcador de activación de la expresión génica. BHB: β -hidroxibutirato. IntDen: densidad integrada. Barra de escala 50 μ m. B) Cuantificación de los datos presentados en (a); media \pm SEM: **** $p < 0.0001$ (comparado con el control, prueba de Dunnett). 3 réplicas biológicas y 4 réplicas técnicas.

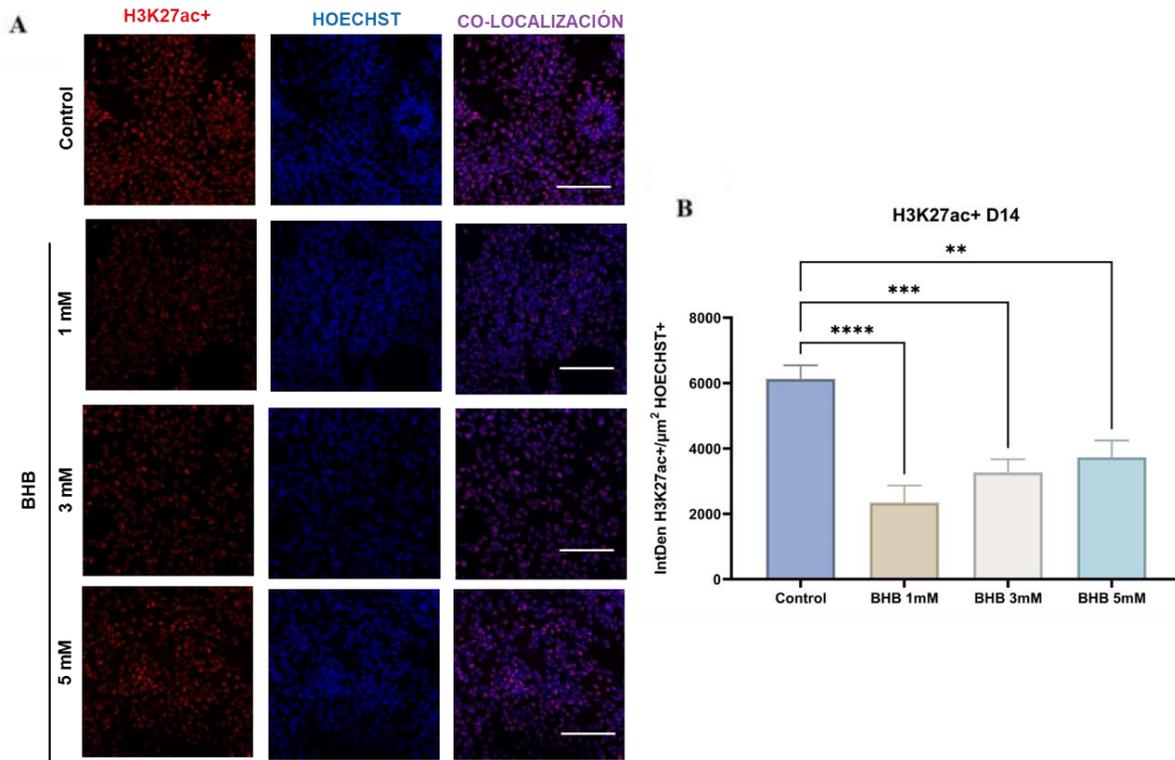


Figura 19. BHB modifica la expresión de H3K27ac en la etapa de maduración.

A) Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica en el día 14 del protocolo de diferenciación para Hoechst, marcador de núcleos y H3K27ac, marcador de activación de la expresión génica. BHB: β -hidroxibutirato. IntDen: densidad integrada. Barra de escala 50 μ m. B) Cuantificación de los datos presentados en (a); media \pm SEM: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ (comparado con el control, prueba de Dunnett). 3 réplicas biológicas y 4 réplicas técnicas.

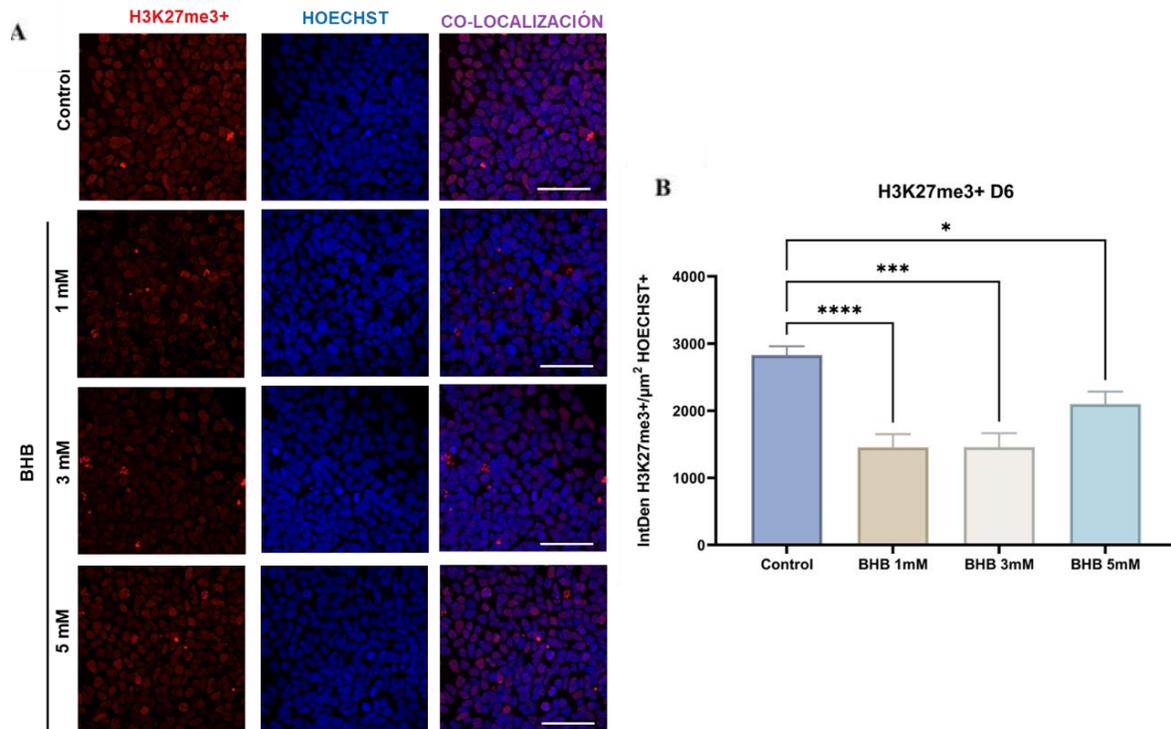


Figura 20. BHB modifica la expresión de H3K27me3 en etapas tempranas. A) Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica en el día 6 del protocolo de diferenciación para Hoechst, marcador de núcleos y H3K27me3, marcador de represión de la expresión génica. BHB: β -hidroxibutirato. IntDen: densidad integrada. Barra de escala 50 μ m. B) Cuantificación de los datos presentados en (a); media \pm SEM: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$ (comparado con el control, prueba de Dunnett). 3 réplicas biológicas y 4 réplicas técnicas.

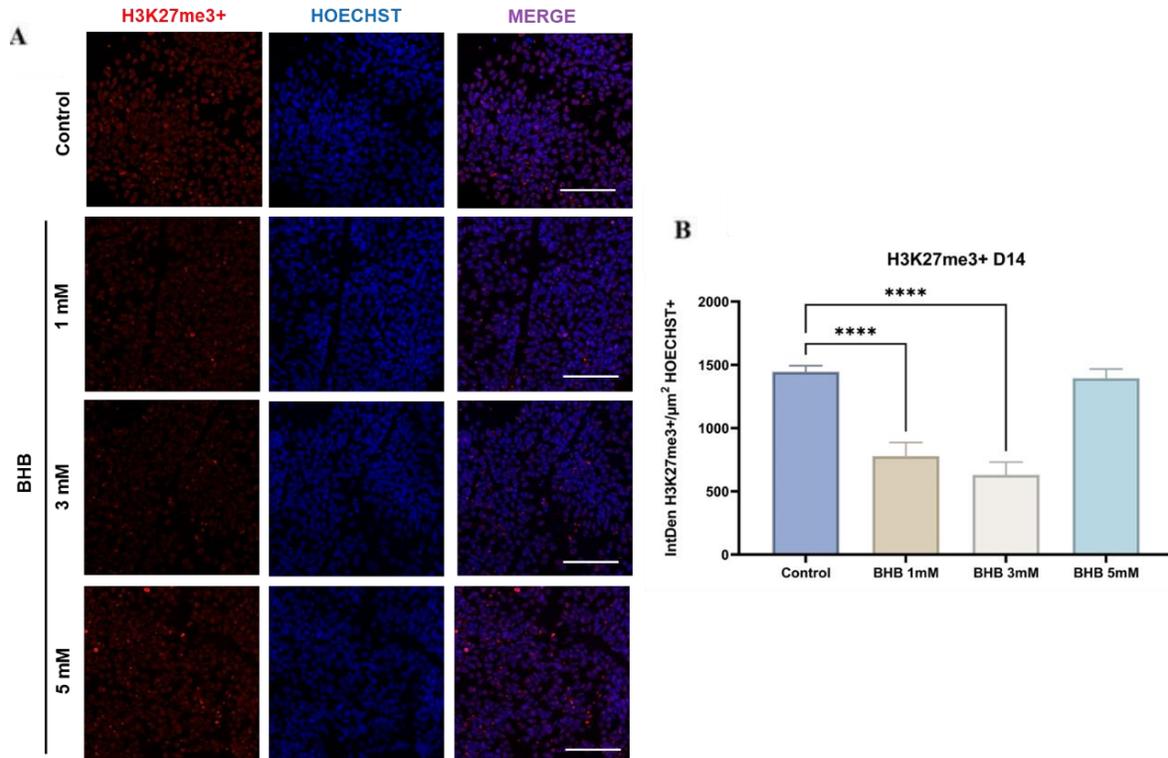


Figura 21. BHB modifica la expresión de H3K27me3 en la etapa de maduración.

A) Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica en el día 14 del protocolo de diferenciación para Hoechst, marcador de núcleos y H3K27me3, marcador de represión de la expresión génica. BHB: β -hidroxibutirato. IntDen: densidad integrada. Barra de escala 50 μm . B) Cuantificación de los datos presentados en (a); media \pm SEM: **** $p < 0.0001$ (comparado con el control, prueba de Dunnett). 3 réplicas biológicas y 4 réplicas técnicas.

9. Discusión

A lo largo de los años, se ha logrado un progreso significativo para descubrir los mecanismos por los cuales las NPC se diferencian hacia neuronas durante la neurogénesis embrionaria y adulta. Recientemente se ha identificado que además de las vías de señalización morfogénicas y los factores transcripcionales que gobiernan los procesos de diferenciación neuronal, el metabolismo celular puede servir como un centro molecular para integrar una variedad de vías de señalización

que regulan la neurogénesis, durante la embriogénesis y en el cerebro de mamíferos adultos (45,46). Por lo tanto, el estudio de la interacción entre los programas transcripcionales, la señalización morfogénica y su regulación ascendente o descendente del estado metabólico, puede mejorar indudablemente nuestra comprensión de cómo las NPC regulan diversas etapas del proceso neurogénico.

Específicamente, desde hace varios años se ha demostrado que en el cerebro en desarrollo, tanto de ratas como de humanos, se induce un cambio en la utilización de sustratos metabólicos, siendo los KB una fuente de energía importante en las primeras etapas del neurodesarrollo (16,18), sin embargo, aunque su papel en la neurogénesis no ha sido abordado, las observaciones recientes subrayan su importancia como mediadores metabólicos y de señalización vitales en el cerebro (20,21). Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto del BHB durante la diferenciación de neuronas DA del mesencéfalo ventral a partir de hESC, debido a que las mDA tienen una gran relevancia en la clínica por su neurodegeneración selectiva en la Enfermedad de Parkinson.

Debido a que no hay trabajos previos que describan el efecto del BHB en algún protocolo de diferenciación neuronal, se evaluaron distintos marcadores importantes para el desarrollo del linaje dopaminérgico. Los resultados obtenidos demuestran que dentro del rango fisiológico de concentración (1-3 mM), el BHB tiene un efecto positivo sobre la expresión de los marcadores TUJ1 y FOXA2, los cuales están relacionados con la inducción específica de NPC hacia mDA. En un día posterior del protocolo se evaluaron los marcadores MAP2 y TH, donde también se puede observar un efecto similar del BHB, sugiriendo que tanto en etapas tempranas como en la etapa de maduración, el BHB promueve la diferenciación dopaminérgica, al aumentar la población de mDA en los cultivos.

Por otra parte, se ha demostrado que el metabolismo celular puede tener un papel crucial en la proliferación de NPC tanto durante el período embrionario como en la etapa adulta (46), por lo tanto, también se evaluó el marcador de proliferación, Ki67, y el marcador de NPC, NESTINA. Los resultados obtenidos muestran que dentro

del rango fisiológico de concentración, el BHB tiene un efecto positivo sobre el estado proliferativo de las NPC, al aumentar los niveles de expresión de Ki67 y favorece la diferenciación de NPC, al disminuir la expresión de NESTINA. Junto con estos datos se puede sugerir que el BHB puede tener un papel importante sobre los procesos de proliferación y diferenciación neuronal de NPC tanto *in vitro* como *in vivo*.

Estos resultados se pueden correlacionar con varios mecanismos descritos para el BHB, como es el caso de las modificaciones epigenéticas (40,41), las cuales se han demostrado desempeñan un papel importante en la regulación del destino de las NPC, siendo la metilación y la acetilación de las histonas las principales modificaciones que promueven cambios en el estado proliferativo de las NPC. Dado que el destino de las NPC está regulado tanto metabólicamente como epigenéticamente, se ha descrito un vínculo estrecho entre la regulación metabólica y epigenética (47). Específicamente, parece que ciertos metabolitos promueven una reprogramación epigenética de las NPC, lo que afecta su autorrenovación y diferenciación (47). En el caso del BHB, se ha demostrado que actúa como un inhibidor endógeno de las HDAC, pero que también puede actuar como molécula de señalización al modificar la acetilación y metilación de las histonas por la activación de vías de señalización intracelulares (37-39). Por lo tanto, en este trabajo también se midió la expresión de dos marcas de histonas, H3K27ac y H3K27me3, las cuales se asocian con activación y represión de la expresión génica, respectivamente.

Los resultados obtenidos demuestran que la expresión de ambas marcas de histonas a nivel global se ve modificada por el BHB, de manera general se observa una disminución con las distintas concentraciones de BHB. Sin embargo, para el caso de la H3K27ac parece contrario a lo que se ha descrito anteriormente, ya que el BHB al ser un inhibidor de las HDAC, debería aumentar la expresión de la H3K27ac, pero hay que considerar que este efecto del BHB no se ha evaluado en un proceso de diferenciación y ni en tratamientos a largo plazo, ya que usualmente su efecto se ha evaluado después de 1 a 24 horas en modelos animales o cultivos *in vitro*. También es importante tener en cuenta que estos resultados no se pueden

relacionar directamente, es decir, el efecto de las marcas con la expresión de los marcadores evaluados, ya que la expresión de las modificaciones epigenéticas es a nivel global y sería necesario, evaluar específicamente su presencia en cada uno de los promotores de los genes objetivos con las distintas concentraciones de BHB.

Por último, se ha demostrado que el cerebro tiene el segundo contenido de lípidos más alto del cuerpo después de los adipocitos y que el metabolismo de los lípidos y los ácidos grasos contribuyen a la neurogénesis (46). En particular, se ha especulado que las NPC en proliferación activan la lipogénesis para aumentar la cantidad de lípidos disponibles, que luego se utilizarán para la síntesis de la membrana plasmática (46). Por otra parte, ciertas vías metabólicas de lípidos también podrían influir directamente en la maduración y diferenciación neuronal (47). Así como se ha sugerido que el metabolismo del colesterol podría ser una vía de importancia específica para el desarrollo de las neuronas (45). En el caso de los KB además de ser fuente de energía, se ha demostrado que contribuyen a la lipogénesis y biosíntesis de esteroides en el cerebro en desarrollo (48). Por lo tanto, es importante considerar que el efecto positivo del BHB observado en este protocolo de diferenciación dopaminérgica puede deberse en parte a un aumento del metabolismo energético total, pero también a sus procesos anabólicos, necesarios para mantener diversas funciones celulares importantes durante el neurodesarrollo como la señalización neuronal, la síntesis de fosfolípidos y el transporte axonal. En este trabajo no se evaluaron estos procesos y su evaluación contribuiría en una mejor comprensión del papel del BHB en el desarrollo del mesencéfalo ventral *in vivo*.

10. Conclusión

En conclusión, se estudió el efecto del BHB sobre la diferenciación neuronal dopaminérgica en un modelo *in vitro*, mostrando que el BHB tiene un efecto positivo durante este proceso, lo que sugiere que posiblemente tenga un papel importante en la neurogénesis. Adicionalmente se indagó sobre el mecanismo potencial del BHB sobre la diferenciación y maduración de células que expresan marcadores relacionados con el linaje dopaminérgica a través de marcas epigenéticas. Juntos, estos resultados pueden sugerir que el metabolismo celular puede servir como un

integrador de señales que traduce una variedad de factores en una respuesta metabólica coordinada que puede afectar la fisiología y el comportamiento celular en múltiples niveles, por ejemplo, estado energético, fuente de utilización de combustible, estrés oxidativo, procesos anabólicos y epigenéticos. En consecuencia, descubrir la conexión entre el destino celular y el metabolismo deberían proporcionar en el futuro estrategias para la diferenciación dirigida de las hESC y por ende, mejorar la comprensión sobre el desarrollo del SNC.

11. Aproximaciones experimentales futuras

Este trabajo evaluó el efecto del BHB en el proceso de diferenciación dopaminérgica mediante inmunotinciones, obteniendo resultados positivos, sin embargo, sería necesario caracterizar este efecto mediante otras técnicas como Western Blot y RT-PCR, así como llevar a cabo posteriores análisis para complementar los resultados obtenidos como:

Evaluar la expresión a nivel de ARNm y proteína de los transportadores y enzimas involucradas en el metabolismo de los KB.

Evaluar si la concentración de 5 mM no tiene un efecto citotóxico mediante tinción de TUNEL.

Evaluar marcadores para otros tipos celulares como GFAP, marcador de astrocitos y O4, marcador de oligodendrocitos.

Evaluar otras marcas epigenéticas de activación y represión de la expresión génica, así como la marca novedosa de la β -hidroxibutilación.

Evaluar el impacto de BHB en la proliferación y diferenciación de otras estructuras cerebrales en desarrollo.

12. Referencias

1. Shahbazi M. N. (2020). Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development* (Cambridge, England), 147(14), dev190629. <https://doi.org/10.1242/dev.190629>
2. ten Donkelaar, H.J., Yamada, S., Shiota, K., van der Vliet, T. (2014). Overview of the Development of the Human Brain and Spinal Cord. In: *Clinical Neuroembryology*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-3-642-54687-7_1
3. Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychology review*, 20(4), 327–348. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
4. Catala, M. (2019). Development of the Central Nervous System. In: Di Rocco, C., Pang, D., Rutka, J. (eds). In *Pediatric Neurosurgery*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31512-6_1-1
5. Hernández-Flórez CE, Beltrán MA, Contreras GA. Desarrollo neuroembriológico: el camino desde la proliferación hasta la perfección. *Univ Med*. 2018;59(3). 1-10. doi: <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.umed59-3.dneu>
6. Casas Gimeno, G., & Paridaen, J. T. M. L. (2022). The Symmetry of Neural Stem Cell and Progenitor Divisions in the Vertebrate Brain. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 885269. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.885269>
7. Allodi, I., & Hedlund, E. (2014). Directed midbrain and spinal cord neurogenesis from pluripotent stem cells to model development and disease in a dish. *Frontiers in neuroscience*, 8, 109. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00109>
8. Tian, L., Al-Nusaif, M., Chen, X., Li, S., & Le, W. (2022). Roles of Transcription Factors in the Development and Reprogramming of the Dopaminergic Neurons. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 845. <https://doi.org/10.3390/ijms23020845>

9. Arenas, E., Denham, M., & Villaescusa, J. C. (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development* (Cambridge, England), 142(11), 1918–1936. <https://doi.org/10.1242/dev.097394>
10. La Manno, G., Gyllborg, D., Codeluppi, S., Nishimura, K., Salto, C., Zeisel, A., Borm, L. E., Stott, S. R. W., Toledo, E. M., Villaescusa, J. C., Lönnerberg, P., Ryge, J., Barker, R. A., Arenas, E., & Linnarsson, S. (2016). Molecular Diversity of Midbrain Development in Mouse, Human, and Stem Cells. *Cell*, 167(2), 566–580.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.027>
11. Ásgrímsdóttir, E. S., & Arenas, E. (2020). Midbrain Dopaminergic Neuron Development at the Single Cell Level: *In vivo* and in Stem Cells. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 463. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00463>
12. Wang, M., Ling, K. H., Tan, J. J., & Lu, C. B. (2020). Development and Differentiation of Midbrain Dopaminergic Neuron: From Bench to Bedside. *Cells*, 9(6), 1489. <https://doi.org/10.3390/cells9061489>
13. Romito, A., & Cobellis, G. (2016). Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions. *Stem cells international*, 2016, 9451492. <https://doi.org/10.1155/2016/9451492>
14. Sozzi, E., Nilsson, F., Kajtez, J., Parmar, M., & Fiorenzano, A. (2022). Generation of Human Ventral Midbrain Organoids Derived from Pluripotent Stem Cells. *Current protocols*, 2(9), e555. <https://doi.org/10.1002/cpz1.555>
15. Yeap, Y. J., Teddy, T. J. W., Lee, M. J., Goh, M., & Lim, K. L. (2023). From 2D to 3D: Development of Monolayer Dopaminergic Neuronal and Midbrain Organoid Cultures for Parkinson's Disease Modeling and Regenerative Therapy. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2523. <https://doi.org/10.3390/ijms24032523>
16. Steiner P. (2019). Brain Fuel Utilization in the Developing Brain. *Annals of nutrition & metabolism*, 75 Suppl 1, 8–18. <https://doi.org/10.1159/000508054>
17. McKenna, M. C., Dienel, G. A., Sonnewald, U., Waagepetersen, H. S., & Schousboe, A. (2012). Energy Metabolism of the Brain. *Basic Neurochemistry*:

Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology: Eighth Edition, 200–231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00011-0>

18. Oyarzábal A., Musokhranova U., Barros Lf. & García-Cazorla A. (2021). Energy metabolism in childhood neurodevelopmental disorders. *EBioMedicine*, 69, 103474. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103474>

19. Tanner, G. R., Lutas, A., Martínez-François, J. R., & Yellen, G. (2011). Single K ATP channel opening in response to action potential firing in mouse dentate granule neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(23), 8689–8696. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5951-10.2011>

20. Jensen, N. J., Wodschow, H. Z., Nilsson, M., & Rungby, J. (2020). Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–17. <https://doi.org/10.3390/IJMS21228767>

21. Camandola, S., & Mattson, M. P. (2017). Focus: Metabolism: Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 36(11), 1474. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201695810>

22. Silva, B., Mantha, O. L., Schor, J., Pascual, A., Plaçais, P. Y., Pavlowsky, A., & Preat, T. (2022). Glia fuel neurons with locally synthesized ketone bodies to sustain memory under starvation. *Nature Metabolism* 2022 4:2, 4(2), 213–224. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00528-6>

23. Robinson, A. M., & Williamson, D. H. (1980). Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiological reviews*, 60(1), 143–187. <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.1.143>

24. Cunnane, S. C., & Crawford, M. A. (2014). Energetic and nutritional constraints on infant brain development: Implications for brain expansion during human evolution. *Journal of Human Evolution*, 77, 88–98. <https://doi.org/10.1016/J.JHEVOL.2014.05.001>

25. Nehlig, A. (2004). Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70(3), 265–275. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2003.07.006>
26. Nehlig, A., & Pereira de Vasconcelos, A. (1993). Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Progress in Neurobiology*, 40(2), 163–220. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(93\)90022-K](https://doi.org/10.1016/0301-0082(93)90022-K)
27. Vannucci, S. J., & Simpson, I. A. (2003). Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 285(5), E1127–E1134. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00187.2003>
28. Rafiki, A., Boulland, J. L., Halestrap, A. P., Ottersen, O. P., & Bergersen, L. (2003). Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience*, 122(3), 677–688. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2003.08.040>
29. Adam, P. A., Räihä, N., Rahiala, E. L., & Kekomäki, M. (1975). Oxidation of glucose and D-B-OH-butyrate by the early human fetal brain. *Acta paediatrica Scandinavica*, 64(1), 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1975.tb04375.x>
30. Morris, A. A. M. (2005). Cerebral ketone body metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28(2), 109–121. <https://doi.org/10.1007/S10545-005-5518-0>
31. García-Rodríguez, D., & Giménez-Cassina, A. (2021). Ketone Bodies in the Brain Beyond Fuel Metabolism: From Excitability to Gene Expression and Cell Signaling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 171. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2021.732120/BIBTEX>
32. Koppel, S. J., & Swerdlow, R. H. (2018). Neuroketotherapeutics: A modern review of a century-old therapy. *Neurochemistry international*, 117, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.05.019>
33. Naithani, D., & Karn, S. K. (2020). The Role of Ketone Bodies in Improving Neurological Function and Efficiency. *Health Scope* 2020 9:2, 9(2). <https://doi.org/10.5812/JHEALTHSCOPE.86578>

34. Jiang, Z., Yin, X., Wang, M., Chen, T., Wang, Y., Gao, Z., & Wang, Z. (2022). Effects of Ketogenic Diet on Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *Aging and Disease*, 13(4), 1146. <https://doi.org/10.14336/AD.2021.1217>
35. Włodarek, D. (2019b). Role of Ketogenic Diets in Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). *Nutrients*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/NU11010169>
36. Gough, S. M., Casella, A., Ortega, K. J., & Hackam, A. S. (2021). Neuroprotection by the Ketogenic Diet: Evidence and Controversies. *Frontiers in nutrition*, 8, 782657. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.782657>
37. Sleiman, S. F., Henry, J., Al-Haddad, R., El Hayek, L., Haidar, E. A., Stringer, T., Ulja, D., Karuppagounder, S. S., Holson, E. B., Ratan, R. R., Ninan, I., & Chao, M. V. (2016). Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body β -hydroxybutyrate. *ELife*, 5(JUN2016). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.15092>
38. Marosi, K., Kim, S. W., Moehl, K., Scheibye-Knudsen, M., Cheng, A., Cutler, R., Camandola, S., & Mattson, M. P. (2016). 3-Hydroxybutyrate regulates energy metabolism and induces BDNF expression in cerebral cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 139(5), 769–781. <https://doi.org/10.1111/JNC.13868>
39. Hu, E., Du, H., Zhu, X., Wang, L., Shang, S., Wu, X., Lu, H., & Lu, X. (2018). Beta-hydroxybutyrate Promotes the Expression of BDNF in Hippocampal Neurons under Adequate Glucose Supply. *Neuroscience*, 386, 315–325. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2018.06.036>
40. Dąbek, A., Wojtala, M., Pirola, L., & Balcerczyk, A. (2020). Modulation of Cellular Biochemistry, Epigenetics and Metabolomics by Ketone Bodies. Implications of the Ketogenic Diet in the Physiology of the Organism and Pathological States. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 788, 12(3), 788. <https://doi.org/10.3390/NU12030788>
41. Xie, Z., Zhang, D., Chung, D., Tang, Z., Huang, H., Dai, L., Qi, S., Li, J., Colak, G., Chen, Y., Xia, C., Peng, C., Ruan, H., Kirkey, M., Wang, D., Jensen, L. M., Kwon, O. K., Lee, S., Pletcher, S. D., ... Zhao, Y. (2016). Metabolic Regulation of Gene

Expression by Histone Lysine β -Hydroxybutyrylation. *Molecular Cell*, 62(2), 194–206. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2016.03.036>

42. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>

43. Smits, L. M., Reinhardt, L., Reinhardt, P., Glatza, M., Monzel, A. S., Stanslowsky, N., Rosato-Siri, M. D., Zanon, A., Antony, P. M., Bellmann, J., Nicklas, S. M., Hemmer, K., Qing, X., Berger, E., Kalmbach, N., Ehrlich, M., Bolognin, S., Hicks, A. A., Wegner, F., Sternecker, J. L., ... Schwamborn, J. C. (2019). Modeling Parkinson's disease in midbrain-like organoids. *NPJ Parkinson's disease*, 5, 5. <https://doi.org/10.1038/s41531-019-0078-4>

44. Tapia, M. (2013). Image J para microscopía. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. <https://www.biomedicas.unam.mx/wp-content/pdf/unidad-de-microscopia/guia-de-imagej-para-microscopia.pdf?x70584>

45. Knobloch, M., & Jessberger, S. (2017). Metabolism and neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 42, 45–52. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2016.11.006>

46. Maffezzini, C., Calvo-Garrido, J., Wredenber, A., & Freyer, C. (2020). Metabolic regulation of neurodifferentiation in the adult brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 2483–2496. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03430-9>

47. Angelopoulos, I., Gakis, G., Birmpas, K., Kyrousi, C., Habeos, E. E., Kaplani, K., Lygerou, Z., Habeos, I., & Taraviras, S. (2022). Metabolic regulation of the neural stem cell fate: Unraveling new connections, establishing new concepts. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 1009125. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.1009125/BIBTEX>

48. Cotter, D. G., Schugar, R. C., & Crawford, P. A. (2013). Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 304(8), H1060. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00646.2012>

49. Moriarty, N., Gantner, C. W., Hunt, C. P. J., Ermine, C. M., Frausin, S., Viventi, S., Ovchinnikov, D. A., Kirik, D., Parish, C. L., & Thompson, L. H. (2022). A combined cell and gene therapy approach for homotopic reconstruction of midbrain dopamine pathways using human pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, 29(3), 434–448.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.01.013>
50. Guo, X., Tang, L., & Tang, X. (2021). Current Developments in Cell Replacement Therapy for Parkinson's Disease. *Neuroscience*, 463, 370–382. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.03.022>