



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS**

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE DOCENCIA
JEFATURA DE POSGRADO

**GENERACIÓN DE PRECURSORES NEURALES: PARTICIPACIÓN DE ENTORNOS
NEURALES, MEDIOS CONDICIONADOS COMO
AGENTES INDUCTORES SOBRE QUERATINOCITOS**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN MEDICINA MOLECULAR

Q U E P R E S E N T A

**Q.F.B. VÍCTOR HUGO
MAGDALENO IZQUIERDO**

D I R E C T O R D E T E S I S:

Dr. JESÚS SANTA-OLALLA TAPIA

Cuernavaca, Morelos, México a 27 de julio del 2020

El presente proyecto se realizó en:

Laboratorio de Biología de Células Troncales
Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular “Ruy Pérez Tamayo”
Facultad de Medicina, UAEM
Hospital del Niño y Adolescente Morelense

Miembros del comité tutorial:

Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia
Dr. Juan José Acevedo Fernández
Dr. Diego Ricardo Esquiliano Rendón
Dr. Alonso Valderrama Flores
M. en C. José Santos Ángeles Chimal

Miembros del jurado de examen:

Dr. Jesús Santa Olalla-Tapia
Dr. Juan José Acevedo Fernández
Dr. Diego Esquiliano Rendón
Dra. Verónica Narváez Padilla
Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con registro 510507
y a la Fundación Telmex-Telcel con registro 182029220 por mi financiamiento durante los
estudios de la Maestría en Medicina Molecular

Índice

1. Resumen	4
2. Introducción: Desarrollo embrionario del SNC	5
2.2 Inducción neural	5
2.3 Regionalización y determinación	6
2.4 Establecimiento del eje dorsoventral (D-V)	7
3. Origen embrionario de las células troncales neurales	17
3.1 Nicho en el contexto de las células troncales	17
3.1.1 Función del nicho de las células troncales	18
3.1.2 Componentes del nicho de las células troncales	19
3.1.3 Factores solubles presentes en el nicho de células troncales	20
3.1.4 Interacciones célula- célula e interacciones célula- MEC	23
3.1.5 Influencia de las señales mecánicas en la elección de destino	24
3.1.6 Participación de las señales topográficas en el comportamiento troncal	25
3.1.7 El papel de las vesículas extracelulares en el nicho neural	26
4. Clases de precursores neurales	27
5. Neurogénesis	29
6. Gliogénesis	32
6.1 Diferenciación glial	35
6.2 Efecto de agentes solubles	36
7. Células troncales epidermales	36
8. Plasticidad	37

8.1 Definición operativa	37
8.2 Reprogramación nuclear	39
8.3 Desdiferenciación	40
8.4 Transdiferenciación	41
8.5 Transdeterminación	41
9. Medios condicionados de origen neural	42
9.1 Su efecto sobre la diferenciación y la proliferación celular	42
9.2 Caracterización de medios condicionados de origen neural.	45
9.2.1 Medio condicionado derivado de meduloblastoma	45
9.2.2 Medio condicionado derivado de neuroblastoma	50
10. Antecedentes	52
10.1 Generales	52
10.2 Específicos	53
11. Planteamiento del problema	56
12. Objetivos	57
12.2 Específicos	57
13. Hipótesis	57
14. Materiales y metodología	58
14.1 Cultivo de queratinocitos (HEKn)	58
14.2 Cultivo de neuroblastoma (SH-SY5Y)	58
14.3 Cultivo de meduloblastoma (DAOY)	58

14.4 Cosecha del medio condicionado de células tumorales neurales (MC-CTN)	59
14.5 Generación de agregados epidermales	59
14.6 Inducción NPC de queratinocitos	59
14.7 Caracterización por RT-PCR	60
15. Resultados	61
15.1 Propagación y caracterización a las líneas tumorales neurales	61
15.2 Expansión y caracterización fenotípica de las células epidermales	64
15.3 Generación medios condicionados de líneas tumorales humanas	67
15.4. Evaluación la capacidad de inducción neural de los medios condicionados sobre células epidermales	70
16. Discusión	77
17. Conclusiones	82
18. Perspectivas	83
19. Bibliografía	84

I. Lista de figuras

- Figura 1. Difusión diferencial de los principales morfógenos que participan en la regionalización.
- Figura 2. Vía canónica de Shh.
- Figura 3. Binomio en la elección de destino durante la regionalización mediante Wnt.
- Figura 4. Modelo del secuestro de Gli3 mediado por cadherina 7.
- Figura 5. Componentes celulares y acelulares del nicho troncal.
- Figura 6. Efecto de la elasticidad del sustrato sobre la diferenciación de las células troncales mesenquimales.
- Figura 7. Esquema de las diversas clases de precursores neurales.
- Figura 8. Entidades dérmicas que componen las diferentes capas de la piel.
- Figura 9. Panorama general de la reprogramación, transdiferenciación y desdiferenciación.
- Figura 10. Evento natural de desdiferenciación en pez cebra
- Figura 11. Viabilidad, rendimiento y horas por división de la línea celular SH-SY5Y (ATCC CRL-2266).
- Figura 12. Caracterización de la línea SH-SY5Y
- Figura 13. Viabilidad, rendimiento y horas por división de la línea celular DAOY (ATCC HTB-186).
- Figura 14. Caracterización de la línea celular DAOY.
- Figura 15. Viabilidad, rendimiento y horas por división de la línea celular HEK_n (ATCC PCS-200-010).
- Figura 16. Caracterización de la línea HEK_n.
- Figura 17. Obtención del medio condicionado de la línea celular SH-SY5Y.
- Figura 18. Caracterización de SH-SY5Y, generador de medio condicionado
- Figura 19. Obtención del medio condicionado de la línea tumoral DAOY.
- Figura 20. Generación de agregados epidermales en condiciones no adherentes.
- Figura 21. Evaluación del efecto del medio condicionado de SH-SY5Y en condición adherente.
- Figura 22. Evaluación del efecto del medio condicionado de DAOY en condición adherente.
- Figura 23. Caracterización de las células HEK_n en condiciones adherentes en medio condicionado de SH-SY5Y y DAOY.
- Figura 24. Inducción de neuroesferas sobre células epidermales mediante medios condicionados de origen tumoral de SH-SY5Y.

Figura 25. Inducción de neuroesferas sobre células epidermales mediante medio condicionado de DAOY.

II. Lista de abreviaturas

ADN	Ácido 2'-dexosirribunucleico
NG2	Antígeno neural tipo 2, del inglés Neural antigen type 2
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
APC	Célula precursora de astrocitos, del inglés Astrocytes precursor cell
O2A	Célula precursora de oligodendroglía y astrocitos tipo 2, del inglés Oligodendrocyte astrocyte type 2 cell
CNi	Célula neural inducida
iPS	Célula troncal pluripotencial inducida, del inglés induced Pluripotential stem cell
CPH	Célula progenitora hipocampal
CPN	Célula progenitora neural
CT	Célula troncal
CTEH	Célula troncal embrionaria humana
CTA	Célula troncal adulta
CTN	Célula troncal neural
CTNA	Célula troncal neural del adulto
CTNi	Célula troncal neural inducida
CTEpi	Célula troncal epidermal
CTG	Célula troncal germinal
Eje A-P	Eje Anteroposterior
Eje D-V	Eje Dorsoventral
Eje R-C	Eje Rostrocaudal
aFGF	Factor de crecimiento fibroblástico ácido, del inglés acid Fibroblastic growth factor
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico, del inglés beta Fibroblastic growth factor

TGF- β	Factor de crecimiento transformante, del inglés Transforming Growth factor- β
EGF	Factor de crecimiento epidermal, del inglés Epidermal growth factor
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés Vascular endotelial growth factor
GGF-2	Factor de crecimiento glial tipo 2, del inglés Glial growth factor type 2
IGF-1	Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1, del inglés Insulin -like growth factor type 1
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés Platelet-derived growth factor
NGF	Factor de crecimiento nervioso, del inglés Nerve growth factor
LIF	Factor inhibidor de leucemias, del inglés Leukemia inhibitory factor
CNTF	Factor neurotrófico ciliar, del inglés Ciliary neurotrophic factor
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro, del inglés Brain derived neurotrophic factor
CBF α -1,	Factor de unión nuclear α tipo 1, del inglés α -Core binding factor type 1
FT	Factor transcripcional
HD	Homeodomínio
bHLH	Hélice bucle hélice básica, del inglés basic Helix loop helix
IL	Interleucina
MCI	Masa celular interna
MEC	Matriz extracelular

MC-DAOY	Medio condicionado derivado de DAOY
MC-LS	Medio condicionado libre de suero
MC-SH-SY5Y	Medio condicionado derivado de SH-SY5Y
MB	Meduloblastoma
PSA-NCAM	Molécula de adhesión celular neural polisialada, del inglés poly siliated neural cell adhesion molecule
MN	Motoneurona
NFM	Neurofilamento de peso molecular
Nrp-1	Neuropilina 1, del inglés Neuphiline-1
Ngn3	Neurogenina 3
PO	Precursor oligodendrocítico
PATm	Progenitor de amplificación transitoria multipotente
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial, del inglés Glial fibrillary acidic protein
MAP2	Proteína asociada al microtúbulo tipo 2, del inglés Microtubule associated protein type 2
ADMP	Proteína morfogenética anti dorsalizante, del inglés anti dorsalizing morphogenetic protein)
NAPIL1	Proteína de ensamblado de nucleosoma tipo 1
BMP	Proteína morfogenética de hueso, del inglés Bone morphogenetic protein
NeuN	Proteína nuclear neuronal, del inglés Neuronal nuclear
SNC	Sistema Nervioso Central
Shh	Sonic hedgehod
VEs	Vesículas extracelulares
ZSV	Zona Subventricular

1. Resumen

La investigación en el campo de la biología de las células troncales se ha visto enriquecida tanto en los aspectos funcionales, como mecanísticos y terapéuticos por la interesante y amplia oferta desarrollada de tecnologías en biología celular, bioquímica y los avances en las “ómicas” durante la última década. El conocimiento y caracterización de los componentes del nicho de las células troncales, es un punto clave de este trabajo. El cual es una entidad espacial y temporal altamente dinámica y compleja que integra múltiples señales de diferente naturaleza química, que son generadas por distintas fuentes celulares que en última instancia van a regular el comportamiento de la célula troncal, ya bien sea para que se mantenga en un estado quiescente, bien alcance un estado proliferativo o bien, ser comprometida a diferenciar con la finalidad de repoblar la progenie ante eventos de daño o de recambio tisular. Señales extracelulares como factores de crecimiento, moléculas pequeñas libres o ancladas a la matriz extracelular y las características topológicas del sustrato, son agentes que están presentes en el nicho e inclusive en un sistema de cultivo que en conjunto comprometen a las células a un fenotipo celular especificado o a su estado indiferenciado. En los sistemas *in vitro*, se pueden caracterizar por separado cada uno de esos elementos, una herramienta es el uso de los medios condicionados, que poseen un conjunto de moléculas secretadas al entorno extracelular y que puede cumplir justamente la parte de las señales abióticas que participan en regular el entorno del nicho de la célula troncal. En el presente trabajo, el principal objetivo fue evaluar el potencial de medios condicionados de origen neuroglial como agentes inductores del compromiso neural sobre queratinocitos. Se identificó que el medio condicionado de SH-SY5HY impulsó a los queratinocitos hacia la generación de agregados tridimensionales semejantes a neuroesferas tras 50 horas de incubación. Tanto el medio condicionado de DAOY y SH-SY5Y están induciendo la ganancia de marcadores de precursores neurales multipotentes, como Sox2 y de nestina. Por otro lado, en las células no adherentes, se indujo la expresión de nestina y vimentina. En conclusión, los medios condicionados de SH-SY5Y y DAOY están induciendo la expresión de proteínas asociadas a los precursores neurales multipotentes indiferenciados. Estos resultados abren la posibilidad de usar células del propio paciente, para generar alternativas terapéuticas para desórdenes crónico-degenerativos, como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington.

2. INTRODUCCIÓN

2. Desarrollo embrionario del SNC

2.2 Inducción neural.

El sistema nervioso central (SNC) de los humanos comienza en torno a los 18 días después de la fecundación. Se origina de un engrosamiento del ectodermo dorsal que posteriormente genera una estructura tubular que se alarga formando el neuroeje, la que experimenta curvaturas y pliegues. El encéfalo, la región más rostral del tubo neural adquiere su forma final por engrosamientos y vesiculaciones. Durante la gastrulación, se forman las tres capas germinativas (endodermo, mesodermo y ectodermo) adquiriendo el embrión una forma de disco trilaminar lo que se acompaña de un evento denominado inducción neural, que origina al neuroepitelio, y con ello, al SNC. Cada capa germinativa se diferencia a distintos linajes celulares que dan lugar a los órganos y estructuras del embrión.

Una vez que el óvulo es fecundado, da lugar a una masa de células denominada mórula y ésta a la blástula. La masa celular interna (MCI) de la blástula tardía pasa a adquirir la forma de un cuerpo trilaminar que forma parte de la gástrula. El SNC se origina desde una capa germinativa, el ectodermo, donde la región dorsal se engrosa y forma un engrosamiento, la placa neural, localizada en la región ectodermodorsal iniciando así la etapa de neurulación, la cual concluye hasta la cuarta semana. El embrión en desarrollo, en esta fase se denomina neurula. A los 21 días, la placa neural sufre una depresión y forma el surco neural, sus bordes laterales se engrosan dando lugar a las crestas neurales.

La depresión del surco neural se acentúa y el canal neural empieza a adquirir su forma y a la par los pliegues neurales se encuentran en la línea central y dorsal, lo que favorece su fusión para dar lugar al tubo neural. El tubo neural es la estructura anatómica que da lugar al encéfalo y la médula espinal en una dirección rostrocaudal (R-C) del neuroeje. La notocorda regula el proceso de desarrollo del neuroeje, y de manera activa durante el proceso tardío de la gastrulación. A su alrededor se forma la columna vertebral, y a medida que el SNC se genera, la notocorda se degenera persistiendo únicamente como un remanente que pasará a formar parte del núcleo pulposo de los discos intervertebrales¹.

A los 28 días de gestación, el tubo neural se cierra del extremo rostral para formar tres cavidades interconectadas, las cuales se convertirán en los ventrículos, mientras que los tejidos a su alrededor formarán las tres partes principales del encéfalo: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. Estando el prosencéfalo en la región más rostral, el mesencéfalo en la medial y el rombencéfalo, en la región más caudal. Los ventrículos laterales y el tercer ventrículo se desarrollan a partir de la cámara interna del prosencéfalo. La región neuroepitelial que rodea al tercer ventrículo formará al diencéfalo. El mesencéfalo adquiere su forma final y se estrecha aún más la cámara en su interior dando lugar al acueducto cerebral, a la par, el rombencéfalo subdivide en metencéfalo y en mielencéfalo².

2.3 Regionalización y determinación.

El SNC en los vertebrados está subdividido en diferentes regiones a lo largo del eje anteroposterior (eje A-P) y en el desarrollo embrionario es clave un balance finamente ajustado entre las señales de proliferación y aquellas asociadas a eventos de diferenciación. Diferentes moléculas tienen papeles preponderantes específicos en función de su concentración focalizada y al receptor al que se ligan. Durante el desarrollo embrionario, los eventos de decisión de destino celular están asociados a señales de largo alcance que actúan sobre precursores. Los morfógenos son moléculas señalizadoras extracelulares, secretadas por organizadores secundarios (por ejemplo, notocorda), que participan en controlar los diversos destinos celulares en función de su concentración local. Al difundirse, especifican diversos territorios neurales estableciendo la identidad posicional para cada región. El mesodermo dorsal y posteriormente la notocorda participan activamente en establecer patrones de diferenciación a lo largo del neuroeje y del eje dorsoventral (D-V) mediante la secreción de moléculas extracelulares señalizadoras, llamadas morfógenos, estableciendo patrones de diferenciación a lo largo del eje A-P y a través del eje D-V lo que establece ejes de coordenadas en ambas orientaciones, lo que confiere información espacial a cada precursor celular del neuroepitelio, lo que permite otorgar una identidad posicional dentro del tubo neural dependiendo de sus coordenadas a lo largo del eje rostro-caudal (R-C) y D-V, este proceso especifica progenitores de la placa neural hacia una identidad ventral o dorsal. Los morfógenos definen patrones de expresión de factores de transcripción (FT), los cuales

establecen dominios de células precursoras que se diferenciarán a determinados subtipos celulares tanto en la espina dorsal como en el encéfalo. Cada eje (D-V y A-P), tiene un organizador en cada extremo, donde se liberan desde la etapa embrionaria, de forma selectiva los cinco principales morfógenos (Wnt, BMP, Shh, ácido retinoico y FGF) desde la etapa embrionaria que participan en la generación de identidad celular (**Figura. 1**). Es importante destacar que las señales derivadas de la notocorda inducen la formación de estructuras como la placa del piso y las motoneuronas y a la par, reprimen o previenen la expresión de marcadores dorsales³.

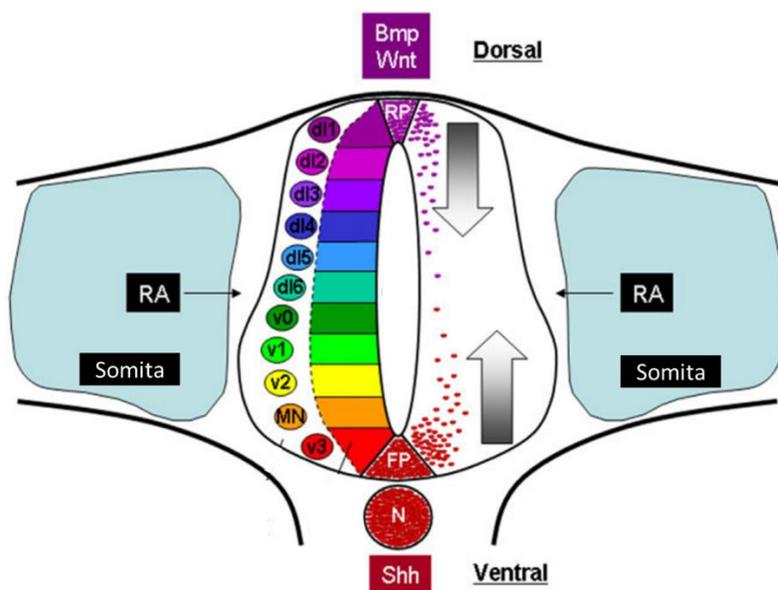


Figura 1. Difusión diferencial de los principales morfógenos que participan en la regionalización. Los progenitores del neuroepitelio alrededor del canal central, de forma progresiva van a migrar y diferenciar a los diferentes fenotipos en función de la concentración de los morfógenos que señalicen. La placa del piso (FP, del inglés Floor plate), secreta a Shh, mientras que la placa del techo (RP, del inglés, Roof plate) libera a BMPs y Wnt. El AR emana desde las somitas adyacentes. Tomado y modificado de Ulloa y Martí³⁴.

2.4 Establecimiento del eje dorsoventral (D-V)

En la comprensión del proceso de regionalización del tubo neural, se ha desarrollado un modelo que permite integrar la evidencia de los eventos moleculares que se presentan en su ventralización y dorsalización. El modelo prosomérico, describe la división del cerebro en una configuración cuasi cartesiana que define patrones moleculares longitudinales (columnas) y

transversales (segmentos), denominados prosómeros, que se intercalan para esbozar y definir campos de desarrollo en el cerebro anterior. El proceso de regionalización es gradual y continuo y comienza tan pronto como inicia la inducción del neuroectodermo^{4,5}.

Ventralización: Sonic hedgehog (Shh) es un morfógeno miembro de la familia de Hedgehog (Hh), secretado por la notocorda, estructura localizada ventralmente al tubo neural, desde la cual se detona el inicio de la neurogénesis al establecer la inducción de la placa neural que posteriormente invaginará para formar el surco neural. La placa del piso en el surco neural también secreta Shh que delimita bloques o dominios a lo largo del eje DV del tubo neural, lo que conduce a generar patrones específicos de subtipos de neuronas, como motoneuronas e interneuronas. Al cerrarse el tubo neural se establecen cinco dominios de células progenitoras, la placa del piso (p3), pMN, p2, p1 y p0. Cada dominio de progenitores participará en el desarrollo de un subtipo específico de interneuronas post mitóticas (V0s a V3) y motoneuronas (MN)⁶. La señalización de Shh involucra dos proteínas transmembranales, Patched (Ptc) y Smoothened (Smo) que culmina en la regulación de la actividad de Factores Transcripcionales (FTs) que contienen dedos de zinc, miembros de la familia Gli, que activan o reprimen la actividad de sus genes diana en presencia o ausencia de Shh⁷ (**Figura. 2**).

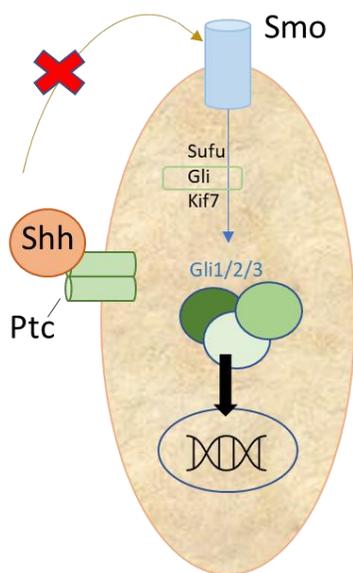


Figura 2. Vía canónica de Shh. En ausencia de Shh, Ptc se encarga de inhibir a Smo. Cuando Shh está presente, Shh se une a Ptc y evita que Smo sea bloqueado, entonces Smo se internaliza y se acumula. Esto activa a Gli y permite que se transloque junto a Gli2 y Gli3 al interior del núcleo y se dirija hacia sus genes diana.

Existen tres proteínas Gli (Gli1-3), que participan en el proceso de ventralización en los vertebrados. Gli1 es únicamente un activador, mientras Gli2 y Gli3 exhiben un comportamiento tanto activador como represor en función del estado proteolítico de la proteína. En presencia de Shh, se induce la expresión de Gli1, se evita la degradación total y parcial de Gli2 y Gli3, respectivamente, se translocan al núcleo e inducen la expresión de sus genes diana^{8,9}. La activación de la familia Gli en la especificación de los progenitores neurales, establece un gradiente en el sentido ventral a dorsal de Gli1, mientras que Gli3 establece un gradiente represor en el sentido inverso, dorsal a ventral. Por otra parte, Gli2 es expresado a lo largo del eje D-V¹⁰ (**Figura. 3**).

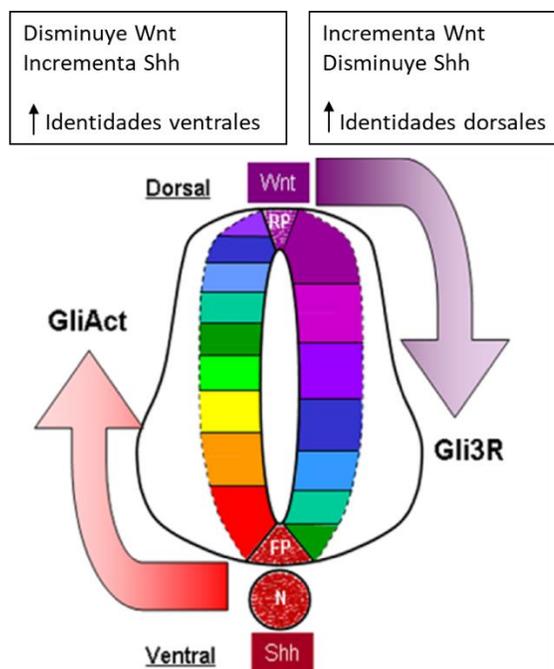


Figura 3. Binomio en la elección de destino durante la regionalización mediante Wnt. Las interacciones antagonistas entre Wnt y Shh encamina a los precursores del neuroepitelio a diferentes identidades. La presencia de Shh, promueve la identidad ventral en los progenitores del neuroepitelio y el incremento de Wnt, favorece el destino dorsal. Cuando no hay presencia de Shh, Gli3 se hidroliza de su extremo carboxi terminal y se genera Gli3R, el cual reprime vías diana de Shh. La presencia de Shh estabiliza las isoformas de Gli y lo activan, GliAct. Tomado y modificado de Ulloa y Martí³⁴.

El proceso ventralizante mediado por Shh mediante proteínas Gli, se ha propuesto que se desarrolla en tres etapas:

- i. Se establece un gradiente de Shh que regula un conjunto de FT con homedominios (HD) o hélice- bucle- hélice básica (bHLH, del inglés de basic helix loop helix) de acuerdo con si son inhibidos (clase I) o inducidos (clase II) por Shh.
- ii. Las interacciones generadas entre los FT con HD y los bHLH, específicamente Pax7, Irx3 Dbx1, Dbx2, Pax6 (clase I), Nkx6.1 Nkx2.2 (clase II) determinan a los cinco dominios de progenitores (p0-p3 y pMN) en diferentes posiciones dorsoventrales.
- iii. Las interacciones combinadas entre FT Nkx2.2, Nkx6.1 e Irx3 especifica la identidad de las neuronas generadas en la tercera parte del tubo ventral¹¹.

Bajo este esquema de expresión combinatoria, el límite ventral p0-dorsal es establecido por Pax7¹², el límite p0-p1 lo define la expresión de Dbx1, el límite ventral p1-p2 se establece por Dbx2¹³, el límite entre p2-pMN es definido por Irx3 y la expresión de Pax6 define el límite pMN-p3. Además, proteínas de clase II, Nkx6.1 y Nkx2.2 auxilian en el establecimiento de los límites p1/p2 y pMN-p3, respectivamente¹².

La vía de señalización Shh/Gli es determinante en el proceso de ventralización, mientras que la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, se expandieron los subtipos de progenitores dorsales durante la inducción neural. Experimentos en donde se realiza la activación ectópica de la vía Wnt/ β -catenina, resulta en la expansión de subtipos celulares asociados a genes de identidad dorsal como Pax6 y Pax7, además de la inhibición concomitante de genes ventrales como Olig2 y Nkx2.2¹³.

En la ventralización del neuroepitelio, también se ven involucradas moléculas de adhesión celular como elementos mediadores en la amplificación de la señalización iniciada por Shh. La cadherina 7, es perteneciente a la familia clásica de las cadherinas. Se expresa en la frontera distal del gradiente de Shh, específicamente a partir de la región intermedia del tubo neural¹⁴. El papel que se propone a cadherina 7, es principalmente de amplificador de la señalización

de Shh y delimitar las regiones ventrales de la médula espinal dorsal, además de ser requerida para restringir la expresión de genes dorsales (*Pax7*). Cadherina 7 actúa como un correceptor de Shh y promueve la agregación de Shh sobre la superficie celular, lo que facilita el acoplamiento de Gli3 al supresor de fusión. Esto resulta en la prevención de la degradación de Gli3 y la formación del estado represor Gli3R (**Figura. 4**). Específicamente, el complejo Cadherina 7/Shh amplifica la vía de Shh al evitar que Gli3FL (activador transcripcional de longitud completa) se fosforile parcialmente. En cambio, Gli3FL se acompleja con el supresor de fusión, esto resulta en limitar el movimiento intracelular de Gli3 y activar de forma más eficiente la señalización dependiente de Gli¹⁴.

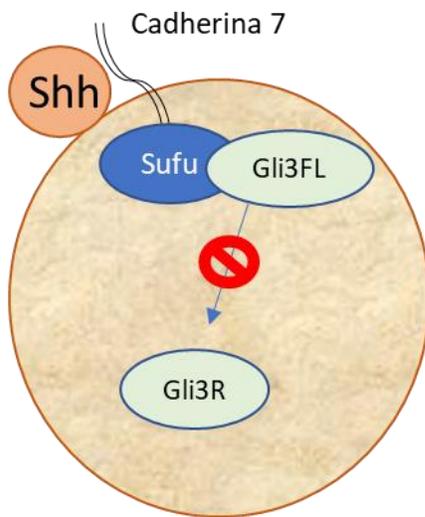


Figura 4. Modelo del secuestro de Gli3 mediado por cadherina 7. En la presencia de Shh, cadherina 7 cumple el papel de capturar a Gli3 en su forma sin hidrolizar (Gli3FL) para evitar que sufra degradación proteolítica de su extremo carboxi terminal, se fosforile y se convierta en la forma represora de la actividad.

Los agentes solubles pertenecientes a la familia de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs, del inglés Bones Morphogenetics Proteins) participan en la inducción del mesodermo y en la ventralización de los vertebrados. Los primeros estudios concernientes a esta región del neuroepitelio realizados en pez cebra y en *Xenopus laevi*, demostraban que la sobreexpresión de BMP2 y BMP4 impulsaba el destino dorsal e inhibían la inducción de los subtipos ventrales¹⁵. Sin embargo, hay evidencia experimental que reporta que la microinyección de ARNm de BMP4 en los blastómeros dorsales durante la gastrulación

induce la expresión de genes ventralizantes como *xwnt8* y *xhox3* causando la ventralización de tejidos dorsales como la notocorda. Los experimentos de microinyección de ARNm de BMP2¹⁶, BMP7¹⁷ y de componentes de la señalización de BMP, tales como *Smad1*¹⁸, demuestran tener un efecto similar a BMP4 en la ventralización del mesodermo.

Las mutaciones puntuales en el gen *bmp* también tienen severos efectos en la organización dorsoventral durante la gastrulación. La mutación *swirl* en el gen *bmp2* en embriones de pez cebra, regula a la baja la expresión de *bmp4* que da lugar a embriones con defectos en la organización posterior y ventral¹⁹.

Dorsalización: Los experimentos de injertos (mesodermo dorsal) desarrollados por Spemann y Mangold demostraron que el organizador en *Xenopus* es una estructura que secreta al entorno en desarrollo señales morfogenéticas dorsalizantes²⁰. Desde la notocorda se presenta la secreción activa de moléculas antagonizantes de la actividad de miembros de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF- β del inglés Transforming Growth factor- β) como BMP4 y BMP7 y miembros de la familia de Wnt (del inglés Wntless, sin alas, una mutación descubierta en moscas), que en conjunto son reguladores clave en el establecimiento del patrón D-V. La secreción y difusión se presenta desde la placa del techo y desde estructuras aledañas a la placa neural que especifican los territorios alares del embrión²¹. Esto es confirmado por los experimentos de inhibición de BMP4, que resultan en la ventralización de la región dorsal del tubo neural²⁰.

Las señales dorsalizantes incluyen proteínas de unión que antagonizan la actividad de BMPs, entre ellas, cordina, noggin y folistatina. Estas son señales de inducción neural que tienen un papel redundante, pues los ratones mutantes homocigotos para cada una de estas señales no muestran defectos en el patrón D-V durante la gastrulación a pesar de que los ratones mutantes para folistatina fallecen en las primeras horas de nacidos.^{21,22}. Los primeros experimentos de Smith y Harland en embriones de *Xenopus* demuestran el papel de noggin como un factor soluble secretado desde la notocorda capaz de inducir el desarrollo normal dorsal en embriones²³. En otros experimentos, la adición de noggin en cultivos de blastocistos de *Xenopus*, induce la síntesis de transcritos de la molécula de adhesión celular neural, una molécula de adhesión celular expresada en todo el SN, β -III-tubulina, marcador expresado

preferencialmente en el cerebro anterior y en la espina dorsal, XIF3, una proteína filamentosa intermedia y la actina muscular²⁴. Esta evidencia establece el papel de noggin como una molécula señalizadora que actúa induciendo directamente tejido neural.

Cordina es una proteína extracelular secretada por el mesodermo axial y estructuras anexas. Su expresión está regulada por los productos génicos que codifican los genes *gsc* (gosecoide) y *Xnot2*, los cuales contienen homedominios. Con los experimentos de microinyección de ARNm de *gsc* y *Xnot2* en blastómeros de *Xenopus*, se concluye que el transcrito de cordina, pero no noggin, es activado a través de los homedominios de *gsc* y *Xnot2*, participando en una red de FTs que regula la dorsalización. Además, cordina es necesaria para delimitar la región dorsal de la ventral. Si bien cordina por sí sola no es capaz de inducir la diferenciación del mesodermo, su expresión es un elemento que favorece la inducción de la notocorda en blastocistos tratados con bFGF²⁵.

La folistatina es una proteína cuya expresión se localiza en el blastoporo en embriones de *Xenopus*, donde se sugería que podía tener un papel dorsalizante al inicio de la gastrulación. Los experimentos de inyección del ARNm que codifica a folistatina demostró que es capaz de dorsalizar los blastocistos de *Xenopus* en estadio de ocho blastómeros²⁶. Es importante destacar el papel del LiCl en los experimentos de biología del desarrollo como un agente que activa la vía canónica de Wnt, que resulta en la dorsalización de los embriones antes de la gastrulación. Además, al hibridar sondas de folistatina en embriones en desarrollo tratados con LiCl, se muestra su expresión en el blastoporo. Y bajo el mismo esquema experimental, agregando una sonda anti sentido de ARN dirigida contra folistatina, se muestra que la inducción neural detonada por LiCl, es capaz de restablecer el eje D-V. La detección génica por medio de hibridación fluorescente *in situ* (*FISH*, del inglés Fluorescence In Situ Hybridization) demuestra la tanto la expresión de *gsc* como de *Xnot2* cuando se microinyecta ARNm de folistatina. La capacidad de inducción de tejido neural por folistatina se demostró mediante la transfección de una construcción de folistatina regulada por el promotor de citomegalovirus (CMV) en la línea celular P19, lo que resultó en la expresión de marcadores neurales como el neurofilamento de peso molecular intermedio (NF-M, del inglés neurofilament medium), Molécula de Adhesión de Células Neurales (NCAM, del inglés Neural cell adhesion molecule) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP del inglés Glial

fibrillary acidic protein). El papel dorsalizante de la folistatina también se ve reflejado en su actividad antagonista de BMP4. Los experimentos de sobreexpresión por microinyección de ARNm de folistatina en embriones completamente ventralizados mediante la expresión ectópica de BMP4, dieron como resultado la dorsalización de los mismos, sugiriendo un papel antagonista hacia BMP4^{27,28}.

La dorsalización es un proceso que ocurre a lo largo del eje A-P y como se describió arriba, está segmentado en columnas, por tanto, se requiere una molécula que juegue un papel en restringir la frontera dorsoventral. La proteína morfogenética antidorsalizante, (ADMP, del inglés anti dorsalizing morphogenetic protein), con una estructura homóloga a BMP3, ejerce una actividad supresora de la actividad génica pro-dorsal.

Los experimentos de microinyección en blastocistos de *Xenopus*, demuestran que el ARNm de la proteína morfogenética antidorsalizante regula a la baja factores dorsalizantes como noggin, goosecoide y folistatina como un mecanismo local para definir los límites dorsales²⁹.

En conjunto a los factores dorsalizantes previos, los gradientes de Wnt3 y Wnt3a participan en la adquisición de las identidades dorsales, donde se expresan preferencialmente en la región dorsal del tubo neural. Se demostró utilizando experimentos de Northern blot en embriones de ratón de 10.5 días *post-coitum* demuestran que Wnt3a está enriquecida desde la porción dorsal de la médula espinal hasta las regiones diencefálica y telencefálica, esto sugirió que Wnt3a podía tener un papel en esbozar la línea media dorsal a lo largo de todo el neuroeje en embriones de ratón en desarrollo³⁰. Para estudiar el papel de Wnt, las células humanas de teratocarcinoma (ATCC CRL-2073) son un buen modelo experimental al compartir muchas propiedades con las células troncales embrionarias e identificar los genes diana que podrían activarse durante el desarrollo embrionario. Es interesante destacar el efecto del medio condicionado enriquecido con WNT3a (MCW3a) en las células humanas de teratocarcinoma sobre su tasa de proliferación en la que participan elementos como β -catenina, folistatina, el gen homeótico de Msh tipo 2 y el inhibidor del ADN tipo 2 (ID-2, del inglés Inhibitor of DNA binding type 2) y que fueron regulados al alza, de acuerdo con los experimentos tipo Northern. Los experimentos de expresión de genes reporteros, como la luciferasa, demostraron que los genes homeóticos de Msh tipo 1 y 2, *ID2/3*, *folistatina* y el complejo *REST/NRSF* tienen promotores con elementos de respuesta a Wnt, conclusión que se ve reforzada cuando se

indujo una mutación en el promotor objetivo de Wnt del gen que codifica a Folistatina, conllevando a que se abatiera su expresión.

Se identificó que el tratamiento con medio condicionado (MC) enriquecido con Wnt3a elevó alrededor de 5-10 veces la expresión de β -catenina vs medio control en las células humanas de teratocarcinoma indicando el efecto de Wnt3a enriquecido en el MC Wnt3a sobre la activación de β -catenina. En el mismo estudio, se detectó que el MC Wnt3a, indujo de la expresión de MSX2, REST/NRSF y folistatina tras cuatro horas de incubación, induciendo su expresión hasta 15 veces. Además, la sinergia entre Wnt3a y BMP4 elevó la expresión de genes blanco de BMP4, como MSX1/2 e ID2, genes asociados al desarrollo temprano del mesodermo en el establecimiento del eje D-V hasta 25 veces en comparación cuándo BMP4 o Wnt3a actuaban solos^{31,32}. Los experimentos basados en el ratón polidactílico (Xt) demuestran que la forma represora de Gli3, carboxi-truncada, Gli3R, también es un antagonista de la vía de Shh que participa en el bloqueo del destino ventral sobre los progenitores celulares y a nivel de la regulación del desarrollo de los miembros³³.

En conjunto con las señales ventrales, en especial Shh, se establece un código molecular en el tubo neural a lo largo del eje DV. Esto especifica inicialmente cuatro zonas neuroepiteliales que corresponden a la placa del techo, al piso de la placa, las placas alares y basales³⁴, que posteriormente definirán dominios para las neuronas sensoriales y motoras³⁵.

Patrón anteroposterior: Tras la fecundación del óvulo, se completa la segunda división meiótica, la cual libera al segundo cuerpo polar y cuya posición dirige la orientación del eje A-P³⁶. El establecimiento del eje A-P permite el desarrollo de un grupo de células en la región más caudal del embrión, el denominado nodo primitivo, que se trata de un organizador primario y que libera a cordina, goosecoide y el factor nuclear hepático 3β ³⁷. La migración de las primeras células que atraviesan el nodo primitivo forma una región bien definida que va a dirigir el desarrollo rostral, la placa precordial³⁸. El establecimiento de la polaridad A-P y el respectivo eje permiten la definición de estructuras tanto primarias como secundarias que ejecutan una función secretora. Esto incluye moléculas como factor de crecimiento fibroblástico (FGF, del inglés Fibroblastic growth factor), cerberus, lefty-1, nodal y ácido retinoico que inducen tejidos anteriores que formarán parte de la cabeza, así como el cerebro anterior y medio^{39,40}. Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, la participación de

la señalización activada por FGF en el establecimiento del eje A-P, se ve reflejada por los defectos en el desarrollo en los experimentos de pérdida y ganancia de función en *Xenopus*⁴¹, ratón⁴² y pollo⁴³. La adición de bFGF y noggin en embriones de *Xenopus*, muestra tener un efecto inductor de tejido neural anterior, determinado por la expresión de HoxB9. Los experimentos de explantes tratados con bFGF y noggin al mismo tiempo, permiten ampliar las regiones de las zonas rostral y caudal determinadas por la expresión de otx2 y HoxB9, respectivamente. Sin embargo, el tratamiento solo de bFGF o noggin sobre el ectodermo temprano, no induce la expresión de marcadores del cerebro anterior y medio como En-2 y Krox20 sugiriendo una sinergia entre ambas moléculas en la definición del eje A-P. Es importante destacar el papel que tiene bFGF como un inductor neural de marcadores como molécula de adhesión celular neural y neuropilina-1, una proteína que participa en guiar a los axones durante el desarrollo embrionario³⁹. La activación de la vía de señalización por FGF no actúa sola para establecer el patrón rostro-caudal, sino que, en combinación con el gradiente de ácido retinoico, comparten la habilidad de regular la expresión del FT caudal⁴⁴.

Los genes Hox, son productos génicos clave en la delimitación del eje A-P. Muchos loci Hox, tienen elementos de respuesta a ácido retinoico (RARE, del inglés Retinoic acid response elements) que regulan la expresión y función de los genes Hox en el neuroectodermo. *Cdx1* codifica para un FT con homeodominio que es regulado por AR. Los experimentos en ratones mutantes nulos para RARE exhiben una expresión reducida de *Cdx1* que se comparan fenotípicamente a la progenie mutante nula de *Cdx1* con defectos en la espina dorsal, por tanto, *Cdx1* también está participando en especificar el tronco vertebral y la región caudal en el eje A-P⁴⁵. Es importante destacar que toda la red transcripcional encargada de dotar la identidad posicional a los progenitores como entidades rostrales, segmentan el cerebro anterior en las regiones antes mencionadas llamadas rombómeros (r1-r8) que dará lugar a los nervios motores craneales y a las somitas, desde las cuales derivarán al tronco vertebral y la región caudal⁴⁶.

Cerberus es una proteína originalmente aislada de *Xenopus*, secretada desde el endomesodermo anterior. Los experimentos de microinyección en embrión de *Xenopus* del mRNA del gen que codifica a *Cerberus* demostraron que podía inducir la formación ectópica de una segunda cabeza lo que sugería el papel que podía desarrollar en la región rostral tras el

establecimiento del eje A-P⁴⁷. *mCer-1*, es el homólogo murino de *Cerberus*, detectado en embriones a comienzos de la gastrulación en el mesodermo y endodermo en la región anterior del embrión y expresado en la notocorda y en la placa precordial. Los experimentos de explantes del mesodermo anterior, demostraron la capacidad de mCer-1 de ser un inductor neural anterior y mantener la expresión de *Otx2* en la placa neural anterior además de participar en el establecimiento del eje A-P⁴⁸.

3. Origen embrionario de las células troncales neurales.

Las células troncales embrionarias humanas se generan a partir de las células que componen a la masa celular interna (MCI) o el embrioblasto. Las células de la masa celular interna van perdiendo su pluripotencialidad a medida que se dividen y se comprometen volviéndose más diferenciadas. A lo largo de la vida postnatal es fundamental para la sobrevivencia del organismo, el que las células conserven algún grado de indiferenciación o potencial de expansión para regenerar tejidos o estructuras celulares dañadas. Las células que llevan a cabo esta tarea se denominan células troncales multipotentes u órgano-específicas. Las células troncales órgano-específicas sufren divisiones asimétricas para dar lugar a una célula troncal idéntica a la progenitora y otra que dará origen a la progenie diferenciada, en conjunto la participación de estas poblaciones participa en los procesos para reemplazar a las células dañadas o en caso de lesiones agudas o crónicas⁴⁹. El origen de las células troncales neurales empieza poco después de generarse la masa celular interna al momento de dar origen al ectodermo, de la cual se genera la placa neural, constituida por el neuroepitelio, posteriormente se suceden una serie de eventos que permiten generar diferentes células precursoras neurales, con propiedades de troncalidad, que poseen diferente potencial de diferenciación, pasando por estadios que comprenden precursores neuroepiteliales primitivos, tempranos, tardíos y el de glía radial, ésta última participará en dar origen a la célula troncal neural del adulto (CTNA) que es el precursor neural que se ubica en las regiones neurogénicas del SNC⁵⁰.

3.1 Nicho en el contexto de las células troncales

Austin Smith⁵¹ definió nicho como un entorno selectivo para preservar las características funcionales de las células troncales estableciéndolo como “un microambiente celular que proporciona el soporte y los estímulos necesarios para mantener la capacidad de

autorrenovación”. También se entiende por nicho, un microambiente especializado en el que las células residen y que controla la autorrenovación de la célula troncal y la diferenciación de los progenitores multipotentes de amplificación transitoria⁵². Bajo este esquema de conceptos es donde el entorno de las CTs dará origen al linaje neural, por lo que se vuelve fundamental, resaltando que las señales que recibe una célula son críticas para determinar su destino⁵³.

La investigación reciente de los componentes que constituyen a los nichos de células troncales en mamíferos pone de manifiesto que éstas entidades histológicas son fundamentales para la función de la célula troncal, además se identifica que son tan diversos como las diferentes clases de CTs existentes y que la desregulación de estos, son la causa de muchas patologías asociadas a la regeneración de tejidos, envejecimiento^{54,55} y eventos de tumorigénesis⁵⁶.

El nicho que mejor se ha caracterizado es el de las CTNAs del modelo murino, que es un entorno dinámico, donde diferentes subpoblaciones neurales juegan un papel definido para la neurogénesis en el adulto. El nicho de la Zona Sub-Ventricular (ZSV) adulta, contiene células endodiales multiciliadas que delimitan las paredes del ventrículo lateral. Cierta población de astrocitos, poseen las características funcionales de células troncales, que tienen actividad neurogénica, pues se dividen para dar origen a células progenitoras de amplificación transitoria, estas migran hacia el bulbo olfatorio, diferenciándose en su trayecto a neuroblastos, sobre un trayecto denominado corriente migratoria rostral. Además de poblaciones neurales, el nicho está enriquecido por poblaciones endoteliales, de las que hay evidencia que controlan la proliferación e inducen a las células troncales a diferenciarse a neuronas. Estas poblaciones precursoras neurogliales, están en zonas concentradas alrededor de los vasos sanguíneos, facilitando la comunicación y el intercambio de material entre estos dos tipos celulares⁵⁷.

3.1.1 Función del nicho de las células troncales.

La tarea principal del nicho es de proveer un ambiente celular y acelular propicio a las CTs, que permita la integración de componentes de señalización locales y sistémicos que regulen la proliferación celular, la sobrevivencia, la diferenciación y la localización para que éstas se dividan en la progenie diferenciada y en células idénticas al precursor de origen

(autorrenovación) con el fin de mantener una reserva de células troncal en caso de un requerimiento posterior. Esto fisiológicamente se traduce en la reparación y mantenimiento del tejido donde el nicho de la célula troncal reside⁵⁸.

La caracterización de nichos celulares tanto de vertebrados e invertebrados ha puesto de manifiesto que estos comparten una serie de atributos funcionales que les permiten ejercer su función:

- a) Las señales que se integran en el nicho regulan la autorrenovación, sobrevivencia y mantenimiento de las células troncales⁵⁹.
- b) El acomodo espacial entre las CTs y las células de soporte, como las estromales, además pueden polarizar a las CTs dentro del nicho para promover divisiones celulares asimétricas^{60,61}.
- c) Las distintas clases de moléculas de adhesión, las células estromales y la matriz extracelular, anclan a las CTs dentro del nicho en cercanía a las señales de autorrenovación y sobrevivencia⁶².

3.1.2 Componentes del nicho de las células troncales.

El nicho está compuesto por la célula troncal *per sé*, diversos factores solubles, moléculas unidas a membrana, receptores de superficie celular, proteínas de la matriz extracelular (MEC), células del estroma, que dan apoyo estructural a las CTs, tejido vascular que transporta señales sistémicas, así como algunas clases de CTs circulantes e información endócrina al microambiente de la célula troncal⁵⁸. Dentro de un nicho, las células troncales están por lo general, unidas a la lámina basal o al estroma. La lámina basal y los vasos sanguíneos están estrechamente asociados a través de la MEC, cuyos componentes moleculares tienen varias funciones dentro del nicho troncal, como anclaje de las células al sitio, secuestro y presentación de factores difusibles y/o unión a la MEC, así como la participación de las células circundantes. La MEC y la lámina basal guardan una especial relación con la microvasculatura, que se perfila como un componente que puede tener un papel en la toma de decisión de destino celular a través de contacto célula-célula y/o por señales difusibles. La lámina basal y los contactos célula-célula también pueden influir en el destino celular, al fijar

un plano de orientación en la división celular, así como factores solubles que puedan estar distribuidos simétrica o asimétricamente (**Figura. 5**)^{57,58}.

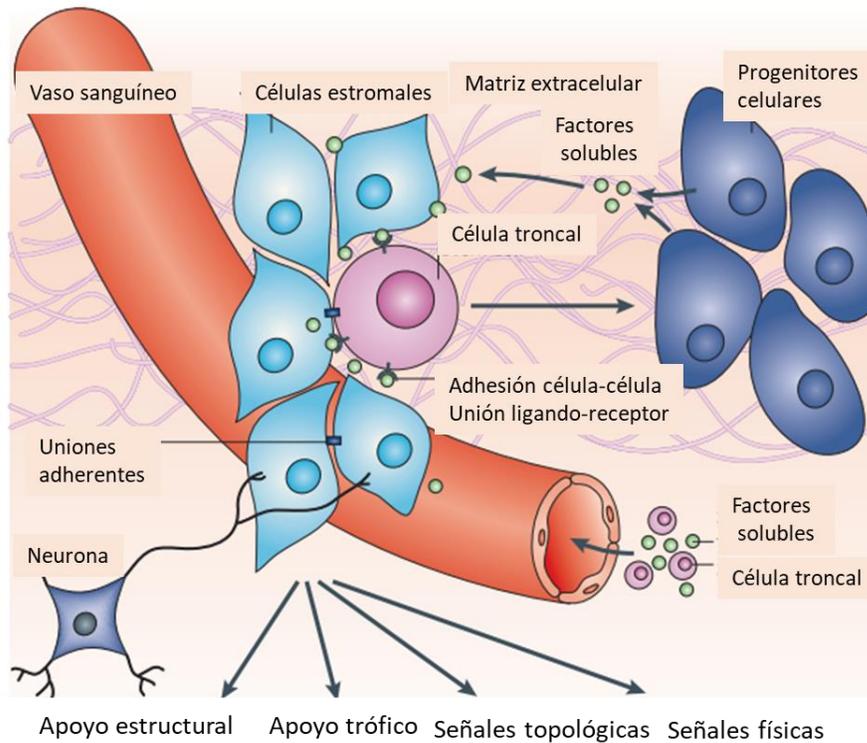


Figura 5. Componentes celulares y acelulares del nicho troncal. Este entorno complejo y dinámico integra señales de diferentes fuentes paracrinas, autocrinas y endócrinas que modulan el comportamiento de la célula troncal a diferentes niveles. Los factores solubles y las interacciones con la matriz extracelular modulan de forma profunda su respuesta a la autorrenovación. Los nichos troncales se han visto que están en cercanía a los vasos sanguíneos. No es necesario que un nicho en particular esté conformado por cada uno de los componentes mostrados, sino que pueden variar en función del contexto histológico. Tomado y modificado de Jones⁵⁷.

3.1.3 Factores solubles presentes en el nicho de células troncales.

Son esenciales para determinar la tasa de autorrenovación, sobrevivencia y en el mantenimiento de las funciones de las CTs. Pueden actuar localmente a una distancia de 1-2 diámetros celulares o difundir a través del nicho para participar en la toma de decisión del destino celular a distancia.

Las vías de señalización ejemplifican uno de los mecanismos por el cual los ligandos solubles pueden estar presentes en el nicho troncal y regular la proliferación de CTs. La transducción de la vía de Wnt es particularmente importante en la sobrevivencia de CT embrionarias fetales o neonatales, pues en los modelos murinos, la delección experimental de *SOX17* en la línea germinal, induce la expresión de Dickkopf-1, un antagonista de Wnt, que causa la muerte de la CT hematopoyética embrionaria, pero no las que han adquirido un fenotipo adulto⁶³. Esto indica que la activación de la vía de señalización de Wnt por sus ligandos solubles es necesaria para la sobrevivencia de la CT hematopoyética.

La presencia de factores de crecimiento (FC) como la somatomedina, o el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1, del inglés Insulin-like growth factor type 1), son reconocidos como agentes solubles que impulsan la proliferación de varios tipos celulares y son secretados en diferentes tejidos⁶⁴. La adición de IGF-1 o una forma recombinante que contiene el dominio de unión al receptor de IGF-1 (IGFR-1, del inglés Insulin-like growth factor type 1 receptor) a cultivos de fibroblastos de piel humana, demostró que tiene un potencial mayor en estimular la síntesis de ácido 2'-dexosirribunocleico (ADN) que la insulina, determinado en función de la cantidad de timidina H³ incorporada⁶⁵. El efecto sobre la mitosis dependiente de la presencia del IGF-1 también ha sido demostrada en blastos mieloides al incrementar la tasa de proliferación en un 92% contra el control en cultivos celulares de explantes de médula ósea de pacientes de leucemia linfocítica aguda⁶⁶.

El papel que juegan estructuras anatómicas como la médula ósea se ve reflejado por la secreción de diferentes factores a nivel sistémico. Se ha demostrado que la participación de moléculas secretadas por la médula ósea tiene un efecto sobre la proliferación de cultivos de neuroblastoma humano. Los cultivos de SK-N-SH (ATCC HTB-11 de la cual se derivó la línea celular de neuroblastoma, SH-SY5Y) demostraron que ante la presencia del Factor de Célula Troncal o de bFGF, se consumía timidina H³ en la misma proporción con relación al control y esto se ve reflejado en la inducción de la síntesis de ADN durante la fase S del ciclo celular. Sin embargo, la caracterización de la molécula N-CAM por citometría de flujo del cultivo SK-N-SH, demostró que el tratamiento del cultivo con IL-1 β y TGF β inducen la expresión de N-CAM en un 5.1% y 9.5% con relación al total de las células. Esto significa que la médula ósea libera factores a nivel sistémico que son reconocidos por neuroblastos,

donde juegan un papel en la diferenciación de las células troncales neurales (CTN)^{67,68}. Las señales extrínsecas que componen el nicho, aparte de las ya mencionadas, incluyen a bFGF⁶⁹, neuroregulina-1, BMP4⁷⁰ y factor de crecimiento epidermal (EGF, del inglés Epidermal Growth Factor)⁷¹ forman parte de los factores solubles que median el destino de las CTNs. bFGF juega un papel en la especificación del destino de los progenitores comprometidos, donde la ausencia de esta señal favorece el destino glial. Los cultivos del nervio óptico del cerebro de rata demostraron que la incubación de los precursores neurales inmunopositivos a nestina, vimentina y O4, tras un periodo de incubación con bFGF de 36 h dieron lugar a una progenie inmunopositiva a β -III-tubulina, proteína asociada a microtúbulo (Map2, del inglés microtubule associated protein type 2) y proteína nuclear neuronal (NeuN, del inglés Neuronal nuclear) a tasas de 9, 18, y 15%, respectivamente con relación al número total de núcleos marcados con DAPI⁶⁹. Una característica arriba mencionada de los nichos es la capacidad por parte de la MEC, de secuestrar elementos solubles con la finalidad de modular la concentración de una señal extracelular. bFGF, es un ejemplo de elemento soluble que participa en la definición de la identidad de las CTNs de forma dependiente de su concentración. En cultivos de precursores neurales corticales de origen murino se ha observado que las bajas concentraciones de bFGF, mantienen un programa pro-neuronal, mientras que el tratamiento con una elevada concentración de bFGF (10 μ g/mL), promueve la proliferación de las CTs y estimula a los precursores a generar células gliales (~10% GFAP, O4 vs total de núcleos marcados con DAPI) además de las neuronales (~90% β -III-tubulina vs total de núcleos marcados con DAPI)⁷². En el contexto del nicho de las células troncales, las moléculas solubles han demostrado ser importantes mitógenos para mantener cultivos de precursores multipotentes en un estado proliferativo y también de regular la proporción de los progenitores neurales comprometidos.

Además de los factores secretados, otra clase de entidades químicas como los iones y las moléculas pequeñas pueden proveer señales a los nichos de células troncales. Las especies reactivas de oxígeno, (EROs), en el contexto neural, tienen un efecto importante sobre la sobrevivencia de las CTNs. En los cultivos de la ZSV de ratón, las neuronas post mitóticas demostraron que el estrés oxidativo inducido por el ácido 3-nitropropiónico, disminuían la actividad mitocondrial e incrementaba el contenido de EROS. Sin embargo, ante el mismo reto, las CTNs, regularon al alza la proteína desacopladora tipo 2 (UCP-2, del inglés

Uncoupled type 2) y el glutatión superoxidasa (GPx, del inglés Glutathione peroxidase), además del superóxido dismutasa, que en conjunto merman la reactividad de las EROs y previenen del deterioro celular de las CTNs. La disección de la ZSV *in vivo* mostró que el cerebro anterior murino, presenta una elevada expresión estacionaria de UCP2 y GPx, en comparación a otras células nerviosas de otras regiones del cerebro, que la apoyan en limitar el estrés oxidativo generado por el enriquecido ambiente de oxígeno molecular presente en el cerebro⁷³. Estos resultados entran en armonía con la definición del nicho troncal, al ser un microambiente de residencia que le proporcionan un entorno de protección y mecanismos de sobrevivencia a la CT.

3.1.4 Interacciones célula- célula e interacciones célula- MEC.

La unión física entre la CT y las células estromales, que son células de soporte estructural que delimitan la región que ocupará el nicho, es importante en regular el comportamiento de la célula troncal y en mantener a las CTs dentro del nicho mediante el contacto con la MEC⁷⁴. Además, es un lugar donde ocurren las uniones adherentes, las interacciones mecánicas y están presentes señales espaciales que en conjunto regularán el comportamiento de la célula troncal.

Las uniones adherentes son contactos intercelulares mediados por la unión homotípica o heterotípica de proteínas transmembranales dependientes de Ca^{+2} , llamadas cadherinas⁷⁵. Las diferentes moléculas de adhesión como las cadherinas y las integrinas son una característica hallada frecuentemente en la retención de las CTs en los nichos que residen, cuyos niveles de expresión pueden ser tan elevados que son empleados como un marcador de nicho dentro de un tejido. Por ejemplo, la $\alpha 6$ -integrina es una molécula de adhesión altamente expresada por los queratinocitos basales dentro de la epidermis⁷⁶. Estos se acomplejan con las cadenas $\beta 1/ \beta 4$ de la lámina basal que forma parte de la MEC. Es interesante que si bien los ratones que carecen de $\alpha 6$ -integrina se desarrollan hasta el alumbramiento, presentan una enfermedad similar a la epidermólisis bullosa en humanos, sugiriendo un papel en la maduración del sistema tegumentario⁷⁷. Dentro del nicho de la célula troncal epidermal (CTEpi), la presencia de la $\beta 1$ -integrina ejerce la función de orquestar correctamente la proliferación de las células troncales multipotentes que forman parte del folículo capilar y la epidermis interfolicular. En los experimentos de mutagénesis dirigida mediada por el sistema

Cre-LoxP en ratones, los animales que carecen de $\beta 1$ -integrina, la proliferación de los progenitores epidermales es severamente afectada, además es acompañado de una expresión reducida de la $\alpha 6\beta 4$ integrina, esto resulta en una disminución y malformación de los queratinocitos basales⁷⁸.

Por tanto, la presencia de las moléculas de adhesión en las uniones célula-célula y célula-MEC son necesarias para el comportamiento y desarrollo correcto de las CTEpi y la integridad del nicho.

En referencia al linaje neural, la participación de las cadherinas en un contexto embrionario se ve reflejado por la expresión de la N-cadherina y $\beta 6$ -cadherina que retienen a las CTNs en la región dorsal del tubo neural temprano. En el desarrollo posterior, éstas son reguladas a la baja, mientras se eleva la expresión de cadherina-7, cuando las células de la cresta neural migran desde el tubo neural⁷⁹. Entre las entidades celulares que componen al nicho, la proliferación de los progenitores gliales está regulada por la participación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés (Platelet-derived growth factor) y el complejo $\alpha 5\beta 3$ integrina. Se demostró *in vitro*, que la ausencia de estas moléculas de adhesión reduce la proliferación de los progenitores gliales, determinado por la incorporación de BrdU⁸⁰. Si bien PDGF fue originalmente aislado de las plaquetas, también es secretado de fibroblastos y células endoteliales. Esto indica que las señales generadas incluso desde fuentes lejanas pueden viajar al nicho neural y son capaces de impulsar la proliferación mediada por el complejo $\alpha 5\beta 3$ integrina de los progenitores comprometidos⁸¹.

3.1.5 Influencia de las señales mecánicas en la elección de destino

Debido a las diferentes presiones por parte de los fluidos y fuerzas de tensión provenientes de las células vecinas y de la MEC a las que el nicho de la célula troncal está expuesto, estas señales mecánicas pueden impactar profundamente en la especificación del linaje de la CT. En un estudio *in vitro* del 2006, empleando células troncales mesenquimales, se demostró que la elasticidad relativa del sustrato sobre el que crecen las células troncales mesenquimales es capaz de especificar el linaje al que las células diferenciarán. Si el sustrato tiene una elasticidad similar al tejido cerebral, las CTMs mostraron un perfil de ARNm enriquecido (5 veces) de

nestina, β -III-tubulina, NF de peso ligero (NFL) y la molécula de adhesión celular neural comparado con los pases tempranos del cultivo sobre la misma superficie. Sobre la superficie más rígida, que mimetiza al tejido óseo, se favoreció un perfil de ARNm de hasta 4 veces mayor de osteocalcina, COL3A1, una clase de colágeno tipo III presente en el estroma de la médula ósea y el factor de unión nuclear α tipo 1 (CBF α -1, del inglés α -Core binding factor type 1) además de adquirir una morfología similar a los osteoblastos (**Figura. 6**)⁸². Estas señales mecánicas se traducen a un contexto fisiológico donde la elasticidad de la MEC que compone al nicho puede presentar alteraciones inducidas por daño, enfermedad o envejecimiento y en conjunto tener un impacto profundo sobre el destino celular y en la actividad regenerativa de las CTs⁵⁸.

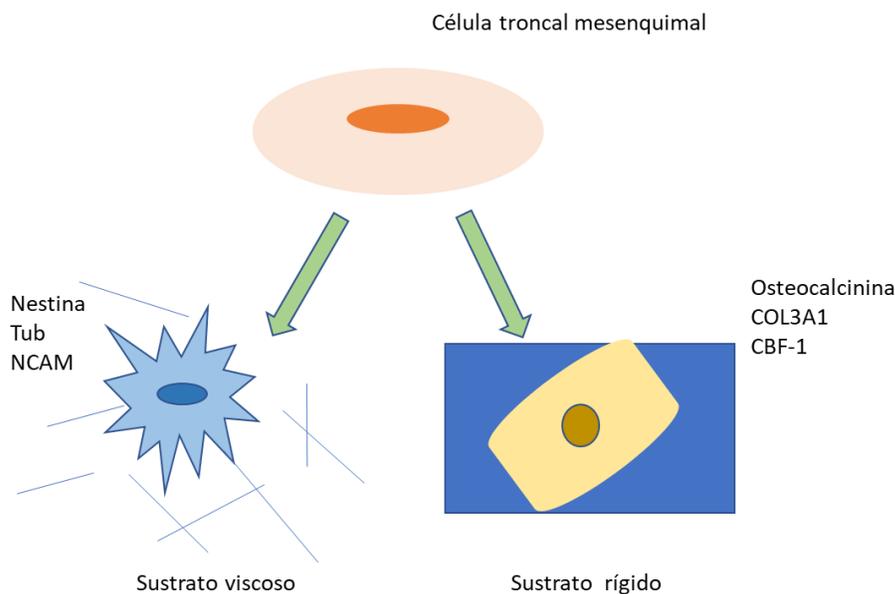


Figura 6. Efecto de la elasticidad del sustrato sobre la diferenciación de las células troncales mesenquimales. La rigidez del sustrato es capaz de direccionar el destino celular de la célula troncal mesenquimal. Es interesante que el medio viscoso, que mimetiza al tejido cerebral, es capaz de inducir la ganancia de marcadores del linaje neural, aún de una capa germinativa no ectodérmica.

3.1.6 Participación de las señales topográficas en el comportamiento troncal

La orientación precisa de la CT dentro del nicho puede tener un papel importante en mantener la proporción de precursores celulares y el número de células encaminadas a la diferenciación. La orientación de los polos celulares con relación a la MEC o a las células del estroma es un

factor que está implicado en la concentración diferencial de factores que alcanzan a la CT y que permiten establecer un determinado estado celular: autorrenovación o diferenciación. Este atributo de los nichos celulares se ve reflejado en las células germinales de *D. melanogaster*. Las células troncales germinales de los ovarios han revelado que, en función de la orientación del huso mitótico de las células troncales germinales, establece su destino celular. Si éste se orienta hacia las células de apoyo, la progenie permanece dentro del nicho, donde sigue recibiendo señales de autorrenovación para mantener la identidad de CT, mientras que la otra célula hija se ubica afuera del nicho, donde deja de recibir señales de autorrenovación y empieza a activar programas de diferenciación específicos^{83,84}. Las divisiones celulares asimétricas de los precursores celulares en relación al nicho también se ve reflejada en las células proliferativas de la membrana basal de la piel. En los experimentos de tinción de embrión de ratón, se demostró que cuando las células basales proliferativas se encaminan a la estratificación, el huso mitótico se orienta perpendicularmente a la membrana basal para dividirse asimétricamente generando una célula comprometida suprabasal que se diferenciará y formará parte de la barrera estratificada y una segunda célula basal proliferativa⁸⁵.

Por tanto, la división celular asimétrica, es un mecanismo que permite generar distintos tipos celulares en función de la polarización de la célula progenitora y es clave en la regulación de la identidad de las CTs que forman parte de la reserva dentro del nicho.

3.1.7 El papel de las vesículas extracelulares en el nicho neural

Hasta hace no más de tres décadas se pensaba que las vesículas liberadas por las células eran fragmentos de membrana resultado del proceso apoptótico. Ahora se tiene conocimiento que el ambiente extracelular en condiciones *in viva* contiene vesículas extracelulares (VEs) secretadas por las entidades celulares y que actualmente están emergiendo como agentes importantes de la comunicación intercelular y modulares del microambiente⁸⁶. Se sabe que los nichos neurales contienen un tipo de VEs denominadas exosomas del tamaño 30 a 120 nm de diámetro que encapsulan micro ARN (miRNAs, del inglés micro RNA) y proteínas. Se demostró que, en el nicho neurogénico de la ZSV, las CTNs liberan exosomas que actúan como morfógenos que regulan la morfología y fisiología de la glía hacia un fenotipo no estelar CD11b/Iba1 positivo. Además de retroalimentar en modo negativo la proliferación de las

CTNs residentes⁸⁷. Los exosomas presentes en el nicho neurogénico modulan activamente el fino balance entre la autorrenovación, la diferenciación y el estado quiescente de las células progenitoras neurales, perfilándose como reguladores nóveles en la neurogénesis en adultos⁸⁸.

Los experimentos de captura y caracterización de vesículas señalan que los microambientes neurogénicos contienen VEs funcionales llamados ectosomas que encapsulan ARN, proteínas y factores solubles. A diferencia de los exosomas que se originan a partir de la exocitosis de partículas de cuerpos multivesiculares, los ectosomas son generados a partir de la membrana plasmática. Se caracterizan por un tamaño de 100-350 nm de diámetro y de liberación inmediata tras su formación^{89,90}. Estudios recientes han demostrado la presencia de VEs en los nichos tumorales como importantes reguladores de la capacidad regenerativa de la integridad del nicho conocidos como *nicho-onco-regenerativo* con una importante función en mediar las vías de regeneración y reparación del tejido⁹¹. Recientemente se ha demostrado la presencia y liberación de VEs por CTNs en el nicho embrionario en modelo murino. La VE encapsulaba la proteína CD63-GFP en cerebros indiferenciados. Al estar bajo el promotor de *Sox2*, se examinó su trayectoria cuyo destino final era ser incorporados hacia población astrocítica y a neuronas embrionarias implicando una comunicación a corto alcance entre diferentes elementos celulares que componen el nicho⁹².

En resumen, todas las señales provenientes de las diferentes fuentes celulares y sistémicas que el nicho integra están encaminadas a controlar la tasa de proliferación de los precursores neurales, determinar los fenotipos de diferenciación terminal y principalmente de regular la autorrenovación y diferenciación de las CTs.

4. Clases de precursores neurales.

Las células troncales multipotentes neuroepiteliales dan lugar a todas las células del SNC. A medida que progresa el desarrollo neural del cerebro, la multipotencialidad de estas células se vuelve cada vez más restringida, con lo que paulatinamente se comprometen y generan células neuronales y gliales. A continuación, se describen los principales tipos de células precursoras neurales (CPNs) por el que las células precursoras atraviesan para generar la progenie diferenciada (**Figura. 7**).

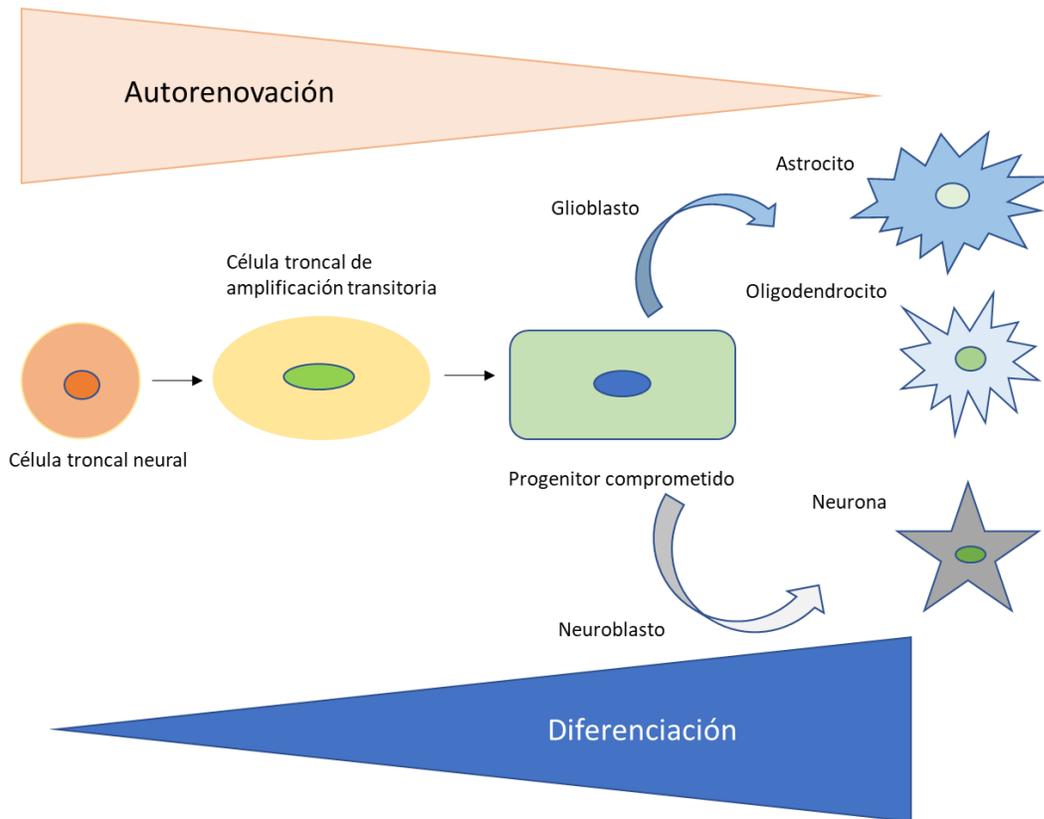


Figura 7. Esquema de las diversas clases de precursores neurales. Las células troncales se caracterizan por un grado de autorrenovación además de tener una capacidad de diferenciarse a un determinado linaje celular. A medida que se diferencian, son menos plásticas y pierden la capacidad de generar una célula idéntica a sí misma. En la estirpe neural, existen dos tipos de progenitores comprometidos. El glioblasto que da lugar a las células de la glía y el neuroblasto, que genera a los diferentes subtipos neuronales.

Célula troncal neural (CTN): es una población celular precursora indiferenciada que tiene la oportunidad de generar todas las estirpes neurales, tiene capacidad de autorrenovación (que se divide en células idénticas a sí mismas) y de diferenciación (que puede dar lugar a células fenotípicamente diferentes de sí mismas por división asimétrica). Es una población de tipo multipotente, que da lugar a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Se pueden derivar de

estadios celulares más primitivos como de las células troncales embrionarias⁹³. Durante la etapa adulta, las células neurales se siguen reemplazando a través de un subtipo de CTN, las CTNA. La localización neuroanatómica de las últimas es muy restringida de acuerdo con la literatura actual, esta población se encuentra en la ZSV de los ventrículos laterales, en la médula espinal y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo del SNC⁹⁴. Las CTNs son inmunopositivas a integrina-alfa-6, integrina-beta-1, N-CAM1, PCAM, noggin, y PAX6. Además, poseen biomarcadores asociados a proliferación celular neural, tales como Sox 2, nestina y Pax, que también se expresan en los estadios de determinación del destino neural⁹⁵.

Progenitor de amplificación transitoria multipotente (PATm): son una población de precursores temprana en transición entre las células troncales y las células diferenciadas, con elevada tasa de proliferación, baja capacidad de autorrenovación y sobre las que recae la función de la regeneración tisular⁹⁶. Al proliferar rápidamente permiten expandir la población, lo cual puede ser necesario de acuerdo con el grado de lesión o de recambio tisular requerido, para que posteriormente se empiecen a diferenciar hacia población de progenitoras restringidas en base a su potencial de diferenciación, neuroblastos y glioblastos. Son inmunodefinidos como GFAP/Dlx(+), nestina (+), SOX2 (+), Notch1 (+)^{49,97}.

Progenitores comprometidos: Es una población de precursores restringida que está compuesta por los neuroblastos y glioblastos, sin capacidad de autorrenovación, pero aún con capacidad proliferativa, particularmente los glioblastos, donde los primeros dan lugar a neuronas y los segundos a células de la glía. La población neuroblástica es inmunoreactiva a CD24, beta-III-tubulina y Dlx-2^{49,97}. Mientras que la población glioblástica es inmunopositiva a nestina, A2B5, O4, GFAP, y PSA-NCAM (PSA-NCAM, del inglés Polysialylated neural cell adhesion molecule)⁹⁸.

5. Neurogénesis

Como se estableció en el apartado de la regionalización del tejido neuroepitelial, una vez que los morfógenos han establecido coordenadas de señalización sobre células precursoras y se han establecido dominios, los precursores neurales responden ante un código de factores de transcripción que regulan tanto su proliferación y diferenciación hacia fenotipos neuronales

particulares ⁹⁹. Las CTNs son multipotentes y su diferenciación hacia progenie neuronal y glial está dada por una secuencia de activación de genes proneurales y una serie de señales inductoras como inhibidoras tanto neurogénicas como gliogénicas, respectivamente. El primer fenotipo terminal que se diferencia es el neuronal. Las señales neurogénicas activan la expresión de genes proneurales en los progenitores neurales comprometidos. La eritropoyetina (EPO) regula al alza a Mash1 en el SNC embrionario al promover la diferenciación de progenitores multipotentes hacia progenitores neuronales¹⁰⁰. MASH1 activa diferentes genes proneurales. La acumulación de proteínas proneurales con dominios bHLH relacionados a la familia ATO (Ngn, Neuro D y Olig) en un subconjunto de células progenitoras inducen la activación de la vía de diferenciación neuronal, se inhibe la diferenciación glial y ocurre el arresto del ciclo celular ¹⁰¹. Los experimentos de trasplantes y los experimentos *in vitro* destacan tres elementos importantes que participan en la neurogénesis:

- i. Factores solubles como factores de crecimiento.
- ii. Moléculas de adhesión como PSA-NCAM y la molécula de adhesión celular tipo L (L-CAM, del inglés Cell adhesion molecule type L).
- iii. Vasos sanguíneos, que permiten un eficiente intercambio de nutrientes y señales endócrinas.

Entre las moléculas solubles que participan en los eventos de proliferación y neurogénesis, los factores de crecimiento clásicamente se han visto como mitógenos en cultivos celulares. Al ser removidos del medio, las células se detienen entre las fases G1/S pasando a un estado G0¹⁰². El factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF) y el bFGF son potentes mitógenos sobre las CPNs¹⁰³. Sin embargo, también se ha demostrado que el EGF y el TGF α son inductores en la diferenciación tardía de neuronas y astrocitos a partir de células progenitoras embrionarias, donde los fenotipos terminales son inmunorreactivos a tres neurotransmisores característicos del tejido estriado adulto: GABA, sustancia P y metionin-encefalina¹⁰⁴.

Un segundo componente que participa en los eventos de neurogénesis y que está presente en el nicho, como se describió arriba, son las moléculas de adhesión, donde una función que se destaca son los eventos morfogenéticos acompañados de una regulación muy dinámica de las

moléculas de adhesión involucradas. Por ejemplo, durante el desarrollo temprano del embrión de pollo, el epiblasto expresa únicamente L-CAM. En la fase de neurula, mientras se está invaginando la placa neural, pierde L-CAM y gana la expresión de N-cadherina mientras el ectodermo retiene la expresión de N-cadherina y adquiere la de L-CAM¹⁰⁵. La PSA-NCAM es una molécula de adhesión celular neural asociada a un residuo de ácido polisialico que es expresada principalmente en tejido neural en desarrollo y es esencial para el desarrollo neuronal¹⁰⁶.

La asociación entre el nicho vascular y los eventos neurogénicos refleja la diversidad de los componentes celulares a los que el nicho troncal puede estar asociado para apoyar la generación de células neuronales. Los experimentos de retención de marca e inmunotinción de la ZSG de los cerebros de rata, han demostrado que las células en proliferación (marcadas con BrdU) se encuentran aglomeradas en una región densa compuesta por 37% de células endoteliales. Las células que adquirieron la marca de BrdU, el 44% se encontraron en la ZSG y 20% se hallaron dentro de la zona ventricular que fueron definidas como células endodiales. Al rastrear los fenotipos celulares dentro la población marcada con BrdU, se reveló que el 70% de las células eran inmunoreactivas a nestina y un 37% de células nestina (+) que coexpresaba el factor de von Willebrand y la fosfatasa alcalina. Dentro del 70% de células nestina (+) también se detectó el marcador glial, antígeno neural tipo 2 (NG2, del inglés Neural antigen type 2) en un 12% y GFAP, vimentina y S100- β que mostraron la presencia de astrocitos en fase S. β -III-tubulina y PSA-NCAM también fueron detectadas dentro de las células en proliferación. Se destaca que alrededor del 5% las células nestina (+) coexpresaron vimentina, GFAP o β -III-tubulina, lo que indica una progresión de un fenotipo únicamente nestina (+) hacia un destino glioblástico o neuroblástico. Estas células de linaje neural se encuentran aglomeradas alrededor de pequeños capilares, donde la marca de BrdU fue más intensa. Estos resultados indican que la asociación de los precursores neurales, la glía y la microvasculatura es un requisito que permite la proliferación de los progenitores neurales y la diferenciación hacia un fenotipo neuronal^{108,109}.

6. Gliogénesis

El desarrollo de oligodendrocitos y astrocitos es un proceso que ocurre después de la neurogénesis¹¹⁰. Aunque en algunas regiones cerebrales ambos eventos se traslapan. Una característica de este proceso es que la gliogénesis continúa aun cuando la neurogénesis ha cesado¹¹¹. La oligodendroglía es una población celular que se desarrolla en la región ventral del tubo neural en desarrollo. Los precursores oligodendrocíticos (POs) se generan a partir de otras células de la zona ventricular, donde migran lateral y dorsalmente mientras se dividen. Las células post natales dejan de migrar y empiezan a madurar, acompañadas de una ganancia de marcadores, cambios morfológicos e inician el proceso de mielinización por los oligodendrocitos^{112,113}. Las células gliales también están presentes en regiones extraventriculares con el potencial de generar nuevos oligodendrocitos¹¹⁴. Los astrocitos son generados desde regiones dorsales del neuroepitelio en el tubo neural¹¹⁵.

El glioblasto, es un progenitor multipotente comprometido, derivado del neuroectodermo que genera fenotipos gliales terminales¹¹⁶. Los glioblastos incluso se han aislado desde la 10^o-18^o semana de gestación de tejido embrionario humano y propagado en presencia de EGF e IGF-1¹¹⁷. Los astrocitos y los oligodendrocitos diferenciados emergen de diferentes tipos de precursores con su propio potencial de diferenciación y respuesta a factores de crecimiento¹¹⁸. En los últimos años se han identificado al menos seis diferentes tipos de precursores gliales. Entre ellos el que mejor se ha estudiado es la célula precursora de oligodendroglía y astrocitos tipo 2 (O2A). Es una clase de célula progenitora que genera oligodendrocitos y astrocitos tipo 2. El nervio óptico de rata, uno de los principales modelos para estudiar la diferenciación glial, ha mostrado que la célula O2A se diferencia por default, hacia oligodendrocitos¹¹⁹. Mientras que en cultivo empleando FC específicos, como CTNF y LIF son capaces de diferenciar glioblastos hacia un tipo particular de astrocitos, los astrocitos tipo 2 o tipo 1 (especialmente abundantes en la materia blanca), respectivamente. Los astrocitos tipo 2, a diferencia de los astrocitos tipo 1, expresan A2B5 y carecen de Ran2, sin embargo, ambas poblaciones maduras expresan GFAP, nestina y S100- β ¹²⁰. Los experimentos de trasplante demostraron que los precursores O2A cultivados con bFGF y PDGF se diferenciaron hacia oligodendrocitos mielinizantes en ratones con daño inducido en la médula espinal y no hacia población astrocítica. Esto representa a una población precursora glial restringida que puede generar un

tipo específico de fenotipo maduro¹²¹. Es importante destacar que dentro de las poblaciones que participan en la gliogénesis a partir de precursores gliales, existen dos fenotipos de células O2A, los perinatales que presentan una expresión de A2B5(+) /O4(+) y vimentina (+), mientras que su contraparte adulta, son inmunoreactivos a A2B5/O4 e inmunonegativos a vimentina. Además, los primeros son bipolares y tiene un tiempo de duplicación de 18 h, mientras que los adultos son típicamente unipolares y la población tarda en duplicarse aproximadamente 65 h¹²². Esta clase de precursores gliales también han sido aislados directamente de tejido humano a partir de muestras de materia blanca. Se han detectado precursores gliales inmunoreactivos a A2B5 que tienen la característica de expandirse en cultivo y subsecuentemente diferenciarse a oligodendrocitos funcionales con la capacidad de remielinizar axones dañados¹²³. A comparación de la diferenciación *in vitro*, de los precursores O2A de roedor, las células O2A humanas han demostrado que pueden generar astrocitos A2B5 (+)¹²⁴. La caracterización se ha realizado en células neuroepiteliales tempranas de roedor (10.5E) y se ha identificado una población precursora A2B5 (+) que se diferencia de la población O2A por su respuesta ante FC y potencial de diferenciación. Estas células se han denominado precursores gliales restringidos (PGRs) que inicialmente no expresan PDGFR α y tienen el potencial de diferenciarse hacia astrocitos A2B5(+) /GFAP (+) y astrocitos A2B5(-) /GFAP (+). Los experimentos a densidad clonal de las células multipotentes A2B5(+) indican que se generan clonas constituidas por neuronas y astrocitos. Cuando estos precursores neuroepiteliales se mantienen por pases tardíos, son capaces de generar tanto oligodendrocitos y astrocitos, pero pierden la diferenciación hacia neuronas¹²⁵. Estas poblaciones A2B5(+) con morfología bipolar han sido detectadas en tejido fetal humano (15-18 semanas de gestación) mantenidas con suero fetal de cabra o en medio definido. Se detectaron células con morfología bipolar A2B5 (+). Además de células con morfología estelar que expresa O4 y una segunda población arborizada reactiva a O1 que confirman su identidad de oligodendroglía¹²⁶.

En conjunto, estos resultados indican que el desarrollo embrionario del SNC, requiere de precursores tipo O2A y GPR multipotenciales para generar poblaciones diferenciadas efectoras de la mielinización de las fibras nerviosas en desarrollo.

Otra fuente de células maduras gliales son las oligoesferas. Son agregados celulares flotantes *in vitro* inmunoreactivas a A2B5 seleccionados a partir de una subpoblación de oligodendrocitos y cultivados con medio condicionado de la línea neuronal B104 en una condición no adherente, resultando en una proporción de 98% células GFAP (-) /GD3(+). Una vez que son disgregadas entre sí y se adhieren al sustrato, se inducen a diferenciar empleando suero fetal de cabra al 2%, generando oligodendrocitos y astrocitos tipo 1¹²⁷.

Si bien los precursores previamente descritos tienen la propiedad de generar principalmente oligodendrocitos, también se ha aislado y detectado una población de precursores comprometidos con el potencial de diferenciarse a astrocitos. En ese aspecto, se ha purificado y caracterizado una población celular precursora de astrocitos (APC, del inglés Astrocytes precursor cell) a partir del nervio óptico de rata. Las APCs se caracterizan por ser A2B5(+), Pax2(+) y vimentina (+), mientras que la progenie diferenciada es GFAP (+) y S100β (+). Es interesante destacar que las APC no sobreviven en medio con suero, pero pueden ser rescatadas en presencia de bFGF y factor de crecimiento glial tipo 2 (GGF-2, del inglés Glial growth factor type 2). La diferenciación hacia células GFAP (+) tipo astrocitos, requiere la presencia del factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés Ciliary neurotrophic factor) o el factor inhibidor de leucemias (LIF, del inglés Leukemia inhibitory factor). Además, el cocultivo de APCs con células embrionarias del nervio óptico ha promovió su sobrevivencia y proliferación, sugiriendo el requisito de interacciones intercelulares y factores solubles en controlar el comportamiento de las células multipotentes gliales y en el control de la generación de astrocitos¹²⁸.

Como se describió arriba, existen dos tipos de astrocitos terminalmente maduros, los astrocitos fibrilares y los protoplásmicos, donde los primeros se encuentran en toda la materia blanca mostrando una morfología de largas prolongaciones fibrilares y los segundos se hallan en la materia gris formando núcleos densos inter-ramificados que se asemejan a una estructura esferoide¹²⁹. También se clasifican como astrocitos tipo 1 y tipo 2. Los astrocitos tipo 1 son morfológicamente parecidos a los fibroblastos y proliferan en un medio enriquecido con EGF o en extracto pituitario. Los astrocitos tipo 2, tienen una morfología muy parecida a los astrocitos, que se dividen infrecuentemente en cultivo¹³⁰.

Las células de la glía radial que se desarrollan desde las células neuroepiteliales tempranas comienzan a diferenciarse con el inicio de la neurogénesis al adquirir marcadores gliales, como la expresión de vimentina, GFAP, transportadores de glutamato astrocitos específicos y glutamina sintasa. Se ha demostrado que las células de la glía radial, fundamentales para los eventos de migración celular, generan neuronas y después células gliales como astrocitos y progenitores de oligodendrocitos lo que conlleva a que las zonas neurogénicas presenten una gran diversidad de fenotipos celulares ¹³¹.

6.1 Diferenciación glial.

Los factores solubles como las citocinas, y los FT, son jugadores clave en la diferenciación de precursores troncales hacia progenitores comprometidos que den lugar a neuroblastos o glioblastos. Mientras está ocurriendo el evento de neurogénesis, se presenta un evento de switch, donde Notch señala la diferenciación hacia linaje glial sobre las CTNs regulando a la baja e inhibiendo la expresión de genes proneurales lo que conlleva a que otras CTNs entren a la vía de diferenciación glial. Subsecuentemente, la gliogénesis es mantenida por señales gliogénicas como FGF2, CNTF y BMPs. Tales señales inhiben la neurogénesis por diversos mecanismos como activar inhibidores proneurales de la familia Hes, una familia de genes que codifican FT tipo hélice-bucle-hélice, que conlleva a la degradación de diversas proteínas proneurales y represión a nivel transcripcional. También se han visto implicados FT como NFIA, una familia de genes que regula el comienzo de la gliogénesis durante el desarrollo embrionario de la espina dorsal y es esencial para mantener reprimidos los programas genéticos neurogénicos de la zona ventricular. Y también en promover la migración y diferenciación de precursores de astrocitos en etapas más tardías del desarrollo ¹³². El principal mecanismo de activación de los genes de la familia Hes, es mediante la señalización de la vía de Notch/Delta ¹³³. Los experimentos de *knock out*, en modelo murino de *Hes-1*, mostraron una desregulación de la expresión de *Mash-1*, una reducción de la neurogénesis y de la gliogénesis mientras que su sobreexpresión indujo la diferenciación prematura hacia los fenotipos terminales ¹³⁴. Este efecto de alteración de maduración de células gliales es explicado a través de la interacción antagonista de Hes-1 sobre Mash-1 y una segunda proteína de la familia de Hes, Hes-5. Cuando Jagged, se liga a Notch, se inhibe la diferenciación de los oligodendrocitos, lo que está correlacionado a la regulación al alza del ARNm de *Hes-5* ¹³⁵.

Antes se describió una población que da lugar a los oligodendrocitos, las células O2A, que son los precursores celulares mielinizantes del SNC, estos aparecen tan pronto como las células gliales durante el desarrollo, migran y se dispersan por todo el cerebro. Las células O2A son inmunopositivos a A2B5, al proteoglicano NG2 y al receptor PDGFR- α . Se ha demostrado que el 40% de los astrocitos protoplásmicos en la materia gris son derivados de células gliales-NG2¹³⁶ y que son inmunorreactivos a GFAP y S100B, los oligodendrocitos además presentan marcadores O4, BMP y CNPasa, OLIG 1/2 y GalC¹³⁷.

6.2 Efecto de agentes solubles.

En el desarrollo embrionario, las zonas germinales subventriculares, son la fuente de la población de precursores O2A, que migran al resto del SNC. El PDGF es un factor importante en la estimulación de la proliferación de células O2A. En los experimentos de co-cultivos con neuronas que expresan las subunidades A/B de PDGF, los progenitores se han mantenidos en proliferación en la presencia de bFGF y PDGF. Esto estimula el nivel de expresión del FT POU y promueve la diferenciación hacia oligodendrocito acompañado de un aumento de genes específicos mielinizantes¹³⁸. El NGF es secretado por células gliales¹³⁹ y se ha reportado que afecta negativamente la proliferación de astrocitos a través del receptor de neurotrofinina¹³⁷. Los factores promotores de la glía (GFP, del inglés Glia promoters factors) son péptidos del SNC que estimulan la proliferación específica de poblaciones gliales. La oligodendroglía prolifera por acción de GPF1 y GPF3¹⁴⁰.

7. Células troncales epidermales

Las Células Troncales Epidermales (CTEpi) se ocupan no solo de regenerar a las células de las distintas capas de la epidermis y de participar en la homeostasis de la integridad de la piel y de los folículos, sino que también representan el inicio de algunos tumores y una diana para las terapias génicas¹⁴¹. En mamíferos, después de la gastrulación, las células superficiales dorsolaterales del ectodermo se convierten en epidermis a partir de una monocapa indiferenciada de progenitores celulares, poseen las características comunes a todas las CTs, son capaces de autorrenovarse y diferenciar a múltiples linajes que derivan del tejido de origen, así mismo ante un daño producido en la piel son capaces de incrementar su proliferación y reparar la lesión completamente¹⁴². Las CTEpi residen en la capa basal

germinativa, que es una capa epitelial mitóticamente activa (**Figura. 8**). A medida que la célula escapa de la membrana basal hacia la superficie epidérmica, salen del ciclo celular, detienen la expresión de integrinas y laminina y activan programas genéticos de diferenciación terminal¹⁴³. Las CTEpi en su función de mantener la integridad del tejido a largo plazo ante daños, da origen a una célula troncal idéntica y una célula progenitora de amplificación transitoria con potencial proliferativo, pero con una reducida capacidad de autorrenovación. Los ciclos celulares de las CTEpi se caracterizan por ser largos, una ventaja biológica donde se conserva la capacidad proliferativa se minimizan los errores asociados a la replicación¹⁴¹. Se ha demostrado que las CTEpi expresan diversos marcadores como SOX-9, GLI-1 y CD34^{144,145}.



Figura 8. Estratos dérmicos que componen las diferentes capas de la piel. La piel está compuesta por diferentes capas de células que le permiten cumplir sus funciones fisiológicas de barrera y regenerativas. Las células que continuamente se encuentran en proliferación son las células de amplificación transitoria debido a su papel en la regeneración del tejido dañado y en el recambio tisular. Si bien son células con una elevada capacidad de expansión, son poco autorrenovantes. Las células de la capa basal son células troncales que se encuentran en quiescencia hasta que se requiere repoblar el pool de células de amplificación transitoria.

8. Plasticidad

8.1 Definición operativa

La plasticidad, es un atributo de algunas células que indica su capacidad para diferenciarse a otra estirpe no relacionada con su linaje (o de distinto origen embrionario) y que no está

completamente definido, siendo flexible y en consecuencia responde a señales del microambiente que las rodea y ante señales de daño o alteración de la homeostasis¹⁴⁶.

Existen tres eventos de plasticidad que ocurren naturalmente y que se investigan activamente. La meta principal de la medicina regenerativa es aprovechar dicho conocimiento para auxiliar en el reemplazo de células dañadas o perdidas. De manera general, se ha observado donde una fuente celular primaria es capaz de regresar a estadios menos diferenciados (desdiferenciación)¹⁴⁷ o cambiar directamente a otra estirpe celular (transdiferenciación) e inclusive adquirir fenotipos de células precursoras proliferantes relacionadas de otro linaje (transdeterminación)¹⁴⁸ (**Figura.9**). Se ha propuesto que dichos eventos se acompañan de mecanismos de reprogramación de la cromatina.

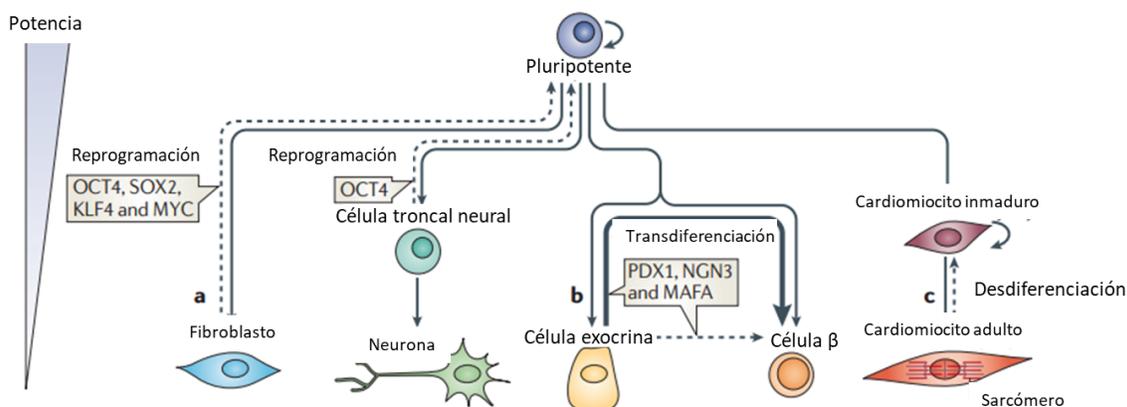


Figura 9. Panorama general de la reprogramación, transdiferenciación y desdiferenciación. Las células diferenciadas bajo ciertas condiciones de cultivo son capaces de desdiferenciarse hasta un nivel pluripotente (marcado con las líneas punteadas), y las células pluripotentes tienen la habilidad de diferenciarse hacia cualquier tipo de linaje celular. En a), es un evento de reprogramación, una mezcla de factores definidos pueden reprogramar el núcleo celular somático para llevarlo a un estado semejante a la célula embrionaria. La transdiferenciación, b), es un fenómeno inducido mediante factores definidos se favorece la conversión a una célula completamente diferenciada de otra capa germinativa. Es un evento que bien puede ocurrir de forma directa o puede cursar con un paso de desdiferenciación hacia un progenitor y reediferenciarse a un tipo celular cercano. En c), la desdiferenciación, un fenotipo celular completamente maduro regresa a un estado celular previo de su propio linaje, donde puede adquirir la propiedad de proliferar y volverse a diferenciar, en especial en tejidos que pueden sufrir daño y el pool de precursores se ha reducido. Tomado y modificado de Jopling e Ispizua Belmonte¹⁴⁸.

8.2 Reprogramación nuclear

Tal vez el proceso de reprogramación que ha llamado más la atención es la reprogramación nuclear, que se favorece a través de un proceso de desdiferenciación, para generar células troncales pluripotenciales, como la respuesta más plástica. Éste involucra el uso de factores exógenos que son capaces de convertir directamente, células diferenciadas hacia un estado pluripotente, es decir con el potencial de diferenciarse hacia cualquier tipo celular¹⁴⁹. El mecanismo de la reprogramación se está comenzando a entender e involucra FTs y modificaciones epigenéticas. Se sabe que el genoma contiene numerosas secuencias de elementos de respuesta, donde potencialmente se pueden unir FTs. La remodelación de la cromatina juega un papel clave en el mecanismo de reprogramación nuclear. La estructura local de la cromatina restringe el acceso a diversos FTs a un cierto número de sitios de unión al ADN permitidos. En un evento de reprogramación, los FTs no sólo deben unirse a sitios específicos de la eucromatina, sino remodelar la cromatina para facilitar el acceso a otros FTs que requieren ser reclutados. Tres hipótesis explican los eventos que ocurren cuando los FTs se unen a sus elementos de respuesta:

- i. Modelo del amplificador permisivo: Los eventos de remodelación de la cromatina se pueden iniciar al sobrepasar los efectos epigenéticos de silenciamiento mediados por el grupo polycomb al unir FTs a elementos permisivos amplificadores en promotores de determinados genes¹⁴⁹.
- ii. Modelos del factor pionero: Los factores pioneros se pueden unir a sitios de la cromatina de fácil acceso y pueden activar genes no permisivos al desensamblar nucleosomas, reclutar complejos remodeladores de la cromatina y FTs adicionales¹⁵⁰.
- iii. Modelo de accesibilidad espontánea: Dada la naturaleza estocástica de los eventos dinámicos asociados a la relajación y condensación de la conformación de la cromatina, varios elementos de regulación en *cis* pueden acceder a determinados sitios de unión a ADN en función de la concentración celular de los FTs reguladores. Un mayor aumento de los FTs se traduce en una mayor probabilidad de eventos de unión

a secuencias reguladoras. Es un modelo que explica como los factores remodeladores de la cromatina, pueden ser reclutados en un sitio particular de un nucleosoma para relajar el enrollamiento del ADN al que está asociado^{151,152}.

8.3 Desdiferenciación

Es un fenómeno que involucra la regresión de una célula terminalmente diferenciada y funcional a estadios más tempranos de su propio linaje. Se han documentado casos de desdiferenciación en muchas especies de vertebrados no mamíferos. El corazón del pez cebra es capaz de regenerarse completamente tras la amputación del 20% de su ventrículo^{153,154}. Esto significa que los cardiomiocitos circundantes deben desdiferenciarse, proliferar y re-diferenciar a tejido cardíaco. Lo que conduce a una regulación a la baja de genes cardiomiocitos-específicos como la cadena pesada de la miosina ventricular¹⁵⁵, así como una regulación a la alza de genes inductores del ciclo celular (**Figura. 10**)¹⁵⁶. Ejemplos de esto en los mamíferos, se encuentran en las células de Schwann, que se encargan de mielinizar los axones de las neuronas del SNP, se desdiferencian y proliferan ante un daño al nervio al que están asociadas¹⁵⁷. Otro ejemplo se da cuando los lóbulos hepáticos son dañados por diferentes tipos de trauma o ante un evento de trasplante. En este caso, se ha establecido que un tipo de células troncales adultas (CTA) residentes, las células troncales mesenquimales, se encargan de regenerar el tejido hepático dañado^{158,159}.

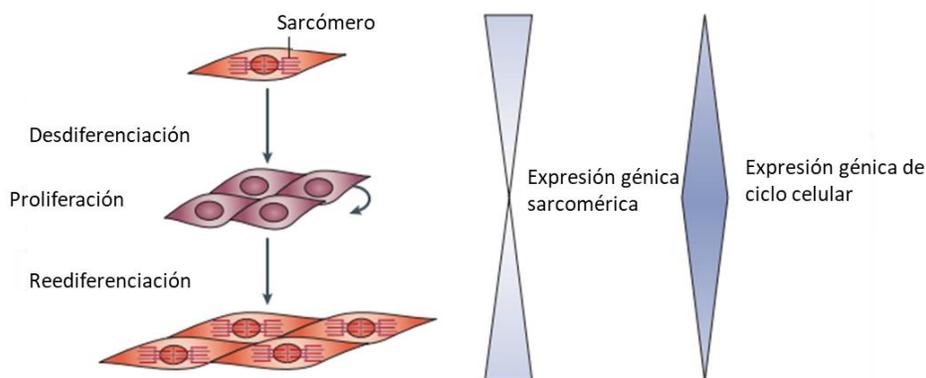


Figura 10. Evento natural de desdiferenciación en pez cebra. Cuando al órgano cardíaco del pez cebra se amputa una parte del ventrículo, los cardiomiocitos circundantes al área de la amputación se desdiferencian, expresan un perfil molecular de ciclo celular a la par que regulan a la baja genes de diferenciación, proliferan y vuelven a diferenciarse para suplir las células faltantes. Tomado y modificado de Jopling e Ispizua Belmonte¹⁴⁸.

8.4 Transdiferenciación

Involucra el cambio de linaje de una célula diferenciada a otro sin pasar por un estado de pluripotencia inducido¹⁴⁷, aunque el término se ha empleado también para la conversión de una célula troncal tejido específica a otro linaje. La transdiferenciación de páncreas a hígado es un ejemplo bien documentado. La formación intrapancreática de tejido hepático se puede inducir en roedores, al alimentarlos con una dieta deficiente de cobre adicionada con un quelante de cobre o exponerlas a un carcinógeno bajo una dieta deficiente de metionina. La transdiferenciación normalmente en procesos regenerativos, expresan marcadores del precursor al que fueron des diferenciadas y entonces, re-diferencian a un linaje distinto, esto es, transdiferenciación indirecta. En la transdiferenciación directa, se diferencia un tipo celular específico de linaje a otro sin involucrar un paso de división celular de la célula parental o de la formación de un fenotipo intermediario¹⁶⁰.

8.5 Transdeterminación

Es un evento plástico, donde ocurre un cambio del compromiso de linaje de células precursoras a un tipo celular relacionado. Se ha demostrado que la inducción de la expresión ectópica de neurogenina 3 (Ngn3), en células hepáticas, las impulsa transitoriamente hacia un fenotipo pancreático secretor de insulina. La magnitud del evento de transdeterminación promovido por Ngn3 fue capaz de establecer aglomerados celulares tipo islotes pancreáticos en el modelo murino e inducir la secreción del polipéptido pancreático, somatostatina y glucagón¹⁶¹. Otro ejemplo que ejemplifica los eventos de plasticidad en la diferenciación en organismos pluricelulares, en donde se induce la transdeterminación de un tipo celular a otro linaje, es el que se puede observar experimentalmente durante el desarrollo de *D. melanogaster*, en donde se cambia la ubicación de los discos imaginales, por ejemplo los discos imaginales que normalmente dan lugar a las patas traseras, se pueden cambiar de ubicación a una región abdominal en larvas hembra, en cuyo caso al desarrollarse hacia un estado larvario más tardío, las células que en condiciones normales formarían una pata del organismo, se transdeterminan hacia células que darán lugar a una ala. Este resultado se relaciona con la presencia de wingless en una región que antagoniza la actividad de los genes polycomb a través de la señalización de JNK¹⁶².

La desdiferenciación, la reprogramación nuclear, la transdeterminación y la transdiferenciación son ejemplos de la capacidad plástica ya sea natural o inducida que las poblaciones celulares poseen, o bien que pueden ejercer en diferentes contextos intracelulares o en respuesta al dinámico cambio del microambiente al que están expuestas.

9. Medios condicionados de origen neural

9.1 Su efecto sobre la diferenciación y la proliferación celular.

El medio condicionado libre de suero (MC-LS), contiene agentes solubles de distinta naturaleza química (como metabolitos, hormonas, factores de crecimiento y proteínas de la MEC) secretados al entorno por un cultivo celular, los que pueden impactar en los procesos de crecimiento, proliferación, sobrevivencia, quiescencia, y diferenciación. Se han realizado ensayos de formación de cuerpos embrioides en presencia de MC-LS generado por precursores embrionarios pancreáticos (16.5 E) sobre células troncales embrionarias, lo cual permitió diferenciarlas como precursores pancreáticos. Esto se demostró por un aumento en el perfil de ARNm de insulina, PDX-1, coexpresión de insulina, péptido C y Glut2. Como es de esperarse de un evento que encamine hacia la diferenciación, el ensayo de incorporación de BrdU, mostró que la proliferación se redujo en un 40% en comparación a las CTE sin tratamiento de MC¹⁶³. En un experimento similar empleando MC-LS, se favoreció la diferenciación hacia precursores de hepatocitos acompañándose de un perfil de expresión de HNF- α , albúmina, cadherina-E y Cy3A4, a partir de CTE ¹⁶⁴.

Los eventos de diferenciación a partir de precursores celulares hacia linaje neural son investigados activamente como una herramienta terapéutica en la que potencialmente podrían retrasar o curar enfermedades neurodegenerativas. En un experimento empleando células progenitoras hipocampales (CPH) de rata en presencia MC-LS derivado de astrocitos corticales, se observó la capacidad del MC-LS en favorecer la diferenciación neuronal. En el mismo estudio también se analizó el papel que las interacciones célula-célula ejercían sobre la neurogénesis, además de investigar el rol de los factores solubles secretados por los astrocitos se empleó un sistema de co-cultivo sin contacto. La expresión basal de TUJ1, un

marcador neuronal, por parte de las CPH, fue del 14%, en comparación al 25% cuando las CPH estaban en presencia de astrocitos. Los resultados, en el sistema Transwell, una configuración de cultivo, donde ambos tipos celulares comparten el mismo medio, pero adheridos en superficies diferentes a modo de pastel, que evita los contactos intercelulares, demostraron el incremento en la expresión de TUJ-1 hasta el 64%. Es importante destacar que la presencia del contacto entre astrocitos tuvo un efecto supresor de la diferenciación neuronal, lo que resalta la importancia de emplear MC para facilitar y favorecer los eventos neurogénicos¹⁶⁵. El empleo de MC-LS en experimentos *in vivo*, han demostrado su efecto en promover la neurogénesis en modelos murinos en relación con los factores solubles derivados de las células endoteliales. En un experimento de infusión intraventricular de MC-LS generado por progenitores endoteliales, se demostró que tiene la capacidad de promover de forma endógena, la neurogénesis de las CTN residentes¹⁶⁶. También se ha evaluado el efecto del MC-LS derivado de células troncales mesenquimales (CTM) en inducir la neurogénesis en un modelo murino de isquemia cerebral. Tras inducir un evento isquémico mediante la oclusión de la arteria cerebral por 90 minutos, se inyectó MC-CTM en el ventrículo cerebral. Se demostró que el perfil de expresión de nestina, Ki-67 y DCX en el estriado y en el córtex se habían incrementado significativamente respecto a los animales control. Esto indica que el MC es una herramienta efectiva para inducir a los precursores neurales a proliferar y a adquirir marcadores de diferenciación¹⁶⁷.

Los diversos medios condicionados del linaje neural se pueden clasificar en función del principal componente celular de linaje restringido del que se derivó: (i) neuroblástico y (ii) glioblástico. Al categorizar de esta manera se permite resaltar los componentes que podrían participar en los efectos celulares que cada progenitor establece en los medios condicionados que se generan.

El ácido retinoico es un morfógeno liposoluble que está participando en la diferenciación terminal de las CPNs al disminuir la tasa de síntesis de los FT tipo bHLH, como los son los inhibidores de diferenciación, *ID1*, *ID2* e *ID3* en las células del linaje SH-SY5Y mientras los genes proneurales, *NEUROD6* y *NEUROD1* se regulan a la alza¹⁶⁸. Los miembros de la familia Wnt, como Wnt3a que están presentes en el MC-LS derivado de CTEs, han sido evaluados por su acción neurogénica. En un experimento *in vitro*, se derivaron neuroesferas del telencéfalo de un embrión murino en desarrollo, las CTN fueron expuestas a un MC

derivado de CTE previamente mantenidas en presencia de bFGF. Se demostró que el MC-CTE si bien promovió la diferenciación de las CTN hacia células neuronales MAP2(+) y células gliales GFAP (+), se suprimió el número de progenitores comprometidos PDGFR (+) /O4(+) /nestina (+). Cuando se retiró bFGF, que es normalmente empleado en el mantenimiento de las CTNs en presencia de MC-Wnt3a, aumentó el número dos veces y media de células MAP2(+) acompañadas de una expresión atenuada de nestina, indicando que Wnt3a está promoviendo la diferenciación hacia células neuronales. Sin embargo, el número de células marcadas con BrdU fue casi el mismo entre las CTN tratadas con MC-Wnt3a vs control. La relación entre el número de células GFAP (+) tratadas vs control, fue de 2.7 veces mayor a la par que el número de células O4(+) disminuyó. Esto indicó que el MC derivado de CTN que contiene Wnt3a amplificó selectivamente la diferenciación neuronal y glial a expensas de la autorrenovación de las CTNs¹⁶⁹.

Los MC de origen neural, tienen la propiedad de amplificar la diferenciación terminal a partir de células de neuroblastoma, como los presentes en la línea SH-SY5Y. El MC derivado de CTN en presencia de AR como coadyuvante se ha evaluado como un promotor de la diferenciación hacia células neuronales. Si bien el tratamiento con AR puede impulsar a las células SH-SY5Y a la apoptosis, el medio condicionado derivado de células troncales neurales (MC-CTN) tiene un efecto protector en la sobrevivencia de los precursores neurales. Además del efecto protector del tratamiento combinado (MC-CTN+AR), la relación del fenotipo β -III-tubulina (+) generado fue del 88% y 91% al tercer y séptimo día de tratamiento, respectivamente. Esto demuestra el papel funcional que tiene el MC de origen neural en facilitar la inducción de células con características neuronales¹⁷⁰.

El mecanismo de acción básico de los MC es el de señalar y activar mediante distintos factores solubles que lo componen, diferentes respuestas celulares. También las interacciones intercelulares que conforman al nicho son una de las formas en cómo se regula el fino balance entre el estado de quiescencia y el asociado a la proliferación en células precursoras, ya sea mediante eventos de fosforilación de la vía ERK/JRK o por la participación de factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado de cerebro (*BDNF*, del inglés Brain derived neurotrophic factor), *NT-3*¹⁷¹ e *IGF-1*¹⁷², mientras que los factores que componen al MC de las CTMs impactan en la diferenciación y viabilidad celular de glía derivada de CPNs¹⁷³.

9.2 Caracterización de medios condicionados de origen neural.

Con el advenimiento de las tecnologías “ómicas” y el desarrollo de la proteómica junto con el empleo cada vez más extendido de los MCs como agentes reguladores de linaje, se hizo necesario dilucidar los componentes químicos que están participando en la inducción de la proliferación y diferenciación.

Los tumores son masas celulares heterogéneas, compuestos de células endoteliales, células diferenciadas y precursores celulares que mantienen su crecimiento celular, promueven la angiogénesis y participan en su metástasis, lo que conlleva a que secreten moléculas de diversa naturaleza que enriquecen el MC. El conjunto de moléculas presentes en el medio de cultivo que recibe la producción de las células cultivadas se reconoce con el término de “secretoma” pues hace referencia únicamente a las proteínas secretadas por todos los tipos celulares presentes en una condición experimental dada que están participando en el mantenimiento de la comunicación celular, proliferación, metabolismo y del sistema inmune^{174,175}.

9.2.1 Medios condicionados derivados de meduloblastoma

El meduloblastoma (MB) es el tipo de cáncer pediátrico cerebral más común, mortal y más agresivo. Presenta una alta dependencia de una proteína denominada ciclina D1¹⁷⁶ cuya regulación es dependiente de FT como PPAR γ , MyoD y Oct1¹⁷⁷ e interacciones con la MEC. Una de las líneas celulares que ha permitido conocer lo que se expresa en el tumor es la línea DAOY, la cual fue derivada de un meduloblastoma cerebelar¹⁷⁸.

La elucidación del secretoma mediante diferentes tecnologías ómicas, ha permitido definir los componentes químicos de algunas líneas celulares como los son, la del epitelio retinal¹⁷⁹, de la CTM¹⁸⁰ y de origen neuroglial.

Entre los estudios proteómicos en líneas neurales humanas, se encuentra el perfilado del secretoma de las CTNs en diferenciación hacia neuronas, mediante electroforesis 2D, que detectó 956 proteínas, las cuales se clasificaron en 21 categorías funcionales diferentes. Alrededor del 21% son proteínas relacionadas al metabolismo, a la síntesis de proteínas, proteínas de shock térmico, metabolitos de ARN y señales de transducción. En la categoría de división y ciclo celular se identificaron a la proteína de migración nuclear NudC que se regula a la alza¹⁸¹, una proteína altamente conservada implicada en la migración neuronal durante el

desarrollo del neocórtex. La cual es requerida para la migración nuclear de los progenitores de la glía radial¹⁸². La proteína de ensamblado de nucleosoma tipo 1 (NAP1L), se detectó regulada al alza. Es una familia de cinco proteínas, cuya importancia biológica está demostrada en los mutantes *Nap1l2*. Estos ratones presentan una sobre proliferación de CTNs y una disminución de la diferenciación neuronal. A nivel molecular, controla genes del ciclo celular como *Cdkn1c* mediante la acetilación de histonas. También interactúa con otras proteínas de la misma familia mediante hélices alfa conservadas que en conjunto reclutan FT y participan en la remodelación de la cromatina¹⁸³. La proteína de choque térmico 70 kDa, se ha descrito como un regulador que favorece el crecimiento del glioblastoma. Los experimentos *in vitro* han demostrado que la regulación a la baja de esta proteína promueve un fenotipo invasor integrina $\beta 1(+)$, mientras que en el análisis 2D su cuantificación demostró su aumento durante la diferenciación¹⁸⁴. Se detectaron dos proteínas pertenecientes a la categoría de síntesis, degradación y metabolismo de proteínas. la ubiquilina-1 y el factor de elongación 2 (EF-2), ambos participan en el desarrollo neuronal. La ubiquilina-1 es un factor que protege contra la apoptosis neuronal y se cuantificó como regulada a la baja cuando las CTNs están diferenciando¹⁸⁵ El EF-2, incrementa la síntesis de proteínas involucradas en la diferenciación neuronal de células de neuroblastoma de ratón¹⁸⁶.

El análisis proteómico de DAOY mediante electroforesis 2D, identificó 53 proteínas, de las cuales 25, estaban sin caracterizar funcionalmente¹⁸⁷. Entre ellas, se identificó a la matrina-3, una proteína que participa en la estabilización del ARNm mediante la formación de complejos supramoleculares¹⁸⁸. La caracterización del secretoma del MC de DAOY, ha identificado la presencia de vesículas extracelulares (VEs)¹⁸⁹. Entre las proteínas contenidas en las VEs, se encuentran, β -actina, GRP78, un regulador maestro de la respuesta a proteínas mal plegadas, que se encarga de reducir el estrés dentro del retículo endoplásmico¹⁹⁰. También se detectó la presencia de HSP90, una proteína de choque térmico, cuyas funciones además de participar en el plegamiento correcto de las proteínas, está en el mantenimiento de los cilios¹⁹¹. En un estudio proteómico de las líneas de meduloblastoma, DAOY y D283¹⁹², se confirmó el origen neural de ambas líneas celulares, al identificarse la enolasa específica de neurona (NSE, del inglés Neuronal specific enolase), la forma más abundante de enolasa glucolítica presente en las neuronas adultas que tiene un papel mitótico en los cultivos de neuronas empleando NGF como coadyuvante¹⁹³.

Si bien el meduloblastoma cerebelar tiene un origen neuroectodérmico y una célula iniciadora de tumores con propiedades de proliferación denominada meduloblasto con un perfil nestina (+) Rb/p53(-) con la capacidad de dar lugar a neuronas, células musculares y glia^{194,195}, el glioblastoma tiene diferentes tipos de células iniciadoras de tumores entre ellas CTNs¹⁹⁶, por lo tanto, puede dar lugar a una secreción diferencial que modifique el contenido del MC. Un atributo común de las células tumorales es la secreción de diferentes factores de crecimiento que señalizan autócrina o parácrinamente su proliferación continua. En los cultivos de CT tumorales en proliferación, se ha cosechado MCs enriquecidos de importantes factores de crecimiento y promotores de la proliferación celular entre las que se encuentran: precursor de granulina (GRN, del inglés Granulin precursor), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés, Vascular endotelial growth factor), precursor de proteína priónica (PRNP, del inglés Prion precursor protein), proteína de unión al factor de crecimiento insulínico tipo 5 (IGFBP5, del inglés Insulin growth factor binding protein type 5) y la proteína de unión a Mac type 2 (Mac-2BP, del inglés Mac binding protein type 2)¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Es importante destacar que FCs como VEGF, fue secretado dentro de exosomas por cultivos primarios de glioblastoma multiforme, células que se encuentran situadas en el nicho vascular, asociadas con las células endoteliales de la microvasculatura. La función de VEGF asociada al interior de los exosomas parece incrementar la permeabilidad y la angiogénesis²⁰⁰. Sin embargo, también se detectó que VEGF secretado, promueve la proliferación de las CTs iniciadoras en función de la cantidad de receptores de VEGF tipo 2 disponibles a los cuales acoplarse. Los experimentos demostraron que, bajo condiciones de hipoxia, la ausencia de VEGF no abatió la proliferación de los precursores. Sin embargo, en hipoxia en la presencia de VEGF (100 ng/mL) promovió la proliferación en dos veces respecto a la condición de normoxia con la misma concentración del FC. Esto indica que VEGF es un inductor de la propagación y que la hipoxia cumple un efecto sinérgico²⁰¹.

Las granulinas también fueron detectadas en el secretoma de las células de glioblastoma¹⁹⁹, estas cumplen una función lisosómica y están involucradas en la inflamación y en la proliferación celular²⁰². Otro FC detectado en el secretoma del glioblastoma y que estimula la proliferación de células de tumores del SNC, es el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés Nerve growth factor) que activa la vía de señalización de Notch. En las células troncales de glioblastoma (CTG), se evaluó la presencia de NGF en cultivos de CTG de una línea U-

87. Mediante un ensayo de MTT, se detectó una mayor expresión de los genes *Hes1* y *Notch-1*, dependiente de la concentración de NGF y se identificó que NGF estimula la proliferación celular. Los experimentos por Western blot, revelaron que esta estimulación es mediada por la vía de Notch1 a través de *Hes-1*²⁰³. En un experimento de diferenciación mediante AMPc dibutílico en líneas celulares de meduloblastoma (MED-3), y neuroblastoma (NB-1 y GOTO), se determinó que el AMPc indujo la sobreexpresión del receptor de NGF acompañado de un incremento en la expresión de proteínas NFM por parte de las células MED-3, pero que eran ausentes en las células NB-1 y GOTO. Este comportamiento, se tradujo en una inhibición de la proliferación del 62% de la línea celular MED-3²⁰⁴.

Los resultados previos se ven reforzados por la evidencia que muestra, que NGF no actúa como un agente de diferenciación en líneas celulares de meduloblastoma (UW228 y UW443) a pesar de que alrededor del 8% de las células expresan un receptor de NGF. Sin embargo, a pesar de la ausencia de NGFr, el AR fue capaz de inducir cambios morfológicos, alargamiento del soma y crecimiento de procesos²⁰⁵. En las células neuroblásticas, NGF, ha sido reportado como un factor que reduce la respuesta a EGF (3<), respuesta medida por los niveles de ornitina descarboxilasa²⁰⁶. Estos resultados muestran el comportamiento diferencial que pueden tener varios componentes de los MC de líneas tumorales del SNC.

La caracterización de la línea de glioblastoma U251 mostró la secreción de interleucinas (IL), IL-1, IL-8, cristalina gamma E tipo 2, tenascina C, prepropéptido de galanina tipo 1, pentraxina 3, SERPINE1, estaniocalcina, factor de comunicación celular de red tipo 2 y la cadena alfa de colágeno 2 tipo 4 (COL4A2, del inglés Collagen type IV Alpha 2 chain)²⁰⁷ y los factores exógenos secretados por las CTs tumorales que predisponen a un estado lábil a las CPNs a transformarse a un fenotipo aberrante de mayor proliferación²⁰⁸.

IL-1, es una molécula que además de participar en la consabida respuesta proinflamatoria²⁰⁹, también ha demostrado ser un agente con la propiedad de modificar el perfil del secretoma de las células troncales germinales (línea celular U251)²⁰⁷. Las células de esta clase de tumor cerebral son muy sensibles a la estimulación por IL-1²¹⁰ debido a su papel en comenzar la cascada neuroinflamatoria del SNC cuando es liberada por los astrocitos²¹¹. El análisis comparativo del secretoma de CTG estimulado con IL-1 vs sin estimulación de IL-1, mostró

una regulación diferencial de 190 proteínas que incluyen citocinas, quimiocinas, FC, proteasas, moléculas de adhesión celular, proteínas de MEC y otras proteínas relacionadas.

Una variante de *SERPINE1*, ha sido descrito como un gen que promueve la longevidad en la comunidad Amish judía, debido a su asociación en células eucariotas con telómeros más largos. La presencia de *SERPINE1* en el MC de U251, la sugiere como un factor autocrino o paracrino que promueve la estabilidad genómica de los telómeros²¹². También está descrita como un gen modulador de la metástasis de las CTG. Los experimentos *knock down* de *SERPINE1*, demostraron tener un efecto supresor del crecimiento del tumor y de la invasión en el cerebro²¹³.

En el espacio extracelular de DAOY, se ha identificado la presencia de IGF-2 y Shh como agentes mitóticos de células precursoras cerebelares. La importancia de IGF-2 radica en que es descrito como un mitógeno fetal involucrado en la progresión de diferentes tumores con origen embrionario²¹⁴. En un análisis comparativo del efecto de IGF-2 en la proliferación de dos clases de meduloblastomas, clásico y desmoplásico que evaluaba el nivel de expresión de ARNm de IGF-2 en presencia Shh, se halló que Shh inducía un mayor nivel de la transcripción de IGF-2 en la variante desmoplásica en comparación al grupo clásico. Los experimentos de consumo de timidina- H^3 en presencia de IGF-2, en conjunto a la línea celular DAOY, demostraron que ni DAOY (0.75 conteos por minuto) ni una línea celular derivada de un meduloblastoma clásico, D283MED, (0.94 cpm) tuvieron una proliferación significativa vs control (1.0 cpm). Sin embargo, en las líneas celulares derivadas de un meduloblastoma desmoplásico, tanto D245MED (1.82 cpm) como MHH-MED-1 (1.83 cpm), se impactó en su proliferación por la presencia de IGF-2. Los resultados indican que IGF-2, tiene un importante papel en la proliferación mediante un mecanismo autocrino²¹⁵.

PDGF, es un FC detectado en el MC de la línea celular de meduloblastoma cerebelar (TE-671). En ese estudio, se cosechó el MC-LS de TE-671 enriquecido por 48 horas para evaluar su efecto en la proliferación sobre una línea celular de fibroblastos (3T3) en presencia de timidina- H^3 . Se detectó que la condición con MC-PDGF 50% tuvo el mayor efecto en la incorporación de timidina (15×10^3 cpm) por las células 3T3 en comparación a la condición MC-PDGF 10% (5×10^3 cpm)²¹⁶. También se ha descrito que PDGF, está participando en la

adquisición del fenotipo neuronal (NFL⁺, NP-Y⁺) pero con bajo nivel de expresión de *c-myc*, vía activación del PDGFr- α ²¹⁷.

En conjunto, estos trabajos indican que las CTNs o los precursores neurales, secretan agentes solubles al entorno de diferente naturaleza química, que impulsan su proliferación y sobrevivencia celular^{218,219}. En el contexto del presente trabajo, esto sugiere algunas señales solubles que podrían contener los MC-LS derivados de líneas tumorales del SNC, podrían participar en las diferentes respuestas celulares que favorezcan eventos de plasticidad.

9.2.2 Medio condicionado derivado de neuroblastoma.

El neuroblastoma es descrito como un cáncer embrionario del sistema nervioso autónomo (SNA), si bien es el cáncer más diagnosticado durante el primer año de vida²²⁰, tiene una de las tasas más altas de remisión espontánea y completa²²¹. Por lo tanto, ha sido de especial interés la resolución del secretoma/MC en los sistemas *in vitro*.

La caracterización proteómica de la línea celular SH-SY5Y, ha sido realizada mediante espectrometría de masas de su secretoma, en donde se detectó la presencia de gránulos de la familia de las graninas o secretograninas, miembros como la cromogranina A, cromogranina B, secretogranina III y VEGF. Además de otras 119 proteínas, de ellas 115 requeridas para la translocación del retículo endoplasmático y proliferación como *Nap111*, complejo de distribución nuclear C (NudC, Nuclear distribution complex C) del inglés y *Vcp*. También se identificaron por predicción basada en algoritmos (SecretomeP) proteínas secretadas de forma no canónica pertenecientes a funciones reguladoras del ciclo celular, proliferación y adhesión celular como la profilina-1, nucleolina, β -V-tubulina y la molécula de adhesión celular neural²²².

La proteína Nap111, es una chaperona de histonas que participa en el borrado de la impronta paterna en precursores de las células germinales primordiales²²³. NudC, es una proteína previamente descrita en el MC de glioblastoma, con una función en participar en la migración nuclear durante la neurogénesis²²⁴. NGF es una molécula previamente descrita, secretada por líneas celulares de glioblastoma (U87MG) y neuroblastoma (IMR-32). En otro estudio se evaluó el efecto de los MC de IMR-32 y U87MG en el crecimiento y desarrollo de las neuritas

en un modelo de feocromocitoma murino (PC12). Se encontró que los MCs de ambas líneas celulares, fueron capaces de inducir el crecimiento de las neuritas dentro de las 48 h de incubación sobre las células PC12. Además, ambos MCs detuvieron la proliferación de las PC12. Por lo tanto, NGF es un factor soluble que promueve la adquisición de un fenotipo neuronal a pesar de detener el crecimiento celular²²⁵.

La investigación en comunicación celular ha identificado que además de los factores solubles que se trataron con especial interés, también existen pequeñas vesículas lipídicas, cuya caracterización está siendo una importante área de estudio en la biología molecular. Los exosomas son vesículas lipídicas provenientes de la membrana celular de 30 a 120 nm de diámetro secretadas por muchos tipos celulares, contienen ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. La literatura demuestra que son especialmente ricos en proteínas y miRNAs que regulan el crecimiento, el metabolismo y la diferenciación^{226,227,228}.

El análisis proteómico de las VEs de las líneas celulares de neuroblastoma HTLA-230 y SH-SY5Y, identificaron la presencia de las siguientes proteínas: fibronectinas, proteínas de choque térmico, proteínas relacionadas al citoesqueleto, prominina-1, basigina, y CD276²²⁹.

Prominina-1, es un marcador de CT tumoral del SNC que identifica tanto a neuroblastoma como a glioblastoma. Los cultivos de neuroblastoma, identificaron a dos subpoblaciones de progenitores neurales que manifiestan un perfil inmunopositivos a Olig-2 (95%), Sox2 (18%), NG2 (4%) y GFAP (3%) para la primera población y Olig2 (97%), Sox2(11%), GFAP (5%) y NG2 (5%) para las células de la materia gris. La incorporación de BrdU en la población tanto de la materia gris como de la blanca fue casi idéntico (~3%), mientras que las células que NG2 originarias de la ZSV, mostraron una incorporación elevada de BrdU (90%). Estos resultados permiten concluir que prominina-1 tiene un efecto inductor de la proliferación en los precursores neurales²³⁰. Basigina (Bsg), es una inmunoglobulina (Ig), detectada en el desarrollo embrionario y en carcinomas embrionarios²³¹. Está descrita como una proteína con dos dominios tipo Ig. En los experimentos *knock out* de *Bsg* en modelo murino, muestran anomalías neurológicas. A nivel celular, induce la liberación de metaloproteinasas²³²

10. ANTECEDENTES

El descubrimiento de la generación de células troncales pluripotenciales inducidas (iPS, del inglés induced Pluripotential Stem) por sobreexpresión viral de cuatro factores de transcripción (Oct3/4, Sox2, c-Myc y klf4) por Yamanaka y Takahashi²³³ en células somáticas produjo un cambio de paradigma y demostró que, a pesar de la complejidad del desarrollo embrionario de un organismo, en realidad se requiere la participación de pocos FT para inducir un estado pluripotencial. Las iPS demostraban ser morfológicamente y funcionalmente muy similares a las Células Troncales Embrionarias. Las iPS cuando son trasplantadas evolucionan en un teratoma en modelos de xenotrasplantes murinos. A pesar de ello, la investigación referente a eventos de plasticidad se tornó en un campo muy activo y ha estado focalizada a emplear medios definidos para reprogramar células de un tejido en particular a otro con fines de terapia celular.

10.1 Generales

La obtención de precursores neurales desde fuentes celulares terminalmente diferenciadas fue el paso lógico para evitar los obstáculos propios de las terapias celulares basadas en iPS, como el riesgo de carcinogénesis. La actual investigación científica está enfocada en entender los mecanismos moleculares y celulares asociados a los eventos inducidos de plasticidad con propósitos terapéuticos²³⁴. También la investigación se ha enfocado en desarrollar protocolos de cultivo, pues la diversidad de fuentes celulares primarias para generar poblaciones de precursores neurales es muy amplia. Se puede emplear tanto cocteles de moléculas pequeñas que mimeticen el efecto de marcadores de inducción neural, transfección con lentivirus y retrovirus que induzcan la expresión de los FT propuestos por Yamanaka, miRNAs que regulan el comportamiento celular y capaces de reprogramar fibroblastos a neuronas, así como emplear diversos medios definidos o condicionados²³⁵ que aumenten la tasa de reprogramación, evitar los problemas asociados a las iPS, como son la integración viral aleatoria que favorece la tumorigenicidad, la contaminación con células no deseadas por la naturaleza heterogénea de los cuerpos embrioides y la teratogenicidad con el uso de ácido retinoico²³⁶.

Se han obtenido precursores neurales desde diversas fuentes y empleando muy pocos e inclusive solo un factor exógeno. Shahbazi et al.²³⁷ emplearon a Zfp521 que es un factor de

transcripción que contiene un motivo de dedo de zinc capaz de reprogramar directamente fibroblastos humanos a NSC multipotentes con capacidad de autorrenovación, presentando características morfológicas y funcionales propias de las CTN control y sin el riesgo de producir tumores en ratones neonatales y adultos. Debido a que las células neurales inducidas (CNis) carecen de capacidad de autorrenovación, ya que son células postmitóticas, es necesario desarrollar protocolos que generen células con capacidad de autorrenovación, multipotentes y que a la par, no presenten potencial tumorigénico. Otros investigadores han conseguido células troncales neurales inducidas (CTNi) que presentan las propiedades antes mencionadas, al transfectar fibroblastos humano únicamente con Sox2, lo que las impulsa a expresar Sox2 y nestina a los cinco días de ser inducidas. Es de remarcar que las CTNi transdiferenciadas a partir de fibroblastos humanos no son pluripotenciales, aunque sí presentan capacidad multipotente y una morfología similar a las CTNs silvestres²³⁸. La transdeterminación como se ha ejemplificado emplea fibroblastos como fuente celular primaria debido a su alta disponibilidad. Sin embargo, también se han empleado células terminalmente inmaduras, como células troncales órgano-específicas.

10.2 Específicos

Hay evidencias que muestran que las células de médula ósea al ser trasplantadas en un entorno neural generan nuevas neuronas^{239,240} por lo que las señales de un entorno *in vivo* el cuál es inherentemente complejo, influyen en gran medida en el destino de las células troncales. Por otra parte, al usar medios definidos, donde se conoce exactamente la concentración de los factores solubles que están presentes, se han desarrollado protocolos empleando MC de origen ectodérmico sobre fuentes celulares troncales mesenquimales para desdiferenciarlas a CTNs. Las células troncales mesenquimales humanas obtenidas de médula ósea, cultivadas en un MC generado por CTNs, son capaces de transdeterminarse al linaje neural. Las células neurales se obtienen a partir de estructuras tipo neuroesferoides con un rendimiento del 95%, las cuales se caracterizan por expresar marcadores de linaje neural para neuronas, astrocitos y oligodendrocitos como beta-III tubulina, GFAP y NG2, respectivamente. Tales CTNs del estudio son funcionalmente, y morfológicamente similares a las CTNs derivadas de cerebro de ratón adulto y embrionario. Aunque las células hacia las que diferencian presentaron potencial de membrana negativo y son capaces de despolarizarse, no reproducen un patrón

electrofisiológico propio de neuronas maduras, a pesar de que la diferenciación neural de las CTNs trasplantadas a la corteza y tejido estriado se siguió por cuatro semanas²⁴¹. Este estudio demostró que es posible llevar la transdeterminación un paso más allá de sólo reprogramar células de un linaje a otro de la misma capa germinativa, diferenciando células de diferente origen embrionario. Principalmente, se distingue de otros protocolos, en el que emplearon un medio condicionado homólogo a las células deseadas, lo que demuestra que el medio contiene factores solubles capaces de inducir eventos de plasticidad tan eficientes que permite cambiar el linaje celular. Las CPNs son generadas al diferenciar CTEs de ratón cultivadas en un medio condicionado de origen neural, alcanzando un porcentaje de 95% de células inmunopositivas a nestina y con capacidad de diferenciación hacia los linajes neuronales y gliales⁵³. Lo que demuestra que las CTNs y CPNs comprometidas pueden ser generadas por eventos de plasticidad y que los MCs pueden ser agentes de reprogramación. Estos fenómenos de plasticidad también se han reportado con el MC de origen glial sobre células de neuroblastoma, observándose cambios morfológicos muy similares a las neuronas silvestres con un porcentaje de diferenciación aproximado del 70%, lo que sugeriría que las células gliales tienen un papel sobre el desarrollo del SNC²⁴². Este antecedente muestra que las células de tumor neuroblástico son capaces de diferenciarse bajo las condiciones apropiadas de cultivo. La diferenciación neuroglial también es llevada a cabo con MC de neuroblastoma partiendo de células troncales de endometrio humano coadyuvándose de un andamio de nanofibras de ácido poliláctico y quitosano, el cual aumenta las interacciones moleculares entre los factores solubles presentes en el medio y las células troncales endometriales. Estas células demostraron tener eventos de plasticidad hacia el linaje neural y glial²⁴³.

Para la terapia de reemplazo celular, los queratinocitos de piel (QP) también se han perfilado como una fuente alternativa de tejido autólogo, que sujetos a eventos de plasticidad, se pueden reprogramar a tipos celulares de tejidos normalmente dañados en condiciones patológicas. Está bien documentado que el ácido trans-retinoico induce la reprogramación mucosa epitelial en queratinocitos embrionarios de rata²⁴⁴, tal como descubrieron Fell y Mellanby²⁴⁵ años antes en tejido ectodérmico de pollo, lo que recobra importancia cuando la población tejido-específica de partida y la deseada surgen de la misma capa germinativa. En 2016 Gopakumar, Chatterjee, Parameswaran, Nirmala y Krishnakumar²⁴⁶ transdiferenciaron QP a células epiteliales de la córnea (CEC, del inglés Epithelial cornea cells) empleando un medio

condicionado de fibroblastos del limbo como una fuente celular alterna para favorecer la diferenciación de células troncales limbares basolaterales. Este experimento demuestra que el nicho al cuál están expuesto los QP, los induce a adquirir un fenotipo celular tipo córnea-epitelial, lo que es detectado por citoqueratinas (CK, del inglés cytokeratines) propias. A los 31 días de cultivo en presencia de medio condicionado de fibroblasto limbal, se detectaron células epiteliales de córnea inmunonegativas a CK14, un marcador hallado en QP asociados a la lámina basal pero sí expresaron marcadores CK de células de córnea maduras, CK3 y CK12 en un porcentaje de 63.69% y 86.07%, respectivamente, sin embargo, fueron inmunonegativas a CK1, un marcador epidermal de piel. Uno de los problemas que se detecta es que no hubo un correcto protocolo para la obtención del medio condicionado de fibroblasto limbal, pues no indica si realizaron una evaluación por microscopía invertida para la detección de células remanentes, tampoco se indica si incubaron el medio condicionado para asegurar la ausencia de células proliferantes, a pesar de que las células que lo producen y las deseadas, sean diferentes. También se ha demostrado que los QP pueden ser reprogramados para que expresen genes y proteínas neurales después de ser tratados con decitabina, un agente antitumoral que inhibe la replicación. Una semana posterior al tratamiento, las células dejaron de expresar marcadores de QPs y comenzaron a expresar marcadores neurales como beta III-tubulina y doblecortina (DCX, del inglés Doublecortin) al final de la tercera semana, y se identificaron células inmunoreactivas a nestina, NFM-1, FOXP2, sinapsina y GLUR1²⁴⁷.

Estos estudios destacan dos cuestiones importantes: 1. los QP son capaces de responder y actuar en consecuencia a las señales recibidas del entorno, lo que indica que los QPs pueden transdiferenciarse a diversos linajes celulares. 2. los precursores neurales se pueden obtener a partir de diversas fuentes celulares de diferente o igual origen embrionario empleando exclusivamente CM neuroglial.

11. Planteamiento del problema

La generación de CTNs a partir de fenotipos terminalmente diferenciados ha abierto una oportunidad para las terapias de neuro-reemplazo autólogo sin las fuertes consideraciones éticas que rodean a las células troncales embrionarias. Esta investigación se enfoca en generar CTNs a partir de una fuente celular primaria sin la generación de células iPS. Entre los problemas asociados al uso de iPS, son la formación de teratomas y la baja eficacia de producción de iPS²³² para su posterior re-diferenciación hacia neuronas²⁴⁸, no las hace la opción terapéutica más viable. La obtención de CTNs autólogas con el potencial de proliferar *in situ* al ser injertadas y la baja probabilidad de rechazo inmunitario, las hace una estrategia terapéutica potencial. Al usar medios condicionados como agentes moduladores de origen neuroglial, aumenta la bioseguridad al evitar los problemas asociados a la transfección vírica con ADN exógeno implicada en potenciales eventos oncogénicos²⁴⁹. Los desórdenes neurodegenerativos, en muchos casos son causados por un único tipo celular, así que obtener precursores neurales con potencial de autorrenovación, permite requerir un bajo volumen del injerto, en contraste si se trasplanta fenotipos terminales. La investigación en torno al descubrimiento e investigación de nuevos fármacos requiere de modelos celulares que permitan evaluar su teratogenicidad, capacidad mutagénica y su ventana terapéutica de forma paciente-específica²⁵⁰. Los modelos animales humanizados, aunque son útiles para algunos ensayos clínicos, no muestran un panorama biológico lo más fiel a las patologías humanas²⁵¹, por lo que obtener una fuente ilimitada de CPNs que permita recrear enfermedades neurodegenerativas y comprender sus mecanismos fisiopatológicos moleculares subyacentes funge como un fuerte atractivo para el campo de la neuropatología²⁵². Por lo tanto, desarrollar protocolos enfocados a generar células precursoras de linaje neural es un imperativo que no sólo redundará en aumentar el conocimiento del repertorio de herramientas moduladoras de eventos neuroplásticos, sino también, encausar y estudiar potenciales aplicaciones clínicas.

Expuesto lo anterior, nos motiva a realizar la siguiente pregunta:

¿Los medios condicionados de entornos neurogliales muestran capacidad de inducción neural *in vitro* sobre células epidermales?

12.OBJETIVOS

12.1 GENERAL: Evaluar la participación de factores solubles secretados por entornos neurogliales en la generación de precursores neurales como moduladores de la inducción neural sobre queratinocitos.

12.2 ESPECÍFICOS:

- Propagar y caracterizar fenotípicamente las líneas tumorales neurales DAOY y SH-SY5Y.
- Propagar y caracterizar fenotípicamente a las células epidermales.
- Generar medios condicionados de líneas tumorales neurales humanas.
- Evaluar la capacidad de inducción neural de medios condicionados sobre células epidermales.

13. HIPÓTESIS

El medio condicionado de origen neuroglial es un agente inductor neural sobre queratinocitos.

14. MATERIALES Y METODOLOGÍA

14.1 Cultivo de queratinocitos (HEK_n)

Se cultivaron queratinocitos epidermales primarios de humano neonatal (ATCC® PCS-200-010™) en medio UDMM-Epi, se incuban a 37 °C, 5% CO₂. El medio se reemplazó cada tercer día. Se subcultivó cuando alcanzó el 80% de confluencia. Se desprendieron agregando dos mL de Tripsina (0.05%)-EDTA (0,02%) para células primarias (ATCC PCS-999-003) precalentado a 37 °C, se incuban por 3 a 6 min a 37 °C. Se observó bajo microscopio óptico para seguir el desprendimiento. Cuando la mayoría de las células se encuentran desprendidas, inmediatamente se agrega igual volumen de medio de inactivación de tripsina y se centrifuga a 400gx5 min. Aspirar el sobrenadante y agregar 8 mL de medio fresco atemperado y sembrar a una densidad de 5x10⁵ células por caja de 100 mm y se incuban a 37 °C, 5% CO₂.

14.2 Cultivo de neuroblastoma (SH-SY5Y)

Las células de neuroblastoma (ATCC® CRL-2266™) se cultivaron con medio DMEM F12 con HEPES (suplementado con 10% FBS, mezcla antibiótica, piruvato de sodio y glutamato). Las células crecen unidas al sustrato y como flotantes, así que las primeras son las que se propagan. Se agregó dos mL de tripsina (0.05%)-EDTA (0,02%) y se incuban por 3 min a 37 °C. El desprendimiento se siguió por microscopio invertido. Cuando las células se observen disgregadas, inmediatamente se inactiva la tripsina agregando dos mL de medio de inactivación 10% FBS. Se realizó una serie de dos lavados con medio de lavado de 2 mL cada uno. Se recolecta y se centrifuga a 400g x 5min a 4 °C. Se determinó la viabilidad celular por exclusión de tripano y se siembra a una densidad de 5x10⁵ células por área de 55 cm². Se incubaba a 37 °C, 5% CO₂.

14.3 Cultivo de meduloblastoma (DAOY)

Las células de meduloblastoma (ATCC® HTB-186™) crecen como anclajes dependientes en un medio DMEM/F12 sin HEPES suplementado con FBS 10%, antibiótico antimetabólico 100X, Glutamax 100X y piruvato de sodio 1X. Para subcultivo, se agregó 2 mL de tripsina (0.05%)-EDTA (0,02%), se incubó por 3-5min a 37 °C. Se sigue el curso de la disgregación por microscopio invertido e inmediatamente se inactiva con el mismo volumen empleado con medio de inactivación una vez que las células se han desprendido. Se realizó dos lavados con 4 mL de medio de lavado (medio basal DMEM). Se centrifugaron a 400g por 5 min a 4 °C y

se resuspende en 2 mL de medio de cultivo. Se siembran a una densidad de 500 000 células por área de 55 cm² y se incuban a 37 °C, 5% CO₂. Se realizó cambio de la mitad del medio total cada tercer día y se subcultiva al cuarto día.

14.4 Cosecha del medio condicionado de células tumorales neurales (MC-CTN)

Una vez establecido el cultivo celular, se permitió su expansión con medio de propagación por tres días (72 horas) o hasta alcanzar el 80% de confluencia, se reemplazó el medio envejecido por medio definido (Glutamax 1X, insulina 25 µg/mL, transferrina 100 µg/mL, progesterona 20 nM, putresina 60 µM, selenita de sodio 30 nM, antibiótico antimicótico 1X, Dubelco/F12 1:1) y se incubó por 72 horas, posteriormente se filtra a través de una membrana con un diámetro de poro de 0.22 µm para descartar de cualquier componente celular. El MC se alícuota y se almacena a -80 °C hasta su empleo.

14.5 Generación de agregados epidermales

Se sembró 2x10⁶ queratinocitos en cajas de cultivo de 60 mm (21 cm²) recubiertas con poli-hema (poly-2-hidroxietil-metacrilato) preparadas 12 horas antes con 6 mL de medio de agregación (antibiótico antimicótico 100X, FGF, EGF, B27 sin vitamina A y DMEM/F12 sin Hepes) y se incuban por 72 horas a 37 °C y 5% CO₂. Tras 72 horas de incubación los agregados epidermales se procesan para disgregarlos. Se recuperó cada caja en un tubo de centrifuga y se permitió sedimentar a los agregados. Se centrifugó a 200g por 5 minutos y se disgregan con 5 mL de Triplex a 37 °C, se mezcla por inversión diez veces y se eyectaron las células contra el fondo del tubo de forma gentil para facilitar la disgregación en una serie de 20 repeticiones. Se inactivó con 5 mL de medio de inactivación (FBS 10%) y se procedió a determinar el rendimiento y la viabilidad celular por el método de exclusión de azul de tripano empleando una cámara de Neubauer.

14.6 Inducción NPC de queratinocitos

Tras disgregar los cúmulos epidermales y determinar su viabilidad y rendimiento se someten a diferentes medios o condiciones experimentales. En una caja multipozo de 24, se sembró 2x10⁶ células epidermales con 500 µL de medio de acuerdo con las siguientes condiciones:

- i. Células epidermales en medio de propagación epidermal 100%
- ii. Células epidermales en medio de agregación, 100%
- iii. Células epidermales en medio condicionado, 40%

- iv. Células disgregadas en medio de propagación epidermal 100%
- v. Células disgregadas en medio de agregación, 100%
- vi. Células disgregadas en medio condicionado, 40%

Se incubó y se realizó seguimiento fotográfico por 120 horas a 37 °C y 5% CO₂.

14.7 Caracterización por RT-PCR

El ARN fue aislado por el método de TRizol-fenol-cloroformo o por fenol ácido, ambos estandarizados en el laboratorio. Se sintetizó el ADNc mediante RT-PCR empleando una enzima reversa transcriptasa MML-V usando Random Primer como cebador a 37°C en un baño seco. Las reacciones de PCR se realizaron en un equipo Labnet Multigene con primers previamente estandarizados y diseñados en el laboratorio para detectar precursores neurales: vimentina, Sox2, nestina, neurogenina-1, β -III-tubulina y Oct4 de acuerdo con las siguientes condiciones de alineamiento:

Tabla I. Panel de primers empleados en la caracterización molecular de los tipos celulares epidermal y neural.

Primers	Tm (°C)	MgCl₂ [mM]	Tamaño (pb)	Control (+)
Vimentina	66.9	0.5	379	Fibroblastos
Sox2	59.7	1.0	126	A549
Nestina	66.9	0.5	456	SH-SY5Y
β -III-tubulina	67.7	3.0	305	SH-SY5Y
Oct4	62	0.5	100	HeLa

15. RESULTADOS

I. Propagación y caracterización de las líneas tumorales neurales.

Para desarrollar medios condicionados como una herramienta experimental se requiere expandir e identificar la naturaleza de las estirpes celulares que se van a emplear. Para tal cometido, se procedió a descongelar y propagar diversas líneas celulares tumorales. Se descongeló la línea SH-SY5Y de la ATCC (CRL-2266), línea de neuroblastoma, pase 7 y se propagó hasta por 20 pases. Notando que a lo largo de los mismos se mantiene su morfología adherente de tipo epitelial (**Figura. 11**)

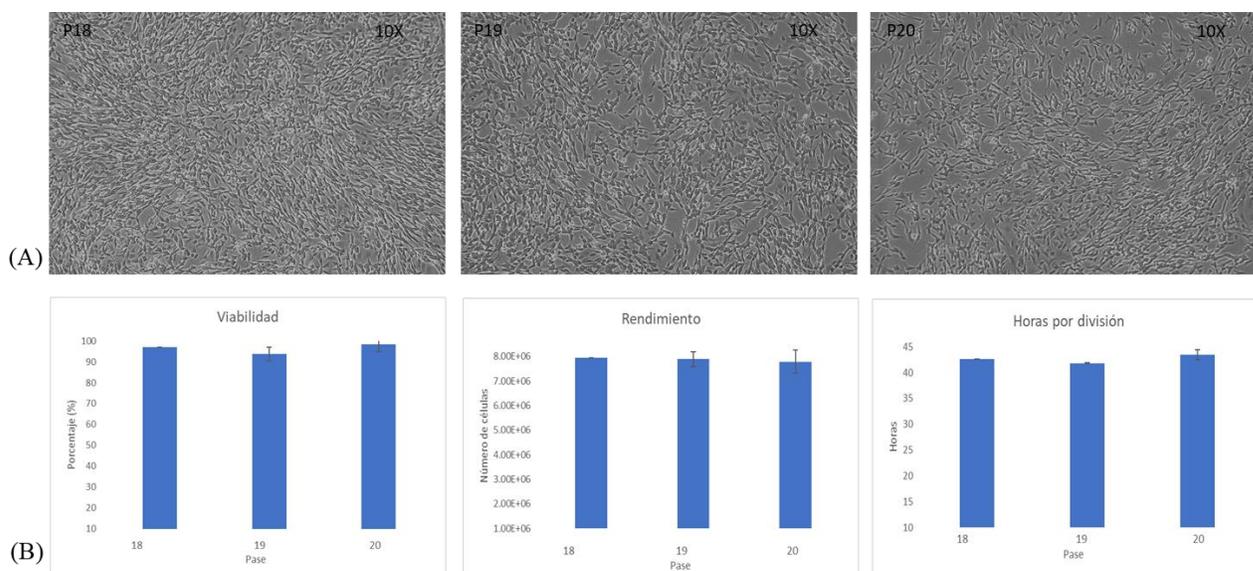


Figura 11. Viabilidad, rendimiento y horas por división de la línea celular SH-SY5Y (ATCC CRL-2266).

En el panel (A) se muestra la morfología del cultivo y en el panel (B) se muestran el promedio de la viabilidad celular, rendimiento y horas por división de SH-SY5Y a lo largo de los pases 18,19 y 20. En cada inicio de cultivo se siembra una densidad celular de 1×10^6 por caja de 100 mm/55 cm² tras descongelar el vial respectivo de la línea a ser propagada. Los subcultivos posteriores se siembran a una densidad celular de 5.0×10^5 por caja de 100 mm. Se realiza subcultivo cada cuatro días cuando se alcanza una confluencia del aproximadamente 90%. Se incuba en una atmósfera humedecida 5% CO₂ a 37 °C. Se muestra el promedio de cada parámetro, n=3.

Tras realizar extracción de ARN total, y la posterior evaluación de calidad, se evaluó el perfil de expresión de la línea SH-SY5Y (**Figura. 12**). Se demuestra que expresa vimentina, Sox2, nestina y β -III-tubulina que son marcadores de neuroblastoma e interesantemente también hay una ligera expresión de Oct4, que es un marcador de pluripotencialidad. Por lo que se demuestra que la línea SH-SY5Y se identifica con una población de neuroblastos.

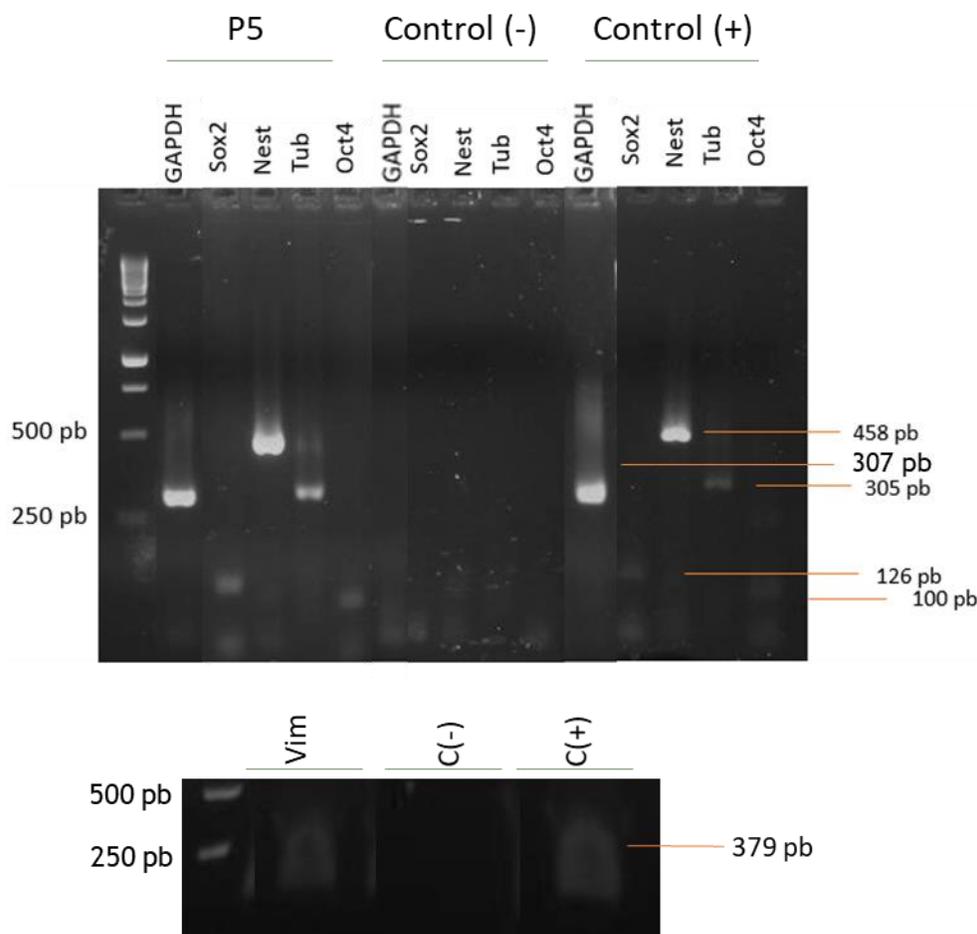


Figura 12. Caracterización de la línea SH-SY5Y. Se evaluó la expresión de vimentina (379 pb), Sox2 (458 pb), nestina (307 pb), β -III-tubulina y Oct4 (100 pb) mediante PCR punto final. se carga controles negativos (agua) y positivos de diversas líneas validadas previamente en el laboratorio. Se emplea un marcador de 100 pb. El gel superior e inferior son de la misma muestra de ARN total. El gel se reveló mediante un transiluminador a 254 nm.

Además de la línea SH-SY5Y, también se descongeló a DAOY (ATCC HTB-186), una línea de meduloblastoma. Se evaluó los mismos parámetros cinéticos de viabilidad, rendimiento y horas por división (**Figura. 13**). Los datos muestran que se obtiene una viabilidad del 95% a

lo largo de los pases, además de rendimiento de 2.5×10^6 células/55 cm². Las horas por división indican un tiempo de doblaje de 40 horas que es el reportado por el laboratorio. Por lo que se concluye un adecuado manejo de la línea tumoral y que se está en condiciones de propagar de forma estable. Así mismo se aisló ARN total de calidad por el método de TRizol-fenol-cloroformo ya estandarizado en el laboratorio

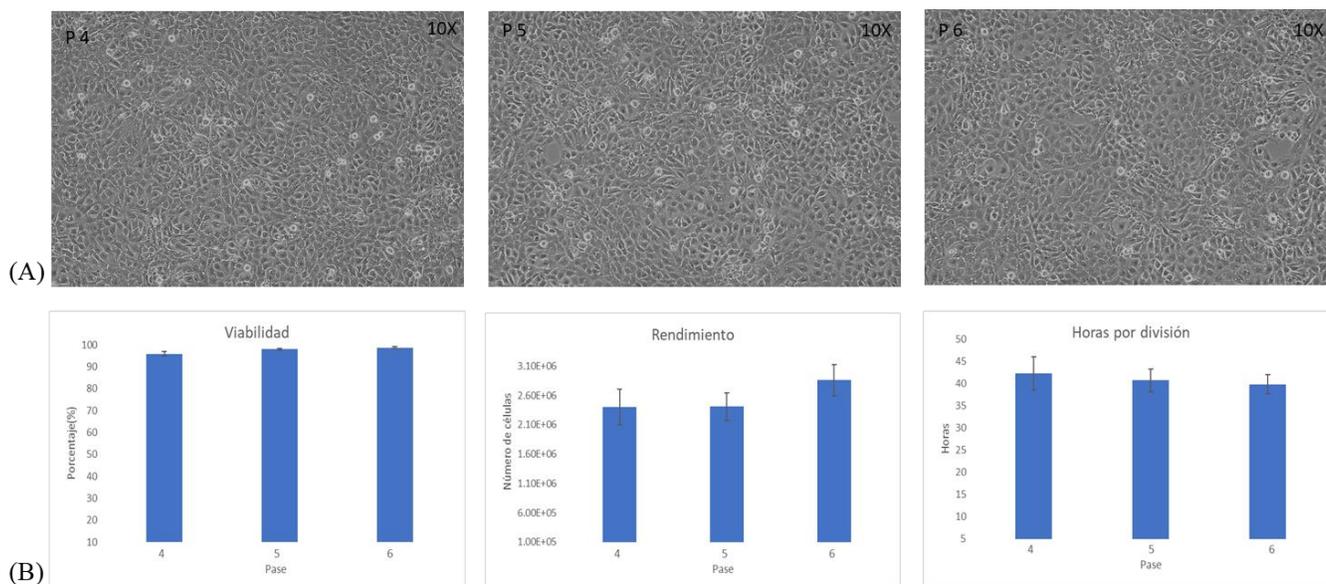


Figura 13. Viabilidad, rendimiento y horas por división de la línea celular DAOY (ATCC HTB-186). En el panel (A) se muestra la morfología del cultivo y en el panel (B) se muestran el promedio de la viabilidad celular, rendimiento y horas por división de HTB-186 a lo largo de los pases 18-19 y 20. En cada inicio de cultivo se siembra una densidad celular de 1×10^6 por caja de 100 mm tras descongelar el vial respectivo de la línea a ser propagada. Los subcultivos posteriores se siembran a una densidad celular de 5.0×10^5 por caja de 100 mm. Se realiza subcultivo cada cuatro días cuando se alcanza una confluencia de aproximadamente 90%. Se incuba en una atmósfera humedecida 5% CO₂ a 37 °C. Cada subcultivo se realiza por triplicado.

La caracterización demuestra la amplificación de dos bandas a 400 pb y debajo de 150 pb que corresponden a la ubicación del desplazamiento de las bandas de los controles de vimentina y Sox2. Por lo tanto, esta línea confirma que presenta el patrón de expresión de origen neural, pues expresa un marcador de linaje (vimentina) y Sox2, un marcador de pluripotencialidad respecto a los controles (**Figura. 14**).

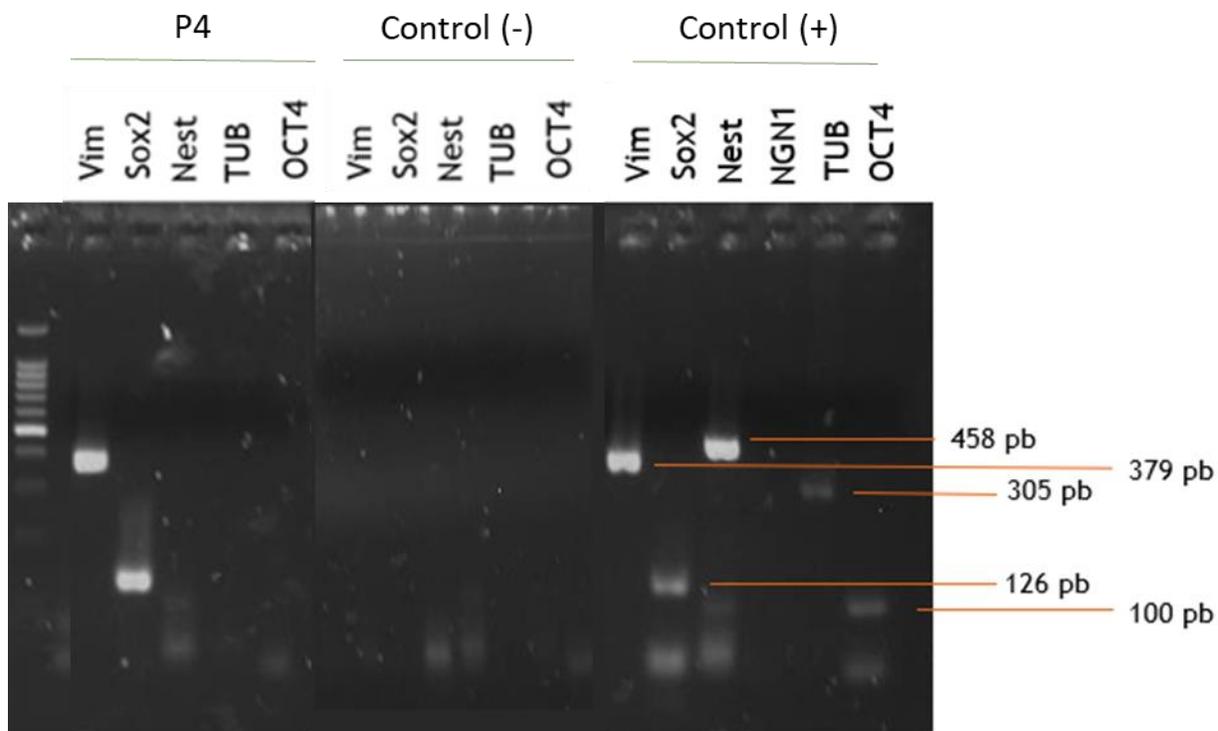


Figura 14. Caracterización de la línea celular DAOY. Se evaluó la expresión de vimentina (379 pb), Sox2 (458 pb), nestina (307 pb), β -III-tubulina y Oct4 mediante PCR punto final. se carga controles negativos y positivos de diversas líneas validadas previamente en el laboratorio. Se emplea un marcador de 100 pb. El gel de agarosa al 2.0% se corrió a 180 V por 1 hora. Se reveló mediante un transiluminador a 254 nm.

II. Expansión y caracterización fenotípica de las células epidermales.

Se descongelaron células epidermales de la línea HEK_n (ATCC PCS-200-010) del pase 4. En el panel superior se muestra su morfología por varios pases y se muestran viabilidades del 90%, rendimiento desde $2.5-3.0 \times 10^6$ células/55 cm². Las horas por división muestran valores de 32 horas (**Figura. 15**). Por lo tanto, la propagación de la población que será intervenida de forma experimental se mantiene estable por varios pases y bajo adecuado manejo que permite su empleo en los futuros experimentos.

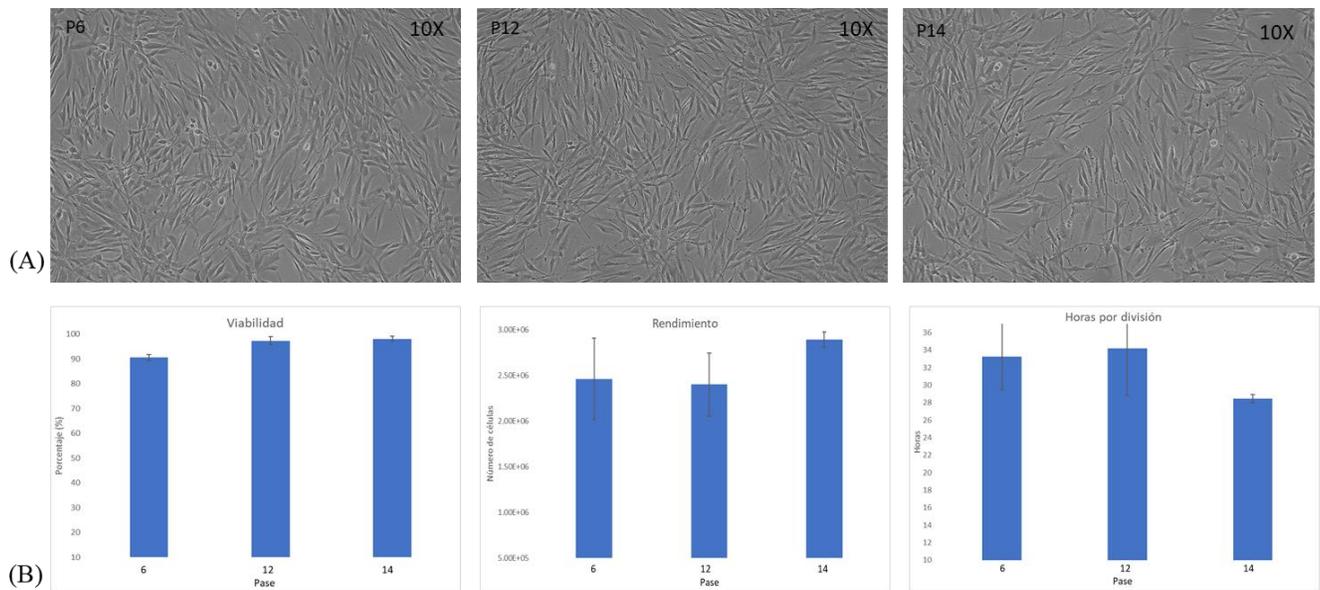


Figura 15. Viabilidad, rendimiento y horas por división de la línea celular HEK293 (ATCC PCS-200-010). En el panel (A) se muestra el registro fotográfico de la morfología de los pases 6, 12 y 14. Para iniciar el subcultivo se descongela un criovial y se siembra a una densidad de 1×10^6 células/55 cm². Para los posteriores subcultivos se siembra a medio millón de células por área de 55 cm². Se subcultiva cada cuatro días y se determina el rendimiento y viabilidad por exclusión de tinción de azul de tripano. En el panel (B) se muestra la viabilidad, el rendimiento y horas por división.

Para caracterizar la línea HEK293 se evalúan marcadores de precursores celulares, así como GAPDH para confirmar que es posible usar la muestra para PCR punto final (**Figura. 16**). Se muestra amplificación de la banda correspondiente a la altura de vimentina (379 pb) y la asociada a la altura de GAPDH (307 pb) por lo que se confirma su empleo como ADNc para ser evaluado. Además, la ausencia de marcadores como nestina y β -III-tubulina descarta su identidad como célula que expresen marcadores del linaje neural.

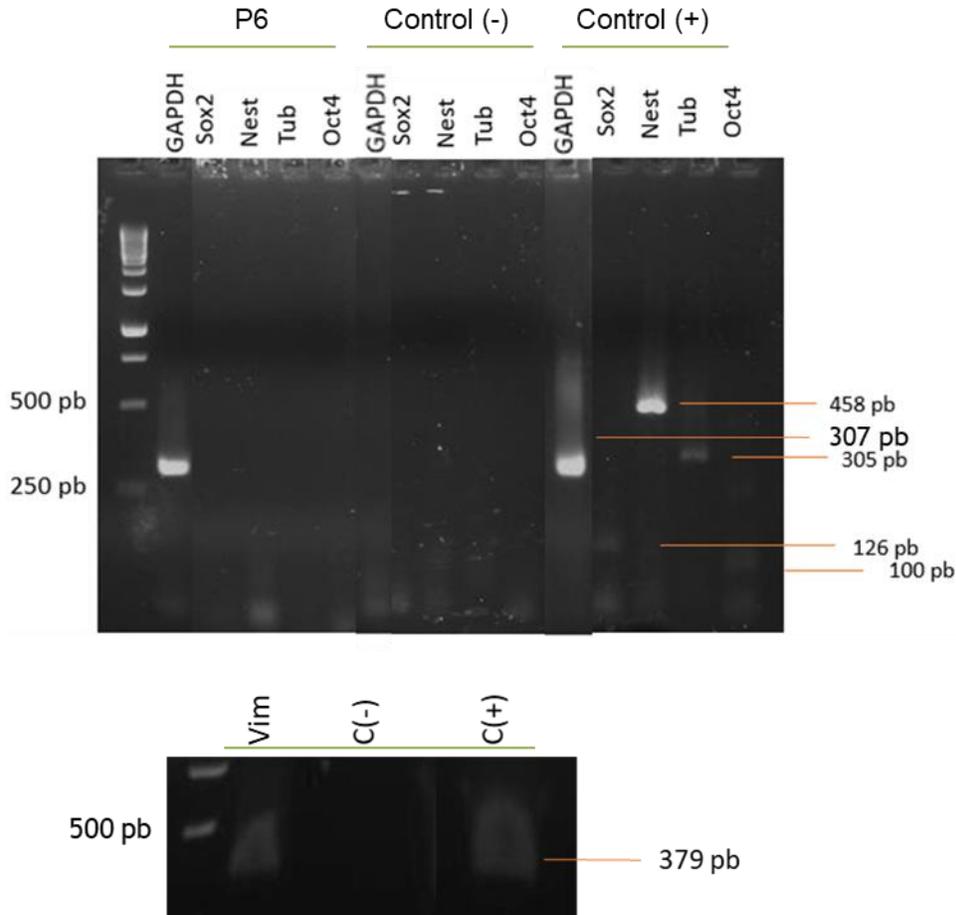


Figura 16. Caracterización de la línea HEK293T. Se evaluó la expresión de GAPDH (307 pb), vimentina (379 pb), Sox2 (458 pb), nestina (307 pb), β -III-tubulina y Oct4 mediante PCR punto final. Se cargan controles negativos y positivos de diversas líneas validadas previamente en el laboratorio. Se emplea un marcador de 100 pb. El gel de agarosa al 2.0% se corrió a 180 V por 1 hora. Se reveló mediante un transiluminador a 254 nm.

III. Generación de medios condicionados de líneas tumorales humanas.

Se generó medio condicionado de la línea SH-SY5Y tras 52 horas en incubación para enriquecer el medio de factores solubles secretados por los neuroblastos. Se registró por tres días para evaluar los posibles efectos que tuviera el medio definido en las células (**Figura. 17**) Si bien se muestra que respecto al tiempo cero hay una menor densidad celular que en los tiempos 24 h y 52 h, no se muestra un cambio en la morfología celular o en el medio que sugiera daño de las células. No se observa detritus celulares y células muertas de forma significativa en ambas condiciones. Por lo tanto, el medio definido pre-enriquecido, no altera el mantenimiento de las células de neuroblastoma. Tras 52 horas de incubación se detuvo la incubación y se generaron alícuotas. Se emplearon células del pase 14 para generar el medio condicionado.

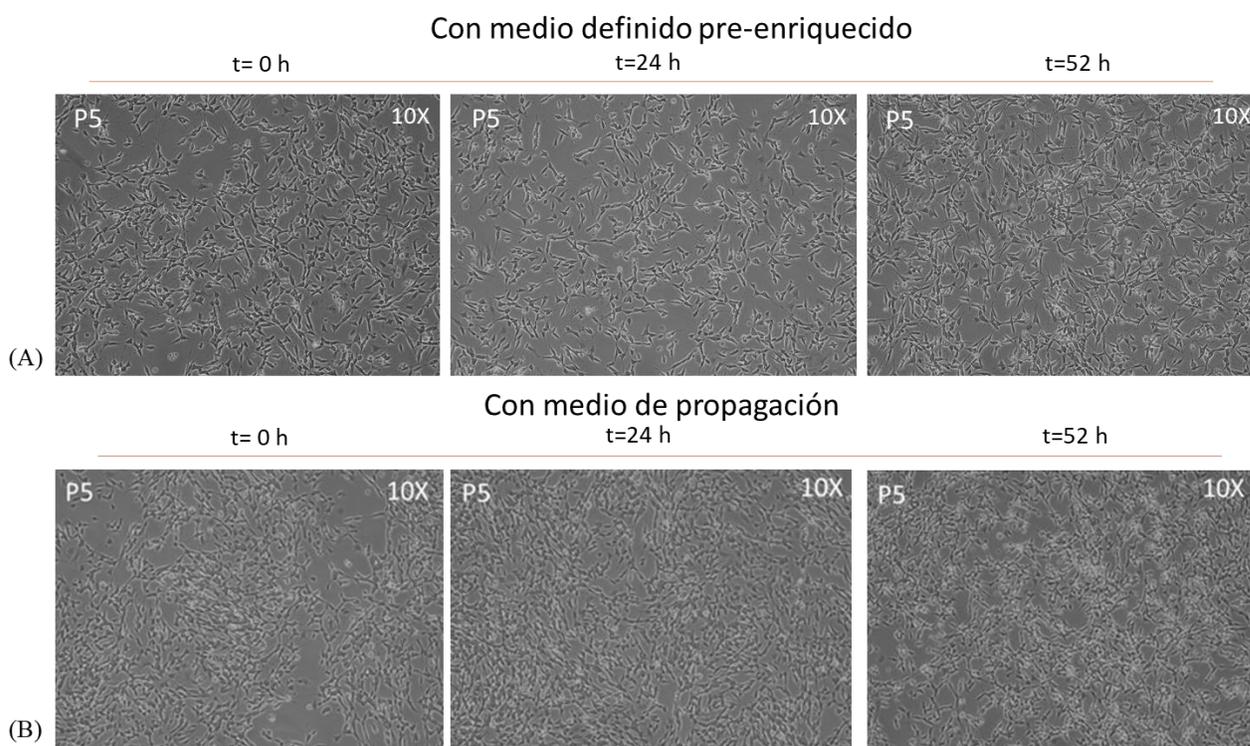


Figura 17. Obtención del medio condicionado de la línea celular SH-SY5Y. Tras expandir el cultivo a una confluencia del 85% se reemplazó el medio de propagación por medio definido sin factores ni FBS. Y se registró su desarrollo a lo largo de 52 horas de incubación evaluando que las células no mostraran signos de daño celular. El panel (A) muestra las células con el medio definido y en el panel (B), en su respectivo medio de propagación. Tras el periodo de incubación, se cosecho el medio y se filtró por membrana de 0.22 μm y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En la caracterización de la línea SH-SY5Y generadora de medio condicionado (SH-SY5Y-G.M.) se indica que son positivos para β -III-tubulina y Sox2 pues amplificó a la altura de 300 y 100 pb que coinciden relativamente a la altura de los marcadores empleados, 305 y 126 pb, respectivamente (**Figura. 18**). Por lo tanto, la condición SH-SY5Y-G.M mantiene la identidad de neuroblasto de SH-SY5Y.

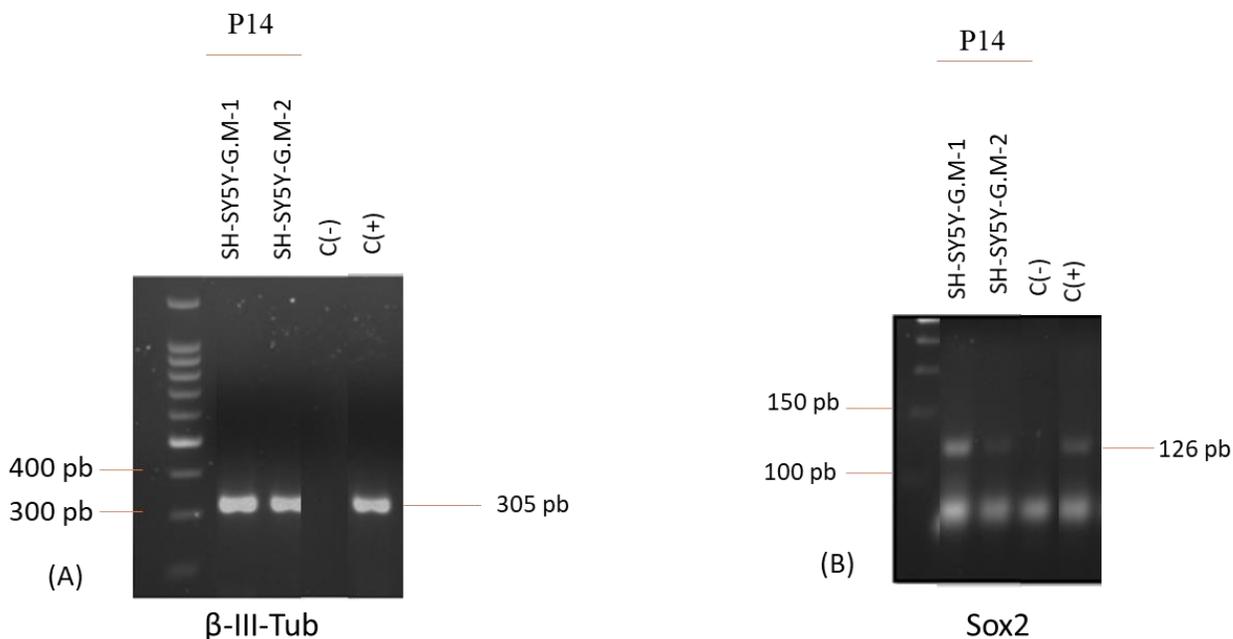


Figura 18. Caracterización de SH-SY5Y, generador de medio condicionado. Se evaluó la expresión de los marcadores β -III-tubulina, 305 pb, (A) y Sox2, 126 pb, (B) en las células control SH-SY5Y-G.M. del pase 14. Se carga un control positivo interno para el correspondiente marcador y un control negativo de agua para descartar contaminación de los reactivos con material genético. Se corrió en gel agarosa 2.0% a 180 V por 1 hora. Se reveló en transiluminador a 254 nm.

Además del medio condicionado de SH-SY5Y, también se generó medio condicionado de meduloblastoma, DAOY, pase 6, bajo condiciones establecidas a las 0, 48 y 72 horas de enriquecimiento del medio definido (**Figura. 19**).

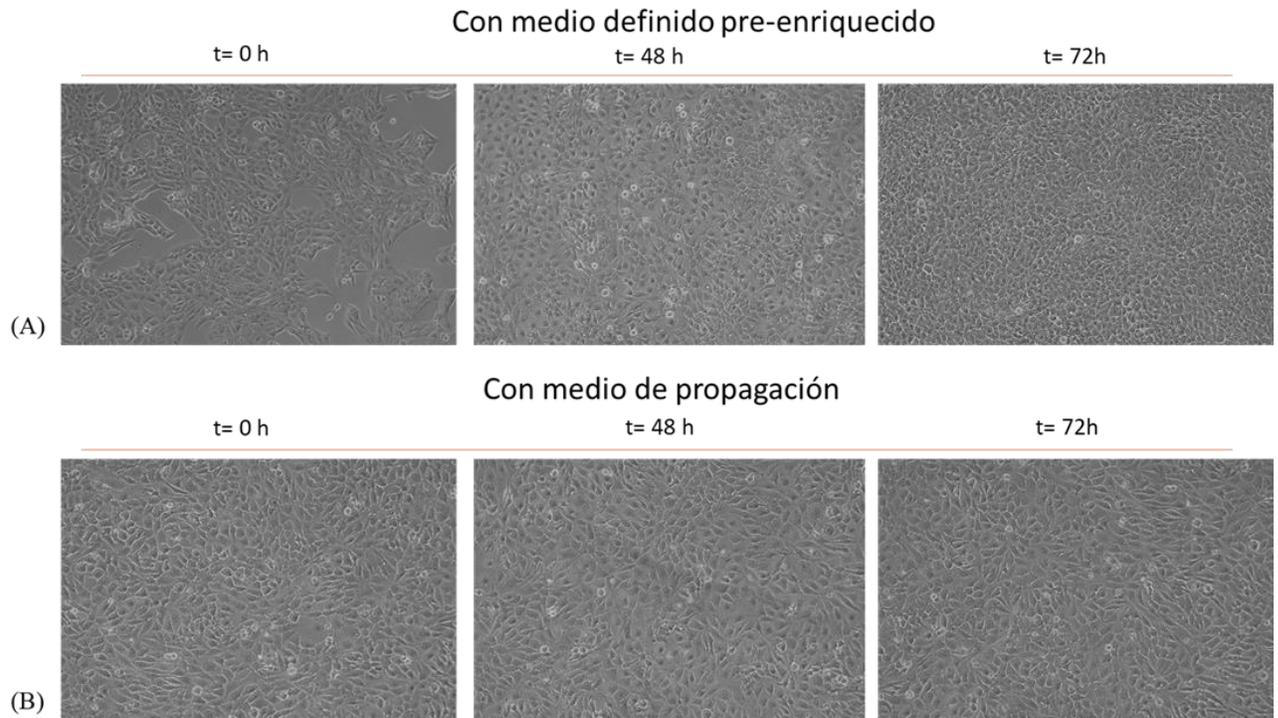


Figura 19. Obtención del medio condicionado de la línea tumoral DAOY. El cultivo se mantuvo en condiciones de propagación hasta alcanzar el 85% de confluencia (A) y se procedió a reemplazar su medio por un medio definido sin factores ni FBS (B). Tras 72 horas de incubación se detuvo la incubación y se filtró por membrana de poro 0.22 μm . Se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se observa que la morfología es típicamente de DAOY en ambas condiciones. Se aprecia que la densidad celular se mantiene hasta las 72 horas. Se concluye que la incubación en el medio definido no afecta al cultivo celular de meduloblastoma.

IV. Evaluación de la capacidad de inducción neural de los medios condicionados sobre células epidermales.

Se generaron agregados epidermales en condición no adherente. Se muestra que a partir de 24 horas se presenta formación de estructuras tridimensionales y que va en aumento hasta las 48 horas (**Figura.20A**), posteriormente los agregados tienden a conglomerarse entre sí (**Figura. 20B**). Se observan estructuras sin daño celular o detrito en el medio. La superficie de estas se halla lisa y con una apariencia íntegra lo que muestra su adecuada viabilidad.

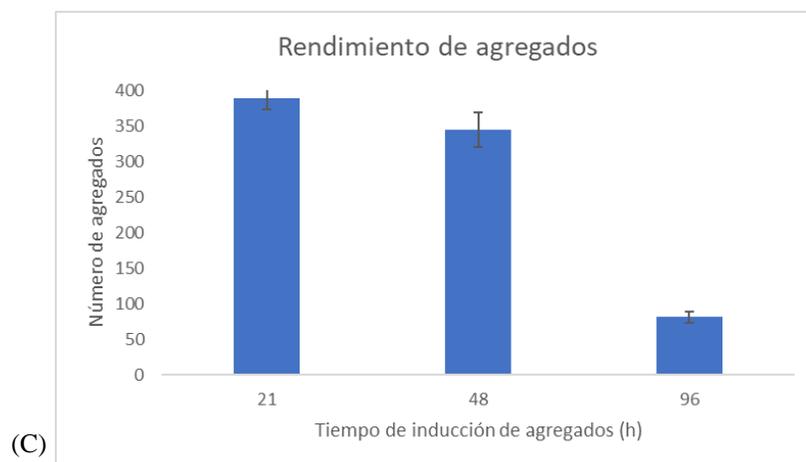
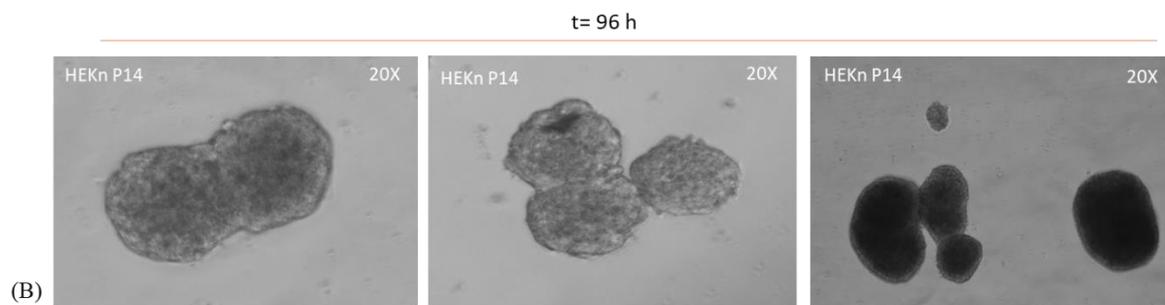
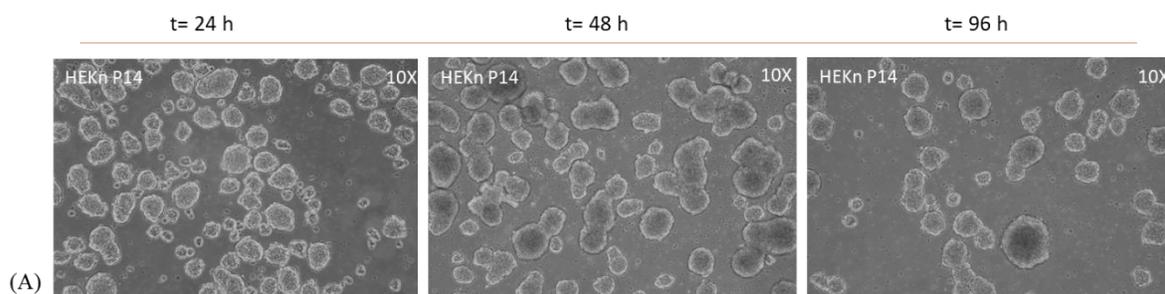
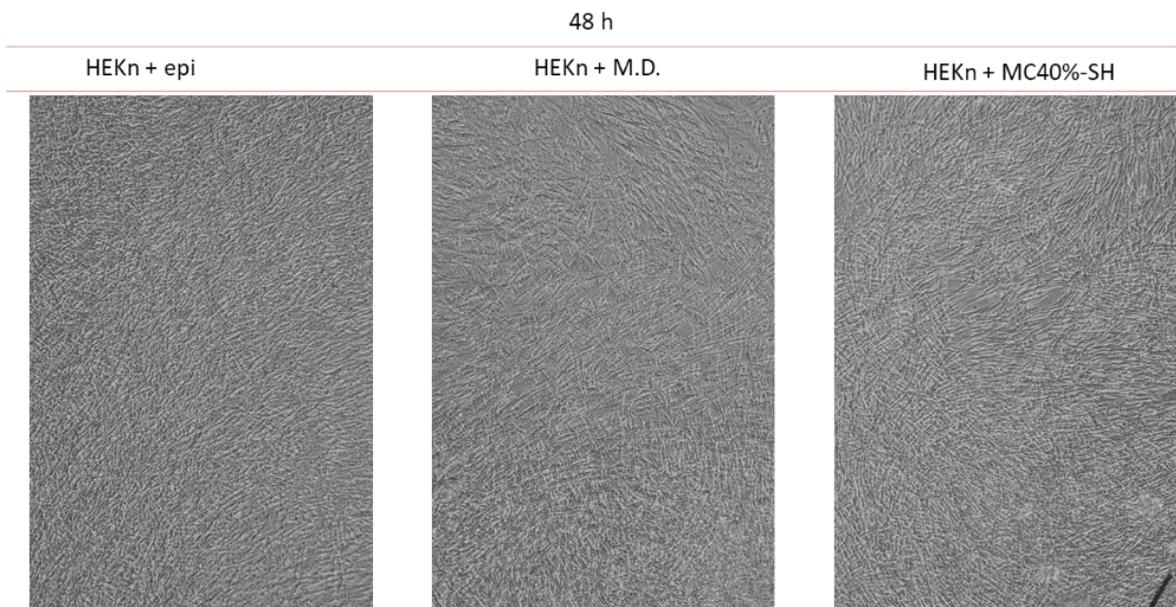


Figura 20. Generación de agregados epidermales en condiciones no adherentes. Se sembraron 2×10^6 células epidermales / 21 cm^2 . Se incubaron por 96 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y $5\% \text{ CO}_2$ sobre placas recubiertas de poli-hema (A). A los cuatro días de inducción, los agregados tienden a conglomerarse en unidades de mayor densidad celular (B). Se contó el número de agregados que se generaron durante el tiempo de agregación (C). El conteo se realizó por triplicado.

En la **Figura. 20C**, se grafica el número de agregados. Es importante resaltar que al cuarto día de inducción de agregación, los agregados se conglomeran, generando estructuras supracelulares. Esto genera un efecto que disminuye el número de agregados discretos. Sin embargo, esto no afecta la morfología de los agregados.

La condición adherente en las células epidermales, pase 14, con medio de propagación sigue el comportamiento morfológico típico epitelial y que la presencia de medio condicionado de origen de neuroblastoma, SH-SY5Y (**Figura. 21**) o de meduloblastoma, DAOY (**Figura 22**) en condición adherente no induce la formación de neuroesferas o agregados celulares, pues a las 48 y 72 horas de incubación no se observan estructuras 3D.



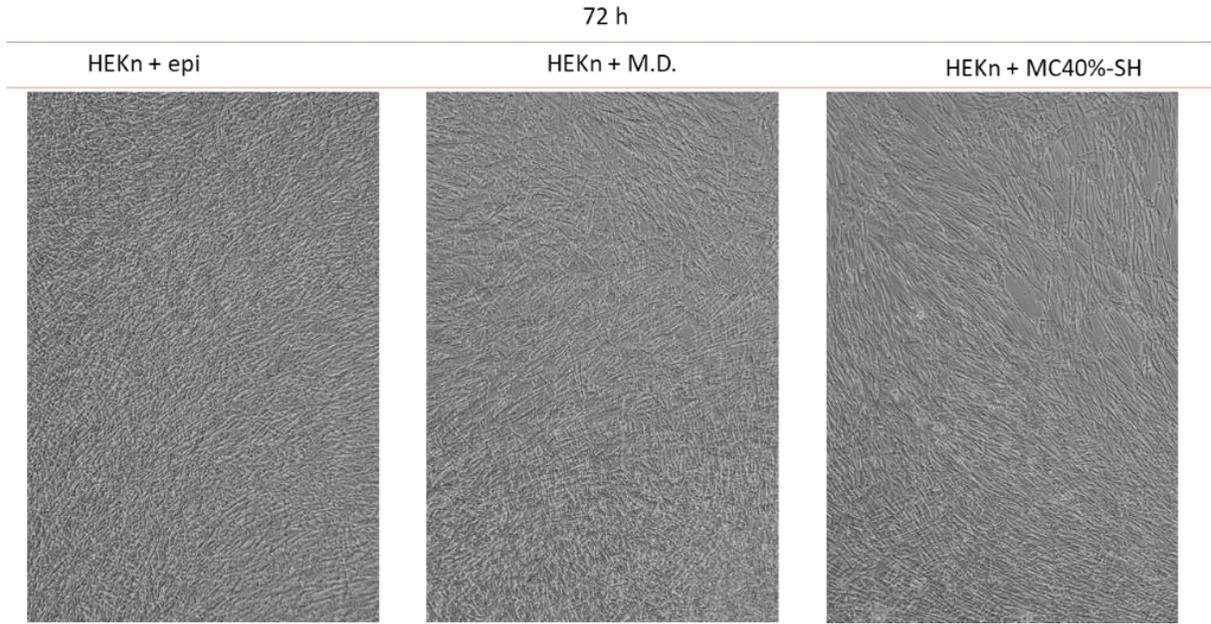


Figura 21. Evaluación del efecto del medio condicionado de SH-SY5Y en condición adherente. Las células HEKn, pase 14, se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/ 1.9 cm^2 en placa multipozo de 24. Se incubaron por tres días y se registró si había formación de neuroesferas o inducción de agregados.





Figura 22. Evaluación del efecto del medio condicionado de DAOY en condición adherente. Se sembraron 2×10^5 células/ 1.9 cm^2 en placa multipozo de 24, pase 14. En la parte superior de las imágenes se indica la condición empleada. Se registra si hay formación de agregados tridimensionales a las 48 y 72 horas.

Se aisló ARN total de calidad para identificar el perfil de expresión de HEKn en condición adherente como control. Se evaluó un panel de marcadores y se demuestra que HEKn sin inducir agregación y bajo condición adherente en medio condicionado expresa vimentina, Sox2 y nestina (**Figura. 23**).

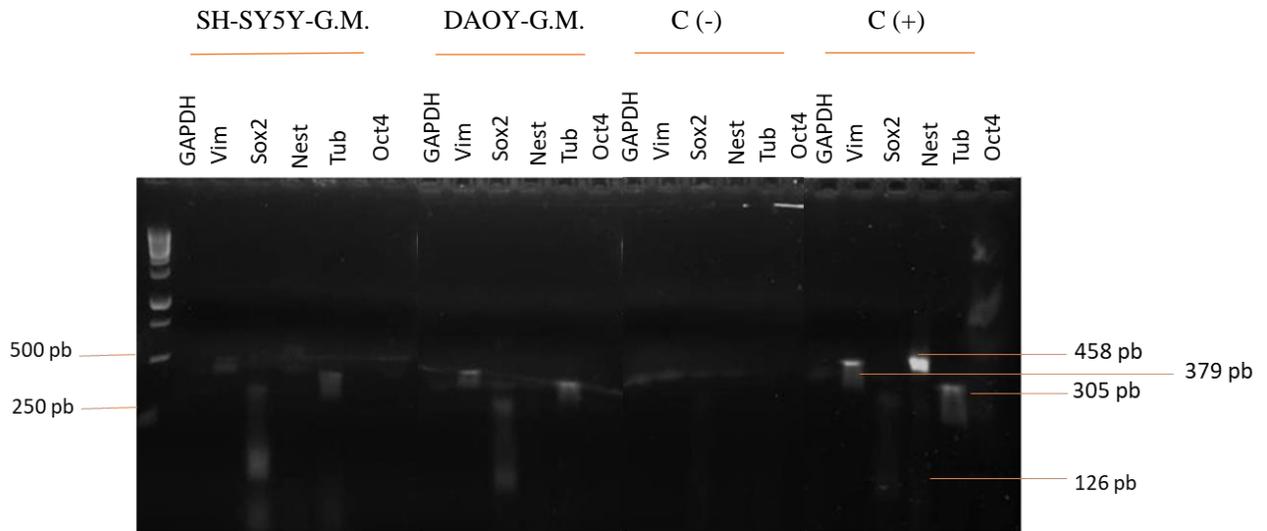


Figura 23. Caracterización de las células HEK_n en condiciones adherentes

en medio condicionado de SH-SY5Y y DAOY. Se realizó PCR punto final del panel de marcadores en las células epidermales, pase 14, en condición adherente, expuestas al medio condicionado de SH-SY5Y y DAOY tras 72 horas de incubación. Se evalúa la expresión de vimentina, (Vim, 379 pb); Sox2 (126 pb), Nest (Nestina, 458 pb); tubulina (TUB, 305 pb) y Oct4 (100 pb). Se cargó en gel agarosa al 2% y se corrió a 180 V por 1 hora. Se revela en transiluminador a 254 nm.

Tras evaluar el perfil de expresión de las líneas celulares generadoras de medio condicionado en condiciones definidas y la caracterización de HEK_n, pase 14, en adherencia en presencia de medio condicionado de origen neuroglial sin inducción del estado de agregación se está en condiciones para evaluar el efecto del medio condicionado en agregados epidermales comprometidos.

Se muestra el seguimiento fotográfico de los experimentos de inducción neural con el medio condicionado de SH-SY5Y (**Figura. 24**) y de DAOY (**Figura. 25**). En el medio epidermal, las células mantienen su morfología y no se observa generación de neuroesferas. La morfología de las neuroesferas obtenidas en condición adherente, se observa como esferoides bien definidos en suspensión, densos y sin periferia iridiscente. Es de resaltar que las estructuras esferoides se mantuvieron en una condición estable por intervalo de 96 – 120 horas (MC de SH-SY5Y).

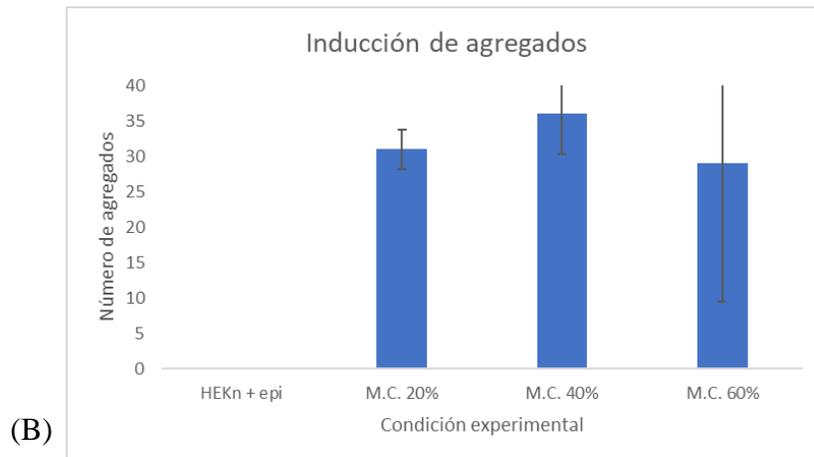
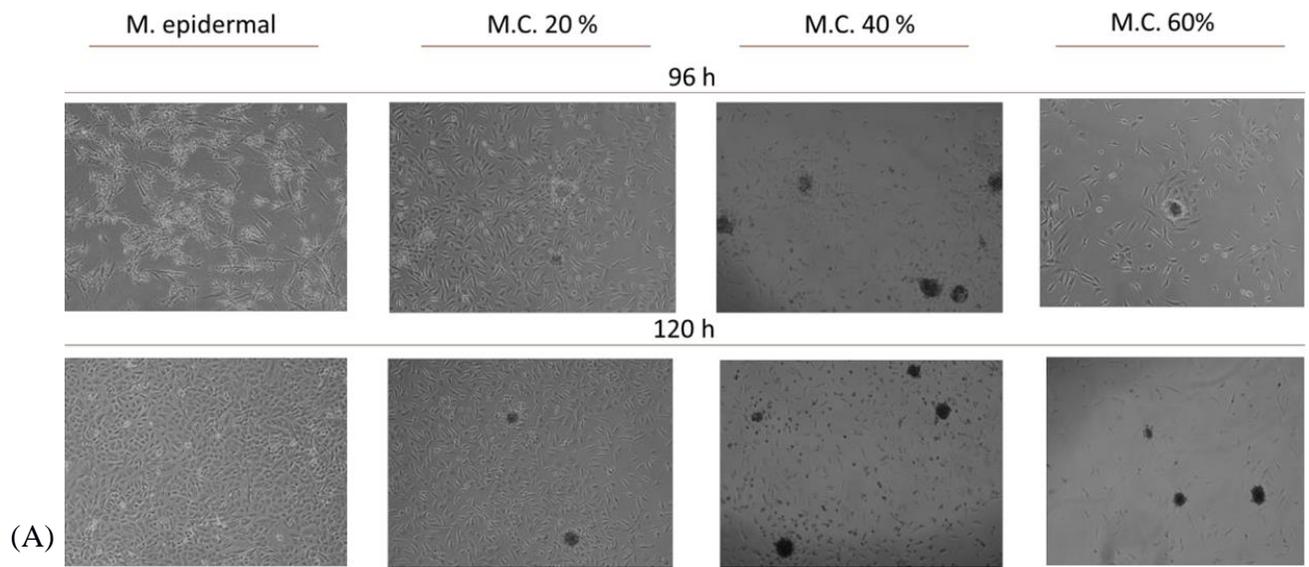


Figura 24. Inducción de neuroesferas sobre células epidermales mediante medios condicionados de origen tumoral de SH-SY5Y. Tras el periodo de formación de agregados, se disgregaron y sembraron 2.0×10^5 células/pozo por cada condición. La primera columna corresponde a células HEKn en medio epidermal de propagación. Desde la segunda hasta la cuarta columna corresponden a las condiciones experimentales 20, 40 y 60 % de medio condicionado. Se muestran duplicados de cada condición.

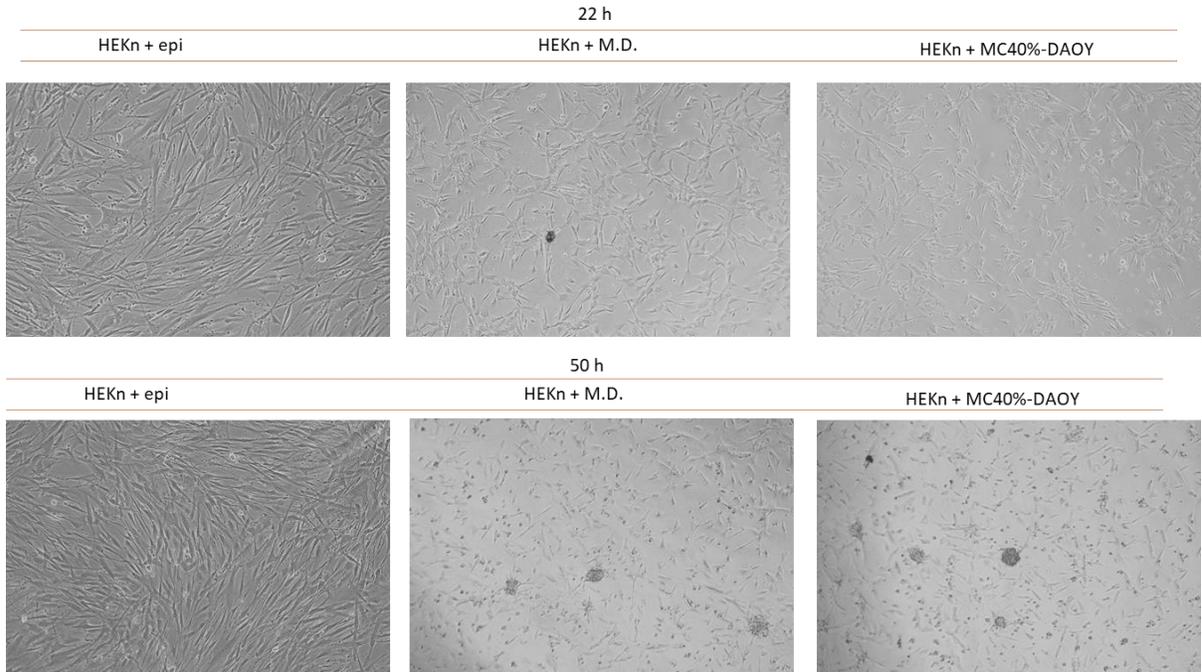


Figura 25. Inducción de neuroesferas sobre células epidermales mediante medio condicionado de DAOY. Se siembra a una densidad de 2×10^5 células/1.9cm². Se sigue el registro fotográfico del cultivo por 50 horas.

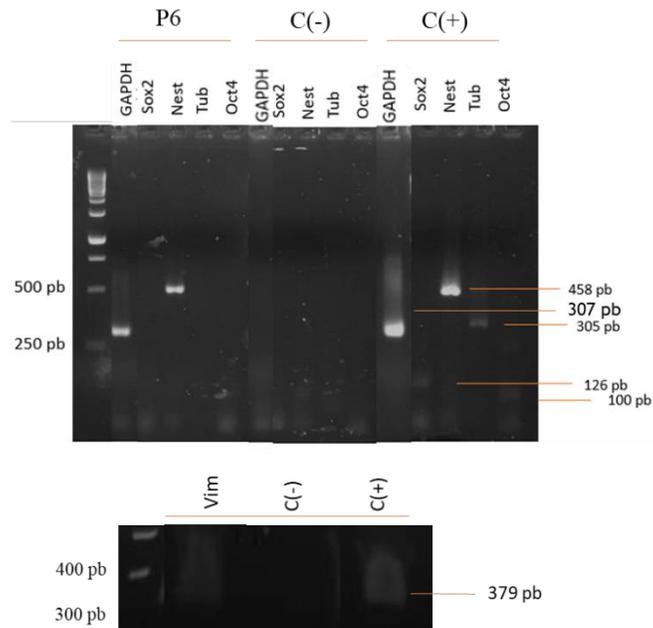


Figura 26. Caracterización de la entidad celular en la condición MC40%-DAOY. Se evalúa la expresión de GAPDH, Sox2, nestina, β -III-tubulina y Oct4 en disgregados celulares derivados de HEKn, pase 6.

Se aisló ARN total del experimento de inducción neural. Se encuentra que las entidades epidermales que, si bien antes no expresaban nestina en su propio medio de propagación, se detecta la ganancia en la expresión del marcador tras un periodo de incubación de 50 horas en medio condicionado de meduloblastoma (**Figura. 26**).

16. Discusión.

Desde el trabajo seminal del 2006 de Yamanaka, se ha destacado la importancia de las fuentes celulares como base de las terapias de reemplazo celular autólogo^{233,251,252}. Esta investigación evalúa la capacidad de los medios condicionados de origen neuroglial en diferenciar células epidermales hacia CPNs con capacidad de proliferación, como consecuencia de un evento de plasticidad. Nuestros hallazgos demuestran que los medios condicionados derivados de meduloblastoma y neuroblastoma son capaces de favorecer eventos plásticos de la línea epidermal, HEKn, a estructuras tridimensionales tipo neuroesferas y dirigir las a adquirir el compromiso hacia linaje neural de una forma semejante a las neuroesferas derivadas de tejido cortical murino²⁵³. Es interesante que neuroesferas derivadas de cultivos primarios de glioblastoma humano CD133(+) presentaron una morfología íntegra, robusta y poco espaciada entre los constituyentes celulares y que además mostraron un perfil de expresión de GFAP(+), nestina (+), nanog (+) y Sox2(+) a las 72 h de cultivo en presencia de bFGF y EFG²⁵⁴, resultados que se asemejan a los nuestros en cuanto a la ganancia en la expresión de nestina y la generación de neuroesferas con una apariencia robusta y poco espaciada de las células que la conforman a las 50 h de inducción con MC-DAOY/SH-SY5Y. Es importante subrayar que las neuroesferas previamente descritas derivadas de glioblastoma, fuesen CD133(+), mientras que las CD133(-) no generaban neuroesferas. Se ha descrito que las CTEpi repobladoras del pool celular del nicho troncal epidermal son CD133(+)²⁵⁵. Esta curiosa habilidad que tienen los precursores epidermales en formar agregados celulares y las células tumorales del SNC en formar neuroesferas sugiere que el evento de agregación podría recaer en la expresión de CD133 o que las células formadoras de esferoides celulares que se caracterizan en expresar CD133, también denominada Prominina-1, podrían regular una actividad favorecedora de dicha agregación. En este último sentido hay evidencia que proponen su participación en formar estructuras localizadas en la membrana involucradas en migración, por otra parte, se ha demostrado que es una molécula que auxilia en la activación

de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina²⁵⁶. Interesantemente, además presenta una isoforma soluble secretada que forma parte del secretoma de las células de neuroblastoma²²⁸. Lo que podría influir en los efectos observados en nuestros resultados.

La caracterización inicial de la línea HEKn, confirmó la ausencia de nestina y β -III-tubulina, marcadores de linaje neural que concuerdan con la caracterización de cultivos primarios epidermales. La presencia de vimentina se ha reportado como una característica de células que transitan de un estado epitelial diferenciado hacia un estado desdiferenciado asociado con la capacidad de expansión *in vitro*²⁵⁷, lo que concuerda con las células HEKn en proliferación que presentan una remarcada expresión de vimentina. CD133 se ha identificado como un marcador de CT tumoral y CT normal²⁵⁸, y la inducción de cultivos 3D se describe como la mejor manera de modelar células con capacidad de proliferación respecto a retener la información espacial que se pierde en los cultivos 2D²⁵⁹. La diferenciación de los precursores epidermales que son llevados a un estado lábil de agregación en un sistema de co-cultivo con astrocitos, refleja las interacciones célula-célula que caracterizan al nicho troncal. Esta condición de co-cultivo permite la generación de células neurales nestina (+)²⁶⁰. Los reportes han demostrado el papel de los astrocitos como células directoras en la instrucción y diferenciación²⁶¹ y el de las CTEs como inductoras al linaje neural sobre los queratinocitos²⁶². Esto indica que las neuroesferas derivadas de precursores epidermales (HEKn), son sistemas de cultivo con capacidad de expansión y la habilidad de agregarse.

Toma *et al*, resaltan el atributo que tienen las células epidermales para agregarse y formar cuerpos esféricos como evidencia de la existencia de una subpoblación de células troncales dérmicas con potencial multilinaje al detectar células nestina (+) y β -III-tubulina (+) en cultivos primarios bajo condiciones no adherentes²⁶³. Es interesante que nuestros resultados del efecto de los MCs de SH-SY5Y y DAOY en la línea HEKn bajo condición adherente resalten que, es posible observar agregados celulares similares a neuroesferas, además de detectar alteración en su perfil molecular, hallándose la expresión de vimentina, nestina y Sox-2, reconocidos marcadores de origen neural. La expresión de nestina, vimentina y Sox-2 se han detectado en CPNs derivadas a partir de células troncales multipotentes que han sido inducidas a formar cuerpos embrioides con un perfil de marcadores pan-neurales Sox1, Sox2 y nestina²⁶⁴. Lo que indica la magnitud de la penetrancia del efecto tanto del MC de SH-SY5Y

como de DAOY en el fenotipo molecular de HEKn. La detección de Sox-2, como marcador de célula troncal multipotente, es coincidente con resultados de ser identificado en CTNs proliferantes derivadas de CTEs, mientras que la detección de nestina en HEKn bajo el efecto de los MCs, concuerda con su expresión en células progenitoras neurales, mesenquimales y en precursores de la glía radial²⁶⁵. Es importante destacar que el fenotipo de los eventos moleculares asociados al fenómeno de agregación contrasta claramente con la ganancia de nestina antes y después del estímulo mediante MC-DAOY.

Se ha demostrado que la nestina funge un papel importante tanto en la autorrenovación y sobrevivencia de las CTNs^{266,267}. Los experimentos *in vivo*, muestran que los ratones “*knock out*” de nestina^{-/-}, presentan un neuroepitelio con una alta tasa de apoptosis y los cultivos de las CTNs derivadas de tejido embrionario, muestran una proliferación lenta, de acuerdo con el marcaje con BrdU y un marcaje positivo a la Casp3- α , un marcador de apoptosis, con una relación del 6.4% vs embriones-CTN nestina^{+/+} (1% \ll). Sin embargo, cuando se abolió la expresión de vimentina, que es necesaria para la polimerización de nestina, no se detectó ninguna señal de apoptosis²⁶⁸. En un modelo embrionario murino de ganancia de función, se sobre expresó nestina bajo el control del promotor de ROSA26. Esto condujo al incremento en la proliferación celular, señalado por el incremento en la detección de Ki67 (80% células Ki67 (+) /células totales -embrión nestina^{-/-} vs 40% células totales Ki67(+) / células totales -embrión silvestre), el aumento en el volumen del embrión y la activación de PI3K. Sin embargo, no se detectó señal de algún evento apoptótico²⁶⁹. Estos resultados en conjunto indican que nestina está activamente participando en la sobrevivencia y en la proliferación celular asociada a la autorrenovación. Es interesante que las CTNs derivadas de embriones nestina^{-/-}, arriba descritos, tengan abolida su capacidad de renovación, el cuál es un evento distintivo de las células capaces de generar neuroesferas. Por lo que podríamos proponer que nestina también pudiera estar participando en la generación de las estructuras obtenidas en nuestro laboratorio, lo que se traduce en especial relevancia para nuestro trabajo, al aportar evidencia de que se está generando una población neural con capacidad de expansión.

Una cuestión interesante es porqué los agregados estimulados con MC-DAOY/SH-SY5Y mostraron únicamente de expresión de nestina y vimentina, mientras que las células en condición adherente también con medio condicionado de DAOY, mostraron la adición de la expresión de Sox-2 y β -III-tubulina al perfil molecular previo. Una primera hipótesis sugiere que al llevar a HEK_n hacia un estado de agregación, las hace transitar hacia un estado más indiferenciado que no adquiere la ganancia de Sox-2. Esto se podría probar si las neuroesferas detectadas coexpresan Ki-67 y un marcador de un estado menos diferenciado como Musashi-1/2.

Una segunda hipótesis sugiere que se requiere de más tiempo de incubación para impulsar a las neuroesferas a ganar la expresión de Sox2. Pues se mostró que las neuroesferas generadas sí expresan nestina. Respecto a esta idea, al no detectarse Sox2, podría ser que la expresión de nestina es suficiente para encaminar las células hacia un estado menos diferenciado y que la ganancia de la expresión de Sox2, toma lugar cuando la población es comprometida al destino neural. Esta sugerencia es favorecida por la ligera detección de β -III-tubulina, como un evento que, si bien no es totalmente plástico, sí se está favoreciendo la toma de decisión hacia otro linaje de la misma capa germinativa que podría ser el neural.

Una tercera hipótesis interesante, está relacionada con la condición adherente *per se*. Es curioso que, ante los mismos estímulos detonados por los MCs de neuroblastoma y meduloblastoma, la adherencia de HEK_n al sustrato sin llegar a condiciones de confluencia, esté participando activamente en la ganancia de la expresión de marcadores, lo que reflejaría la importancia de las condiciones de cultivo iniciales. En la descripción de los componentes del nicho troncal, se resaltó que una de las señales que impulsan la adquisición de marcadores específicos de linaje, es el estado físico del sustrato, donde un sustrato viscoso, semejante al tejido cerebral, inducía a las CTMs a expresar β -III-tubulina, mientras que, si se cultivan en un sustrato rígido, que mimetiza al hueso, se gana la expresión de hasta cuatro veces mayor de osteocalcinina, COL3A1 y CBF α -1⁸². En adición a lo anterior, se ha descrito que cuando las CTs de glioblastoma se expanden en un cultivo en suspensión, se identifican como células CD133(+), Sox2(+), mientras que en la condición adherente no se hallaron oligoesferas ni células Sox2(+)²⁷⁰. Por lo tanto, no se escapa la idea que las interacciones con el sustrato y las

interacciones célula-célula estén participando en la inducción de Sox2 y β -III-tubulina, lo que las impulsaría finalmente a ser una población neural con la propiedad de expandirse.

Recapitulando, los MCs, poseen componentes o capacidades de producción de moléculas que estarían impulsando una población a desdiferenciarse o bien, a transdeterminarse a una segunda población con capacidad de expansión que comparte marcadores con el linaje neural.

17. Conclusiones

1. Las células HEK_n tienen la susceptibilidad de ser llevadas a un estado de agregación en donde incrementan la expresión de marcadores neurales.
2. Los medios condicionados de SH-SY5Y y DAOY alteran la expresión de HEK_n en condición adherente, incrementando la expresión de marcadores de CTN.
3. El medio condicionado de origen neuroglial es capaz de inducir la formación de agregados semejantes a neuroesferas e inducir la expresión de marcadores de CTNs.
4. El medio condicionado de origen neuroglial induce la expresión de nestina como un marcador de autorrenovación en los agregados tridimensionales.

18. Perspectivas

- 1.** La caracterización molecular de la naturaleza química de los agentes solubles permanece como una tarea importante para comprender el papel de las moléculas señalizadoras que participan en los fenómenos de transdeterminación y desdiferenciación.
- 2.** Dilucidar el curso que siguen las entidades epidermales en su camino al linaje neural, enfocándose en el papel de los medios condicionados como actores en la inducción y pérdida y/o ganancia de marcadores clave de cada estado celular.
- 3.** Profundizar en los perfiles de expresión diferenciales que la condición adherente y no adherente pueden llegar a definir.
- 4.** Evaluar la capacidad de diferenciación de los agregados celulares a fenotipos neuronales terminales y relevancia funcional como tipos celulares maduros mediante Patch-clamp.
- 5.** Identificar por medio de xenotrasplantes en modelos animales el potencial tumorigénico de los agregados generados y su multipotencialidad.

19. Bibliografía

1. Arteaga Martínez, S., & García Peláez, M. Embriología humana y biología del desarrollo. Médica Panamericana. 2013. México 106-112
2. Carlson, N. Fisiología de la conducta. Pearson Educación. 2006. Madrid 81-82
3. Wilson, L., & Maden, M. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental Biology*, 2005. 282(1), 1-13.
4. Puelles L, Rubenstein J. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends in Neurosciences*. 2003; 26(9):469-476
5. Rubenstein J, Martinez S, Shimamura K, Puelles L. The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science*. 1994;266(5185):578-580.
6. Rojas, M., Signore, I., & Mejías, R. Morfógenos Durante el Desarrollo Embrionario de Vertebrados. *International Journal Of Morphology*, 2014; 32(1), 319-326.
7. Wang Y, McMahon A, Allen B. Shifting paradigms in Hedgehog signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 2007;19(2):159-165.
8. Pan Y, Bai C, Joyner A, Wang B. Sonic hedgehog Signaling Regulates Gli2 Transcriptional Activity by Suppressing Its Processing and Degradation. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(9):3365-3377.
9. Wang B, Fallon J, Beachy P. Hedgehog-Regulated Processing of Gli3 Produces an Anterior/Posterior Repressor Gradient in the Developing Vertebrate Limb. *Cell*. 2000;100(4):423-434.
10. Jacobs C, Huang P. Notch signalling maintains Hedgehog responsiveness via a Gli-dependent mechanism during spinal cord patterning in zebrafish. *eLife*. 2019;8.
11. Briscoe J, Pierani A, Jessell T, Ericson J. A Homeodomain Protein Code Specifies Progenitor Cell Identity and Neuronal Fate in the Ventral Neural Tube. *Cell*. 2000;101(4):435-445.
12. Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell T. Two Critical Periods of Sonic Hedgehog Signaling Required for the Specification of Motor Neuron Identity. *Cell*. 1996;87(4):661-673.
13. Ille F, Atanasoski S, Falk S, Ittner L, Märki D, Büchmann-Møller S et al. Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Developmental Biology*. 2007; 304(1):394-408.

14. Kawano R, Ohta K, Lupo G. Cadherin-7 enhances Sonic Hedgehog signalling by preventing Gli3 repressor formation during neural tube patterning. *Open Biology*. 2017; 7(12):170225.
15. Dale L, Jones C. BMP signalling in early *Xenopus* development. *BioEssays*. 1999; 21(9):751-760.
16. Hemmati-Brivanlou A, Thomsen G. Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: Expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Developmental Genetics*. 1995;17(1):78-89.
17. Hawley S, Wunnenberg-Stapleton K, Hashimoto C, Laurent M, Watabe T, Blumberg B et al. Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Genes & Development*. 1995; 9(23):2923-2935.
18. Graff J, Bansal A, Melton D. *Xenopus* Mad Proteins Transduce Distinct Subsets of Signals for the TGF β Superfamily. *Cell*. 1996;85(4):479-487.
19. Nguyen V, Schmid B, Trout J, Connors S, Ekker M, Mullins M. Ventral and Lateral Regions of the Zebrafish Gastrula, Including the Neural Crest Progenitors, Are Established by *abmp2b/swirl* Pathway of Genes. *Developmental Biology*. 1998; 199(1):93-110.
20. Harland R, Gerhart J. Formation and function of Spemann's organizer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997;13(1):611-667.
21. Matzuk M, Lu N, Vogel H, Sellheyer K, Roop D, Bradley A. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*. 1995;374(6520):360-363.
22. McMahon J, Takada S, Zimmerman L, Fan C, Harland R, McMahon A. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes & Development*. 1998; 12(10):1438-1452.
23. Smith W, Harland R. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell*. 1992; 70(5):829-840.
24. Hawley S, Wunnenberg-Stapleton K, Hashimoto C, Laurent M, Watabe T, Blumberg B et al. Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Genes & Development*. 1995; 9(23):2923-2935.
25. Sasai Y. *Xenopus* chordin: A novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell*. 1994;79(5):779-790.
26. Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, De Robertis E. Regulation of neural induction by the *Chd* and *Bmp-4* antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature*. 1995;376(6538):333-336.

27. Fainsod A, Deißler K, Yelin R, Marom K, Epstein M, Pillemer G et al. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mechanisms of Development*. 1997;63(1):39-50.
28. Rogers M, Rosen V, Wozney J, Gudas L. Bone morphogenetic proteins-2 and -4 are involved in the retinoic acid-induced differentiation of embryonal carcinoma cells. *Molecular Biology of the Cell*. 1992;3(2):189-196.
29. Moos Jr M, Wang S, Krinks M. Anti-Dorsalizing Morphogenetic Protein is a novel TGF- β homolog expressed in the Spemann organizer. *Development*. 1995;3226(121):4293-4301.
30. Roelink H, Nusse R. Expression of two members of the Wnt family during mouse development--restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube. *Genes & Development*. 1991;5(3):381-388.
31. Willert J, Epping M, Pollack J, Brown P, Nusse R. A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Developmental Biology*. 2002;2(1):8.
32. Maeda R, Kobayashi A, Sekine R, Lin J, Kung H, Maeno M. Xmsx-1 modifies mesodermal tissue pattern along dorsoventral axis in *Xenopus laevis* embryo. *Development*. 1997;13(124):2553-2560.
33. Dessaud E, McMahon A, Briscoe J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development*. 2008;135(15):2489-2503.
34. Ulloa F, Martí E. Wnt won the war: Antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Developmental Dynamics*. 2009;NA-NA.
35. Pierani A, Brenner-Morton S, Chiang C, Jessell T. A Sonic Hedgehog-Independent, Retinoid-Activated Pathway of Neurogenesis in the Ventral Spinal Cord. *Cell*. 1999;97(7):903-915.
36. Gardner R. Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development. *Development*. 2001;6(121):839-847.
37. Lawson A, Colas J, Schoenwolf G. Classification scheme for genes expressed during formation and progression of the avian primitive streak. *The Anatomical Record*. 2001;262(2):221-226.
38. Gros J, Feistel K, Viebahn C, Blum M, Tabin C. Cell Movements at Hensen's Node Establish Left/Right Asymmetric Gene Expression in the Chick. *Science*. 2009;324(5929):941-944.
39. Lamb, T., & Harland, R. (1995). Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern. *Development*, 11(121), 3627-3636.

40. Liguori, G., Echevarría, D., Improta, R., Signore, M., Adamson, E., Martínez, S., & Persico, M. (2003). Anterior neural plate regionalization in *cripto* null mutant mouse embryos in the absence of node and primitive streak. *Developmental Biology*, 264(2), 537-549.
 41. Amaya E, Musci T, Kirschner M. Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *xenopus* embryos. *Cell*. 1991;66(2):257-270.
 42. Davidson B, Cheng L, Kinder S, Tam P. Exogenous FGF-4 Can Suppress Anterior Development in the Mouse Embryo during Neurulation and Early Organogenesis. *Developmental Biology*. 2000;221(1):41-52.
 43. Storey K, Goriely A, Sargent C, Brown J. Early posterior neural tissue is induced by FGF in the chick embryo. *Development*. 1998;125(1253):473-484.
 44. Bayha E, Jørgensen M, Serup P, Grapin-Botton A. Retinoic Acid Signaling Organizes Endodermal Organ Specification along the Entire Antero-Posterior Axis. *PLoS ONE*. 2009;4(6):e5845.
 45. Houle M. Retinoic acid regulates a subset of *Cdx1* function in vivo. *Development*. 2003;130(26):6555-6567.
 46. Sturgeon K, Kaneko T, Biemann M, Gauthier A, Chawengsaksophak K, Cordes S. *Cdx1* refines positional identity of the vertebrate hindbrain by directly repressing *Mafb* expression. *Development*. 2010;138(1):65-74.
 47. Bouwmeester T, Kim S, Sasai Y, Lu B, Robertis E. Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature*. 1996;382(6592):595-601.
 48. Biben C, Stanley E, Fabri L, Kotecha S, Rhinn M, Drinkwater C et al. Murine Cerberus Homologue *mCer-1*: A Candidate Anterior Patterning Molecule. *Developmental Biology*. 1998;194(2):135-151.
 49. Acevedo Fernández, J., Ángeles Chimal, J., Rodríguez Molina, V., & Santa-Olalla Tapia, J. *Células Troncales Neurales*. 2011. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 89-109
 50. Fuentealba L, Rompani S, Parraguez J, Obernier K, Romero R, Cepko C et al. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*. 2015;161(7):1644-1655.
 51. Smith, A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441(7097), 1060-1060.
 52. Alvarez-Buylla, A., & Lim, D. For the Long Run. *Neuron*. 2006; 41(5), 683-686.
- Shen, Q. Endothelial Cells Stimulate Self-Renewal and Expand Neurogenesis of Neural Stem Cells. *Science*, 2004; 304(5675), 1338-1340.

53. Conboy I, Conboy M, Wagers A, Girma E, Weissman I, Rando T. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. 2005;433(7027):760-764.
54. Ryu B, Orwig K, Oatley J, Avarbock M, Brinster R. Effects of Aging and Niche Microenvironment on Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells*. 2006;24(6):1505-1511.
55. Zhu Y. Neurofibromas in NF1: Schwann Cell Origin and Role of Tumor Environment. *Science*. 2002;296(5569):920-922.
56. Riquelme, P., Drapeau, E., & Doetsch, F. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*. 2008;363(489), 123-137.
57. Jones D, Wagers A. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(1):11-21.
58. Xie T. A Niche Maintaining Germ Line Stem Cells in the Drosophila Ovary. *Science*. 2000;290(5490):328-330.
59. Yamashita Y. Orientation of Asymmetric Stem Cell Division by the APC Tumor Suppressor and Centrosome. *Science*. 2003;301(5639):1547-1550.
60. Wallenfang M. Developmental Biology: Orienting Stem Cells. *Science*. 2003;301(5639):1490-1491.
61. Song X, Xie T. DE-cadherin-mediated cell adhesion is essential for maintaining somatic stem cells in the Drosophila ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(23):14813-14818.
62. Kim I, Saunders T, Morrison S. Sox17 Dependence Distinguishes the Transcriptional Regulation of Fetal from Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cell*. 2007;130(3):470-483.
63. Briese V, Hopp H. Somatomedine--Insulinähnliche Wachstumsfaktoren [Somatomedins--insulin-like growth factors]. *Zentralbl Gynakol*. 1989;111(15):1017-1024.
64. Vroede M, Rechler M, Nissley S, Ogawa H, Joshi S, Burke G et al. Mitogenic Activity and Receptor Reactivity of Hybrid Molecules Containing Portions of the Insulin-like Growth Factor I (IGF-I), IGF-II, and Insulin Molecules. *Diabetes*. 1986;35(3):355-361.
65. Estrov Z, Meir R, Barak Y, Zaizov R, Zadik Z. Human growth hormone and insulin-like growth factor-1 enhance the proliferation of human leukemic blasts. *Journal of Clinical Oncology*. 1991;9(3):394-399.

66. Becke D, Gross N, Beretta Brognara C. Effects of stem cell factor and other bone marrow-derived growth factor on the expression of adhesion molecules and proliferation of human neuroblastoma cells. *European Journal of Cancer*. 1995;31(4):467-470.
67. Skladchikova G, Rønn L, Berezin V, Bock E. Extracellular adenosine triphosphate affects neural cell adhesion molecule (NCAM)-mediated cell adhesion and neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience Research*. 1999;57(2):207-218.
68. Palmer T, Markakis E, Willhoite A, Safar F, Gage F. Fibroblast Growth Factor-2 Activates a Latent Neurogenic Program in Neural Stem Cells from Diverse Regions of the Adult CNS. *The Journal of Neuroscience*. 1999;19(19):8487-8497.
69. Li W, Cogswell C, LoTurco J. Neuronal Differentiation of Precursors in the Neocortical Ventricular Zone Is Triggered by BMP. *The Journal of Neuroscience*. 1998;18(21):8853-8862.
70. García-Alonso L, Romani S, Jiménez F. The EGF and FGF Receptors Mediate Neuroglial Function to Control Growth Cone Decisions during Sensory Axon Guidance in *Drosophila*. *Neuron*. 2000;28(3):741-752.
71. Qian X, Davis A, Goderie S, Temple S. FGF2 Concentration Regulates the Generation of Neurons and Glia from Multipotent Cortical Stem Cells. *Neuron*. 1997;18(1):81-93.
72. Madhavan L, Ourednik V, Ourednik J. Increased “Vigilance” of Antioxidant Mechanisms in Neural Stem Cells Potentiates Their Capability to Resist Oxidative Stress. *Stem Cells*. 2006;24(9):2110-2119.
73. Song X. Germline Stem Cells Anchored by Adherens Junctions in the *Drosophila* Ovary Niches. *Science*. 2002;296(5574):1855-1857.
74. Lodish H. *Biología celular y molecular*. 3rd ed. Buenos Aires [etc.]: Médica Panamericana; 2016.
75. Watt, F.M. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J*. 2002; 21: 3919-3926.
76. Georges-Labouesse E, Messaddeq N, Yehia G, Cadalbert L, Dierich A, Le Meur M. Absence of integrin $\alpha 6$ leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nature Genetics*. 1996;13(3):370-373.
77. Brakebusch C, Grose R, Quondamatteo F, Ramirez A, Jorcano J, Pirro A et al. Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on $\beta 1$ integrin expression on keratinocytes. *The EMBO Journal*. 2000;19(15):3990-4003.
78. Nakagawa S, Takeichi M. Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development*. 1998;(125):2963-2971.

79. Baron W. The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrins. *The EMBO Journal*. 2002;21(8):1957-1966.
80. Bowen-Pope D, Raines E. History of Discovery. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(11):2397-2401.
81. Engler A, Sen S, Sweeney H, Discher D. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. 2006;126(4):677-689.
82. Deng W, Lin H. Spectrosomes and Fusomes Anchor Mitotic Spindles during Asymmetric Germ Cell Divisions and Facilitate the Formation of a Polarized Microtubule Array for Oocyte Specification in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 1997;189(1):79-94.
83. Yamashita Y. Orientation of Asymmetric Stem Cell Division by the APC Tumor Suppressor and Centrosome. *Science*. 2003;301(5639):1547-1550.
84. Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*. 2005;437(7056):275-280.
85. Raposo, G. and Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 2013; 200(4), pp.373-383.
86. Morton, M., Neckles, V., Seluzicki, C., Holmberg, J. and Feliciano, D. Neonatal Subventricular Zone Neural Stem Cells Release Extracellular Vesicles that Act as a Microglial Morphogen. *Cell Reports*, 2018; 23(1), pp.78-89.
87. Bátiz L, Castro M, Burgos P, Velásquez Z, Muñoz R, Lafourcade C et al. Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2016;9(501), pp. 1-28.
88. Cocucci, E. and Meldolesi, J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*. 2015; 25(6), pp.364-372.
89. Meldolesi, J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Current Biology*, 2018; 28(8), pp.R435-R444.
90. Becker, A., Thakur, B., Weiss, J., Kim, H., Peinado, H. and Lyden, D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*, 2016; 30(6), pp.836-848.
91. Yoshimura A, Adachi N, Matsuno H, Kawamata M, Yoshioka Y, Kikuchi H et al. The Sox2 promoter-driven CD63-GFP transgenic rat model allows tracking of neural stem cell-derived extracellular vesicles. *Disease Models & Mechanisms*. 2017;11(1), pp. 1-11.
92. Gage, F. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438.

93. Feliciano, D., Bordey, A., & Bonfanti, L. Noncanonical Sites of Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*. 2015; 7(10), a018846.
94. Zhang, J., & Jiao, J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Research International*, 2015, 1-14.
95. Hsu, Y., Li, L., & Fuchs, E. Transit-Amplifying Cells Orchestrate Stem Cell Activity and Tissue Regeneration. *Cell*. 2014; 157(4), 935-949.
96. Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J., & Alvarez-Buylla, A. EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adult Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron*, 2002;36(6), 1021-1034.
97. Sandrock, R., Wheatley, W., Levinthal, C., Lawson, J., Hashimoto, B., Rao, M., & Campanelli, J. Isolation, characterization and preclinical development of human glial-restricted progenitor cells for treatment of neurological disorders. *Regenerative Medicine*. 2010; 5(3), 381-394.
98. Watson, C., Paxinos, G., & Puelles, L. The mouse nervous system London: Academic 2012; 2-12
99. Tetsuro Shingo, S., Sorokan, T., & Weiss, S. Erythropoietin Regulates the In Vitro and In Vivo Production of Neuronal Progenitors by Mammalian Forebrain Neural Stem Cells. *Journal Of Neuroscience*, 2001;21(24), 9733-9743
100. Bertrand, N., Castro, D., & Guillemot, F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Reviews Neuroscience*, 2002;3(7), 517-530.
101. Heldin, C., & Westermark, B. Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell*. 1984;37(1), 9-20.
102. Schwindt, T., Motta, F., Gabriela F., B., Cristina G., M., Guimarães, A., & Calcagnotto, M. et al. Effects of FGF-2 and EGF removal on the differentiation of mouse neural precursor cells. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*, 2009; 81(3), 443-452.
103. Takeichi M. Cadherins: A Molecular Family Important in Selective Cell-Cell Adhesion. *Annual Review of Biochemistry*. 1990;59(1):237-252.
104. Brusés J, Rutishauser U. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie*. 2001;83(7):635-643.
105. Palmer T, Willhoite A, Gage F. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*. 2000;425(4):479-494.
106. Reynolds, B., Tetzlaff, W., & Weiss, S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 1992; 12(11), 4565-4574.

107. Dong Z, Su L, Mino J. Effects of endothelial cells on renewal and differentiation of neural stem cells. *Sheng*. 2007; 24(5):1184-6.
108. Jacobson M. *Developmental neurobiology*. Plenum Press. New York. 1994.
109. Sturrock RR. Gliogenesis in the prenatal rabbit spinal cord. *J Anat*. 1982;134 (Pt 4):771-93.
110. Butt A, Ransom B. Morphology of astrocytes and oligodendrocytes during development in the intact rat optic nerve. *The Journal of Comparative Neurology*. 1993;338(1):141-158.
111. McMorris F, McKinnon R. Regulation of Oligodendrocyte Development and CNS Myelination by Growth Factors: Prospects for Therapy of Demyelinating Disease. *Brain Pathology*. 1996;6(3):313-329.
112. Dimou L, Gallo V. NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia*. 2015;63(8):1429-1451.
113. Pringle N, Guthrie S, Lumsden A, Richardson W. Dorsal Spinal Cord Neuroepithelium Generates Astrocytes but Not Oligodendrocytes. *Neuron*. 1998;20(5):883-893.
114. Raff, M., Miller, R., & Noble, MA glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature*. 1983;303(5916), 390-396.
115. Chalmers-Redman R, Priestley T, Kemp J, Fine A. In vitro propagation and inducible differentiation of multipotential progenitor cells from human fetal brain. *Neuroscience*. 1997;76(4):1121-1128.
116. Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annual Review Of Neuroscience*. 2009; 32(1), 149-184.
117. McMorris F, McKinnon R. Regulation of Oligodendrocyte Development and CNS Myelination by Growth Factors: Prospects for Therapy of Demyelinating Disease. *Brain Pathology*. 1996;6(3):313-329.
118. Mayer-Proschel M, Rao MS, Noble M. Progenitor cells of the central nervous system: a boon for clinical neuroscience. *J NIH Res* 1996; (9):31-36.
119. Groves A, Barnett S, Franklin R, Crang A, Mayer M, Blakemore W et al. Repair of demyelinated lesions by transplantation of purified 0-2A progenitor cells. *Nature*. 1993;362(6419):453-455
120. Noble M. The oligodendrocyte-type-2 astrocyte lineage: in vitro and in vivo studies on development, tissue repair and neoplasia. In: Gage FH, Christen Y, editors. *Research and perspectives in neuroscience: isolation,*

characterization and utilization of CNS stem cells. New York: Springer-Verlag.1997; p 151–168

121. Scolding N, Rayner P, Sussman J, Shaw C, Compston D. A proliferative adult human oligodendrocyte progenitor. *NeuroReport*. 1995;6(3):441-445.
122. Scolding N, Rayner P, Compston D. Identification of A2B5-positive putative oligodendrocyte progenitor cells and A2B5-positive astrocytes in adult human white matter. *Neuroscience*. 1999;89(1):1-4.
123. Rao M Mayer-Proschel M. Glial-Restricted Precursors Are Derived from Multipotent Neuroepithelial Stem Cells. *Developmental Biology*. 1997;188(1):48-63.
124. Rivkin M, Flax J, Mozell R, Osathanondh R, Volpe J, Villa-Komaroff L. Oligodendroglial development in human fetal cerebrum. *Annals of Neurology*. 1995;38(1):92-101.
125. Avellana-Adalid V, Nait-Oumesmar B, Lachapelle F, Evercooren A. Expansion of rat oligodendrocyte progenitors into proliferative oligospheres that retain differentiation potential. *Journal of Neuroscience Research*. 1996;45(5):558-570.
126. Mi H, Barres B. Purification and Characterization of Astrocyte Precursor Cells in the Developing Rat Optic Nerve. *The Journal of Neuroscience*. 1999; 19(3):1049-1061.
127. Ramon Y, Cajal S. *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres*. Maloine.1909. Paris.
128. Raff, M., Miller, R., & Noble, M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature*, 1983; 303(5916), 390-396.
129. Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annual Review Of Neuroscience*, 2009;32(1), 149-184.
130. Deneen, B., Ho, R., Lukaszewicz, A., Hochstim, C., Gronostajski, R., & Anderson, D. The Transcription Factor NFIA Controls the Onset of Gliogenesis in the Developing Spinal Cord. *Neuron*, 2006; 52(6), 953-968.
131. Jarriault S, Le Bail O, Hirsinger E, Pourquoié O, Logeat F, Strong C et al. Delta-1 Activation of Notch-1 Signaling Results in HES-1 Transactivation. *Molecular and Cellular Biology*. 1998;18(12):7423-7431.
132. Ishibashi M, Ang S, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, Guillemot F. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes & Development*. 1995;9(24):3136-3148.

133. Wang S, Sdrulla A, diSibio G, Bush G, Nofziger D, Hicks C et al. Notch Receptor Activation Inhibits Oligodendrocyte Differentiation. *Neuron*. 1998;21(1):63-75.
134. Zhu, X., Bergles, D., & Nishiyama, A. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development*, 2007;135(1), 145-157.
135. Lu, Q., Park, J., Noll, E., Chan, J., Alberta, J., & Yuk, D. et al. Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors. *Proceedings Of The National Academy of Sciences*, 2001; 98(19), 10851-10856.
136. Collarini E, Pringle N, Mudhar H, Stevens G, Kuhn R, Monuki E et al. Growth factors and transcription factors in oligodendrocyte development. *Journal of Cell Science*. 1991;1991(Supplement 15):117-123.
137. Houlgatte, R., Mallat, M., Brachet, P., & Prochiantz, A. Secretion of nerve growth factor in cultures of glial cells and neurons derived from different regions of the mouse brain. *Journal Of Neuroscience Research*.1989; 24(2), 143-152.
138. Cragolini, A., Huang, Y., Gokina, P., & Friedman, W. (2009). Nerve growth factor attenuates proliferation of astrocytes via the p75 neurotrophin receptor. *Glia*, 57(13), 1386-1392.
139. Giulian, D. Brain peptides and glial growth. I. Glia-promoting factors as regulators of gliogenesis in the developing and injured central nervous system. *The Journal Of Cell Biology*, 1986; 102(3), 803-811.
140. Lavker, R., & Sun, T. (2000). Epidermal stem cells: Properties, markers, and location. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 97(25), 13473-13475.
141. Weissman, I., Anderson, D., & Gage, F. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, 2001;17(1), 387-403.
142. Blanpain, C., & Fuchs, E. Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, 2006; 2(1), 339-373.
143. Kretzschmar, K., & Watt, F. Markers of Epidermal Stem Cell Subpopulations in Adult Mammalian Skin. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine*-. 2014; 4(10), 13631-13635
144. Blau, H. Stem-cell fusion: A twist of fate. *Nature*, 2002; 419(6906), 437-437.
145. Jopling, C., Boue, S., & Belmonte, J. Differentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011; 12(2), 79-89.
146. Wagers, A., & Weissman, I. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*, 2004; 116(5), 639-648.

147. Taberlay, P., Kelly, T., Liu, C., You, J., De Carvalho, D., & Miranda, T. et al Polycomb-Repressed Genes Have Permissive Enhancers that Initiate Reprogramming. *Cell*, 2011; 147(6), 1283-1294.
148. Zaret, K., & Carroll, J. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes & Development*, 2011;25(21), 2227-2241.
149. Li G, Levitus M, Bustamante C, Widom J. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004;12(1):46-53.
150. Poirier M, Bussiek M, Langowski J, Widom J. Spontaneous Access to DNA Target Sites in Folded Chromatin Fibers. *Journal of Molecular Biology*. 2008;379(4):772-786.
151. Poss, K. (2002). Heart Regeneration in Zebrafish. *Science*, 298(5601), 2188-2190.
152. Major R, Poss K. Zebrafish heart regeneration as a model for cardiac tissue repair. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2007;4(4):219-225.
153. Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A., & Belmonte, J. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*, 2010; 464(7288), 606-609.
154. Sleep, E., Boué, S., Jopling, C., Raya, M., Raya, Á., & Belmonte, J. Transcriptomics approach to investigate zebrafish heart regeneration. *Journal Of Cardiovascular Medicine*, 2010; 1(5), 369-380.
155. Chen, Z., Yu, W., & Strickland, S. Peripheral Regeneration. *Annual Review Of Neuroscience*, 2007; 30(1), 209-233.
156. Cienfuegos J, Rotellar F, Baixauli J, Regueira F. Regeneración hepática; el secreto mejor guardado. Una forma de respuesta al daño tisular. *Rev Esp Enferm Dig*. 2014;106(3):171-194.
157. de Miguel M, Prieto I, Moratilla A, Arias J, Aller M. Mesenchymal Stem Cells for Liver Regeneration in Liver Failure: From Experimental Models to Clinical Trials. *Stem Cells International*. 2019; 1-12.
158. Tosh, D., & Horb, M. How Cells Change Their Phenotype. *Handbook Of Stem Cells*. 2013; 95-100.
159. Yechoor, V., Liu, V., Espiritu, C., Paul, A., Oka, K., Kojima, H., & Chan, L. Neurogenin3 Is Sufficient for Transdetermination of Hepatic Progenitor Cells into Neo-Islets In Vivo but Not Transdifferentiation of Hepatocytes. *Developmental Cell*, 2009; 16(3), 358-373.
160. Lee N, Maurange C, Ringrose L, Paro R. Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature*. 2005;438(7065):234-237

161. Vaca P, Martín F, Vegara-Meseguer J, Rovira J, Berná G, Soria B. Induction of Differentiation of Embryonic Stem Cells into Insulin-Secreting Cells by Fetal Soluble Factors. *Stem Cells*. 2006;24(2):258-265.
162. Hannoun Z, Fletcher J, Greenhough S, Medine C, Samuel K, Sharma R et al. The Comparison between Conditioned Media and Serum-Free Media in Human Embryonic Stem Cell Culture and Differentiation. *Cellular Reprogramming*. 2010;12(2):133-140.
163. Oh J, Recknor J, Recknor J, Mallapragada S, Sakaguchi D. Soluble factors from neocortical astrocytes enhance neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult rat hippocampus on micropatterned polymer substrates. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009;91(2):575-585.
164. Porz, N.; Seiler, S.; Putzu, A.; Andres, R.; Raabe, A.; Widmer, H. R.; Di Santo, S. Intraventricular infusion of endothelial progenitor cell conditioned medium promotes endogenous neurogenesis. In: 9th Annual Swiss Stem Cell Network Meeting. Bern. 2013; 08.02.2013.
165. Taei A, Hassanzadeh G, Dargahi L, Nasoohi S, Kadivar M, Farahmandfar M. The effect of conditioned medium of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells on neurogenesis markers in a rat model of ischemic stroke. *IBRO Reports*. 2019;6:S114.
166. López-Carballo G, Moreno L, Masiá S, Pérez P, Baretino D. Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway by Retinoic Acid Is Required for Neural Differentiation of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(28):25297-25304.
167. Muroyama Y, Kondoh H, Takada S. Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;313(4):915-921.+
168. Yang H, Wang J, Sun J, Liu X, Duan W, Qu T. A new method to effectively and rapidly generate neurons from SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*. 2016; 610:43-47.
169. Jiao Q, Li X, An J, Zhang Z, Chen X, Tan J et al. Cell-Cell Connection Enhances Proliferation and Neuronal Differentiation of Rat Embryonic Neural Stem/Progenitor Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017;11.
170. Yan Y, Sailor K, Vemuganti R, Dempsey R. Insulin-like growth factor-1 is an endogenous mediator of focal ischemia-induced neural progenitor proliferation. *European Journal of Neuroscience*. 2006; 24(1):45-54.
171. Ribeiro C, Salgado A, Fraga J, Silva N, Reis R, Sousa N. The secretome of bone marrow mesenchymal stem cells-conditioned media varies with time and drives a distinct effect on mature neurons and glial cells (primary cultures). *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2011; 5(8):668-672.

172. Chen G, Chen J, Liu H, Chen S, Zhang Y, Li P et al. Comprehensive Identification and Characterization of Human Secretome Based on Integrative Proteomic and Transcriptomic Data. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019; 7(299): 1-14
173. Makridakis M, Vlahou A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *Journal of Proteomics*. 2010;73(12):2291-2305.
174. Zhao X, Song T, He Z, Tang L, Zhu Y. A novel role of cyclinD1 and p16 in clinical pathology and prognosis of childhood medulloblastoma. *Medical Oncology*. 2009;27(3):985-991.
175. Klein E, Assoian R. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *Journal of Cell Science*. 2008;121(23):3853-3857.
176. 5. Daoy ATCC ® HTB-186™ Homo sapiens brain/cerebellum desmopla [Internet]. Atcc.org. 2020 [cited 3 June 2020]. Available from: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-186.aspx>
177. An E, Sen S, Park S, Gordish-Dressman H, Hathout Y. Identification of Novel Substrates for the Serine Protease HTRA1 in the Human RPE Secretome. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010;51(7):3379.
178. Choi Y, Lim J, Kim K, Acharya B, Cho J, Bae Y et al. Secretome Analysis of Human BMSCs and Identification of SMOC1 as an Important ECM Protein in Osteoblast Differentiation. *Journal of Proteome Research*. 2010;9(6):2946-2956.
179. Hoffrogge R, Mikkat S, Scharf C, Beyer S, Christoph H, Pahnke J et al. 2-DE proteome analysis of a proliferating and differentiating human neuronal stem cell line (ReNcell VM). *Proteomics*. 2006; 6(6):1833-1847.
180. Cappello S, Monzo P, Vallee R. NudC is required for interkinetic nuclear migration and neuronal migration during neocortical development. *Developmental Biology*. 2011;357(2):326-335.
181. Attia M, Förster A, Rachez C, Freemont P, Avner P, Rogner U. Interaction between Nucleosome Assembly Protein 1-like Family Members. *Journal of Molecular Biology*. 2011;407(5):647-660.
182. Sun G, Cao Y, Guo J, Li M, Dai Y. Heat Shock Cognate Protein 70 Enhanced Integrin β 1 Mediated Invasion in Cancer Cells. *Cancer Management and Research*. 2020; 12:981-991.
183. Nomura Y. Neuronal Apoptosis and Protection: Effects of Nitric Oxide and Endoplasmic Reticulum-Related Proteins. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2004; 27 (7):961-963.

184. Li H, Chen H, Huang F. Identification of a Rapidly Dephosphorylating 95-kDa Protein as Elongation Factor 2 during 8-Br-cAMP Treatment of N1E115 Neuroblastoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995;217(1):131-137.
185. Martelli C, D'Angelo L, Barba M, Baranzini M, Inserra I, Iavarone F et al. Top-down proteomic characterization of DAOY medulloblastoma tumor cell line. *EuPA Open Proteomics*. 2016;12:13-21.
186. Salton M, Elkon R, Borodina T, Davydov A, Yaspo M, Halperin E et al. MatrIn 3 Binds and Stabilizes mRNA. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23882.
187. Bisaro B, Mandili G, Poli A, Piolatto A, Papa V, Novelli F et al. Proteomic analysis of extracellular vesicles from medullospheres reveals a role for iron in the cancer progression of medulloblastoma. *Molecular and Cellular Therapies*. 2015;3(1).
188. Park K, Eun Kim G, Morales R, Moda F, Moreno-Gonzalez I, Concha-Marambio L et al. The Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78/BiP Modulates Prion Propagation in vitro and in vivo. *Scientific Reports*. 2017;7(1).
189. Prodromou N, Thompson C, Osborn D, Cogger K, Ashworth R, Knight M et al. Heat shock induces rapid resorption of primary cilia. *Development*. 2012;139(24):e2408-e2408.
190. Peyrl A, Krapfenbauer K, Slavc I, Yang J, Strobel T, Lubec G. Protein profiles of medulloblastoma cell lines DAOY and D283: Identification of tumor-related proteins and principles. *PROTEOMICS*. 2003;3(9):1781-1800.
191. Vinores S, Marangos P, Parma A, Guroff G. Increased Levels of Neuron-Specific Enolase in PC 12 Pheochromocytoma Cells as a Result of Nerve Growth Factor Treatment. *Journal of Neurochemistry*. 1982;37(3):597-600.
192. Valtz N, Hayes T, Norregaard T, Liu S, McKay R. An Embryonic Origin for Medulloblastoma. *New Biology*. 1991;3(4):364-371.
193. Sutter R, Shakhova O, Bhagat H, Behesti H, Sutter C, Penkar S et al. Cerebellar stem cells act as medulloblastoma-initiating cells in a mouse model and a neural stem cell signature characterizes a subset of human medulloblastomas. *Oncogene*. 2010;29(12):1845-1856.
194. Yao M, Li S, Wu X, Diao S, Zhang G, He H et al. Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cellular & Molecular Immunology*. 2018;15(8):737-739.
195. Treps L, Perret R, Edmond S, Ricard D, Gavard J. Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2017;6(1):1359479.

196. Thellung S, Corsaro A, Bosio A, Zambito M, Barbieri F, Mazzanti M et al. Emerging Role of Cellular Prion Protein in the Maintenance and Expansion of Glioma Stem Cells. *Cells*. 2019;8(11):1458.
197. Polisetty R, Gupta M, Nair S, Ramamoorthy K, Tiwary S, Shiras A et al. Glioblastoma cell secretome: Analysis of three glioblastoma cell lines reveal 148 non-redundant proteins. *Journal of Proteomics*. 2011;74(10):1918-1925.
198. Ding M, Bruick R, Yu Y. Secreted IGF1BP5 mediates mTORC1-dependent feedback inhibition of IGF-1 signalling. *Nature Cell Biology*. 2016;18(3):319-327.
199. Xu C, Wu X, Zhu J. VEGF Promotes Proliferation of Human Glioblastoma Multiforme Stem-Like Cells through VEGF Receptor 2. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:1-8.
200. Xia X, Serrero G. Identification of Cell Surface Binding Sites for PC-Cell-Derived Growth Factor, PCDGF, (Epithelin/Granulin Precursor) on Epithelial Cells and Fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;245(2):539-543.
201. Park J, Chang I, Ahn J, Kim J, Song J, Moon S et al. Nerve Growth Factor Stimulates Glioblastoma Proliferation through Notch1 Receptor Signaling. *Journal of Korean Neurosurgical Society*. 2018;61(4):441-449.
202. Kokunati T, Sawa H, Tatsumi S, Tamaki N. Expression of Nerve Growth Factor Receptor by Human Primitive Neuroectodermal Tumors. *Neurología médico-quirúrgica*. 1994;34(8):523-529.
203. Keles G, Berger M, Schofield D, Bothwell M. Nerve Growth Factor Receptor Expression in Medulloblastomas and the Potential Role of Nerve Growth Factor as a Differentiating Agent in Medulloblastoma Cell Lines. *Neurosurgery*. 1993;32(2):274-280.
204. Huff K, Guroff G. Nerve growth factor-induced reduction in epidermal growth factor responsiveness and epidermal growth factor receptors in PC12 cells: An aspect of cell differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1979;89(1):175-180.
205. Tarassishin L, Lim J, Weatherly D, Angeletti R, Lee S. Interleukin-1-induced changes in the glioblastoma secretome suggest its role in tumor progression. *Journal of Proteomics*. 2014; 99:152-168.
206. Hartmann W, Koch A, Brune H, Waha A, Schüller U, Dani I et al. Insulin-Like Growth Factor II Is Involved in the Proliferation Control of Medulloblastoma and Its Cerebellar Precursor Cells. *The American Journal of Pathology*. 2005;166(4):1153-1162
207. Dinarello C. IL-18: A TH1 -inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999;103(1):11-24.

208. Tarassishin L, Lee S. Interferon regulatory factor 3 alters glioma inflammatory and invasive properties. *Journal of Neuro-Oncology*. 2013;113(2):185-194.
209. John G, Lee S, Song X, Riviuccio M, Brosnan C. IL-1-regulated responses in astrocytes: Relevance to injury and recovery. *Glia*. 2004;49(2):161-176.
210. Khan S, Shah S, Klyachko E, Baldrige A, Eren M, Place A et al. A null mutation in *SERPINE1* protects against biological aging in humans. *Science Advances*. 2017;3(11):eaao1617.
211. Seker F, Cingoz A, Sur-Erdem İ, Erguder N, Erkent A, Uyulur F et al. Identification of *SERPINE1* as a Regulator of Glioblastoma Cell Dispersal with Transcriptome Profiling. *Cancers*. 2019;11(11):1651.
212. Toretsky J, Helman L. Involvement of IGF-II in human cancer. *Journal of Endocrinology*. 1996;149(3):367-372.
213. Hartmann W, Koch A, Brune H, Waha A, Schüller U, Dani I et al. Insulin-Like Growth Factor II Is Involved in the Proliferation Control of Medulloblastoma and Its Cerebellar Precursor Cells. *The American Journal of Pathology*. 2005;166(4):1153-1162.
214. Whelan H, Nelson D, Strother D, Przybylski C, Figge G, Mamandi A. Medulloblastoma cell line secretes platelet-derived growth factor. *Pediatric Neurology*. 1989;5(6):347-351.
215. Andrae J, Molander C, Smits A, Funa K, Nistér M. Platelet-derived growth factor-B and -C and active α -receptors in medulloblastoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;296(3):604-611.
216. Sporn M, Roberts A. Autocrine growth factors and cancer. *Nature*. 1985;313(6005):745-747.
217. Berquin I, Dziubinski M, Nolan G, Ethier S. A functional screen for genes inducing epidermal growth factor autonomy of human mammary epithelial cells confirms the role of amphiregulin. *Oncogene*. 2001;20(30):4019-4028.
218. London W, Castleberry R, Matthay K, Look A, Seeger R, Shimada H et al. Evidence for an Age Cutoff Greater Than 365 Days for Neuroblastoma Risk Group Stratification in the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(27):6459-6465.
219. Carlsen N. How frequent is spontaneous remission of neuroblastomas? Implications for screening. *British Journal of Cancer*. 1990;61(3):441-446.
220. Rozek W, Kwasnik M, Debski J, Zmudzinski J. Mass spectrometry identification of granins and other proteins secreted by neuroblastoma cells. *Tumor Biology*. 2013;34(3):1773-1781.

221. Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange U, Cesari F et al. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature*. 2008;452(7189):877-881.
222. Xiang X, Beckwith S, Morris N. Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(6):2100-2104.
223. Satpute R, Kashyap R, Poonam R, Purohit H. Secretory factors of human neuroblastoma (IMR-32) and human glioblastoma (U87MG) cell lines induce neurite outgrowths in PC12 cells. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006;44(5):367-370.
224. Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen X et al. Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *The Scientific World Journal*. 2015:1-8.
225. Yu X, Odenthal M, Fries J. Exosomes as miRNA Carriers: Formation–Function–Future. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(12):2028.
226. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J et al. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 2015;13(1):17-24.
227. Marimpietri D, Petretto A, Raffaghello L, Pezzolo A, Gagliani C, Tacchetti C et al. Proteome Profiling of Neuroblastoma-Derived Exosomes Reveal the Expression of Proteins Potentially Involved in Tumor Progression. *PLoS ONE*. 2013;8(9)
228. Holmberg Olausson K, Maire C, Haidar S, Ling J, Learner E, Nistér M et al. Prominin-1 (CD133) Defines Both Stem and Non-Stem Cell Populations in CNS Development and Gliomas. *PLoS ONE*. 2014;9(9)
229. Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, Ozawa M, Miyazawa S, Muramatsu T. Basigin, a New, Broadly Distributed Member of the Immunoglobulin Superfamily, Has Strong Homology with Both the Immunoglobulin V Domain and the β -Chain of Major Histocompatibility Complex Class II Antigen. *The Journal of Biochemistry*. 1990;107(2):316-323.
230. Muramatsu T, Miyauchi T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol*. 2003;18:981-987.
231. Takahashi, K., & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4), 663-676.
232. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663-676.

233. Lanza, R., & Atala, A. (2013). Handbook of stem cells (2nd ed., pp. 95-100). London: Elsevier/AP.
234. Shahbazi, E., Mirakhori, F., Ezzatizadeh, V., & Baharvand, H. Reprogramming of somatic cells to induced neural stem cells. *Methods*. 2018;133, 21-28.
235. Zhang, J., Yu, X., Ma, B., Yu, W., Zhang, A., & Huang, G. et al. Neural differentiation of embryonic stem cells induced by conditioned medium from neural stem cell. *Neuroreport*, 2006; 17(10), 981-986.
236. Shahbazi, E., Moradi, S., Nemati, S., Satarian, L., Basiri, M., & Gourabi, H. et al. Conversion of Human Fibroblasts to Stably Self-Renewing Neural Stem Cells with a Single Zinc-Finger Transcription Factor. *Stem Cell Reports*, 2016; 6(4), 539-551.
237. Ring, K., Tong, L., Balestra, M., Javier, R., Andrews-Zwilling, Y., & Li, G. et al. Direct Reprogramming of Mouse and Human Fibroblasts into Multipotent Neural Stem Cells with a Single Factor. *Cell Stem Cell*, 2012; 11(1), 100-109.
238. Cogle, C., Yachnis, A., Laywell, E., Zander, D., Wingard, J., Steindler, D., & Scott, E. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *The Lancet*, 2004; 363(9419), 1432-1437.
239. Crain, B., Tran, S., & Mezey, E. Transplanted human bone marrow cells generate new brain cells. *Journal Of The Neurological Sciences*, 2005; 233(1-2), 121-123.
240. Ma, K., Fox, L., Shi, G., Shen, J., Liu, Q., & Pappas, J. et al. Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Neurological Research*, 2011; 33(10), 1083-1093
241. Monard, D., Solomon, F., Rentsch, M., & Gysin, R. Glia-Induced Morphological Differentiation in Neuroblastoma Cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 1973; 70(6), 1894-1897.
242. Ebrahimi-Barough, S., Hoveizi, E., Norouzi Javidan, A., & Ai, J. Investigating the neuroglial differentiation effect of neuroblastoma conditioned medium in human endometrial stem cells cultured on 3D nanofibrous scaffold. *Journal Of Biomedical Materials Research Part A*, 2015; 103(8), 2621-2627.
243. Akimoto, Y., Miyaji, M., Morimoto-Kamata, R., Kosaka, Y., & Obinata, A. Retinoic Acid-Induced Epidermal Transdifferentiation in Skin. *Journal Of Developmental Biology*, 2014; 2(3), 158-173.
244. Fell, H., & Mellanby, E. Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by high vitamin A. *The Journal Of Physiology*, 1953; 119(4), 470-488.
245. Gopakumar, V., Chatterjee, N., Parameswaran, S., Nirmala, S., & Krishnakumar, S. In vitro transdifferentiation of human skin keratinocytes to corneal epithelial cells. *Cytotherapy*, 2016; 18(5), 673-685.

246. Bickenbach, J., Tomanek-Chalkley, A., Wiechert, S., & Winter, M. Human Skin Keratinocytes Can Be Reprogrammed to Express Neuronal Genes and Proteins After a Single Treatment with Decitabine. *BioResearch Open Access*, 2013; 2(3), 217-221.
247. Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., & Yamamoto, T. et al. Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Science Translational Medicine*, 2012; 4(145).
248. Kim, S., Kim, J., Kwak, T., Park, S., Kim, K., & Park, H. et al. Generation of Integration-free Induced Neural Stem Cells from Mouse Fibroblasts. *Journal Of Biological Chemistry*, 291(27), 2016; 14199-14212.
249. Kim, H., & Jin, C. Stem Cells in Drug Screening for Neurodegenerative Disease. *The Korean Journal Of Physiology & Pharmacology*, 2012; 16(1), 1.
250. Denayer, T., Stohr, T., & Van Roy, M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *European Journal Of Molecular & Clinical Medicine*, 2014;2(1), 5.
251. Kim, S., Lee, H., & Kim, Y. (2013). Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology*, n/a-n/a.
252. Kim Su, de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. *J Neurosci Res*. 2009;87(10):2183–2200.
253. Brewer GJ, Torricelli JR. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nat Protoc*. 2007;2(6):1490–1498.
254. Pavon LF, Marti LC, Sibov TT, et al. In vitro Analysis of Neurospheres Derived from Glioblastoma Primary Culture: A Novel Methodology Paradigm. *Front Neurol*. 2014; 4:214
255. Charruyer A, Strachan L, Yue L, Toth A, Cecchini G, Mancianti M et al. CD133 Is a Marker for Long-Term Repopulating Murine Epidermal Stem Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(11):2522-2533.
256. Manoranjan B, Chokshi C, Venugopal C, Subapanditha M, Savage N, Tatari N et al. A CD133-AKT-Wnt signaling axis drives glioblastoma brain tumor-initiating cells. *Oncogene*. 2019;39(7):1590-1599.
257. Joannides A, Gaughwin P, Schwiening C, et al. Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *Lancet*. 2004;364(9429):172–178.
258. Glumac P, LeBeau A. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clinical and Translational Medicine*. 2018;7(1):18.
259. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Science*. 2017;108(3):283-289.

260. Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. 2002;417(6884):39–44.
261. Arzate DM, Guerra-Crespo M, Covarrubias L. Induction of typical and atypical neurogenesis in the adult substantia nigra after mouse embryonic stem cells transplantation. *Neuroscience*. 2019; 408:308–326.
262. Denham M, Dottori M. Neural Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Methods in Molecular Biology*. 2011;99-110.
263. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001;3(9):778–784.
264. Brafman DA. Generation, Expansion, and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cell (hPSC) Derived Neural Progenitor Cells (NPCs). *Methods Mol Biol*. 2015; 1212:87–102.
265. Ellis P, Fagan BM, Magness ST, et al. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci*. 2004;26(2-4):148–165.
266. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(12):2177–2195.
267. Wei LC, Shi M, Cao R, Chen LW, Chan YS. Nestin small interfering RNA (siRNA) reduces cell growth in cultured astrocytoma cells. *Brain Res*. 2008; 1196:103–112.
268. Park D, Xiang AP, Mao FF, et al. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(12):2162–2171.
269. Liu J, Ji X, Li Z, Zheng H, Zheng W, Jia J et al. Nestin overexpression promotes the embryonic development of heart and brain through the regulation of cell proliferation. *Brain Research*. 2015; 1610:1-11.
270. Lv K, Chen Z, Zhang X, Zhang Q, Liu L. Selective enrichment of CD133+/SOX2+ glioblastoma stem cells via adherent culture. *Oncology Letters*. 2018.



Cuernavaca, Mor., 18 de junio de 2020.

Dra. Vera Lucia Petricevich
Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Generación de Precursores Neurales: Participación de Entornos Neurales, Medios Condicionados como Agentes Inductores sobre Queratinocitos**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Víctor Hugo Magdaleno Izquierdo. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente



Dr. Juan José Acevedo Fernández



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 18 de junio de 2020.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Generación de Precursores Neurales: Participación de Entornos Neurales, Medios Condicionados como Agentes Inductores sobre Queratinocitos**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Víctor Hugo Magdaleno Izquierdo. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen l se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Verónica Narváez Padilla

Calle Leñeros esquina Iztacóhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 18 de junio de 2020.

Dra. Vera Lucia Petricevich
Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Generación de Precusores Neurales: Participación de Entornos Neurales, Medios Condicionados como Agentes Inductores sobre Queratinocitos**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Victor Hugo Magdaleno Izquierdo. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente


Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Calle Leñeros esquina Iztacihuatl s/n Col. Volcánes, C.P. 62360. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uam.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORIA
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 18 de julio de 2020.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Generación de Precusores Neurales: Participación de Entornos Neurales, Medios Condiciones como Agentes Inductores sobre Queratinocitos**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Víctor Hugo Magdaleno Izquierdo. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Diego Esquiliano Rendón

Calle Leñeros esquina Iztaccihuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DIEGO ESQUILIANO RENDÓN | Fecha:2020-07-29 11:40:53 | Firmante
ns3kaCZgJ0P98qN2n9XxpueS4Peq4bp7FRZ7IIYKAZgAJV78FLE45ozcYgesVWkZGeK2+naPz3AqPC3sxVKILJdokE3haptf8UjW74NnE/2tmvtyHxhEPbZSa59d8xU7LqFGaTgVxB0m8QEm7smdBv6wSaRRJuwkKdVJ+TywYdrpcR611J9dmJwEKnxLRtbNP1rV6UIPL60GPFwz20APOZEV4E3cxFxAel+ebo80pPrGV08UbyoPgBfL7y8U7rR8CbU5U9PPH4kr7PKSG2CBqtxmiWQI9WmonJwlrspmh1sBazghzOU25loGlotcz9dTUtqkiQeX0YAww--

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



RJGV2I

<https://efirma.uaem.mx/noRepudiateCLAJTTKun3obOLIUCKtz33MgnAqAAXG>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 18 de junio de 2020.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Generación de Precusores Neurales: Participación de Entornos Neurales, Medios Condiciones como Agentes Inductores sobre Queratinocitos**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Víctor Hugo Magdaleno Izquierdo. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen l se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Calle Leñeros esquina Iztacuilhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESUS SANTA OLALLA TAPIA | Fecha:2020-06-25 16:02:16 | Firmante
vlfwMDScWogLRreIGeXDNw8VLUByCYp4uJl1V/S1dRNkyUbjGBBoyezRclbJkqldJNasGPAUPy9nUPxxHnWmKg8m4ZJ6ZYWWT5mvS0df9A9lJgpJSxIVaxouHN1AQ9hvlukKX
T1LeE7symF5F1PakHVTzNwRLeHkkHOCKIhNsmYpAcLEE76pkwQ/mqQ8UOe399aOVw142taRPse1y49BLaLV21kgcE60JLR/KSaA5cStVY89nmU3XmrUMLPzGqrsVSMfctb86
CawVVDK8fxMrjhGZASB4kOzDTVkQ8K0wOQ3TbLlJphCdM03RF9xSHKKAshCooHPL6DozW--

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



qwao1S

<https://efirma.uaem.mx/NoRepudio/b19nQ21x0dSRbRKC4Q3N26BQfwCbCy9t>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023