



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

***Evaluación de la participación de los receptores metabotrópicos P2Y2 y P2Y4
en la señalización activada por ATP en células precursoras neuronales del
epitelio olfatorio***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Q.F.B. Zuly Armando Sánchez Florentino

Comité de tutores:

Director de tesis: **Dra. Beatriz Gómez González**

Asesor externo: **Dr. Héctor Solís Chagoyán**

Asesor externo: **Dr. Edgar Flores Soto**

Noviembre 2020

Declaración de originalidad

El que suscribe Zuly Armando Sánchez Florentino, alumno (a) del posgrado en biología experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Evaluación de la participación de los receptores metabotrópicos P2Y2 y P2Y4 en la señalización activada por ATP en células precursoras neuronales del epitelio olfatorio",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestría es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 25 de noviembre del 2020.

Atentamente



Zuly Armando Sánchez Florentino

Nombre y firma del alumno



Evaluación de la participación de los receptores metabotrópicos P2Y2 y P2Y4 en la señalización activada por ATP en células precursoras neuronales del epitelio olfatorio.

Con base en la legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 25 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DR. HECTOR FERNANDO SERRANO
- DR. JUAN CARLOS GOMEZ VERJAN
- DR. JAIME EDUARDO CALIXTO GONZALEZ
- DR. EDGAR FLORES SOTO



ZULY ARMANDO SANCHEZ FLORENTINO
ALUMNO

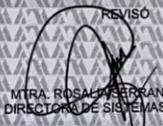
Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: ZULY ARMANDO SANCHEZ FLORENTINO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ



MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

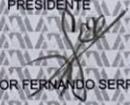
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



DR. HECTOR FERNANDO SERRANO

VOCAL



DR. JUAN CARLOS GOMEZ VERJAN

VOCAL



DR. JAIME EDUARDO CALIXTO GONZALEZ

SECRETARIO



DR. EDGAR FLORES SOTO

El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo Consejo clave DAFCYT-2003IMPI-NNN0020.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACYT.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 697823

COMITÉ DE TUTORES

Directora de tesis

Dra. Beatriz Gómez González

Departamento de Biología de la reproducción, Área de neurociencias,

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor externo

Dr. Héctor Solís Chagoyán

Investigador en Ciencias Médicas "C".

Laboratorio de Neurofarmacología, Subdirección de Investigaciones Clínicas,

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

Asesor externo

Dr. Edgar Flores Soto

Técnico Académico Asociado "B" Tiempo Completo.

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina.

Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

Las células multipotentes son un tipo importante de células troncales, las cuales tienen la capacidad de autorrenovar su población indiferenciada al dividirse y su progenie se diferencia en múltiples tipos de células en un tipo de tejido u órgano específico. En particular, las células precursoras neuronales (NPCs) del epitelio olfatorio (EO) proliferan, migran y se diferencian para reemplazar a las células que mueren en eventos que dañan el epitelio. Las NPCs del EO humano han sido aisladas y propagadas en cultivos celulares para estudiar diversos procesos dependientes de la señalización de Ca^{2+} , en particular la vía purinérgica. El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de los receptores purinérgicos P2Y2 y P2Y4 funcionales en las NPCs con rasgos de multipotencialidad obtenidas del EO humano. En el presente estudio, se determinó por inmunofluorescencia que en un cultivo clonal de NPCs, los receptores purinérgicos P2Y2 y P2Y4 son expresados en las células troncales que co-expresan marcadores moleculares de multipotencia tales como las proteínas nestina, musashi-1 y SOX2. Adicionalmente, se confirmó la funcionalidad de estos receptores por microfluorimetría al evaluar la activación de los purinoceptores con ATP y medir la concentración citosólica de Ca^{2+} en las NPCs. Los resultados sugieren que el cultivo clonal está constituido por células troncales con rasgos de multipotencia; además, que estas células expresan receptores purinérgicos funcionales P2Y2 y P2Y4.

ABSTRACT

Multipotent cells are an important type of stem cell, can self-renew their undifferentiated population and their progeny differentiate into multiple cell types in a specific tissue or organ type. Particularly, neural precursor cells (NPCs) in the olfactory epithelium (EO) proliferate, migrate, and differentiate to replace died cells during epithelial-damaging events. NPCs of human EO have been isolated and propagated in cellular cultures to study different processes that are dependent on Ca^{2+} signaling, particularly the purinergic pathway. The objective of this work was to determine the expression of functional P2Y2 and P2Y4 purinergic receptors in NPCs with multipotentiality traits obtained from human EO. In the present study, it was determined by immunofluorescence that in a clonal culture of NPCs, the purinergic receptors P2Y2 and P2Y4 were expressed in stem cells that express multipotency molecular markers such as nestin, musashi-1 and SOX2 proteins. Additionally, the functionality of these metabotropic receptors was confirmed through evaluation of purinoceptors activation with ATP in NPCs by measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration by microfluorometry. Results suggest that stem cells in the clonal culture co-expressed multipotency traits and functional P2Y2 and P2Y4 purinergic receptors.

Índice general	
1. Introducción	1
1.1. Características generales de las células troncales neuronales	2
1.2. Distribución de las NPCs en el neuroepitelio olfatorio	3
1.3. Características generales de la vía purinérgica	4
1.4. Clasificación de los receptores purinérgicos	5
1.5. Los receptores purinérgicos y el desarrollo neuronal	8
2. Antecedentes	10
3. Justificación	11
4. Pregunta de Investigación	12
5. Hipótesis	12
6. Objetivos	12
6.1. Objetivo general	12
6.2. Objetivos particulares	13
7. Materiales y métodos	13
7.1. Aislamiento de células precursoras neuronales olfativas humanas (hONPC)	13
7.2. Cultivo selectivo de células precursoras neuronales del epitelio olfatorio	15
7.3. Detección de proteínas por inmunofluorescencia	16
7.4. Separación de proteínas por electroforesis unidimensional	18
7.5. Detección de proteínas por Western blot	19
7.6. Cuantificación del Ca^{2+} citosólico por microfluorometría	20
7.7. Análisis estadístico	21
8. Resultados	21
8.1. Expresión de los marcadores específicos de multipotencialidad	21
8.2. Expresión de los receptores purinérgicos P2Y2 y P2Y4	24
8.3. Respuesta de Ca^{2+} estimulada por ATP en células precursoras neuronales	29
9. Discusión	30
10. Conclusiones	34
11. Perspectivas	34
12. Referencias	37

1. Introducción

En los últimos años se ha destacado la importancia de las células troncales o precursoras, más allá del interés de su estudio en el campo de la biología del desarrollo, derivado de que se ha sugerido su uso en la terapia celular para revertir o atenuar patologías que cursan con degeneración celular, como la diabetes y el infarto al miocardio, así como enfermedades o trastornos del sistema nervioso central (SNC) como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, los accidentes cerebrovasculares, la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras (Child et al., 2018).

A pesar de los avances en el trasplante celular, aún existen complicaciones en esta estrategia terapéutica que se pueden atribuir al conocimiento limitado de los distintos mecanismos celulares y moleculares que regulan la fisiología de las células troncales; en particular, se conoce poco de los mecanismos neurogénicos de proliferación, diferenciación y migración. En modelos animales se ha observado que la señalización purinérgica participa en la regulación de esos procesos neurogénicos. Sin embargo, en humanos la señalización purinérgica acoplada a estos procesos no se ha estudiado y se desconoce cuáles son los tipos de receptores activados por adenosín trifosfato (ATP) que modulan tales funciones (Solís-Chagoyán et al., 2019). Por esta razón, es importante abordar este tema para entender el funcionamiento de la señalización purinérgica en las células precursoras humanas en sujetos saludables, para que posteriormente podamos comparar estos resultados obtenidos con las células troncales obtenidas de pacientes con enfermedades psiquiátricas, en quienes se han

encontrado anomalías tanto en la señalización purinérgica como en la proliferación, migración y diferenciación de las células precursoras neuronales.

1.1. Características generales de las células troncales neuronales

Las células troncales o precursoras son mitóticamente activas e indiferenciadas; considerando su potencia de diferenciación, se clasifican en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Las células totipotenciales son embrionarias y su progenie tiene la capacidad de diferenciarse en cualquiera de los tipos celulares que forman los tejidos corporales. Las células pluripotenciales se diferencian en los tipos celulares procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias. Las células multipotenciales son capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria. Finalmente, las células unipotenciales son las más comprometidas y solo tienen la capacidad de diferenciar en un tipo celular (Sobhani et al., 2017).

La terminología para nombrar a las células troncales está en formación, en este trabajo se hará referencia a la glía radial y su progenie como “células troncales neuronales” (NSCs, por sus siglas en inglés “neuronal stem cells”) y a las células troncales neuronales en la etapa adulta como “células precursoras neuronales” (NPCs, por sus siglas en inglés “neuronal precursor cells”) (Tang y Illes, 2017). Las NSCs se han aislado de muchas regiones del SNC embrionario, en tanto que las NPCs se han encontrado distribuidas en nichos neurogénicos específicos del cerebro y en la médula espinal. Estos nichos están formados por diversos tipos celulares como astrocitos,

neuronas, así como por células de vasos sanguíneos, y crean un ambiente apropiado para regular las funciones de las células troncales indiferenciadas y quiescentes. En el SNC de sujetos adultos, las NPCs son multipotentes (tienen la capacidad de diferenciar en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) y auto-renuevan indefinidamente su población (Ellis et al., 2004; Tang y Illes, 2017).

1.2. *Distribución de las NPCs en el neuroepitelio olfatorio*

El órgano sensorial olfatorio de los vertebrados está formado por un neuroepitelio especializado formado principalmente por tres tipos celulares: las neuronas sensoriales olfatorias (OSNs de sus siglas en inglés “olfactory sensory neurons”), las cuales transmiten la información olfatoria desde la cavidad nasal a los bulbos olfatorios localizados en el cerebro; las células sustentaculares, que comparten algunas propiedades con las células epiteliales y gliales; y las células basales, las cuales son NPCs multipotentes que mantienen la capacidad regenerativa del epitelio olfatorio a lo largo de toda la vida (Gayle y Burnstock, 2005).

Estas células troncales del neuroepitelio olfatorio proliferan, migran y se diferencian para reemplazar células muertas como las OSN en respuesta a eventos que dañan el epitelio (Child et al., 2018). Las NPCs multipotenciales del epitelio olfatorio humano pueden ser aisladas y propagadas en cultivos celulares, por ello se han planteado como un modelo para estudiar alteraciones a nivel celular en distintas enfermedades (Alizadeh et al., 2018). Las NPCs del neuroepitelio olfatorio se caracterizan por

expresar marcadores específicos como las proteínas nestina, musashi-1, SOX-2, B-FABP, Notch y NCAM (Ellis et al., 2004).

1.3. Características generales de la vía purinérgica

El ATP es un nucleótido formado por una base de purina (adenina), una ribosa (β -D-ribofuranosa) y el grupo trifosfato. Su función principal es almacenar energía que se utiliza en las reacciones químicas de la célula. Las moléculas de ATP se generan durante la respiración celular y se catabolizan durante los procesos de biosíntesis, movilidad y la división celular (Gicquel et al., 2017). Aunque el papel del ATP en el metabolismo energético se conoce desde hace mucho tiempo, en la actualidad se sabe que los nucleótidos y los nucleósidos también tienen un papel como señalizadores celulares (Burnstock et al., 2012; Gicquel et al., 2017).

En 1972, el Dr. Geoffrey Burnstock propuso un nuevo papel para el ATP como un neurotransmisor en nervios que no se activan ni con adrenalina ni con acetilcolina en el intestino y la vejiga. Ahora se sabe que el ATP así como otros metabolitos derivados de este nucleótido, tales como el ADP, la adenosina, el UTP y el UDP, regulan un amplio rango de procesos fisiológicos, que incluyen la comunicación intercelular (neurotransmisión), la extensión de neuritas, la proliferación, migración y diferenciación celular así como la apoptosis en tejidos tan diversos como la piel, el músculo esquelético, los huesos, el sistema inmune, el SNC y el sistema nervioso autónomo (Burnstock, 1972; Magni y Ceruti, 2013; Cieślak et al., 2018). Tras la evidencia que documentó el papel del ATP y sus nucleótidos derivados como

neurotransmisores, se desarrolló el concepto de señalización purinérgica (Huang et al., 2019). Incluso, se demostró que estos nucleótidos se unen a receptores membranales de distinto tipo denominados receptores purinérgicos (Gicquel et al., 2017).

1.4. Clasificación de los receptores purinérgicos

La señalización purinérgica se activa por nucleótidos y nucleósidos que actúan como ligandos de dos tipos de receptores membranales. Los receptores tipo P1 están acoplados a proteínas G y comprenden 4 subtipos, nombrados A1, A2A, A2B y A3; la adenosina es el ligando de todos estos receptores. Por otro lado, los receptores tipo P2 son activados por distintos nucleótidos (ATP, ADP, UTP, UDP y UDP-glucosa). Estos a su vez son clasificados en dos subtipos agrupados por sus características farmacológicas, estructurales y sus propiedades bioquímicas; los receptores P2Y son metabotrópicos y están acoplados a proteínas G (1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14), mientras que los receptores P2X (1-7) son ionotrópicos (Figura 1) (Burnstock y Kennedy, 1985; Ribeiro et al., 2018; Cieślak et al., 2018).

Tanto los receptores P2X y P2Y se distribuyen en todas las células del SNC, como neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, microglía y las células endoteliales (Burnstock y Kennedy 1985; Abbrachio y Burnstock 1994; Gicquel et al., 2017; Cieślak y Wojtczak, 2018). La familia de los receptores ionotrópicos P2X son canales iónicos transmembranales permeables a Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} . Estos receptores tienen dos dominios transmembranales hidrofóbicos (M1 y M2) separados por un ectodominio que consta

de un sitio de unión a ATP, así como de regiones intracelulares N-terminal y C-terminal, y un sitio de unión a cinasas. La activación de su dominio extracelular requiere de la unión de al menos tres moléculas de ATP, el cual es considerado su único ligando fisiológico (Burnstock, 2007; Gicquel et al., 2017; Ribeiro et al., 2018).

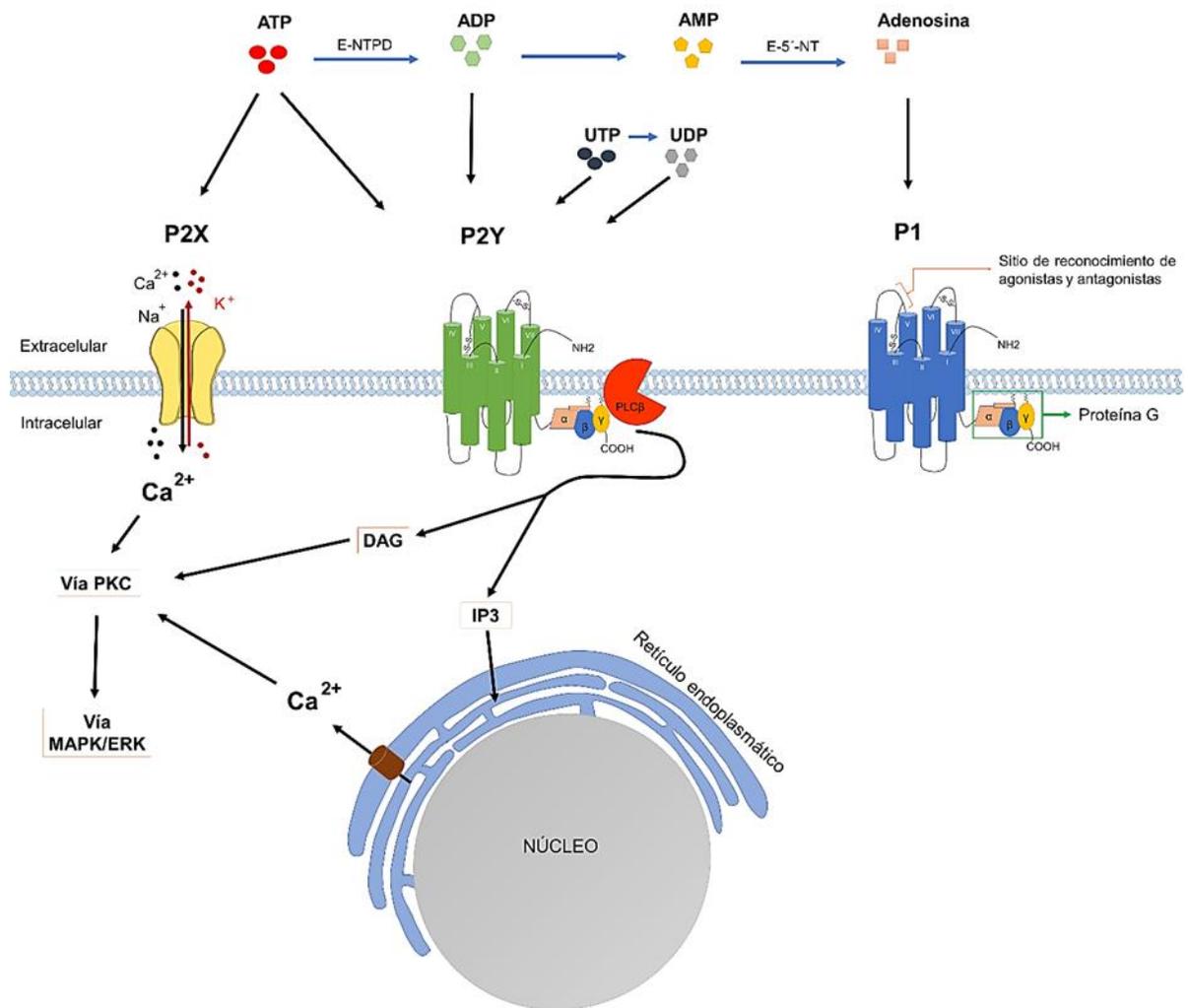


Figura 1. Representación esquemática de la señalización purinérgica. Los receptores P2X son canales iónicos homo o heterotriméricos; su unión con ATP induce la apertura del poro mediante un cambio conformacional que permite la entrada de Na^+ y Ca^{2+} y la salida de K^+ . Los purinoceptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G, los cuales tienen siete dominios transmembranales; la unión con su ligando (ATP, ADP, UTP o UDP) activa diferentes vías de señalización (P2Y1, 2, 4, 6, 11) con G_q/G_{11} , P2Y11 con G_s y P2Y12, 13, 14 con G_i/G_o .

Los receptores P2X existen como homotrómeros o heterómeros y son funcionales únicamente cuando las tres subunidades están unidas. La actividad de los receptores P2X puede también ser regulada por pH, ciertos xenobióticos y por iones (Khakh et al., 1999; Gicquel et al., 2017).

Los purinoceptores P2Y son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Esta familia se divide en ocho subtipos (P2Y1, 2, 4, 6, y 11-14), los cuales pueden ser activados por varias purinas, difosfatos de pirimidinas, o nucleótidos trifosfatos. Todos estos receptores tienen características estructurales similares: un extremo N-terminal extracelular, un extremo C-terminal intracelular, siete regiones transmembrana hidrofóbicas, tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. Sus sitios de unión se han encontrado entre los dominios transmembranales sexto y séptimo (Ralevic y Burnstock 1998; Gayle y Burnstock 2005; Huang et al., 2019).

La farmacología de los P2Y es compleja debido a que estos receptores tienen una amplia variedad de ubicaciones celulares y tisulares, además de muchos ligandos diferentes (ATP, ADP, UTP, UDP, glucosa, etc.) (Gicquel et al., 2017). La activación de las proteínas G por los receptores P2Y induce una gran variedad de efectos biológicos, debido a la posterior activación de diferentes efectores, incluyendo MAP cinasas (MAPK), Rho-cinasa, fosfolipasa A2, óxido nítrico, transactivación de receptores de factores de crecimiento y muchos otros (Magni y Ceruti, 2013).

En las células gliales radiales, la activación de los receptores purinérgicos metabotrópicos inducida por ATP, en su mayoría de receptores P2Y1, induce el incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico; esta activación sincroniza el ciclo celular y la migración de NSCs para la formación de las capas corticales (Ulrich et al., 2012; Ribeiro et al., 2018). Además, se ha demostrado que muchos de estos receptores regulan el funcionamiento de distintos tipos de canales iónicos en las neuronas maduras. Por ejemplo, el receptor P2Y1 sensible a ADP modula la inhibición de canales de potasio Kv_7 , de canales K_2P , canales de Ca^{2+} $\text{Cav}_{2.2}$ y de los receptores de glutamato NMDA, así como la apertura de canales de potasio KCa_2 . La activación de receptores P2Y2 conduce a la apertura de KCa_3 , CFTR, canales de Cl^- activados por Ca^{2+} y a una reducción en la corriente del receptor NMDA. Por su parte, los receptores P2Y12 están involucrados en la inhibición de canales de Ca^{2+} y canales K_2P por ADP (Gafar et al., 2016).

1.5. Los receptores purinérgicos y el desarrollo neuronal

Los receptores P2Y se acoplan a una variedad de proteínas G y estimulan diversas vías de señalización intracelular que participan en la regulación del desarrollo del SNC. Se ha observado que el receptor P2Y2, que se acopla a G_q , puede ser activado equipotencialmente por los nucleótidos ATP y UTP. La activación del P2Y2 aumenta la migración microglial a través de la interacción del motivo Arg-Gly-Asp (RGD) del receptor con las integrinas $\alpha\beta_3/5$ y la proteína asociada a la integrina CD47 (Magni y Ceruti, 2013; Liao et al., 2007).

En el cultivo de neuroesferas obtenidas de la zona subventricular (SVZ) se ha observado que la activación del receptor P2Y1 evoca un incremento transitorio de Ca^{2+} , con lo que aumenta la tasa de proliferación celular en presencia del factor de crecimiento epidermal y de FGF2. Curiosamente, la proliferación aumenta cuando se aplican conjuntamente agonistas de los receptores P2Y1 y P2Y2 (Mishra et al., 2006). La activación del receptor P2Y2 acoplado a proteína G mediante 5'-O-(3-tio) trifosfato (ATP γ S) en presencia del factor de crecimiento nervioso conduce a la colocalización y asociación de los receptores de tirosina cinasa A y P2Y2, el cual es un mecanismo necesario para una mayor diferenciación neuronal (Arthur et al., 2005). Adicionalmente, se encontró que la activación de los receptores P2Y4 en las células troncales embrionarias induce una mayor proporción de neuronas que expresan el transportador de glutamato vesicular (vGluT), un marcador de las neuronas glutamatérgicas. Estos resultados indican que la neurotransmisión purinérgica participa también en la diferenciación neuronal (Uda et al., 2016).

El desarrollo adecuado del cerebro implica que los procesos de proliferación, diferenciación y migración de los precursores neuronales se lleven a cabo de modo eficiente. Los defectos en los procesos del desarrollo temprano contribuyen con la aparición de diversas enfermedades psiquiátricas tales como la esquizofrenia, el trastorno de espectro autista, la depresión mayor y el trastorno bipolar, entre otras (Wilkinson et al., 2019; Courchesne et al., 2019).

2. Antecedentes

Los receptores purinérgicos se han identificado en sistemas sensoriales que incluyen el ojo, el oído interno, la lengua y la piel. Sin embargo, solo pocos estudios se han enfocado en el epitelio olfatorio, aunque se conocen los subtipos de purinoceptores localizados en los tipos de tejidos presentes en la cavidad nasal de la rata (Vodyanoy y Vodyanoy, 1987; Gayle y Burnstock, 2005). Asimismo, se sabe que la neuroglia y las neuronas contienen diferentes combinaciones de receptores purinérgicos, los cuales contribuyen con la regulación versátil de los procesos fisiopatológicos del sistema nervioso central (SNC) y en el control de la neurogénesis de humanos adultos (Cieślak et al., 2018; Ribeiro et al., 2018).

Estudios previos indican que el cultivo de las células multipotenciales del epitelio olfatorio humano (hOE) permiten conocer diversos procesos celulares dependientes de la señalización de Ca^{2+} activada por la señalización purinérgica en células de estirpe neuronal (Solís-Chagoyán et al., 2019). En estas células cultivadas y obtenidas de humano se ha observado que los receptores purinérgicos metabotrópicos se activan preferencialmente para incrementar la concentración citosólica de Ca^{2+} y con este efecto generan la exocitosis de moléculas de las que no se ha determinado su identidad química (Solís-Chagoyán et al., 2019).

La activación de los purinoceptores P2Y en células de la glía radial en modelos animales permite que las neuronas diferenciadas *de novo* se dirijan a los sitios de destino al parecer a través de la activación de los receptores P2Y1, P2Y2 y P2Y13.

Además, el ATP induce la proliferación de NSCs mediante la generación y propagación de ondas de Ca^{2+} (Ribeiro et al., 2018). Estos datos sugieren que esos receptores purinérgicos metabotrópicos modulan diversas funciones del desarrollo neuronal a través del incremento de Ca^{2+} citosólico. Sin embargo, se desconoce si las células precursoras neuronales obtenidas del hOE expresan los receptores purinérgicos P2Y2 y P2Y4 y cómo es su señalización.

3. Justificación

En la búsqueda de modelos experimentales más adecuados en humanos vivos, se desarrolló un procedimiento no invasivo para obtener células del epitelio olfatorio humano. El cultivo de estas células permitió caracterizar la vía purinérgica activada por ATP en el humano, aunque se desconoce si los receptores P2Y2 y P2Y4 funcionales son expresados específicamente en las células precursoras neuronales con características moleculares de multipotencialidad. Este cultivo celular obtenido de sujetos sanos permitirá caracterizar el funcionamiento de la señalización purinérgica en humanos sanos para que en el futuro sea posible comparar el funcionamiento de esta vía en sujetos diagnosticados con enfermedades neuropsiquiátricas.

4. Pregunta de Investigación

¿Los receptores metabotrópicos P2Y2 y P2Y4 se expresan y son funcionales en células precursoras neuronales con rasgos de multipotencia derivadas del epitelio olfatorio humano?

5. Hipótesis

Los receptores metabotrópicos P2Y2 y P2Y4 funcionales se expresan específicamente en las células precursoras neuronales con rasgos de multipotencialidad derivadas del neuroepitelio olfatorio humano.

6. Objetivos

6.1. *Objetivo general*

Determinar la expresión de los receptores purinérgicos P2Y2 y P2Y4 funcionales en las células precursoras neuronales con rasgos de multipotencialidad obtenidas del epitelio olfatorio humano.

6.2. *Objetivos particulares*

- Determinar que el cultivo celular obtenido por clonación está formado predominantemente por las células precursoras con rasgos específicos de multipotencialidad.
- Determinar que los receptores purinérgicos P2Y2 y P2Y4 se expresan en las células precursoras neuronales del epitelio olfatorio.
- Determinar que los receptores purinérgicos expresados en las células precursoras neuronales son funcionales.

7. Materiales y métodos

7.1. *Aislamiento de células precursoras neuronales olfativas humanas (hONPC)*

Este estudio se llevó a cabo con cultivos criopreservados que se almacenan en el Banco Celular del Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Las muestras del epitelio olfatorio se obtuvieron de acuerdo con la declaración de Helsinki para la investigación que involucra humanos, además los sujetos firmaron una carta de consentimiento informado. Los protocolos experimentales fueron previamente aprobados por el Comité Institucional de Bioética (Clave del protocolo: CEI/C/022/2020).

Las células del cultivo primario heterogéneo se obtuvieron del hOE por exfoliación de la cavidad nasal (Figura 2), mediante el protocolo descrito en detalle por el grupo de la

Dra. Gloria Benítez (Benítez-King et al., 2011). Brevemente, las células se obtuvieron con un cepillo interdental y se disociaron mecánicamente en medio Duplecco's modified Eagle medium/nutrient mixture F-12 (DMEM/F12), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina y 1% (v/v) de estreptomicina-penicilina. Las células disociadas se sembraron en cajas de 4 pozos y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta que el cultivo alcanzó confluencia. Los cultivos se resembraron en botellas con área mayor para obtener subcultivos en distintos pasajes. Estos subcultivos se criopreservaron sumergidas en nitrógeno líquido en medio DMEM suplementado y 8% de DMSO.

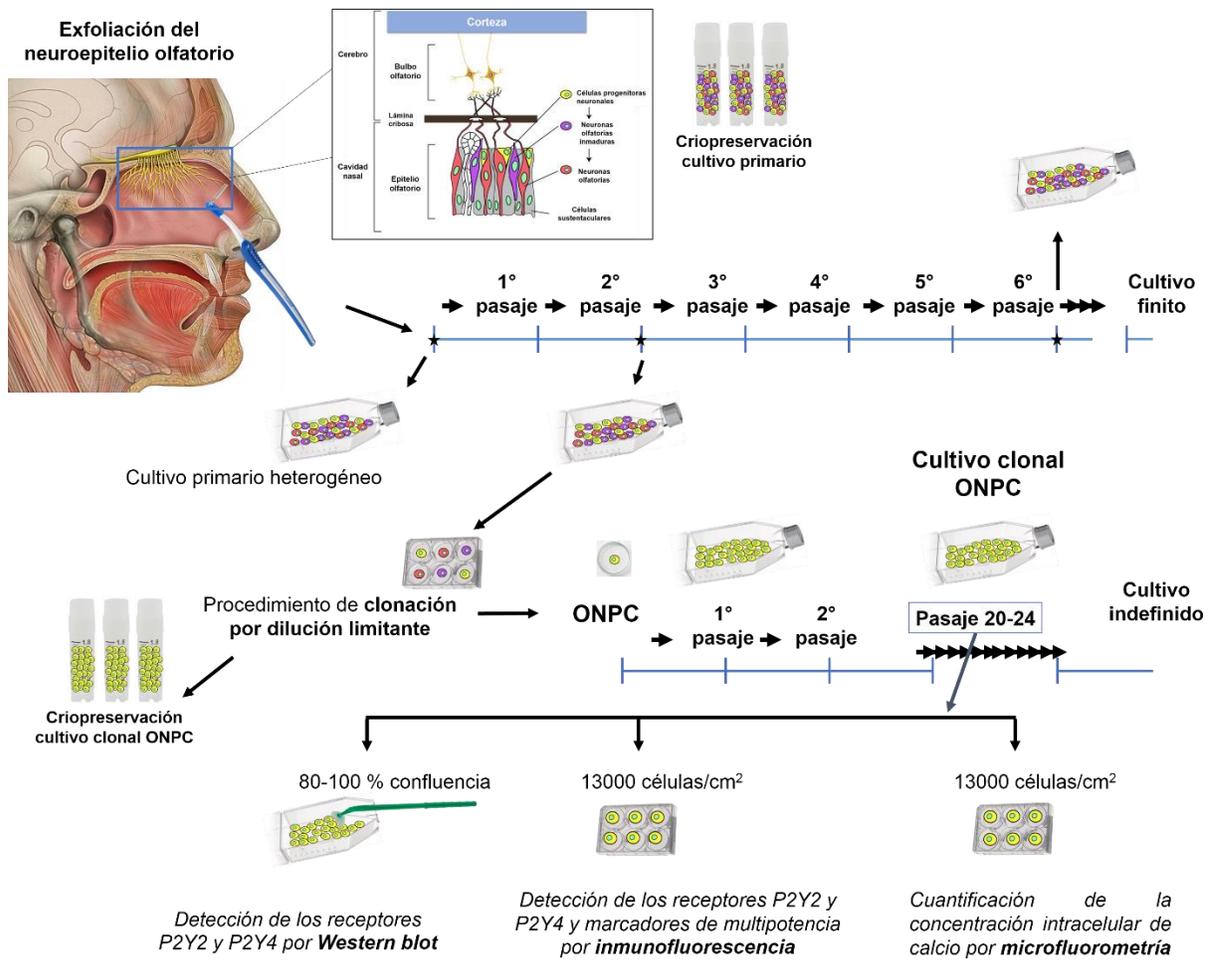


Figura 2. Esquema que representa el procedimiento para obtener los cultivos celulares de hONPC. Las células de los cultivos primarios del epitelio olfatorio se obtuvieron por exfoliación de la cavidad nasal y se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado a 37°C y 5% de CO₂. El cultivo clonal de las hONPC se obtuvo a través del procedimiento de dilución limitante. En el esquema se indica la estrategia experimental y la cantidad de células requerida para cada tipo de experimento. Abreviaturas: ONPC= Células precursoras neuronales olfatorias.

7.2. Cultivo selectivo de células precursoras neuronales del epitelio olfatorio

La obtención y el aislamiento del cultivo clonal de hONPC se realizó mediante el método de dilución limitante descrito por (Solís-Chagoyán et al., 2019). Brevemente, las células de los subcultivos primarios se descongelaron en el tercer pasaje y se

cultivaron en cajas de 96 pozos en una densidad de 1 célula/pozo. Los subcultivos derivados de una sola célula se propagaron hasta el pasaje 60; los subcultivos derivados de este ensayo también se criopreservaron en nitrógeno líquido en medio DMEM/F12 suplementado y con 8% de DMSO. Este procedimiento de dilución celular asegura que los cultivos contengan una población clonal homogénea de células multipotenciales derivadas de una célula (hONPC) con respuestas similares. Las células hONPC utilizadas para los experimentos de este trabajo se descongelaron en pasajes 20-25 y se cultivaron con medio DMEM/F12 suplementado a 37°C y 5% de CO₂.

7.3. Detección de proteínas por inmunofluorescencia

Las células se sembraron en una densidad de 13000 células/pozo en cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro en cajas de cuatro pozos y se mantuvieron en cultivo durante tres días con temperatura y CO₂ controlados. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, se permeabilizaron con PBS-Tween-20 al 0.2% (v/v) durante 30 min y se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% (p/v) durante 1 hora con la finalidad de evitar la unión inespecífica de proteínas. Los anticuerpos primarios y secundarios se titularon para determinar sus concentraciones óptimas para detectar proteínas indicadoras de las células precursoras multipotenciales: SOX-2 (1:60), musashi-1 (1:60) y nestina (1:60) (R&D Systems®, Cat. NC025). Además, se detectaron mediante esta técnica los receptores purinérgicos P2Y2 (1:80; Alomone, APR-010) y P2Y4 (1:150; Alomone, APR-006). Todos los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos secundarios utilizados contra las proteínas de multipotencia fueron: IgG (H+L) cabra anti-conejo, acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 488 1:500, (Invitrogen, Cat. A32723) para nestina, el anticuerpo IgG (H+L) de burro anti-cabra acoplado al fluorocromo DyLight 488 (Invitrogen, Cat. SA5-1086) para SOX-2 y Musashi-1. Los anticuerpos secundarios se diluyeron en PBS-BSA al 1% (p/v) durante 90 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario utilizado contra los receptores purinérgicos fue: Rhodamine TRITC AffiniPure cabra anti-rabbit IgG (H+L) (1:150 para P2Y2 y 1:250 para P2Y4). El anticuerpo secundario se diluyó en PBS-BSA al 1% (p/v) durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Para cuantificar el número total de células se tiñeron los núcleos con 0.150 μ M de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 5 minutos y finalmente las células se colocaron con medio de montaje (PBS-Glicerol, 1:10) para su observación en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TE2000). Las imágenes se capturaron mediante una cámara digital Nikon (modelo DS-Ri2) y el software NIS-Elements AR (versión 4.3). La especificidad de los anticuerpos primarios para los receptores purinérgicos se evaluó mediante la preadsorción de los anticuerpos con los péptidos de bloqueo respectivos y el control de especificidad de los anticuerpos secundarios se realizó al omitir la incubación de los anticuerpos primarios. El control negativo para determinar la especificidad de los anticuerpos primarios para los marcadores de multipotencialidad se realizó en macrófagos de ratón J774A.1 estimulados con LPS durante 24 horas.

7.4. Separación de proteínas por electroforesis unidimensional

Las células se descongelaron y se sembraron en una botella de 75 cm². Cuando el cultivo alcanzó el 80% de confluencia, las células se rasparon con buffer de lisis RIPA que contiene (en mM): 50 Tris (pH 7.4), 0.5 EDTA, 1% Nonidet P40, 1 NaF, 0.5% PMSF, 0.5 Na₃VO₄ y 20 µg/ml de inhibidores de proteínas (aprotinina, pepstatina y leupeptina). La lisis celular fue realizada por sonicación (3 pulsos, 35 Hz, 20 s). La concentración de proteínas totales se determinó mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para la separación de las proteínas se utilizó el método de electroforesis unidimensional de Laemmli con un equipo Miniprotean (Bio-Rad). Para separar las proteínas se cargaron 3, 6 y 9 µg de proteínas totales para detectar los receptores P2Y₄ y 5, 10 y 15 µg para los receptores P2Y₂. Se utilizó un gel separador al 10% (5 ml acrilamida/bis acrilamida, 30/0.8%; 3.75 ml Tris-HCl 1.5 M pH 8.8; 6.1 ml H₂O mili-Q; 0.3 ml SDS 10%; 10 µL TEMED y 100 µL de persulfato de amonio) y un gel concentrador al 4% (1 ml acrilamida/bis acrilamida 30/0.8%; 1.9 ml Tris-HCl 0.5 M pH 6.8; 4.6 ml H₂O mili-Q; 75 µL SDS 10%; 10 µL de TEMED y 50 µL de persulfato de amonio). Las muestras se colocaron en buffer de carga comercial 4X (Laemmli Sample Buffer Cat: 161-0747) y se calentaron a 98°C durante 5 min. Para determinar el peso molecular de las proteínas de las muestras se utilizó una mezcla comercial de proteínas de peso molecular conocido (BioRAD, Cat: 1610374).

7.5. Detección de proteínas por Western blot

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) activadas con metanol con un equipo de transferencia (BioRAD; Trans-Blot® Turbo). Al término de la electro-transferencia el gel transferido se tiñó con azul de Coomassie para corroborar la eficiencia de la transferencia. La membrana se bloqueó por una hora con una solución comercial (Odyssey® Blocking Buffer TBS) para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos con la membrana. Una vez concluido el periodo de bloqueo, la membrana se colocó dentro de una bolsa de plástico y se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios previamente diluidos en la solución bloqueadora: anticuerpo anti-P2Y2 (Alomone, APR-010, 1:750) y anti-P2Y4 (Alomone, APR-006, 1:750). Al día siguiente la membrana se lavó con TBS-T (PBS con 0.1% (v/v) Tween 20) 3 veces durante 10 min para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-rabbit-IgG, 1:50,000 y después la membrana se lavó 3 veces durante 10 min con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Finalmente, la señal quimioluminiscente se produjo con un kit comercial (Millipore, Cat: WBKLS0100). La luz emitida por los estándares de pesos moleculares y los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa se analizó con el sistema de análisis de imágenes BioRAD (Chemi Doc™ MP) y el software Image Lab 6.0.1. La especificidad de los anticuerpos primarios se evaluó mediante la preadsorción de los anticuerpos con los péptidos de

bloqueo respectivos y el control de especificidad de los anticuerpos secundarios se realizó al omitir la incubación de los anticuerpos primarios.

7.6. Cuantificación del Ca^{2+} citosólico por microfluorimetría

Para comparar la respuesta de las precursoras estimuladas con ATP entre las células obtenidas de un sujeto sano y de un paciente con esquizofrenia, se cuantificó la concentración citosólica de Ca^{2+} mediante microfluorimetría. Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio en una densidad de 12000 células/cm² previamente recubiertos con una solución de colágena de cola de rata y se cultivaron por tres días con medio DMEM suplementado.

Las células se incubaron durante 1 h con fura 2-AM 2.5 μ M diluido en el medio de cultivo a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, las células se colocaron en una cámara de perfusión en un microscopio invertido (Diaphot 200, Nikon) y se perfundieron con un flujo de 2-2.5 ml/min con solución de Krebs a 37°C. La solución contenía (en mM): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.6 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 11 glucosa y 2 CaCl₂; el pH se ajustó al airear la solución con carbógeno. La concentración de Ca^{2+} se cuantificó mediante un microfluorómetro (model D-104, Photon Technology International) aplicando estímulos alternados de luz de 340 y 380 nm de longitud de onda y cuantificando la fluorescencia de 510 nm emitida por el fura 2-AM unido al Ca^{2+} . Los estímulos luminosos se aplicaron con una frecuencia de 0.5 Hz y la concentración de Ca^{2+} intracelular se calculó de acuerdo con la fórmula de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985). Se aplicaron dos pulsos de ATP con un periodo inter-estímulo de 15 min.

7.7. Análisis estadístico

El porcentaje de células positivas para las proteínas de multipotencialidad y para los receptores purinérgicos se determinó calculando los porcentajes de las células positivas en cinco campos por triplicado; el 100 % de células en el campo se calculó contando el número total de núcleos. Los datos se graficaron y se representaron como la media \pm el error estándar.

Para comparar la respuesta de las células precursoras estimuladas con ATP, se calculó la diferencia entre la amplitud máxima de cada respuesta menos la media basal $[Ca^{2+}]_i$ de 5 células por grupo. Los datos se graficaron, se representaron como la media \pm el error estándar y se compararon las muestras poblacionales mediante una prueba de t de Student. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism (versión 6.01).

8. Resultados

8.1. Expresión de los marcadores específicos de multipotencialidad

Para determinar si las células precursoras neuronales derivadas del epitelio olfatorio exhiben características de células troncales multipotentes (MpSC) se detectaron por inmunofluorescencia tres marcadores que se expresan específicamente en este tipo de células indiferenciadas (Figura 3). La nestina es una proteína que forma los filamentos intermedios (IFs) y se expresa durante las primeras etapas del desarrollo

en el SNC; Musashi-1 es una proteína de unión a ARN que contiene motivos típicos de reconocimiento de ARN (RRMs) y es responsable de la división asimétrica de las células precursoras de los órganos sensoriales; SOX-2 es un factor de transcripción de caja HMG que se expresa a lo largo de la embriogénesis específicamente en progenitores neuronales del SNC. La expresión de nestina (Figura 3 A1), musashi-1 (Figura 3 B1) y SOX-2 (Figura 3 C1) en el 100% de las células sugiere que el cultivo clonal de NPCs derivadas del epitelio olfatorio humano está formado por células con características moleculares de precursores multipotenciales.

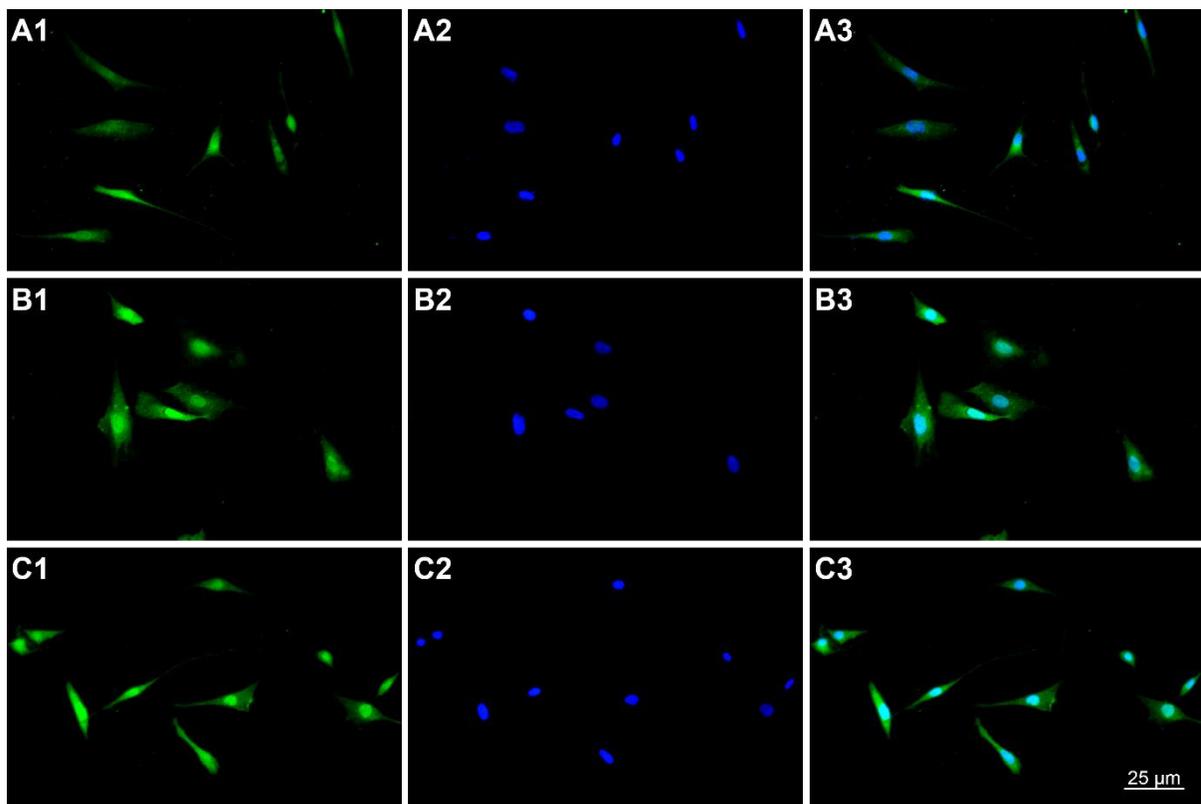


Figura 3. Determinación de la multipotencialidad de las NPCs. Las ONPCs exhiben características de células troncales multipotenciales al expresar nestina (A1-A3), musashi-1 (B1-B3) y SOX-2 (C1-C3). El 100% de las células expresan los tres marcadores de multipotencia. A2, B2 y C2; núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala: 25 μ m.

El control negativo para determinar la especificidad de los anticuerpos primarios para los marcadores de multipotencialidad se realizó en macrófagos de ratón J774A.1 previamente estimulados con LPS (Figura 4). Los resultados muestran que estas células no se tiñeron con los anticuerpos dirigidos contra musashi-1 (Figura 4 B1) ni SOX-2 (Figura 4 C1), y la tinción fue casi nula con el anticuerpo contra nestina (Figura 3 A1). Esto sugiere que los anticuerpos primarios utilizados son específicos en la detección de marcadores moleculares de las células multipotenciales.

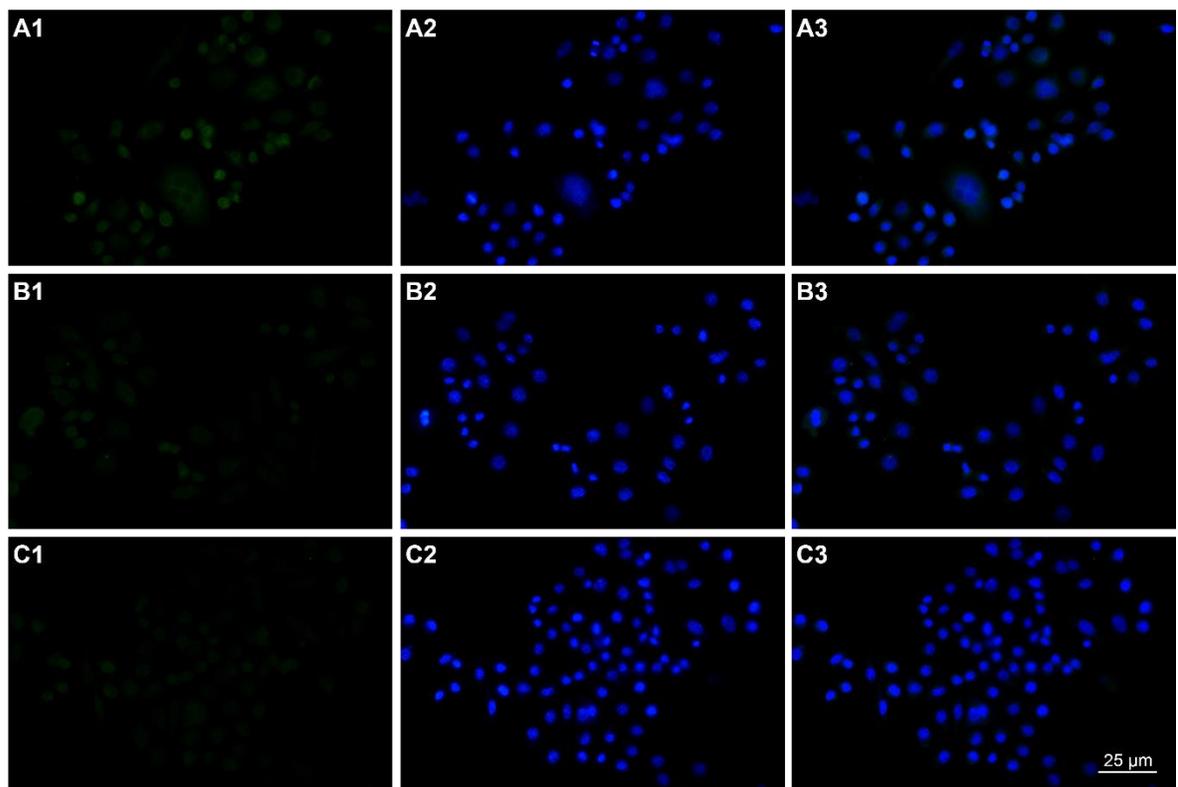


Figura 4. Especificidad de los anticuerpos primarios para detectar los marcadores de rasgo celular. Los controles negativos para la detección de marcadores de multipotencia se realizaron en macrófagos J774A.1. Estas células se diferenciaron con un estímulo de LPS durante 24 h. Como se observa en las tinciones de Nestina (A1), musashi-1 (B1) y SOX-2 (C1) no se detectó en los macrófagos ninguno de los tres marcadores de rasgo que expresan de modo específico las células multipotentes. A2, B2 y C2; núcleos teñidos con DAPI. Los paneles A3, B3 y C3 muestran los empalmes de A1 y A2; B1 y B2; y C1 y C2, respectivamente. Barra de escala: 25 μm .

8.2. Expresión de los receptores purinérgicos P2Y2 y P2Y4

Los receptores purinérgicos P2 son unos de los primeros receptores membranales activos en las células embrionarias durante la gastrulación; en esta etapa, el ATP causa un incremento en las concentraciones de inositol trifosfato y del Ca^{2+} citosólico, lo que sugiere que los receptores activos son metabotrópicos. Por lo anterior, se exploró en un cultivo clonal de NPCs la expresión de los receptores metabotrópicos P2Y2 y P2Y4 en las células precursoras neuronales del epitelio olfatorio mediante el método de inmunofluorescencia. En el cultivo clonal de ONPCs se observó que casi el 100% de las células fueron positivas al marcaje con los anticuerpos anti-P2Y2 y anti-P2Y4 (Figura 5).

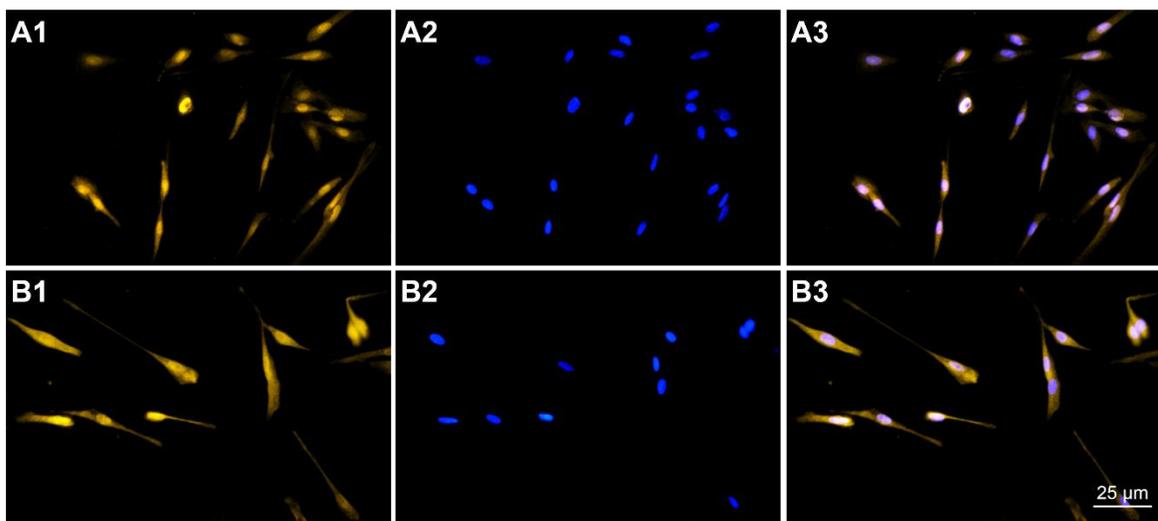


Figura 5. Expresión de los purinoceptores P2Y2 y P2Y4 en ONPCs. A2 y B2) núcleos teñidos con DAPI 0.15 μM , A1) expresión de los receptores P2Y2, B1) expresión de los receptores P2Y4, los paneles A3 y B3 representan el empalme de A1-A2 y B1-B2, respectivamente. Barra de escala: 25 μm .

Para corroborar la especificidad de los anticuerpos que se utilizaron en las inmunofluorescencias, los anticuerpos primarios se preadsorbieron con los respectivos péptidos de bloqueo: P2Y2 (Figura 6A1-A3) y P2Y4 (Figura 6B1-B3). Además, se omitió la incubación de las células con los anticuerpos primarios (Figura 6C1-C3). La ausencia de fluorescencia en los tres casos sugiere que los anticuerpos utilizados se unen de modo específico a su epítipo, los primarios a los receptores purinérgicos y el secundario a los primarios.

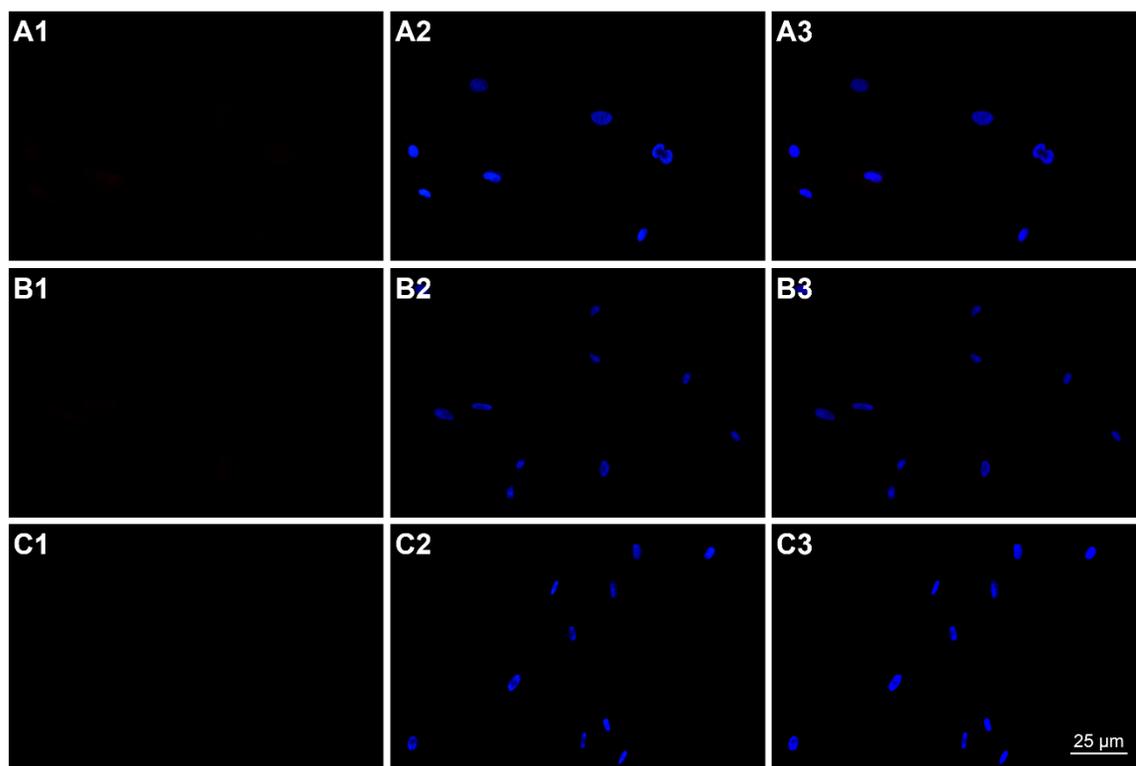


Figura 6. Controles negativos de la detección de purinoceptores en ONPCs. Preadsorción del péptido de bloqueo con el anticuerpo primario anti-P2Y2 (A1-A3); preadsorción del péptido de bloqueo para el anticuerpo primario anti-P2Y4 (B1-B3); omisión de los anticuerpos primarios P2Y2 y P2Y4 (C1-C3). Los núcleos son teñidos con DAPI (A2, B2 y C2). Barra de escala: 25 µm.

Como un control adicional de la especificidad de los anticuerpos primarios para detectar los receptores purinérgicos, se detectaron estos receptores por Western blot en homogenados de los cultivos clonales. En estos experimentos se observó una sola banda de 37 kDa o 49 kDa para los receptores P2Y2 y P2Y4, respectivamente (Figura 7). Esos pesos moleculares calculados fueron consistentes con los valores esperados.

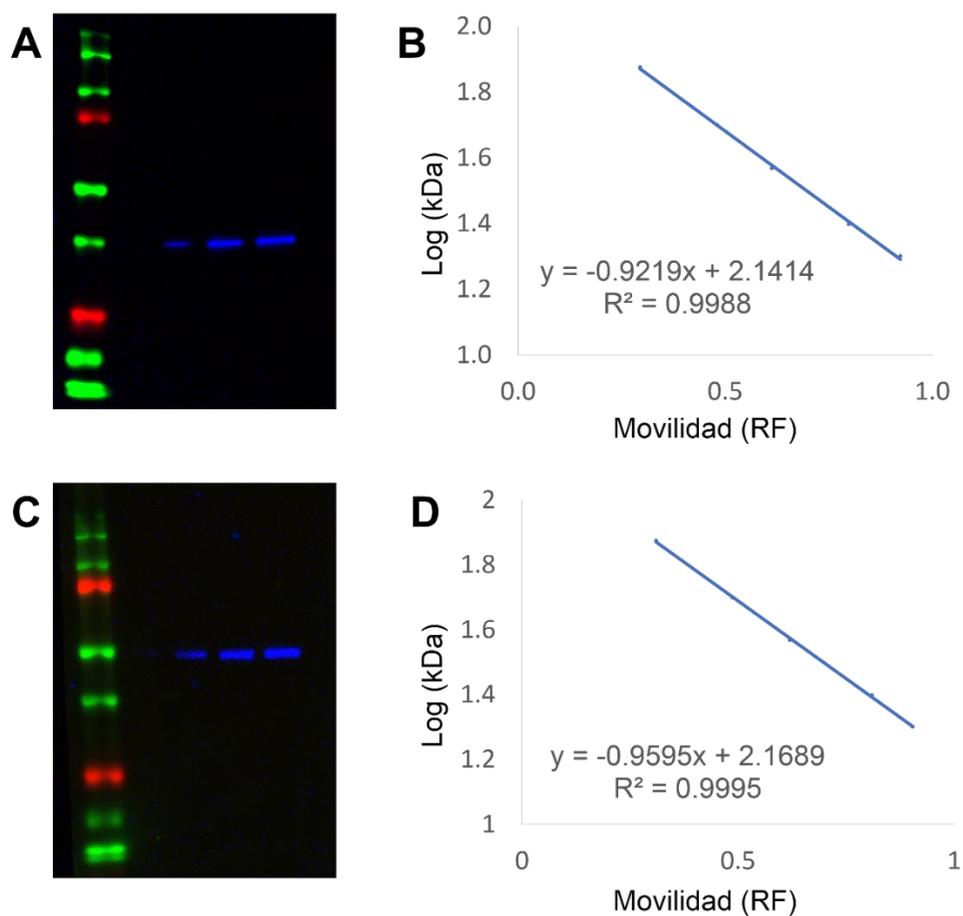


Figura 7. Detección de los receptores P2Y2 y P2Y4 en NPCs. Cuando el cultivo clonal alcanza el 80% de confluencia se raspa con buffer RIPA y se detecta la expresión de los receptores P2Y2 (A) y P2Y4 (C) en las células lisadas mediante Western blot. Los pesos moleculares de las bandas son determinados mediante un modelo matemático al calcular la migración en un gel SDS-PAGE al 10%, el promedio corresponde a cuatro repeticiones por receptor (B y D).

Además, se realizó un ensayo de preadsorción y se omitió la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios sin que en ninguno de los casos se detectara quimioluminiscencia (Figura 8). Esta ausencia en la señal sugiere que tanto los anticuerpos primarios como el secundario se unen específicamente a sus epítopes.

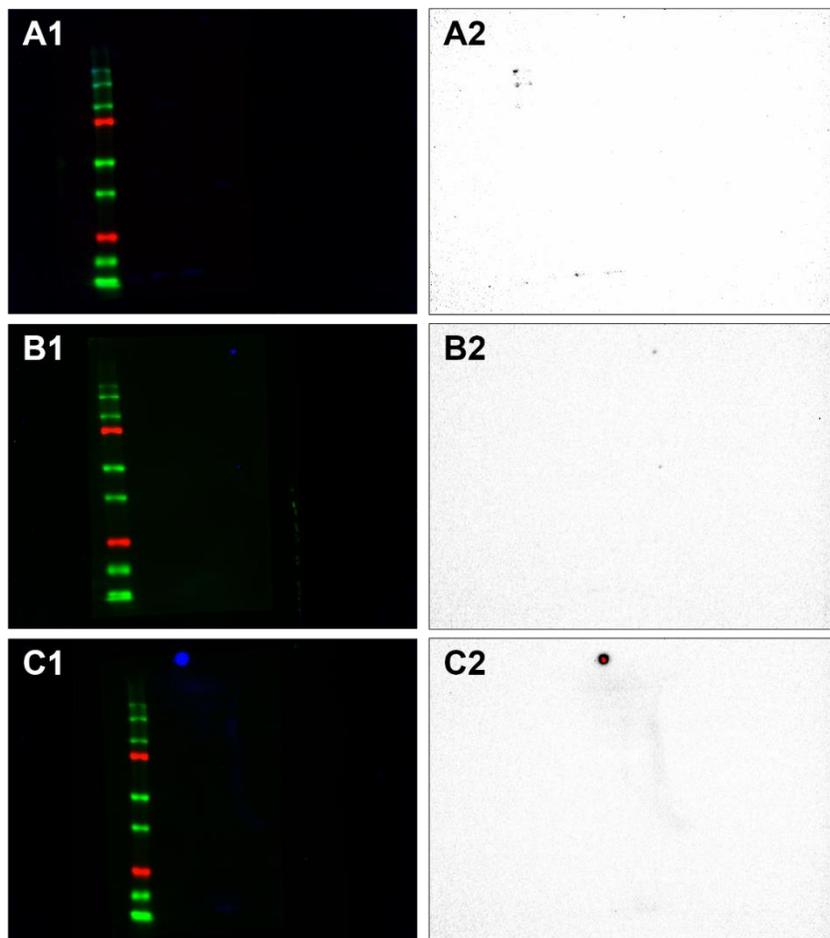


Figura 8. Controles negativos en la detección de los receptores P2Y2 y P2Y4 en NPCs. Cuando el cultivo clonal alcanza el 80% de confluencia se raspó con buffer RIPA y se detectó la expresión de los receptores P2Y2 y P2Y4 en las células lisadas mediante Western blot. Controles de especificidad: 1) preadsorción del péptido de bloqueo con el anticuerpo primario anti-P2Y2 (A1 y A2); 2) preadsorción del péptido de bloqueo para el anticuerpo primario anti-P2Y4 (B1 y B2) y; 3) omisión de los anticuerpos primarios P2Y2 y P2Y4 (C1 Y C2).

La expresión de los receptores purinérgicos P2Y2 y P2Y4 en las NPCs derivadas del epitelio olfatorio se determinó mediante una doble inmunofluorescencia. La doble inmunotinción de los marcadores de multipotencia SOX2, musashi-1 y nestina con los receptores P2Y2 (Figura 9) y P2Y4 (Figura 10), demostró la expresión de estos receptores en el total de las células, sugiriendo con ello que el cultivo clonal de NPCs exhibe características de MpSCs y expresa los purinoceptores P2Y2 y P2Y4.

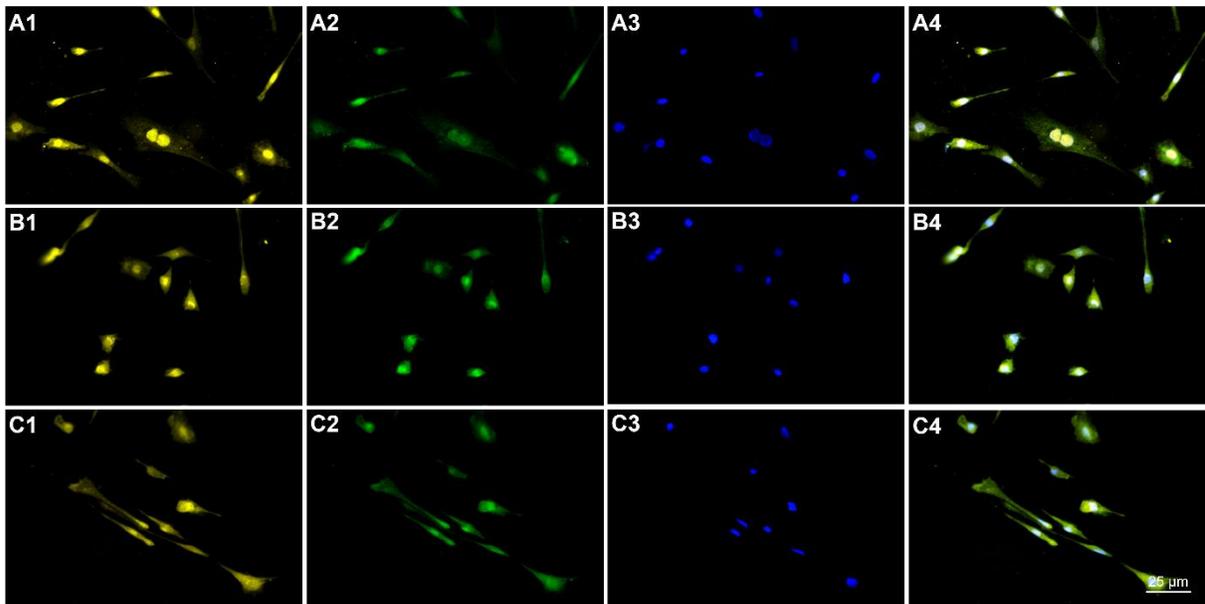


Figura 9. Las células clonales de individuos control co-expresan marcadores de troncalidad y de P2Y2. El doble marcaje de los receptores P2Y2 (A1, B1 y C1) con los marcadores de multipotencia nestina (A2), musashi-1 (B2) y SOX-2 (C2). El conteo de 6 campos por grupo indica que en el 100% de las células expresan el receptor P2Y2 y los marcadores de multipotencia. En A3, B3 y C3 se muestran núcleos teñidos con DAPI. Los paneles A4, B4 y C4 representan los empalmes. Barra de escala: 25 μm .

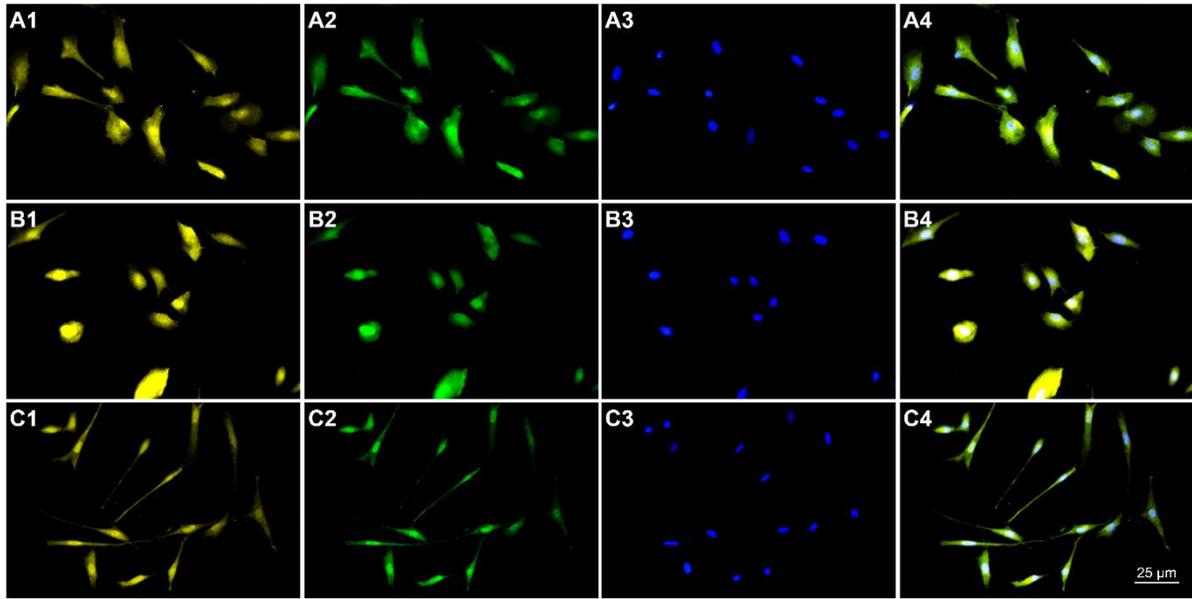


Figura 10. Las células clonales de individuos control co-expresan marcadores de troncalidad y de P2Y4. El doble marcaje de los receptores P2Y4 (A1, B1 y C1) con los marcadores de multipotencia nestina (A2), musashi-1 (B2) y SOX-2 (C2). El conteo de 6 campos por grupo indica que en el 100% de las células expresan el receptor P2Y4 y los marcadores de multipotencia. Los paneles A3, B3 y C3 muestran los núcleos teñidos con DAPI. Los paneles A4, B4 y C4 representan los empalmes. Barra de escala: 25 μm .

8.3. Respuesta de Ca^{2+} estimulada por ATP en células precursoras neuronales

El incremento del Ca^{2+} citosólico activado por ATP en las células precursoras neuronales obtenidas del epitelio olfatorio muestra que los receptores purinérgicos son funcionales; en cada célula se aplicaron dos pulsos de ATP con un periodo interestímulo de 15 min y no se detectaron diferencias entre estas respuestas (Figura 11). Estos resultados sugieren que el efecto de la estimulación con ATP es reproducible y depende de la activación específica de los receptores purinérgicos.

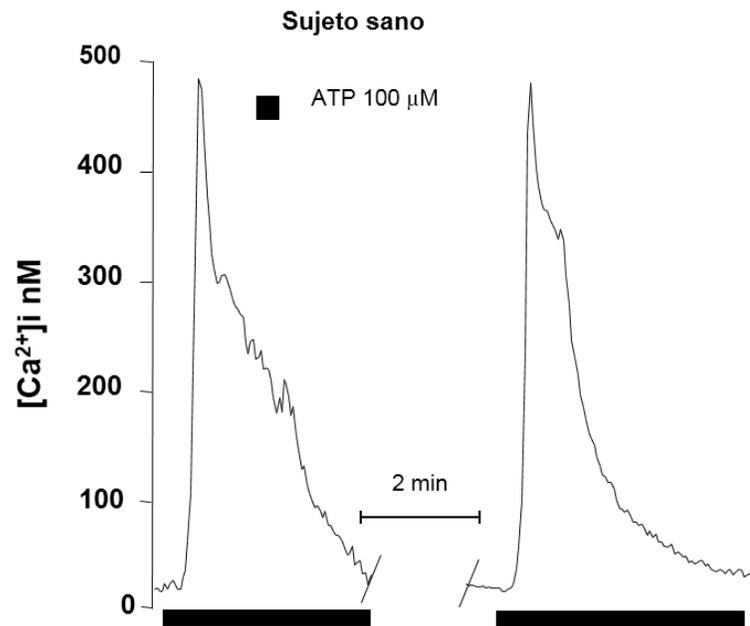


Figura 11. Incremento citosólico del Ca²⁺ en NPCs de un sujeto sano. Las células clonales son cultivadas por tres días para estudiar los cambios en la concentración del Ca²⁺ intracelular mediante microfluorimetría usando un indicador fluorescente (Fura 2-AM). Dos pulsos de ATP son aplicados con un intervalo de 15 minutos entre cada estímulo para determinar la reproducibilidad.

9. Discusión

El epitelio olfatorio es un neuroepitelio pseudoestratificado que contiene varios tipos de células que incluyen las OSN, las células sustentaculares y las células basales. Estas últimas son consideradas células precursoras neuronales y participan en el reemplazo de las OSN que mueren a lo largo de la vida (Calof et al., 1998), así como de la reconstitución de las poblaciones neuronales y no neuronales del epitelio después de una lesión (Scwob et al., 2017).

En el presente estudio se demostró que las células precursoras neuronales derivadas del epitelio olfatorio exhiben características de células troncales multipotenciales ya que expresan marcadores moleculares característicos de multipotencialidad, como nestina, musashi y SOX-2. Nestina es una proteína de los filamentos intermedios (IFs) que se expresa durante las primeras etapas de desarrollo en el SNC y en el tejido miogénico, se ha utilizado ampliamente como marcador de células troncales y precursoras (Pallari et al., 2011). Musashi-1 es una proteína de unión a ARN que contiene motivos típicos de reconocimiento de ARN (RRM) y es responsable de la división asimétrica de las células precursoras de órganos sensoriales; en el sistema nervioso central de mamíferos, Msi1 aparece específicamente en células troncales/precursoras neurales no diferenciadas durante las etapas embrionarias y adultas (Horisawa y Yanagawa, 2012). SOX-2, un miembro de la familia de factores de transcripción SoxB1, es un regulador transcripcional importante en las células troncales pluripotentes (PSCs) (Zhang y Cui, 2014); sin embargo, otros autores señalan que su expresión está restringida a MpSC y está ausente en progenitores comprometidos y en neuronas sensoriales olfatorias (OSN) maduras o inmaduras (Hey et al., 2018). Los resultados de la detección de esas proteínas sugieren que la metodología usada para este trabajo permitió aislar efectivamente las NPCs con características moleculares de MpSCs.

Uno de los primeros sistemas de señalización celular durante el desarrollo embrionario son los receptores purinérgicos (P2X, P2Y y P1), los cuáles se ha visto que participan en la mayoría de los procesos de desarrollo, modulando la fertilización, el desarrollo

embriológico y la diferenciación de varios tipos de tejidos. Adicionalmente, la activación de los receptores P2Y del cerebro promueve la diferenciación neuronal y la síntesis de proteínas (Weissman et al., 2004). En el cerebro se ha evidenciado que receptores P2X y P2Y son expresados en neuronas, células microgliales, astrocitos y células endoteliales. El ligando principal de los receptores P2 es el ATP, el cual se libera en eventos como la neurotransmisión y en condiciones proinflamatorias o apoptóticas (Illes y Ribeiro, 2004; Peterson et al., 2010).

La caracterización de la presencia de los receptores purinérgicos indica que se expresan en la totalidad de las células del cultivo clonal derivado del epitelio olfatorio, donde se aprecia claramente la presencia de los receptores P2Y2 y P2Y4. Estos resultados muestran patrones de expresión similar a los reportados en otros tipos de células troncales, como las células troncales mesenquimales (MSCs) (Jiang et al., 2017), las células troncales/progenitoras derivadas de la médula espinal endimaria (epSPCs) (Gómez-Villafuertes et al., 2015), las células troncales de pulpa dental humana (hDPSCs) (Zang et al., 2019), así como las células troncales neurales (NSCs) (Cavaliere et al., 2015). La expresión alta de los receptores P2Y2 en el asta dorsal de la médula espinal y en los ganglios de la raíz dorsal indica que se establece en el sistema sensorial. Adicionalmente, este subtipo de receptor está presente en la retina e induce la proliferación de NPCs (Cheung et al., 2003; Pearson et al., 2005).

Aunque los resultados cualitativos derivados de la inmunofluorescencia y el western blot no nos permiten hacer una comparación entre la cantidad de proteína exacta de los receptores P2Y2 y P2Y4 en las NPCs, las diferencias observadas son lo

suficientemente evidentes para indicar que P2Y2 tiene una menor expresión en las NPCs que el receptor P2Y4. Estos patrones de expresión son congruentes con los mostrados por Weissman y colaboradores, su investigación *in vivo* mostró que los receptores P2Y1 y P2Y4 se expresan en gran medida en las células en estados embriogénicos tempranos, mientras que la expresión de los receptores P2Y2 y P2Y6 comienza más tarde en ratas, lo que sugiere que las NPCs con características de multipotencialidad tienen una menor expresión de P2Y2 que del receptor P2Y4 (Weissman et al., 2004). Sin embargo, es necesario un análisis cuantitativo para verificar este resultado.

La evidencia de la función basal de los purinoceptores metabotrópicos en células precursoras neuronales obtenidas de sujetos sanos puede constituir la base para la comparación de estudios con NPCs aisladas del epitelio olfatorio de pacientes con diversos trastornos neurodegenerativos. Los receptores P2Y se acoplan a las proteínas G_q , G_i , G_o y G_{12} activando o inactivando o abajo las enzimas PLC y adenilato ciclasa. La activación de los receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y2 y P2Y4 inducida por ATP o UTP promueve ondas de Ca^{2+} intracelular a través de $G_{q/11}/PLC$, lo que conduce a un incremento en IP3 y DAG y aumenta la concentración intracelular de Ca^{2+} y activa PKC, respectivamente (Lustig et al., 1992; von Kugelgen, 2006).

10. Conclusiones

La expresión de las proteínas específicas en las células troncales multipotenciales nestina, musashi-1 y SOX-2 en las NPCs derivadas del epitelio olfatorio humano sugiere que el cultivo está constituido exclusivamente por células con multipotencia. Conjuntamente, las NPCs del cultivo clonal expresa los receptores metabotrópicos P2Y2 y P2Y4, los cuales son funcionales porque inducen el incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol cuando las células son estimuladas con ATP.

11. Perspectivas

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico altamente discapacitante que afecta al 1% de la población mundial. Los síntomas de los pacientes diagnosticados con este trastorno se clasifican dentro de tres categorías: positivos (alucinaciones y delirios), negativos (autismo, alogia y abulia) y síntomas cognitivos. Aunque la etiología de esta enfermedad no ha sido completamente entendida, ciertos factores parecen incrementar el riesgo de desarrollarla; por ejemplo, los factores genéticos, la inflamación, distintos factores ambientales y el abuso de drogas, entre otros, por lo que se le ha considerado como una enfermedad multifactorial. Otras hipótesis sobre esta patología indican que hay una hiperfunción del área dopaminérgica dentro de la corteza cerebral y el área mesocorticolímbica, así como una hipofunción de las aferentes glutamatérgicas (Burnstock et al., 2011). También se ha observado una desregulación en la homeostasis de la adenosina cortical/hipocampal (Singer et al.,

2013), una disminución en la actividad de las neuronas serotoninérgicas (Matsumoto et al., 2005; Kang et al., 2009) y la alteración de distintas proteínas implicadas en la señalización de Ca^{2+} (Scarr y Dean, 2008; Koh, 2013; Guilmatre et al., 2014). La investigación sobre la participación de la señalización purinérgica en la fisiopatología de la esquizofrenia es limitada, principalmente por la falta de modelos experimentales adecuados que permitan estudiar los mecanismos involucrados. Por este motivo se necesita establecer una metodología que permita generar conocimientos conducentes a la contribución de la neurotransmisión purinérgica en las enfermedades psiquiátricas. Tal es el caso del estudio de las células precursoras neuronales obtenidas del epitelio olfatorio.

Al final de este trabajo de maestría se realizaron experimentos preliminares que muestran diferencias significativas en el incremento del Ca^{2+} citosólico activado por ATP en las células precursoras neuronales obtenidas de un participante sano y de un sujeto diagnosticado con EZ (Figura 12). La respuesta en los precursores neuronales del paciente alcanzó menos del 15% de la amplitud respecto del control, lo que sugiere una disfunción de la señalización purinérgica en la EZ. Estos resultados sugieren una alteración en la activación de la vía PLC/IP3/ Ca^{2+} por lo que es necesario estudiar esta vía de señalización en las células precursoras neuronales.

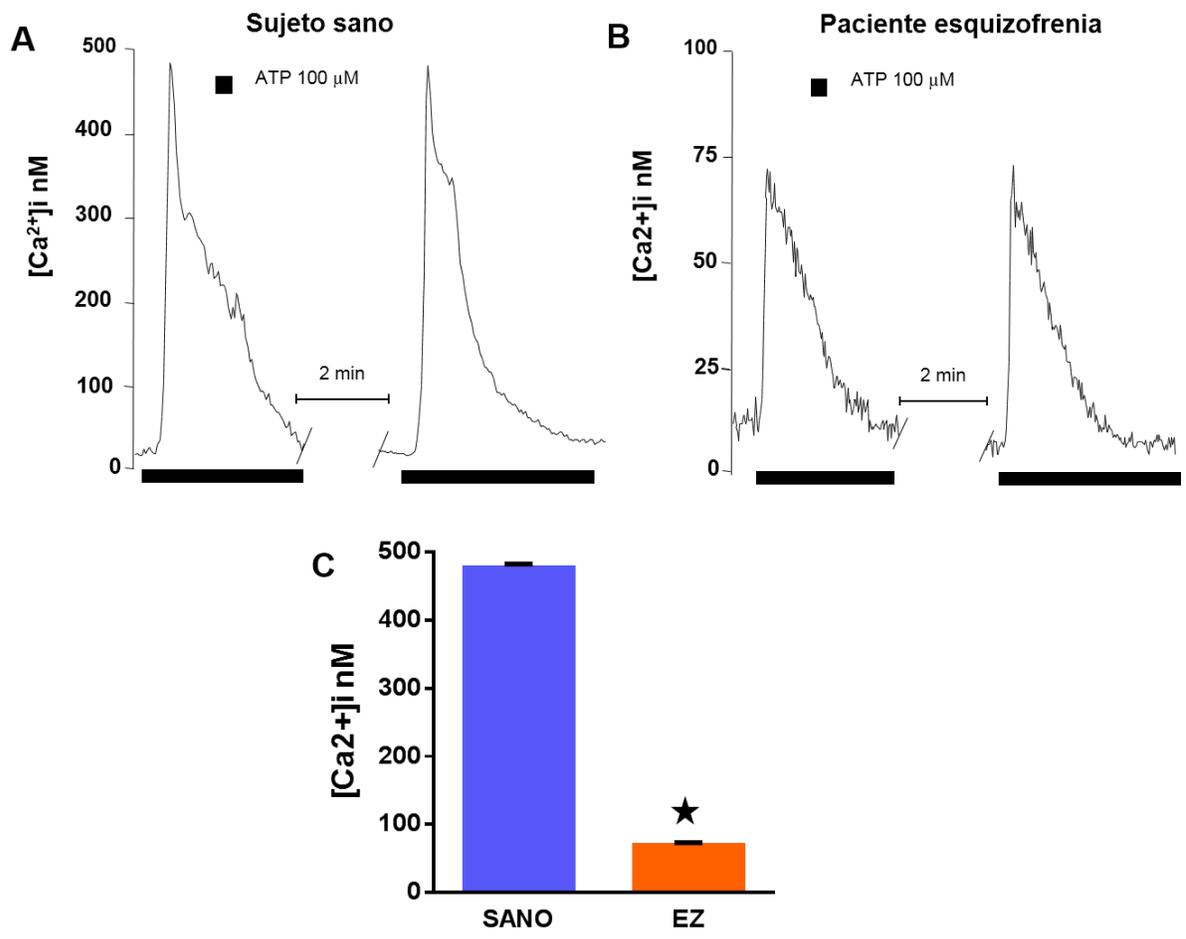


Figura 12. Comparación en el incremento citosólico del Ca²⁺ en NPCs de un sujeto sano contra NPCs de paciente con esquizofrenia. Las células clonales son cultivadas por tres días para estudiar los cambios en la concentración del Ca²⁺ intracelular mediante microfluorimetría usando un indicador fluorescente (Fura 2-AM). Dos pulsos de ATP son aplicados con un intervalo de 2 minutos entre cada estímulo para determinar la reproducibilidad. Los datos se representaron como la media ± el error estándar y se compararon mediante una prueba de t de Student *p<0.001.

12. Referencias

Abbracchio, M. P., & Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?. *Pharmacology & therapeutics*, 64(3), 445-475.

Alizadeh, R., Kamrava, S. K., Bagher, Z., Farhadi, M., Falah, M., Moradi, F., Boroujeni, M. F., Soleimani, A. K., y Komeili, A. (2019). Human olfactory stem cells: As a promising source of dopaminergic neuron-like cells for treatment of Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, 696, 52-59.

Arthur, D. B., Akassoglou, K., y Insel, P. A. (2005). P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(52), 19138-19143.

Benítez-King, G., Riquelme, A., Ortiz-Lopez, L., Berlanga, C., Rodriguez-Verdugo, M. S., Romo, F., Calixto, E. Solís-Chagoyán, H., Jiménez, M., Montaña, L. M. Ramírez-Rodríguez, G., Morales-Mulía, S., y Domínguez-Alonso, A. (2011). A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *Journal of neuroscience methods*, 201(1), 35-45.

Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological reviews*, 24(3), 509-581.

Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences*, 64(12), 1471.

Burnstock, G., Knight, G. E., y Greig, A. V. (2012). Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 526-546.

Burnstock, G., Krügel, U., Abbracchio, M. P., y Illes, P. (2011). Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Progress in neurobiology*, 95(2), 229-274.

Burnstock, G., y Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General Pharmacology: The Vascular System*, 16(5), 433-440.

Calof, A. L., Mumm, J. S., Rim, P. C., y Shou, J. (1998). The neuronal stem cell of the olfactory epithelium. *Journal of neurobiology*, 36(2), 190-205.

Cavaliere, F., Donno, C., y D'Ambrosi, N. (2015). Purinergic signaling: a common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 211.

Cheung, K. K., Ryten, M., & Burnstock, G. (2003). Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 228(2), 254-266.

Child, K. M., Herrick, D. B., Schwob, J. E., Holbrook, E. H., y Jang, W. (2018). The neuroregenerative capacity of olfactory stem cells is not limitless: implications for aging. *Journal of Neuroscience*, 38(31), 6806-6824.

Cieślak, M., Roszek, K., y Wujak, M. (2018). Purinergic implication in amyotrophic lateral sclerosis-from pathological mechanisms to therapeutic perspectives. *Purinergic signalling*, 15(1), 1-15.

Cieślak, M., y Wojtczak, A. (2018). Role of purinergic receptors in the Alzheimer's disease. *Purinergic signalling*, 14(4), 331-344.

Courchesne, E., Pramparo, T., Gazestani, V. H., Lombardo, M. V., Pierce, K., y Lewis, N. E. (2019). The ASD Living Biology: from cell proliferation to clinical phenotype. *Molecular psychiatry*, 24(1), 88-107.

Ellis, P., Fagan, B. M., Magness, S. T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M., y Pevny, L. (2004). SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Developmental neuroscience*, 26(2-4), 148-165.

Gafar, H., Rodriguez, M. D., Chandaka, G. K., Salzer, I., Boehm, S., y Schicker, K. (2016). Membrane coordination of receptors and channels mediating the inhibition of neuronal ion currents by ADP. *Purinergic signalling*, 12(3), 497-507.

Gayle, S., & Burnstock, G. (2005). Immunolocalisation of P2X and P2Y nucleotide receptors in the rat nasal mucosa. *Cell and tissue research*, 319(1), 27-36.

Gicquel, T., Le Daré, B., Boichot, E., & Lagente, V. (2017). Purinergic receptors: new targets for the treatment of gout and fibrosis. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 31(2), 136-146.

Gómez-Villafuertes, R., Rodríguez-Jiménez, F. J., Alastrue-Agudo, A., Stojkovic, M., Miras-Portugal, M. T., y Moreno-Manzano, V. (2015). Purinergic receptors in spinal cord-derived ependymal stem/progenitor cells and their potential role in cell-based therapy for spinal cord injury. *Cell transplantation*, 24(8), 1493-1509.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., y Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of biological chemistry*, 260(6), 3440-3450.

Guilmatre, A., Huguet, G., Delorme, R., y Bourgeron, T. (2014). The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders. *Developmental neurobiology*, 74(2), 113-122.

Hey, C. A., Saltöková, K. B., Bisgaard, H. C., & Møller, L. B. (2018). Comparison of two different culture conditions for derivation of early hiPSC. *Cell biology international*, 42(11), 1467-1473.

Horisawa, K., y Yanagawa, H. (2012). Musashi proteins in neural stem/progenitor cells. In *Neural stem cells and therapy*. IntechOpen.

Huang, L., Otrókoci, L., y Sperlág, B. (2019). Role of P2 receptors in normal brain development and in neurodevelopmental psychiatric disorders. *Brain research bulletin*, 151, 55-64.

Illes, P., & Ribeiro, J. A. (2004). Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *European journal of pharmacology*, 483(1), 5-17.

Jiang, L. H., Hao, Y., Mousawi, F., Peng, H., y Yang, X. (2017). Expression of P2 purinergic receptors in mesenchymal stem cells and their roles in extracellular nucleotide regulation of cell functions. *Journal of cellular physiology*, 232(2), 287-297.

Kang, K., Huang, X. F., Wang, Q., y Deng, C. (2009). Decreased density of serotonin 2A receptors in the superior temporal gyrus in schizophrenia-a postmortem study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(5), 867-871.

Khakh, B. S., Bao, X. R., Labarca, C., y Lester, H. A. (1999). Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nature neuroscience*, 2(4), 322.

Koh, H. Y. (2013). Phospholipase C- β 1 and schizophrenia-related behaviors. *Advances in biological regulation*, 53(3), 242-248.

Liao, Z., Seye, C. I., Weisman, G. A., y Erb, L. (2007). The P2Y2 nucleotide receptor requires interaction with α v integrins to access and activate G12. *Journal of cell science*, 120(9), 1654-1662.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.

Lustig, K. D., Erb, L., Landis, D. M., Hicks-Taylor, C. S., Zhang, X., Sportiello, M. G., & Weisman, G. A. (1992). Mechanisms by which extracellular ATP and UTP stimulate the

release of prostacyclin from bovine pulmonary artery endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1134(1), 61-72.

Magni, G., y Ceruti, S. (2013). P2Y purinergic receptors: new targets for analgesic and antimigraine drugs. *Biochemical pharmacology*, 85(4), 466-477.

Matsumoto, I., Inoue, Y., Iwazaki, T., Pavey, G., y Dean, B. (2005). 5-HT_{2A} and muscarinic receptors in schizophrenia: a postmortem study. *Neuroscience letters*, 379(3), 164-168.

Mishra, S. K., Braun, N., Shukla, V., Füllgrabe, M., Schomerus, C., Korf, H. W., Gachet, C., Ikehara, Y., Sévigny, J., Robson, S. C., y Zimmermann, H. (2006). Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development*, 133(4), 675-684.

Pallari, H. M., Lindqvist, J., Torvaldson, E., Ferraris, S. E., He, T., Sahlgren, C., y Eriksson, J. E. (2011). Nestin as a regulator of Cdk5 in differentiating myoblasts. *Molecular biology of the cell*, 22(9), 1539-1549.

Pearson, R. A., Dale, N., Llaudet, E., & Mobbs, P. (2005). ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron*, 46(5), 731-744.

Peterson, T. S., Camden, J. M., Wang, Y., Seye, C. I., Wood, W. G., Sun, G. Y., Erb, L., Petris, M. J., y Weisman, G. A. (2010). P2Y₂ nucleotide receptor-mediated responses in brain cells. *Molecular neurobiology*, 41(2-3), 356-366.

Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews*, 50(3), 413-492.

Ribeiro, D. E., Glaser, T., Oliveira-Giacomelli, A., y Ulrich, H. (2018). Purinergic receptors in neurogenic processes. *Brain research bulletin*. 151, 3-11.

Scarr, E., y Dean, B. (2008). Muscarinic receptors: do they have a role in the pathology and treatment of schizophrenia?. *Journal of neurochemistry*, 107(5), 1188-1195.

Schwob, J. E., Jang, W., Holbrook, E. H., Lin, B., Herrick, D. B., Peterson, J. N., y Hewitt Coleman, J. (2017). Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *Journal of Comparative Neurology*, 525(4), 1034-1054.

Schwob, J. E., Jang, W., Holbrook, E. H., Lin, B., Herrick, D. B., Peterson, J. N., & Hewitt Coleman, J. (2017). Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *Journal of Comparative Neurology*, 525(4), 1034-1054.

Singer, P., Zhang, C., Boison, D., y Yee, B. K. (2013). Dysregulation of brain adenosine is detrimental to the expression of conditioned freezing but not general Pavlovian learning. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 104, 80-89.

Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadani, S., y Aval, F. S. (2017). Multipotent stem cell and current application. *Acta Medica Iranica*, 55(1), 6-23.

Solís-Chagoyán, H., Flores-Soto, E., Valdés-Tovar, M., Cercós, M. G., Calixto, E., Montaña, L. M., Barajas-López, C., Sommer, B., Aquino-Gálvez, A., Trueta, C., y Benítez-King, G. A. (2019). Purinergic Signaling Pathway in Human Olfactory Neuronal Precursor Cells. *Stem cells international*, 2019.

Tang, Y., y Illes, P. (2017). Regulation of adult neural progenitor cell functions by purinergic signaling. *Glia*, 65(2), 213-230.

Uda, Y., Xu, S., Matsumura, T., y Takei, Y. (2016). P2Y4 nucleotide receptor in neuronal precursors induces glutamatergic subtype markers in their descendant neurons. *Stem cell reports*, 6(4), 474-482.

Vodyanoy, V., & Vodyanoy, I. (1987). ATP and GTP are essential for olfactory response. *Neuroscience letters*, 73(3), 253-258.

von Kugelgen, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Yreceptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* 110, 415–432. doi: 10.1016/j.pharmthera. 2005.08.014.

Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C., y Kriegstein, A. R. (2004). Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, 43(5), 647-661.

Wilkinson, B., Evgrafov, O. V., Zheng, D., Hartel, N., Knowles, J. A., Graham, N. A., Ichida, J. K., y Coba, M. P. (2019). Endogenous cell type–specific Disrupted in Schizophrenia 1 interactomes reveal protein networks associated with neurodevelopmental disorders. *Biological psychiatry*, 85(4), 305-316.

Zhang, S., y Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World journal of stem cells*, 6(3), 305.

Zhang, S., Ye, D., Ma, L., Ren, Y., Dirksen, R. T., y Liu, X. (2019). Purinergic signaling modulates survival/proliferation of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research*, 98(2), 242-249.