

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN CUTÁNEAS:
ANÁLISIS DE SU ORIGEN EMBRIONARIO E IMPLICACIÓN EN EL
DESARROLLO DE NEUROFIBROMAS DÉRMICOS**

Haizea Iribar Lopez

Memoria presentada para optar al grado de Doctor

por la Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea

Departamento de Biología Celular y Fisiología

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Bajo la dirección de los Directores

Ander Izeta Permisan y Araika Gutiérrez Rivera

2018

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia gracias a una ayuda del Programa Predoctoral de Formación de Personal Investigador No Doctor (PRE_2013_1_1068) concedida por el Departamento de Educación, Política Lingüística y Cultura del Gobierno Vasco. Durante este periodo se ha obtenido una ayuda de la European Molecular Biology Organization (EMBO) para realizar una estancia en un centro de investigación extranjero (ASTF 113–2016). El trabajo experimental de la Tesis ha sido financiado con ayudas concedidas por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad [Instituto de Salud Carlos III, PI13/02172], la Diputación Foral de Gipuzkoa (OF98/2012) y el Departamento de Industria del Gobierno Vasco (SAIO-PE12BN010).

ÍNDICE

I. ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	17
RESUMEN	23
INTRODUCCIÓN	27
1. ESTRUCTURA DE LA PIEL	29
1.1 Epidermis	30
1.2 Anejos epidérmicos.....	30
1.2.1 Foliculo Piloso	31
1.2.2 Glándula sebácea.....	33
1.2.3 Glándula sudorípara	33
1.3 Dermis.....	33
1.4 Hipodermis	34
1.4.1 Panículo carnoso.....	35
1.5 Sistema vascular	35
1.6 Sistema nervioso cutáneo.....	38
1.6.1 Sistema nervioso periférico	38
1.6.2 Plexos nerviosos cutáneos.....	40
1.6.3 Inervación autónoma.....	40
1.6.4 Inervación sensitiva	41
1.6.4.1 Inervación sensorial de la piel glabra	42
1.6.4.2 Inervación sensorial de la piel pilosa.....	44
2. ORIGEN EMBRIONARIO DE LA PIEL Y SUS COMPONENTES	45
2.1 Cresta neural.....	45
2.1.1 Especificación de la cresta neural.....	45
2.1.2 Regionalización de la cresta neural	47
2.1.3 Células pre-migratorias y migratorias de la cresta neural.....	48
2.1.4 Células post-migratorias de la cresta neural	49
2.2 Células <i>boundary cap</i>	51
2.3 Las células de Schwann	52
2.3.1 Desarrollo del linaje de Schwann	52
2.3.2 Potencial de las SCP durante el desarrollo.....	54
2.3.3 Mecanismos de regulación de las células de Schwann.....	55
2.3.3.1 Factores que contribuyen a la especificación de la glía periférica.....	55
2.3.3.2 Señales que regulan la supervivencia de las células de Schwann.....	55
2.3.3.3 Proliferación vs diferenciación.....	56
2.3.4 Marcadores de las células del linaje de Schwann	56
2.3.5 Las células de Schwann en la regeneración de nervios periféricos	58
2.4 Somitogenesis.....	61
2.4.1 Especificación y compartimentación de las somitas	61

Índice

2.4.2	Desarrollo temprano de los músculos	63
2.5	Mesodermo de la placa lateral	63
2.6	Origen embrionario de los componentes de la piel.....	64
2.6.1	Formación de la dermis y la epidermis.....	64
2.6.2	Origen embrionario de los precursores dérmicos	65
2.6.3	Origen embrionario de los componentes de la piel	67
3.	TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DEL ORIGEN EMBRIONARIO	68
3.1	Trazado de linaje.....	68
3.2	Recombinación genética.....	68
3.2.1	Sistema Cre-loxP.....	68
4.	MYF5	70
4.1	Expresión de Myf5 durante el desarrollo embrionario	70
4.2	Regulación de la expresión del gen <i>Myf5</i>	71
5.	CONCEPTOS GENERALES SOBRE LAS CÉLULAS MADRE Y PLASTICIDAD CELULAR	72
6.	CÉLULAS MADRE CON POTENCIAL NEURAL DESCRITAS EN LA PIEL	74
6.1	EPI-NCSC	75
6.2	Población Nestina+	76
6.3	SKP	78
6.3.1	Potencial de diferenciación de las SKPs	79
6.3.2	Identidad y origen embrionario de las SKPs	81
6.3.2.1	Identificación de las SKPs	81
6.3.2.2	Origen embrionario de las SKPs	83
7.	SOX2	84
7.1	Sox2 regulador maestro del desarrollo embrionario	84
1.1	Sox2 marcador de células madre adultas.....	87
7.2	Expresión de Sox2 en piel	88
7.2.1	Expresión de Sox2 en la epidermis.....	88
7.2.2	Expresión de Sox2 en la dermis.....	89
7.2.2.1	Expresión de Sox2 en el folículo piloso.....	89
7.3	Desdiferenciación regulada por Sox2 y regeneración	93
8.	NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1.....	94
8.1	Tipos de neurofibromas	95
8.2	Formación de los neurofibromas.....	96
8.2.1	Perdida de heterocigosis (LOH)	96
8.2.2	Célula de origen.....	97
	MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL.....	101
1.	REACTIVOS.....	103
2.	FUNGIBLE	105

3. ANTICUERPOS	106
4. MEDIOS DE CULTIVO	108
4.1 Medio para el mantenimiento de la línea celular estable 804-G.....	108
4.2 Medio para el crecimiento de cultivos primarios.....	108
4.2.1 Medio de disociación (MD).....	108
4.2.2 Medio de proliferación (MP)	108
4.2.3 Medio Basal (MB).....	108
4.2.4 Medio de Joannides (MJ)	108
4.3 Medios para la diferenciación de cultivos primarios	109
4.3.1 Medio de diferenciación glial (Medio de Schwann, MS)	109
4.3.2 Medio de diferenciación neuronal (MN)	109
4.3.3 Medio de diferenciación mesodérmica (MM)	109
5. LÍNEA CELULAR 804-G	109
5.1 Mantenimiento en cultivo de la línea 804-G.....	109
5.2 Preparación de matriz rica en laminina a partir de cultivos de la línea 804-G	110
6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	110
6.1 Metodología para la extracción de ARN	110
6.1.1 miRNeasy® micro y miRNeasy® mini kit	111
6.1.2 RNeasy® Plus micro kit.....	111
6.2 Determinación de la concentración y la integridad del ARN.....	111
6.2.1 NanoDrop® (ND-1000).....	111
6.2.2 Qubit® RNA HS Assay kit	112
6.2.3 RNA 6000 Nano kit.....	112
6.3 Retrotranscripción de muestras de ARN	113
6.4 Pre-amplificación de muestras de ADNc	113
6.5 Análisis de expresión génica por RT-qPCR.....	114
6.5.1 Tecnología TaqMan®.....	115
6.5.2 Tecnología SYBR® Green	116
6.5.3 Cuantificación del producto y análisis de datos	118
6.6 Análisis de expresión con chips de expresión o microarrays	118
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	118
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	121
CAPÍTULO 1	125
1. LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE RATÓN.....	127
2. EXTRACCIÓN, TRANSPORTE Y PROCESADO INICIAL DE MUESTRAS.....	128
3. MUESTRAS PROCESADAS.....	129
4. CULTIVOS CELULARES	132
4.1 Aislamiento y cultivo en suspensión de células derivadas de la piel de ratón	132
4.2 Disgregación de esferas crecidas en los cultivos en suspensión.....	133

Índice

4.3	Diferenciación <i>in vitro</i> de células aisladas de piel ventral de ratón	133
4.3.1	Diferenciación glial.....	133
4.3.2	Diferenciación mesodérmica	134
4.3.3	Diferenciación neuronal.....	134
4.3.4	Cuantificación de la capacidad de diferenciación <i>in vitro</i> de los precursores de piel hacia linaje glial, neuronal y mesodérmico.....	135
5.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	135
5.1	Análisis de expresión génica por RT-qPCR.....	136
5.1.1	Extracción de ARN y retrotranscripción de las muestras	136
5.1.2	Análisis de expresión de genes de linaje de Schwann	137
5.1.3	Análisis de expresión del gen Sox2.....	137
5.2	Análisis de expresión génica con microarrays de expresión	138
5.2.1	Extracción de ARN	138
6.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTÉICA POR INMUNOFLUORESCENCIA	138
6.1	Tinción de tejido completo	138
6.2	Tinción de cortes congelados de piel.....	139
6.3	Inmunofluorescencia de esferas	139
6.4	Tinción de células.....	140
6.5	Caracterización de las tinciones de inmunofluorescencia por microscopia.....	141
7.	CARACTERIZACIÓN Y SEPARACIÓN CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO	141
7.1	Análisis por citometría de flujo	141
7.2	Separación celular por citometría de flujo.....	141
7.3	Estrategia de análisis y separación de las poblaciones EYFP y EGFP	142
1.	ANÁLISIS DEL ORIGEN EMBRIONARIO DE LAS CÉLULAS CON POTENCIAL NEURAL DE LA PIEL UTILIZANDO RATONES TRANSGÉNICOS PARA EL TRAZADO DE LINAJES ESPECÍFICOS	145
1.1	Trazado de linaje en las líneas transgénicas <i>Sox10-Cre</i> y <i>Myf5-Cre^{Sor}</i>	145
1.1.1	Establecimiento de cultivos en suspensión a partir de piel ventral de ratones transgénicos <i>Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}</i> y <i>Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}</i>	145
1.1.2	Análisis de expresión del gen reportero EYFP en los cultivos de esferas derivados de las líneas <i>Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}</i> y <i>Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}</i>	146
1.1.3	Caracterización de la población <i>Myf5+</i> en cultivos derivados de piel ventral de ratones transgénicos <i>Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}</i>	149
1.1.3.1	Caracterización de las células <i>Myf5+</i> en los cultivos de esferas, por inmunofluorescencia.....	149
1.1.3.2	Análisis de expresión de genes del linaje de Schwann en las células <i>Myf5+</i> presentes en los cultivos de esferas	150
1.1.3.3	Diferenciación de las fracciones celulares <i>Myf5+</i> y <i>Myf5-</i> separadas por citometría de flujo	153

1.1.4	Análisis de la localización de las células <i>Myf5-Cre^{Sor}</i> + en piel ventral de ratón	158
1.1.4.1	Músculo panículo carnoso.....	159
1.1.4.2	Plexo nervioso subepidérmico	161
1.1.4.3	Plexo nervioso subepidérmico grueso	163
1.1.4.4	Las células gliales del complejo Lanceolado	166
1.1.4.5	Compartimento superior de la papila dérmica del folículo piloso.....	167
1.1.4.6	Las células <i>Myf5</i> + se encuentran ocasionalmente en localización perivascular	168
1.2	Estudios de trazado de linaje en la línea transgénica <i>BAP195^{cre}</i>	170
1.2.1	Caracterización de la población <i>B195AP</i> + en cultivos derivados de piel ventral de ratones transgénicos <i>B195AP^{CreSor}/R26^{EYFP}</i>	170
1.2.1.1	Análisis de la población <i>B195AP</i> + en el cultivos de esferas por citometría de flujo 170	
1.2.1.2	Diferenciación in vitro de las fracciones celulares separadas por citometría	171
1.2.2	Análisis de la localización de células <i>B195AP</i> + en piel ventral de ratón	174
2.	ANÁLISIS DEL POTENCIAL NEURAL DE LOS PRECURSORES DE PIEL EN RELACIÓN A LA EXPRESIÓN DE SOX2	176
2.1	Aislamiento y cultivo de precursores a partir de piel ventral de ratones transgénicos <i>Sox2^{EGFP}</i> 176	
2.1.1	Caracterización de las células <i>Sox2</i> + en los cultivos de esferas por inmunofluorescencia	176
2.1.2	Diferenciación glial de las fracciones celulares separadas por citometría de flujo en base a la expresión de <i>Sox2</i>	177
2.1.3	Diferenciación neuronal de cultivos derivados de la piel ventral de <i>Sox2^{EGFP}</i>	180
2.1.4	Diferenciación mesodérmica de cultivos derivados de la piel ventral de <i>Sox2^{EGFP}</i>	184
2.2	Análisis de la localización de células <i>Sox2</i> + en piel ventral del ratón <i>Sox2^{EGFP}</i>	185
3.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE SOX2 EN LAS CÉLULAS MYF5+ EN RATONES <i>Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/SOX2^{EGFP}</i>	188
3.1	Análisis de expresión de <i>Myf5</i> y <i>Sox2</i> en la línea triple transgénica <i>Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}</i> por citometría de flujo	188
3.2	Análisis de expresión de <i>Myf5</i> y <i>Sox2</i> en la línea triple transgénica <i>Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}</i> por inmunofluorescencia.....	189
3.3	Análisis de expresión génica utilizando arrays de expresión	191
1.	MUESTRAS CLÍNICAS HUMANAS	199
2.	EXTRACCIÓN, TRANSPORTE Y PROCESADO INICIAL DE MUESTRAS CLÍNICAS	200
3.	MUESTRAS PROCESADAS	200
4.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	202
4.1	Extracción de ARN y retro-transcripción.....	202
4.2	Pre-amplificación y RT-qPCR	202
5.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA POR INMUNOFLORESCENCIA	203

5.1	Tinción de cortes congelados de piel.....	203
5.2	Análisis por microscopía	204
1.	CARACTERIZACIÓN DE NEUROFIBROMAS CUTÁNEOS EN PACIENTES CON NEUROFIBROMATOSIS TIPO1	205
1.1	Selección de expresión de marcadores del linaje de Schwann.....	205
1.1.1	Análisis de expresión de marcadores del linaje de Schwann por RT-qPCR	205
1.1.2	Análisis de expresión de los genes sobre-expresados por inmunofluorescencia..	207
	DISCUSIÓN.....	215
1.	CÉLULAS CON POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN A PROGENIE NEURAL DE LA PIEL VENTRAL DEL RATÓN.....	218
1.1.1	Células precursoras dérmicas adultas (SKP).....	218
1.1.2	Otras poblaciones precursoras con potencial neural descritas en la piel	220
2.	ORIGEN EMBRIONARIO DE LOS PRECURSORES NEURALES DE LA PIEL	222
2.1	Células trazadas por <i>Myf5-Cre^{Sor}</i> : ¿son las <i>boundary cap</i> ?	226
2.2	Células trazadas por <i>Sox2^{EGFP}</i> y los distintos niveles de expresión.....	227
3.	NIVELES DE EXPRESIÓN DE SOX2 Y POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN A PROGENIE NEURAL Y MESODÉRMICA.....	230
4.	RELACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS SOX2+ DE LA DERMIS DEL TRONCO VENTRAL Y LAS CÉLULAS TRAZADAS POR LA LÍNEA TRANSGÉNICA <i>Myf5-Cre^{Sor}</i>	232
5.	FENOTIPO DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN TRAZADAS POR <i>Myf5-Cre^{Sor}</i> EN CULTIVO	233
5.1	Reprogramación de las células de Schwann y reparación	233
5.1	Las células de Schwann se reprograman inducidas por las condiciones del cultivo	235
6.	ORIGEN DE LOS NEUROFIBROMAS DÉRMICOS EN LA NF1	237
6.1	Células de Schwann reprogramadas como origen de los neurofibromas cutáneos	237
6.2	Demostración experimental del origen celular de los NF cutáneos.....	241
	CONCLUSIONES.....	243
	BIBLIOGRAFÍA.....	247
	ANEXO	281

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las fibras nerviosas en base a la velocidad de conducción.....	39
Tabla 2. Mecanorreceptores cutáneos.....	42
Tabla 3. Derivados de la cresta neural craneal y troncal.....	47-48
Tabla 4. Líneas transgénicas de ratón para el trazado de precursores dérmicos.....	66
Tabla 5. Origen embrionario de poblaciones celulares residentes en la piel.....	67
Tabla 6. Reactivos.....	103-104
Tabla 7. Material fungible	105
Tabla 8. Anticuerpos primarios.....	106
Tabla 9. Anticuerpos secundarios	107
Tabla 10. Kits comerciales utilizados para la extracción de RNA.....	110
Tabla 11. Mezcla de compuestos para la reacción de retrotranscripción.....	113
Tabla 12. Programa de termociclado para la reacción de retrotranscripción.....	113
Tabla 13. Mezcla de compuestos para la reacción de preamplificación.....	113
Tabla 14. Programa de termociclado para la reacción de preamplificación.....	114
Tabla 15. Mezcla de compuestos para la reacción de RT-qPCR con sondas TaqMan®.....	114
Tabla 16. Programa de termociclado para la reacción de RT-qPCR con sondas TaqMan®.....	116
Tabla 17. Mezcla de compuestos para la reacción de RT-qPCR con SYBR® Green.....	116
Tabla 18. Programa de termociclado para la reacción de RT-qPCR con SYBR® Green.....	117
Tabla 1.1. Líneas transgénicas de ratón.....	127
Tabla 1.2. Biopsias de piel de líneas transgénicas de ratón.....	129-132
Tabla 1.3. Cebadores utilizados en el análisis de expresión por RT-qPCR	137
Tabla 1.4. Sondas TaqMan® utilizadas en el análisis de expresión por RT-qPCR	138
Tabla 2.1. Biopsias de piel de donantes sanos.....	200
Tabla 2.2. Muestras de neurofibroma y biopsias de piel no afecta de pacientes con NF1	201
Tabla 2.3. Sondas TaqMan® utilizadas en el análisis de expresión por RT-qPCR.....	203
Tabla 2.4. Protocolos utilizados para la fijación y la permeabilización de cortes congelados.....	203
Tabla A1. Genes sobreexpresados en las fracciones Doble+/Sox2+ vs Doble-/Myf5+	283
Tabla A2. Genes infraexpresados en las fracciones Doble+/Sox2+ vs Doble-/Myf5+.....	283

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la piel.....	29
Figura 2. Estructura del folículo piloso.....	32
Figura 3. Distribución del tejido adiposo en la piel humana y de ratón.	35
Figura 4. Estructura anatómica de un vaso sanguíneo.....	36
Figura 5. Sistema vascular cutáneo.....	37
Figura 6. Estructura anatómica de un nervio periférico.....	39
Figura 7. Inervación autónoma de la piel de tronco.....	41
Figura 8. Inervación sensitiva de la piel glabra y pilosa.....	43
Figura 9. Especificación de la cresta neural.....	46
Figura 10. Poblaciones celulares derivadas de células <i>Boundary Cap</i> en la piel de ratón adulto....	51
Figura 11. Desarrollo embrionario de las células de Schwann en ratón.....	53
Figura 12. Marcadores de las células del linaje de Schwann.....	57
Figura 13. Regeneración del nervio periférico.	59
Figura 14. Representación esquemática del desarrollo y la compartimentalización de las somitas	62
Figura 15. Estructura del mesodermo de la placa lateral.....	64
Figura 16. Sistema Cre-loxP.....	70
Figura 17. Modelos de diferenciación, desdiferenciación y transdiferenciación celular.....	74
Figura 18. Localización y métodos de aislamiento de las células HAP-SC a partir de folículos pilosos	77
Figura 19. Expresión de <i>Sox2</i> durante el desarrollo embrionario de ratón.....	88
Figura 20. Expresión de <i>Sox2</i> en la papila dérmica y en la vaina de tejido conectivo del folículo piloso de ratón.....	90
Figura 21. Expresión de <i>Sox2</i> en la piel adulta de ratón.....	92
Figura 22. Estructura anatómica de un fascículo nervioso y un neurofibroma.....	96
Figura 23. Amplificación del ARNm en la reacción de RT-qPCR.....	115
Figura 24. Tecnología Taqman®.....	116
Figura 25. Tecnología SYBR® Green.....	117
Figura 1.1. Ensayos de expresión génica llevados a cabo en el Capítulo 1 de la Tesis.....	136
Figura 1.2. Estrategia de análisis y separación de las poblaciones celulares EYFP+ y EYFP- por citometría de flujo.....	143
Figura 1.3 Estrategia de análisis y separación de las poblaciones celulares EGFP+ por citometría de flujo.	144
Figura 1.4. Cultivo en suspensión de de esferas a partir de piel ventral de la línea transgénica <i>Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}</i>	146
Figura 1.5. Análisis de expresión del reportero EYFP en los cultivos de esferas derivados de las líneas <i>Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}</i> por inmunofluorescencia.....	147

Figura 1.6. Análisis de expresión del reportero EYFP en los cultivos de esferas derivados de las líneas <i>Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}</i> por citometría de flujo.....	148
Figura 1.7. Caracterización de las células EYFP+ en el cultivo de esferas derivado de la línea <i>Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}</i> por inmunofluorescencia.....	150
Figura 1.8. Panel de marcadores del linaje de Schwann para el análisis de expresión por RT-qPCR	151
Figura 1.9. Análisis de expresión de genes del linaje de Schwann en la fracción <i>Myf5+</i> en el cultivo de esferas por RT-qPCR.....	152
Figura 1.10. Cultivo en diferenciación de las fracciones <i>Myf5+</i> y <i>Myf5-</i> separadas por citometría de flujo.	153
Figura 1.11. Análisis de la capacidad de diferenciación glial de las fracciones <i>Myf5+</i> y <i>Myf5-</i>	154
Figura 1.12. Caracterización de la fracción <i>Myf5+</i> en el cultivo de diferenciación glial por inmunofluorescencia.	156
Figura 1.13. Análisis de expresión de genes del linaje de Schwann en la fracción <i>Myf5+</i> en el cultivo de diferenciación glial por RT-qPCR.	158
Figura 1.14. Expresión de <i>Myf5-Cre^{Sor}</i> en el panículo carnoso.....	160
Figura 1.15. Expresión de <i>Myf5-Cre^{Sor}</i> en el plexo nervioso subepidérmico.....	162
Figura 1.16. Expresión de <i>Myf5-Cre^{Sor}</i> en los haces nerviosos localizados a la altura del panículo carnoso.....	164
Figura 1.17. Identificación de células <i>Myf5-Cre^{Sor}</i> + asociadas a células SOX2+ subepidérmicas	165
Figura 1.18. Expresión de <i>Myf5-Cre^{Sor}</i> en las células de Schwann del complejo Lanceolado.....	166
Figura 1.19. Expresión de <i>Myf5-Cre^{Sor}</i> en el compartimento superior de la papila dérmica.....	168
Figura 1.20. Expresión de <i>Myf5-Cre^{Sor}</i> en células perivasculares.....	169
Figura 1.21. Análisis de expresión del reportero EYFP en los cultivos de esferas derivados de las líneas <i>B195AP^{Cre}/R26^{EYFP}</i> por citometría de flujo.	171
Figura 1.22 Cultivo en diferenciación de las fracciones <i>B195AP+</i> y <i>B195AP-</i> separadas por citometria de flujo.	172
Figura 1.23. Análisis de la capacidad de diferenciación glial de las fracciones <i>B195AP+</i> y <i>B195AP-</i>	173
Figura 1.24. Análisis de expresión del reportero EYFP en piel ventral de la línea transgénica <i>B195AP^{Cre}/R26^{EYFP}</i> por inmunofluorescencia.....	175
Figura 1.25. Análisis de expresión del reportero EGFP en el cultivo de esferas derivados de la línea <i>Sox2^{EGFP}</i> por inmunofluorescencia.	177
Figura 1.26. Separación de fracciones celulares en base a la expresión de Sox2 por citometría de flujo.	178
Figura 1.27. Análisis de la capacidad de diferenciación glial de fracciones celulares separadas por citometría de flujo en base al nivel de expresión de Sox2.	180
Figura 1.28. Análisis de expresión del reportero EGFP en cultivos diferenciados hacia linaje neuronal por inmunofluorescencia (línea transgénica <i>Sox2^{EGFP}</i>).	182

Índice

Figura 1.29. Caracterización de los cultivos de esferas diferenciados hacia linaje neuronal por inmunofluorescencia (línea transgénica <i>Sox2^{EGFP}</i>).	183
Figura 1.30. Análisis de expresión de <i>Sox2</i> en cultivos de esferas diferenciados hacia linaje mesodérmico por inmunofluorescencia (línea transgénica <i>Sox2^{EGFP}</i>).	184
Figura 1.31. Análisis de expresión del reportero EGFP en piel ventral de la línea transgénica <i>Sox2^{EGFP}</i> por inmunofluorescencia.	187
Figura 1.32. Análisis de expresión de los reporteros TdTomato y EGFP en los cultivos de esferas derivados de la piel ventral de la línea triple transgénica <i>Myf5-Cre^{Sor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}</i> por citometría de flujo.	189
Figura 1.33. Análisis de expresión de los reporteros TdTomato y EGFP en la piel ventral de la línea triple transgénica <i>Myf5-Cre^{Sor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}</i> por inmunofluorescencia.....	190
Figura 1.34. Genes diferencialmente expresados en fracciones celulares separadas de cultivos de esferas derivados de la línea triple transgénica <i>Myf5-Cre^{Sor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}</i>	192-193
Figura 1.35. Genes del linaje de Schwann expresados en fracciones celulares separadas de cultivos de esferas derivados de la línea triple transgénica <i>Myf5-Cre^{Sor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}</i>	196
Figura 2.1. Panel de marcadores del linaje de Schwann para el análisis de expresión por RT-qPCR	205
Figura 2.2. Análisis de expresión de genes del linaje de Schwann en neurofibromas cutáneos por RT-qPCR.....	207
Figura 2.4. Análisis de expresión y conteo de células CDH19+ por inmunofluorescencia.....	209
Figura 2.5. Análisis de expresión del marcador p75NTR en piel de donante sano y en muestras procedentes de pacientes con NF1 por inmunofluorescencia.....	211
Figura 2.6. Análisis de expresión del marcador S100 en piel de donante sano y en muestras procedentes de pacientes con NF1 por inmunofluorescencia.....	212
Figura 2.7. Detección de un neurofibroma incipiente en una muestra de piel no afectada de un paciente con NF1.....	213
Figura 2.8. Análisis de expresión de los marcadores SOX10 y SOX2 en una muestra de neurofibroma por inmunofluorescencia.....	214

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A260	Absorbancia 260 nanometros
A280	Absorbancia 280 nanometros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
BAC	Cromosoma artificial bacteriano (<i>Bacterial artificial chromosome</i>)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>Brain derived neurotrophic factor</i>)
bFGF	Factor básico de crecimiento fibroblástico (<i>Basic fibroblast growth factor</i>)
bHLH	Hélice-bucle-hélice básica (<i>Basic helix-loop-helix</i>)
BMP	Proteína morfogénica ósea (<i>Bone morphogenetic protein</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
Cdh19	Cadherina 19
Cdh2	Cadherina 2
CM	Célula madre
CMCN	Célula madre de la cresta neural
Cq	Ciclo de cuantificación (<i>Quantification cycle</i>), término estandarizado del ciclo umbral
DEG	Genes diferencialmente expresados (<i>Differentially expressed genes</i>)
Dhh	Desert hedgehog
DM	Dermomiotomo
DML	Labio dorsomedial (<i>Dorsomedial lip</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DREZ	Zona de entrada de la raíz dorsal (<i>Dorsal root entry zone</i>)
DsRed	Proteína roja fluorescente de la especie <i>Discosoma</i> (<i>Discosoma sp. red fluorescent protein</i>)
DWAT	Tejido adiposo dérmico (<i>Dermal white adipose tissue</i>)
ECM	Matriz extracelular (<i>Extracellular matrix</i>)
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EEE	Potenciador epaxial temprano (<i>Early epaxial enhancer</i>)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal growth factor</i>)
EGFP	Proteína verde fluorescente potenciada (<i>Enhanced green fluorescent protein</i>)
EGFP	Proteína verde fluorescente potenciada (<i>Enhanced green fluorescent protein</i>)
EGR1	Proteína 1 de respuesta temprana (<i>Early growth response protein 1</i>)
EGR2	Proteína 2 de respuesta temprana (<i>Early growth response protein 2</i>)
EPI-NCSC	Células madre de la cresta neural epidérmicas (<i>Epidermal-NCSC</i>)
EYFP	Proteína amarilla fluorescente potenciada (<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>)
FABP7	Proteína 7 de unión a ácidos grasos (<i>Fatty acid binding protein 7</i>)
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
FoxO4	<i>Forkhead box O4</i>
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
FSC	Detector de dispersión frontal (<i>Forward Scatter</i>)
GalC	Galactosilceramidasa (<i>Galactosylceramidase</i>)
GAP	Proteína activadora de GTPasas (<i>GTPase activating protein</i>)
GAP43	Proteína 43 asociada al crecimiento (<i>Growth associated protein 43</i>)
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GDNF	Factor neurotrófico derivado de línea celular glial (<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>)

Abreviaturas

GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescent protein</i>)
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
GRN	Red de genes regulatorios (<i>Gene regulatory network</i>)
HAP-SC	Células madre pluripotentes asociadas a folículo piloso (<i>Hair follicle associated pluripotent stem cell</i>)
HBSS	Solución salina tamponada de Hank (<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)
HC	Unidad folicular funcional (<i>Hair cluster</i>)
HMG	<i>High mobility group</i>
HTMR	Mecanoreceptor de alto umbral de activación (<i>High threshold mechanoreceptor</i>)
IGF1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (<i>Insulin growth factor 1</i>)
IPS	Células madre pluripotentes inducidas (<i>Induced pluripotent stem cells</i>)
iSC	Célula de Schwann inmadura (<i>immature Schwann cell</i>)
Itg4	Integrina 4
L1CAM	Molécula L1 de adhesión celular (<i>L1 cell adhesion molecule</i>)
LIF	Factor inhibidor de la leucemia (<i>Leukemia inhibitory factor</i>)
LOH	Perdida de heterozigosidad (<i>loss of heterozygosity</i>)
LPM	Mesodermo de la placa lateral (<i>Lateral plate mesoderm</i>)
LRD	<i>Lysinated rhodamine dextran</i>
LTMR	Mecanoreceptor de alto bajo de activación (<i>Low threshold mechanoreceptor</i>)
MAG	Glicoproteína asociada a la mielina (<i>Myelin-associated glycoprotein</i>)
MBP	Proteína básica de la mielina (<i>Myelin basic protein</i>)
MEP	Punto de salida neuronas motoras (<i>Motorneuron exit point</i>)
mM	Milimolar
MPNST	Tumores malignos de la vaina del nervio periférico (<i>Malignant peripheral nerve sheath tumors</i>)
MPZ	Proteína zero de la mielina (<i>Myelin protein zero</i>)
MRF4	Factor regulador 4 específico de músculo (<i>Muscle specific regulatory factor 4</i>)
MRFs	Factores reguladores miogénicos (<i>Myogenic regulatory factors</i>)
mSC	Célula de Schwann mielinizante (<i>myelinating Schwann cell</i>)
MSX1	Msh homeobox 1
MSX2	Msh homeobox 2
MYF5	Factor 5 miogénico (<i>Myogenic factor 5</i>)
MyH2	Cadena pesada de miosina de fibras adultas (<i>Adult myosin heavy chain</i>)
NCAM	Molécula de adhesión celular neural (<i>Neural cell adhesion molecule</i>)
NF	Neurofibroma
NF1	Neurofibromatosis tipo 1
NGF	Factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve growth factor</i>)
NGFR	Receptor del factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve growth factor receptor</i>)
nm	Nanometro
nmSC	Célula de Schwann no mielinizante
NPC	Células precursoras neurales (<i>Neural precursor cells</i>)
NRG1	Neuregulina-1
NT3	Neurotrofina-3
OCT	<i>Optimal cutting temperature compound</i>

OSM	Oncostatina M
P/S	Penicilina/Estreptomicina (<i>Penicillin/Streptomycin</i>)
Pax1	Factor de transcripción 1 de caja emparejada (<i>Paired box transcriptional factor 1</i>)
Pax3	Factor de transcripción 3 de caja emparejada (<i>Paired box transcriptional factor 3</i>)
Pax7	Factor de transcripción 7 de caja emparejada (<i>Paired box transcriptional factor 7</i>)
Pax9	Factor de transcripción 9 de caja emparejada (<i>Paired box transcriptional factor 9</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDGFR α	Factor de crecimiento alfa derivado de plaquetas (<i>Platelet derived growth factor receptor alpha</i>)
PDGFR β	Factor de crecimiento beta derivado de plaquetas (<i>Platelet derived growth factor receptor beta</i>)
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
PLP1	Proteína proteolípida 1 (<i>Proteolipid protein 1</i>)
PMP22	Proteína periférica de mielina 22 (<i>Peripheral myelin protein 22</i>)
POU3F1	<i>POU domain class 3 transcription factor 1</i>
R26	Rosa 26
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RMA	<i>Robust multi-array average</i>
Rpm	Revoluciones por minuto
RQ	Cuantificación relativa (<i>Relative quantification</i>)
rrEGF	Factor de crecimiento epidérmico recombinante de rata (<i>Recombinant rat epidermal growth factor</i>)
rrFGF2	Factor 2 de crecimiento fibroblástico recombinante de rata (<i>Recombinant rat fibroblast growth factor 2</i>)
RT-PCR	PCR de transcripción reversa (<i>Reverse-transcription PCR</i>)
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real (<i>Real time quantitative PCR</i>)
SCP	Célula precursora de Schwann (<i>Schwann cell precursor</i>)
SEM	Error estándar de la media (<i>Standard error of the mean</i>)
SKPs	Precusores derivados de la piel (<i>Skin derived precursors</i>)
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
SNP	Sistema nervioso periférico
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
SSC	Detector de dispersión lateral (<i>Side Scatter</i>)
SWAT	Tejido adiposo subcutáneo (<i>Subcutaneous white adipose tissue</i>)
TFAP2 α	Factor de transcripción AP-2 alfa (<i>Transcription factor AP-2 alpha</i>)
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
TH	Tirosina hidroxilasa
TRABS	Secuencias equilibradoras de la transcripción (<i>Transcription balancing sequences</i>)
UV	Luz ultravioleta
VEGF α	Factor de crecimiento endotelial vascular alfa (<i>Vascular endothelial growth factor alpha</i>)
VLL	Labio ventrolateral (<i>Ventrolateral lip</i>)
VRE	Vaina radicular externa

Abreviaturas

VRI	Vaina radicular interna
WT	Cepa o enotipo silvestre (<i>Wild type</i>)
y cols.	Y colaboradores
α SMA	Actina de músculo liso alfa (<i>Alpha smooth muscle actin</i>)
μ M	Micromolar
μ m	Micrometro

RESUMEN

En la piel, y posiblemente en otros tejidos, la identificación de poblaciones celulares “*stem*” bajo un excesivo número de denominaciones ha generado confusión en el campo, debido a la reformulación constante de la nomenclatura y a los criterios, muchas veces laxos, por los que se ha considerado una población celular determinada como precursora, y distinta de otras descritas anteriormente. De acuerdo con datos previos del laboratorio respecto a la identidad de las células con potencial neural derivadas de la piel humana (Etxaniz y cols., 2014), los resultados obtenidos en esta Tesis contribuyen a clarificar el campo de las células precursoras aisladas de la piel del ratón, ya que demuestran que las células de Schwann dérmicas son responsables del fenotipo atribuido a las progenitoras neurales descritas en la piel (SKPs). Así mismo, se demuestra que las células de Schwann aisladas en cultivo revierten a un estadio progenitor en un mecanismo de reprogramación dependiente de los niveles de expresión del factor de transcripción *Sox2*. En relación al origen embrionario de las SKPs de la dermis del tronco, las cuales fueron relacionadas con un origen mesodérmico (trazadas de linaje por *Myf5-Cre^{Sor}* y *Dermo1-Cre*), se demuestra que las células de Schwann dérmicas no pertenecen al linaje celular *Myf5+* (presuntamente originadas en el dermomiótomo) y que la activación del promotor en el constructo *Myf5-Cre^{Sor}* no sucede exclusivamente en linajes derivados del dermomiótomo.

El rasgo clínico más característico de la neurofibromatosis tipo 1 (NF1) es el desarrollo de tumores benignos denominados neurofibromas, en los que predominan las células de Schwann que han inactivado los dos alelos del gen *NF1* (*NF1^{-/-}*). La caracterización de neurofibromas dérmicos procedentes de pacientes con NF1 revela un aumento en la expresión de marcadores de desdiferenciación, propios de células de Schwann activadas en respuesta a daño. Así, de acuerdo con el origen propuesto para este tipo de tumor, en este trabajo se propone la reprogramación de las células de Schwann como evento inicial en el desarrollo de los neurofibromas dérmicos.

INTRODUCCIÓN

1. ESTRUCTURA DE LA PIEL

La piel es el órgano que cubre la totalidad del cuerpo, siendo uno de los órganos más extensos, y representa aproximadamente el 7% del peso corporal. Cumple multitud de funciones importantes para el organismo, ya que actúa como barrera de protección frente a distintos agentes físicos, químicos y biológicos, regula la temperatura corporal previniendo la deshidratación y forma parte del sistema somato-sensorial, responsable de la percepción de estímulos externos como el tacto, las variaciones de temperatura o el dolor (Chuong et al., 2002; Koster and Roop, 2007).

En la piel se integran multitud de componentes estructurales, distintos tipos celulares y tejidos especializados que forman un sistema heterogéneo altamente organizado. La piel es un órgano que se adapta funcionalmente a las distintas regiones del cuerpo, y por eso, propiedades como el grosor de la piel, la distribución de los anejos epidérmicos, la densidad de las células pigmentarias o el número y el tipo de receptores sensoriales varían notablemente entre las diferentes áreas (Forni y cols., 2012; Misery, 2014; Sorrell y Caplan, 2004). La piel consta de tres capas principales; la más externa, la **epidermis** (y sus anejos asociados), seguida de la **dermis** y la **hipodermis** (Figura 1).

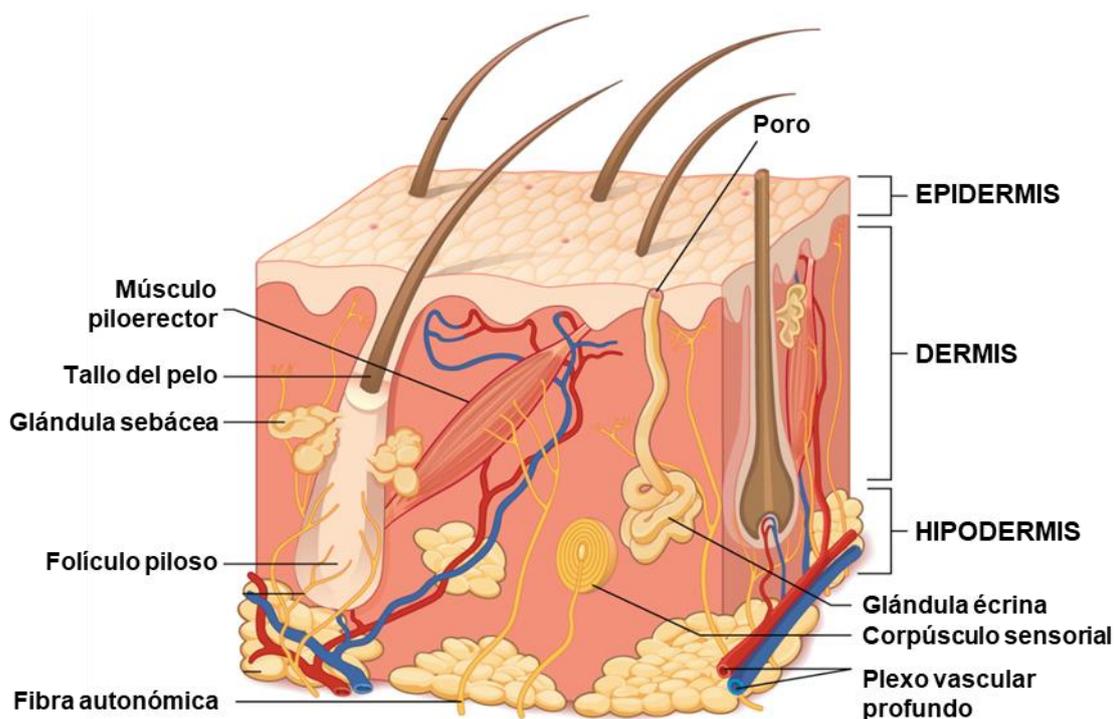


Figura 1. Estructura de la piel. Representación esquemática de la piel, compuesta por tres capas principales; la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis, la capa más externa, está compuesta por un epitelio estratificado que se extiende para formar los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas. La dermis es un tejido conectivo elástico que alberga los anejos epidérmicos, las fibras nerviosas del sistema nervioso periférico, así como el sistema vascular linfático y sanguíneo. La hipodermis, la capa más profunda de la piel, está formada principalmente por tejido adiposo (en el ratón, la hipodermis también incluye una capa de tejido muscular). Imagen adaptada de la página web <https://commons.wikimedia.org>.

1.1 Epidermis

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado que se renueva de forma continua y en la que se distinguen hasta cinco capas; el estrato córneo, el estrato lúcido (presente solo en la piel palmo-plantar), el estrato granuloso, el estrato espinoso y el estrato basal. El número de células que componen cada uno de los estratos varía considerablemente entre la piel humana y la piel de ratón, la cual consta de un menor número de células (Fuchs, 2007). La epidermis se compone en un 90-95% de queratinocitos, células de origen ectodérmico responsables de formar la capa de queratina que recubre la piel. La estratificación de la epidermis se mantiene gracias a la división constante de las células madre que se encuentran en la capa basal. Estas células se diferencian a medida que se desplazan hacia la superficie y al alcanzar la capa córnea pierden el núcleo y se fusionan para desprenderse progresivamente de la superficie de la piel por descamación (Candi et al., 2005; Fuchs, 2007; Watt, 2001).

Además de los queratinocitos, la epidermis contiene otros tipos celulares, como las células de Langerhans, los melanocitos y las células de Merkel. Las células de Langerhans, son células dendríticas que suponen entre el 3-6% del total de la epidermis, y se localizan en las capas superiores del estrato espinoso (Langerhans, 1868). Estas células proceden de las progenitoras eritro-mieloides y actúan como células presentadoras de antígeno, participando en procesos de inmuno-modulación (Gomez Perdiguero et al., 2015; Hoeffel et al., 2012; Malissen et al., 2014). Los melanocitos se originan en la cresta neural (Adameyko y cols., 2009; Dupin y Le Douarin, 2003; Ernfor, 2010a) y se distribuyen de forma uniforme por todo el estrato basal, donde extienden sus prolongaciones dendríticas entre los queratinocitos adyacentes. Los melanocitos son responsables de producir melanina, un pigmento fotoprotector que absorbe la luz ultravioleta (UV), y de transportarla a través de melanosomas hasta los queratinocitos con los que establecen contacto (Miyamura y cols., 2007). Las células de Merkel también se encuentran en la capa basal y se asocian a fibras nerviosas sensitivas para formar mecanorreceptores que intervienen en la percepción del tacto (Haeberle y Lumpkin, 2008; Zimmerman y cols., 2014). El origen embrionario de las células de Merkel fue motivo de debate durante algún tiempo, aunque los investigadores del campo consideran actualmente que las células de Merkel son de origen epidérmico (Keymeulen y cols., 2009; Morrison y cols., 2009).

1.2 Anejos epidérmicos

Los anejos o anexos epidérmicos son estructuras especializadas que se forman por extensión de la epidermis. Algunos de estos anejos se localizan cerca de la hipodermis, pero se mantienen conectados a la superficie de la piel. Los principales anejos epidérmicos de la piel con pelo son los folículos pilosos y las glándulas sebáceas, mientras que, en la piel sin pelo o piel glabra, los anejos más abundantes son las glándulas sudoríparas. Existen también anejos epidérmicos especializados como las uñas o las glándulas mamarias, restringidas a áreas concretas de la piel.

1.2.1 Folículo Piloso

El folículo piloso es una estructura compleja y dinámica con una elevada capacidad de regeneración. Los folículos pilosos cubren una gran parte del cuerpo y funcionan como termorreguladores (aislantes térmicos), receptores sensoriales, sirven de conducto excretor para desechar el sebo y el sudor secretado por las glándulas sebáceas y sudoríparas, además de proteger la piel frente a agresiones físicas. Todas estas funciones están reguladas por el sistema nervioso y endocrino, por lo cual los folículos reciben una rica irrigación sanguínea y están ampliamente inervados por el sistema nervioso autónomo y sensitivo (Paus y Cotsarelis, 1999; Peters y cols., 2002; Schneider y cols., 2009; Xiao y cols., 2013).

A nivel histológico los folículos pilosos se dividen en tres segmentos; el infundíbulo, el istmo, y el segmento inferior (**Figura 2**). El folículo piloso se compone principalmente de tejido epitelial rodeado por una vaina de tejido conectivo, que cubre la zona del bulbo y continúa hasta la papila dérmica. El componente epitelial consta de tres capas que se organizan de manera concéntrica; la vaina radicular externa (VRE), la vaina radicular interna (VRI) y la fibra capilar, compuesta a su vez por la cutícula, la corteza y la médula (Krause y Foitzik, 2006; Paus y Cotsarelis, 1999). El componente conectivo del folículo, representado por la vaina de tejido conectivo y la papila dérmica, constituye en parte un nicho de células madre o precursoras dérmicas. La protuberancia (en inglés *bulge*), localizada en la VRE donde se inserta el músculo erector del pelo, se considera también un nicho importante que alberga varias poblaciones de células madre, como las células madre epidérmicas, responsables de restaurar las células del folículo en cada ciclo capilar y participar en la regeneración de la epidermis en procesos de cicatrización (Ito y cols., 2005; Taylor y cols., 2000; Tumber y cols., 2004). Los folículos pilosos se asocian a las glándulas sebáceas (formados por extensión de la VRE), al músculo erector del pelo (fibras musculares lisas) y a las glándulas ecrinas para formar unidades funcionales denominadas en inglés "*Hair clusters*" (HC) (Poblet y cols., 2016).

En el ser humano se distinguen tres tipos de pelo; (1) el lanugo, cabello suave, fino y ligeramente pigmentado que cubre el feto durante el desarrollo embrionario; (2) el vello, pelo fino que cubre la mayor parte del cuerpo en edades posnatales; y (3) el pelo terminal, el cabello más largo, grueso y pigmentado que se localiza en regiones concretas del cuerpo como las cejas, pestañas, cuero cabelludo, barba, axilas y pubis. A lo largo de la vida, un mismo folículo puede dar lugar a los tres tipos de cabello (Hutchinson y Thompson, 1997; Paus y Cotsarelis, 1999).

En el ratón se han descrito hasta seis tipos diferentes de folículo: Guard, Awl, Auchene, Zigzag y los folículos especializados del bigote y de la cola. Los folículos pilosos más abundantes en la piel, los que cubren la piel de la cabeza, del tronco y de las extremidades, son los de tipo Guard, Awl, Auchene y Zigzag. Estos folículos se clasifican en base a la longitud de la fibra capilar, el número de células que componen la médula o la presencia/ausencia de curvatura en la fibra (Driskell y cols., 2011; Schlake, 2007). Durante el desarrollo embrionario la morfogénesis del pelo ocurre en tres

Introducción

fases sucesivas, cada una de las cuales está regulada por un mecanismo distinto y explica la diversidad morfológica de los diferentes tipos de folículo. En la primera fase de inducción (E13-14,5), se forman las placas epidérmicas primarias que dan lugar a los folículos más largos, los Guard, compuestos por una fibra capilar recta y una médula de dos filas celulares. Los folículos Guard representan el 1-3% del total de folículos en el adulto. Durante la segunda fase de morfogénesis se forman los folículos Awl (E15-16,5), más cortos que los Guard, pero compuestos también por fibras capilares rectas y médulas de entre dos y cuatro capas celulares. En la tercera y última fase de la morfogénesis se generan los folículos Zigzag (E18,5), los más abundantes (70-80%) y los de menor tamaño. Las médulas de estos folículos se componen de una única hilera celular y se caracterizan por presentar, al menos, dos ondulaciones que les proporcionan una silueta en forma de "z". Los folículos Auchene, son prácticamente idénticos a los de tipo Awl, se distinguen únicamente por presentar una ondulación en la fibra capilar y se clasifican habitualmente en el mismo grupo. Los folículos Awl-Auchene representan el 17-30% del total de folículos (Driskell y cols., 2009; Paus y cols., 1999; Stenn y Paus, 2001).

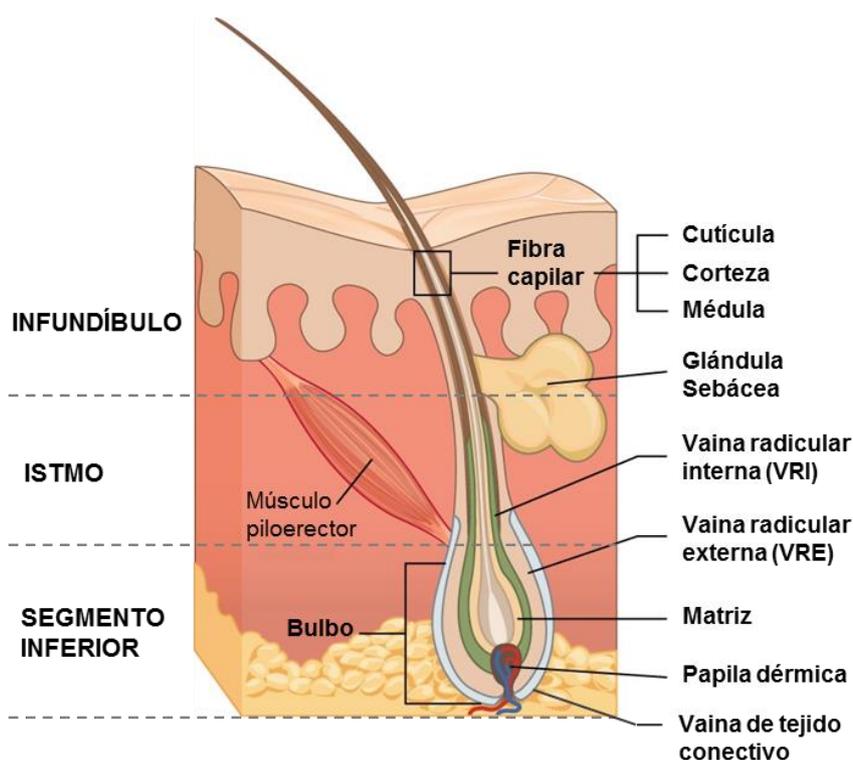


Figura 2. Estructura del folículo piloso. Representación esquemática del folículo piloso dividido longitudinalmente en tres segmentos; el infundíbulo, el istmo y el segmento inferior. Los folículos están compuestos principalmente por tejido epidérmico; por la vaina radicular externa (VRE), la vaina radicular interna (VRI) y la fibra capilar (formada por la cutícula, la corteza y la médula). El componente conectivo del folículo piloso está representado por la vaina de tejido conectivo que cubre el bulbo y la papila dérmica. Los folículos pilosos se asocian a las glándulas sebáceas, al músculo erector del pelo (compuesto por fibras de músculo liso) y a las glándulas ecrinas (no representada en la imagen) para conformar unidades foliculares funcionales (HC). Imagen adaptada de la página web https://commons.wikimedia.org/wiki/File:506_Hair.jpg.

1.2.2 Glándula sebácea

Las glándulas sebáceas son estructuras multilobuladas alojadas en la parte superior de los folículos pilosos. Se encuentran en todas las áreas de la piel, excepto en las palmas de las manos y las plantas de los pies, y su número es mayor en el cuero cabelludo y en la piel facial. Se componen de un único conducto que emerge a partir de los alveolos, formados generalmente por dos o cinco subunidades. Los alveolos se componen de una membrana basal que recubre varias células epiteliales, donde las células más externas son de pequeño tamaño y continúan para conformar el ducto. Las células internas son de mayor tamaño y contienen la materia grasa que constituye el sebo cutáneo. El ducto sebáceo desemboca generalmente en el canal piloso, aunque también puede hacerlo directamente hacia la superficie de la piel. La secreción de la glándula está controlada por el sistema endocrino (Schneider y Paus, 2010; Thody y Shuster, 1989).

1.2.3 Glándula sudorípara

Las glándulas sudoríparas son las estructuras responsables de producir y expulsar el sudor, cumpliendo una importante función en la regulación de la temperatura. La función de las glándulas sudoríparas está regulada por el sistema nervioso autónomo y también por la actividad de varias hormonas circulatorias. Existen dos tipos principales de glándulas sudoríparas, las ecrinas y las apocrinas, que se diferencian en su estructura, función, producto secretado, mecanismo de excreción y distribución anatómica. Las glándulas ecrinas, son las principales glándulas sudoríparas en el ser humano y se distribuyen por todo el cuerpo, aunque predominan en zonas palmo plantares, en las axilas y en la frente. Estas glándulas cumplen una función principal en la regulación de la temperatura y expulsan el sudor directamente a la superficie de la piel. En ratones, las glándulas ecrinas se restringen a la piel palmo-plantar. Las glándulas apocrinas, por otro lado, son menos abundantes en humano y están ausentes en el ratón. Estas glándulas se localizan en áreas concretas de la piel y secretan un sudor más denso con un alto contenido hormonal. Son de mayor tamaño y expulsan su contenido al canal piloso (Lu y Fuchs, 2014; Sato y cols., 1989; W C Lobitz y Dobson, 1961).

1.3 Dermis

La dermis es una capa de tejido conectivo elástico que proporciona a la piel una consistencia flexible y sirve de soporte estructural y nutritivo a la epidermis. La dermis se compone de distintos tipos celulares (principalmente fibroblastos) y presenta un elevado contenido en proteínas fibrosas que se distribuyen en una matriz extracelular acuosa, conocida como sustancia básica. La tasa de renovación de la dermis se debe a la degradación y a la síntesis continua de los componentes proteicos del estroma. Entre las proteínas fibrosas que integran la dermis, las más abundantes (en un 90%) son las fibras de colágeno tipo I y III, seguidas de colágeno tipo IV y tipo VII, presentes en una proporción mucho menor y responsables de sellar la unión dermo-epidérmica. Otros

Introducción

componentes filamentosos de la dermis son las fibras elásticas, la cuales se asocian para formar haces de calibre variable (Sriram y cols., 2015).

La dermis consta de dos regiones bien definidas; la **dermis papilar**, el área más superficial, y la **dermis reticular** o dermis profunda. La dermis papilar se compone de tejido conectivo laxo y un número celular mayor al de la dermis reticular. En su plano superior la dermis papilar proyecta multitud de ondulaciones, denominadas papilas dérmicas, que tienen como objetivo aumentar la superficie de contacto entre la dermis y la epidermis, favoreciendo la adhesión entre ambas capas. Esta región de la dermis contiene fibras de colágeno desorganizadas y fibras elásticas delgadas orientadas perpendicularmente a la membrana basal. La dermis reticular se compone de tejido conectivo denso, compuesto por fibras de colágeno compactas y fibras elásticas gruesas que se orientan en paralelo a la superficie de la piel (Prost-Squarcioni, 2006; Sorrell y Caplan, 2004; Sorrell y cols., 2004, 2006, 2008). En su límite inferior, la dermis reticular presenta una capa de células grasas que forman parte del tejido adiposo cutáneo, distinto al tejido adiposo subcutáneo de la hipodermis. Las células adiposas de la dermis están implicadas en el control del ciclo capilar (Festa y cols., 2011) y en procesos de cicatrización de heridas (Schmidt y Horsley, 2013).

1.4 Hipodermis

La hipodermis o tejido subcutáneo, es la capa más profunda de la piel y se compone principalmente de tejido adiposo (**Figura 1**). El tejido adiposo subcutáneo (en inglés, *subcutaneous white adipose tissue*, SWAT) está compuesto por células grasas o adipocitos inmersos en un estroma ricamente vascularizado e inervado. La región más superficial de la hipodermis, localizada justo bajo la dermis, está formada por agrupaciones celulares compactas separadas por septos que permiten el paso de los vasos y los nervios que avanzan hacia la dermis. La hipodermis es un importante reservorio energético y sirve de protección frente a traumatismos, además de ser un tejido con una alta actividad endocrina que regula múltiples procesos como el metabolismo lipídico, la inflamación cutánea o la angiogénesis (Driskell y cols., 2014).

El tejido adiposo subcutáneo es distinto al tejido adiposo presente en la dermis (en inglés, *dermal white adipose tissue*, DWAT) (**Figura 3**), no solo en su localización, sino también en el origen embrionario de los adipocitos que componen cada uno de los tejidos (Driskell y cols., 2014; Wojciechowicz y cols., 2013). En el ratón, el tejido adiposo cutáneo está separado del tejido adiposo subcutáneo por una capa de tejido muscular denominada panículo carnoso (**Figura 3A**). En el ser humano, la piel no contiene panículo carnoso (en la mayor parte de regiones del cuerpo), pero el tejido adiposo de ambos compartimentos es notablemente distinto a nivel morfológico y metabólico (Sbarbati y cols., 2010) (**Figura 3B**).

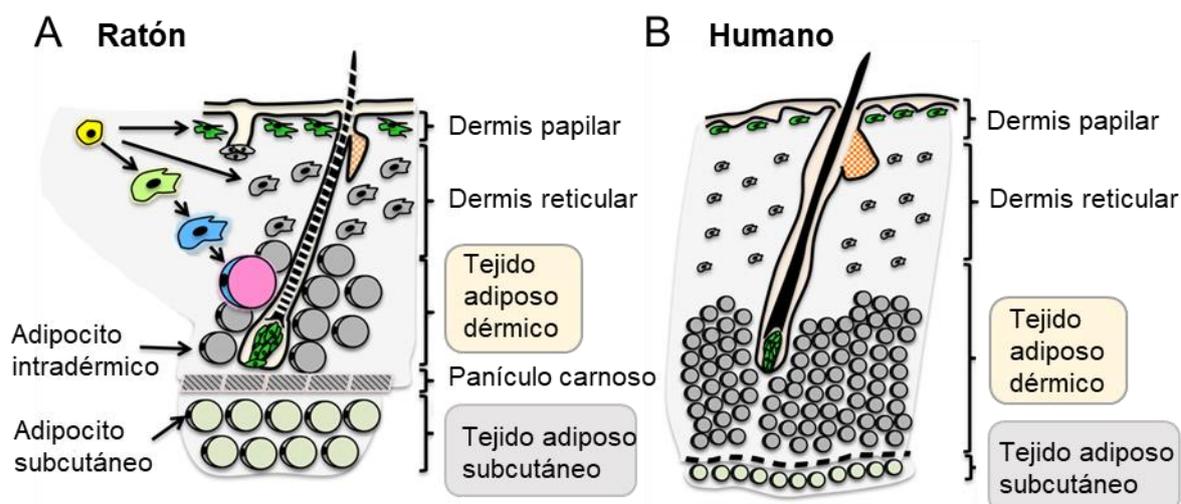


Figura 3. Distribución del tejido adiposo en la piel humana y de ratón. Representación de las distintas capas de tejido adiposo presentes en la piel de ratón (A) y en la piel humana (B). (A) En el ratón, el tejido adiposo cutáneo se localiza debajo de la dermis reticular y se separa del tejido adiposo subcutáneo por una capa de tejido muscular: el panículo carnoso. (B) En la piel humana, en ausencia de panículo carnoso, el tejido adiposo cutáneo se dispone directamente sobre el tejido graso de la hipodermis. Los adipocitos de ambos compartimentos presentan diferencias morfológicas y funcionales. Imagen adaptada de (Driskell y cols., 2014).

1.4.1 Panículo carnoso

El panículo carnoso, *panniculus carnosus* en latín, es una fina capa de músculo estriado presente en la piel de la mayoría de los mamíferos. Esta capa muscular se localiza en la hipodermis, entre el tejido adiposo cutáneo (DWAT) y el tejido adiposo subcutáneo (SWAT) que cubre la fascia superficial (**Figura 3A**). El panículo carnoso es una estructura que está especialmente conservada en algunas especies como los roedores, en los cuales se extiende ampliamente en el dorso y en el abdomen (Inzunza y cols., 2008, Langworthy, 1924, Langworthy, 1925.). En los seres humanos, el panículo carnoso se conserva en zonas anatómicas muy concretas, como el platismo del cuello o en el músculo del escroto, donde posiblemente se haya mantenido como un remanente de la evolución. La función principal del panículo carnoso es la contracción cutánea voluntaria e independiente de los músculos subyacentes. Esta contracción permite sacudir la piel en respuesta a estímulos molestos o nocivos y se propone también como mecanismo para la generación de calor (Pavletic, 2011). El panículo carnoso tiene una función relevante en la cicatrización de heridas y funciona como soporte físico, ya que se fija sobre la fascia muscular y favorece el cierre de la herida por contracción de la dermis y la epidermis (Billingham y Russell, 1956; Greenwood, 2010; Rittié, 2016; Snowden y cols., 1982).

1.5 Sistema vascular

La piel consta de una rica red vascular formada por plexos que transcurren paralelos al eje epidérmico y se comunican a través de múltiples ramificaciones ascendentes. El sistema vascular

Introducción

cumple múltiples funciones en la piel; proporciona soporte nutritivo y participa en la regulación térmica, en la hemostasia y en la respuesta inflamatoria, además de contribuir activamente en el proceso de cicatrización de heridas.

Los vasos sanguíneos están formados por capas concéntricas de células y tejido conectivo (**Figura 4**). La capa interna de los vasos está formada por células endoteliales que se separan de las capas externas circundantes por una lámina basal. La cantidad de tejido conectivo y de células que forman la pared de cada uno de los vasos varía de acuerdo al diámetro y la función del vaso, pero el revestimiento endotelial siempre está presente. Las células endoteliales se alinean en todo el sistema vascular y controlan el paso de los materiales y el tránsito de las células hacia y desde el torrente sanguíneo. Las arterias y venas se desarrollan a partir de pequeños vasos construidos únicamente con células endoteliales y una lámina basal, donde posteriormente se incorporan células perivasculares (pericitos y células de músculo liso) bajo la influencia de señales de las células endoteliales (Alberts y cols., 2002). Así los vasos se organizan en tres capas principales; (1) **Túnica íntima**: capa interna formada por tejido endotelial rodeado de una lámina basal, una lámina propia y tejido conectivo. (2) **Túnica media**: formada por capas concéntricas de células perivasculares entre las cuales se interponen cantidades variables de tejido conectivo. Esta capa está más desarrollada en las arterias que en las venas y es prácticamente inexistente en los capilares. (3) **Túnica adventicia**: la capa más externa, compuesta principalmente por fibras de colágeno y fibras elásticas (**Figura 4**).

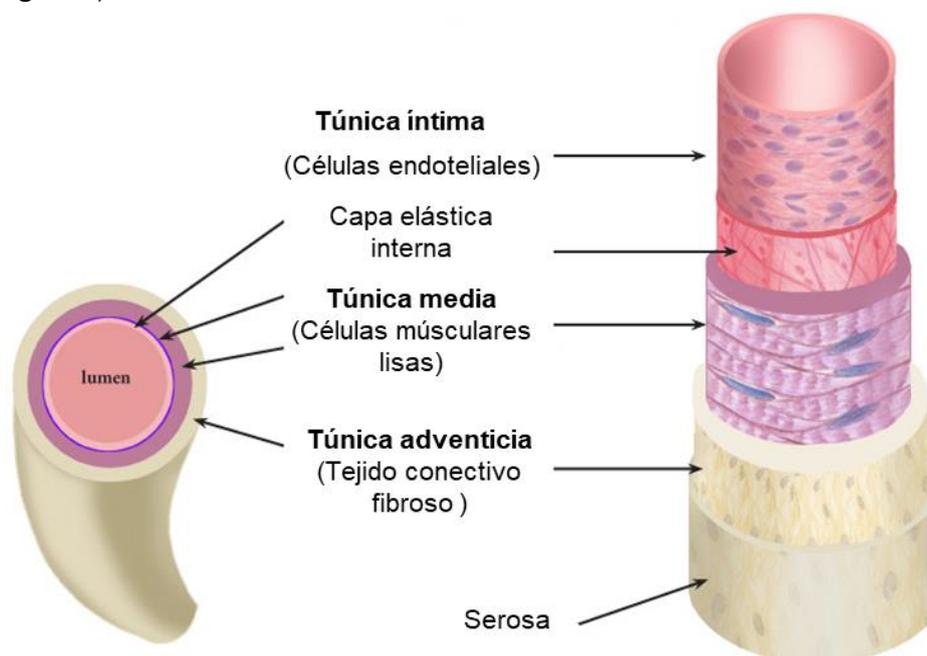


Figura 4. Estructura anatómica de un vaso sanguíneo. Los vasos sanguíneos constan de tres capas principales (desde la más interna a la más externa): la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia. La túnica íntima está formada por una capa de células endoteliales rodeadas de una lámina basal y una lámina propia. La túnica media contiene principalmente células de músculo liso y algo de tejido conectivo, y la túnica adventicia está formada por tejido conectivo fibroso rico en fibras elásticas y fibras de colágeno. Imagen adaptada de <https://www.exploringnature.org>.

En la piel existen tres plexos cutáneos: el **plexo subpapilar** (o plexo vascular superficial), el **plexo dérmico** y el **plexo subdérmico** (o plexo vascular profundo) (**Figura 5**). El plexo vascular subpapilar, se ubica en el límite entre la dermis papilar y la dermis reticular, y extiende pequeños capilares hacia la superficie de las papilas dérmicas, formando “asas” donde se conectan los capilares arteriales y venosos. El plexo dérmico transcurre a la altura de la dermis reticular. El plexo vascular subdérmico, localizado entre la unión de la dermis y la hipodermis, consta de pequeños vasos que nutren las estructuras que reposan en un plano más profundo, como los folículos pilosos o las glándulas sudoríparas. (Braverman, 1989, 1997, 2000; Huggenberger y Detmar, 2011).

En las capas más profundas de la piel se extienden varios plexos que irrigan densamente la hipodermis (el **plexo subcutáneo**) y la fascia (el **plexo asociado a la fascia**). En el ratón, el plexo subcutáneo transcurre asociado al panículo carnoso. Aunque el sistema vascular se representa habitualmente como una red de vasos perfectamente organizados en distintos planos, los estudios más recientes basados en técnicas de estereografía, describen el sistema vascular como una compleja red de vasos organizados en plexos no tan definidos que forman múltiples anastomosis a lo largo de su recorrido (Imanishi y cols., 2008).

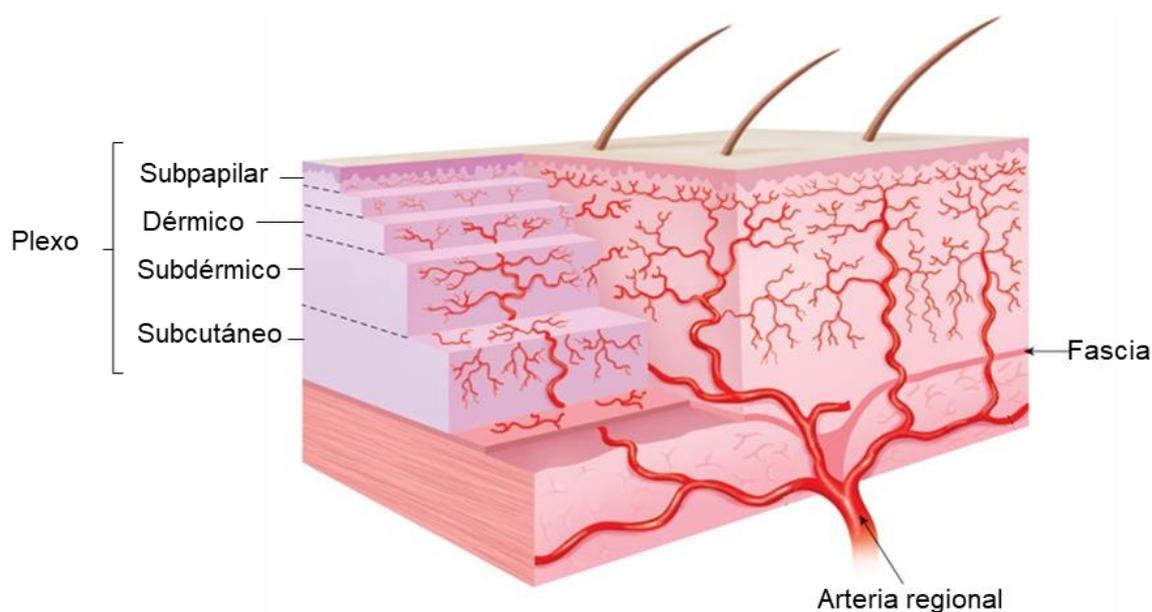


Figura 5. Sistema vascular cutáneo. Representación esquemática del sistema vascular de la piel. El sistema vascular cutáneo consta de tres plexos principales, el plexo subpapilar (localizado entre la dermis papilar y reticular) el plexo dérmico (localizado en la dermis reticular) y el plexo subdérmico (situado en el límite entre la dermis y la hipodermis). En la hipodermis se encuentra el plexo subcutáneo, que se extiende por todo el tejido adiposo y el panículo carnoso (solo en ratón). La fascia, el tejido que separa la piel del músculo, recibe también una rica irrigación sanguínea. Imagen adaptada de *Atlas of Wound Diagnosis y Treatment*.

1.6 Sistema nervioso cutáneo

La piel es un órgano altamente innervado por una compleja red de fibras nerviosas, compuesta principalmente por neuronas sensitivas aferentes y en menor proporción, por neuronas simpáticas del sistema nervioso autónomo.

1.6.1 Sistema nervioso periférico

El sistema nervioso periférico (SNP) representa el conjunto de fibras nerviosas que mantienen conectado el sistema nervioso central (SNC) con el resto del cuerpo. A nivel funcional, el SNP se divide en el sistema nervioso somático, responsable de controlar los movimientos voluntarios y de percibir los estímulos procedentes del medio externo, y el sistema nervioso autónomo (o vegetativo), encargado de regular las funciones corporales mediante acciones involuntarias. El sistema autónomo consta a su vez de dos subdivisiones que actúan de forma complementaria para coordinar las funciones fisiológicas no voluntarias; el sistema simpático y el sistema parasimpático. El sistema nervioso simpático, por lo general, estimula actividades que requieren un gasto energético y prepara el cuerpo para la acción, mientras que el sistema parasimpático, coordina actividades que facilitan el almacenamiento o ahorro de energía (Birch y cols., 2013; Hubbard y Webster, 1974). El SNP está compuesto principalmente por neuronas y por células gliales. Las neuronas se encargan de recibir, procesar y transmitir los impulsos nerviosos, mientras que las células gliales sirven de soporte estructural y trófico de las neuronas, y favorecen la transmisión de los impulsos nerviosos. Existen varios subtipos de neuronas y células gliales, los cuales se especializan para cumplir funciones definidas en distintas subdivisiones del SNP.

Entre los distintos tipos de neuronas, funcionalmente se distinguen las neuronas sensoriales y las motoras (o motoneuronas). Las neuronas sensoriales son fibras aferentes que dirigen la información percibida desde el exterior o desde los órganos internos hacia el SNC. Las motoneuronas son fibras eferentes encargadas de transmitir los impulsos nerviosos desde el SNC hasta los músculos efectores u órganos/tejidos regulados por el sistema nervioso autónomo. A nivel morfológico, los distintos tipos neuronales se caracterizan por presentar una estructura específica que se adapta a sus funciones. Así, las motoneuronas son células multipolares, caracterizadas por desarrollar un único axón y múltiples dendritas que les permite realizar sinapsis con varias neuronas, mientras que las neuronas sensoriales, son células pseudo-unipolares y extienden un solo proceso que se divide en dos para extender cada una de las prolongaciones en una dirección. Las neuronas se pueden clasificar también por la velocidad de conducción del impulso, propiedad que está directamente asociada al diámetro de la fibra y al recubrimiento de mielina (**Tabla 1**). Las fibras nerviosas presentes en la piel son fibras tipo C, A δ y A β (Birch y cols., 2013).

Tabla 1. Clasificación de las fibras nerviosas en base a la velocidad de conducción					
Tipo de fibra		Velocidad conducción	Diámetro	Vaina de mielina	Función
Fibra A	α	70-120	10-20	Sí	Motora
	β	40-70	5-12	Sí	Sensitiva
	γ	10-50	3-6	Sí	Huso muscular
	δ	6-30	2-5	Sí	Sensorial; tacto, vibración
Fibra B		3-15	<3	Sí	Autónoma preganglionar
Fibra C		0,5-2	0,4-1,2	No	Autónoma postganglionar y sensitiva; dolor, temperatura

El SNP del tronco está compuesto por nervios espinales o raquídeos (cervicales, torácicos, lumbares, sacros y coccígeos), que se extienden por pares desde la médula espinal, y por los ganglios que acogen los somas de las neuronas sensoriales y las neuronas motoras del sistema autónomo simpático. Los nervios espinales se mantienen unidos a la médula espinal a través de la raíz dorsal (posterior) y la raíz ventral (anterior), donde realizan sinapsis con las inter-neuronas para establecer contacto con el SNC. La raíz dorsal está formada exclusivamente por fibras sensoriales que transmiten impulsos asociados al dolor, la temperatura, la propiocepción o el tacto, y cuyos cuerpos celulares se localizan en los ganglios de la raíz dorsal (GRD). La raíz ventral consta de fibras motoras somáticas y autónomas, responsables de la contracción de la musculatura esquelética, así como de regular el funcionamiento de los órganos internos y de los anejos de la piel. En este caso, las neuronas motoras somáticas mantienen el soma alojado en la médula espinal, mientras que las fibras autónomas post-ganglionares crean sinapsis en los ganglios simpáticos que se mantienen conectados en una cadena paralela a la columna vertebral (ganglios paravertebrales simpáticos) (Birch y cols., 2013; John I. Hubbard y Henry de F Webster, 1974).

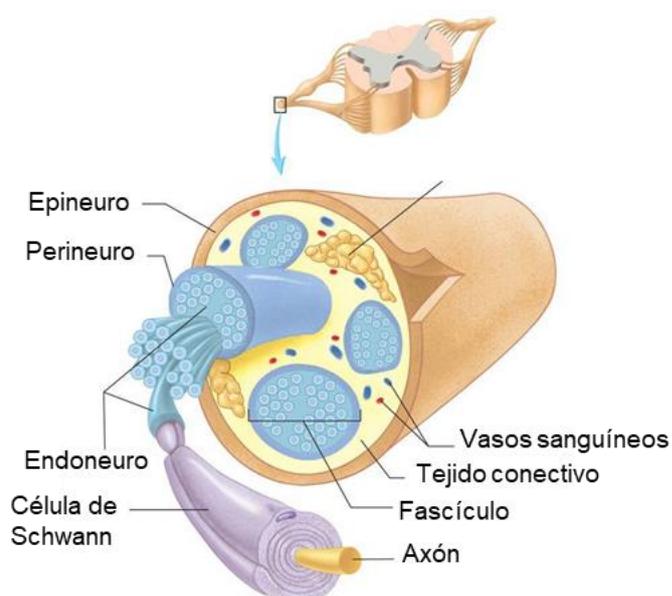


Figura 6. Estructura anatómica de un nervio periférico. Los nervios periféricos se componen de prolongaciones axonales que se asocian a células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes. Las unidades axón-Schwann se rodean de una capa de tejido conectivo; el endoneuro. Los axones y sus cubiertas se agrupan para formar unidades de mayor calibre, fascículos, que se rodean a su vez de otra capa de tejido conectivo; el perineuro. Los nervios contienen varios fascículos envueltos por una cubierta conectiva; el epineuro. Dentro del nervio, el plexo vascular intraneural irriga las distintas estructuras nerviosas. Imagen adaptada de <http://bodyanatomy.info>.

Introducción

Los nervios periféricos son estructuras compactas formadas por grupos de axones rodeados de células de Schwann y tejido conectivo (**Figura 6**). En el SNP, cada filamento axonal está rodeado por una célula de Schwann, que en las fibras mielinizadas incluye una vaina de mielina producida por la propia célula de Schwann. Cada unidad axón-Schwann está rodeada por una membrana basal (neurolema), seguida de una fina capa conectiva denominada **endoneuro**. Los axones se agrupan en fascículos para formar haces de mayor calibre. Los fascículos están a su vez rodeados por otra capa de tejido conectivo, el **perineuro**, compuesta por láminas concéntricas de células aplanadas y fibras de colágeno. Los distintos conjuntos de fascículos son finalmente envueltos por el **epineuro**, una cubierta de tejido conectivo denso que representa la superficie externa de los nervios. Dentro de los nervios, los axones forman un plexo intraneural, de forma que van ocupando posiciones en diferentes fascículos a lo largo de su recorrido. Los nervios periféricos reciben además una rica vascularización que irriga la estructura nerviosa durante todo su trayecto. Los vasos presentes dentro de los haces nerviosos se conectan en red y forman el denominado sistema vascular intraneural (Birch y cols., 2013; Reina y cols., 2000).

1.6.2 Plexos nerviosos cutáneos

Las terminaciones nerviosas cutáneas se organizan en tres grandes plexos orientados en paralelo a la epidermis (al igual que los vasos); el **plexo subcutáneo**, el **plexo cutáneo** y el **plexo subepidérmico**. Esta distribución, así como el número de plexos presentes en la piel, puede variar entre especies (Botchkarev y cols., 1997). En la región más superficial de la piel, se encuentra el plexo nervioso subepidérmico, compuesto por fibras nerviosas más delgadas generalmente no mielinizadas, a partir de las cuales surgen fibras axonales libres que penetran en el estrato basal y ascienden hasta el estrato granuloso. El plexo cutáneo, localizado en el límite inferior de la dermis reticular, inerva estructuras dérmicas como el folículo piloso, el músculo erector del pelo o los vasos sanguíneos. En la región más profunda de la piel se extiende el plexo nervioso subcutáneo, el cual consta de nervios de gran calibre que están en su mayoría mielinizados. En roedores, el plexo subcutáneo se ubica muy próximo al panículo carnosos, generalmente por debajo, e inerva los vasos sanguíneos que irrigan la musculatura cutánea (Reinisch y Tschachler, 2005; Tschachler y cols., 2004).

1.6.3 Inervación autónoma

Las fibras autonómicas presentes en la piel corresponden exclusivamente a prolongaciones neuronales simpáticas, cuyos cuerpos celulares se encuentran en los ganglios paravertebrales. El sistema neurovegetativo cutáneo se compone de fibras de tipo C, con velocidad de conducción lenta y no mielinizadas (**Figura 7**), que inervan el músculo erector del pelo (1), los vasos sanguíneos y linfáticos (2) y las glándulas sudoríparas (3), y regulan funciones como la erección del pelo, la vasodilatación y la vasoconstricción, o la sudoración. Las glándulas sebáceas son anexos no

inervados por el sistema nervioso autónomo y funcionan exclusivamente bajo control hormonal (Ashrafi y cols., 2016; Misery, 2014; Vetrugno y cols., 2003).

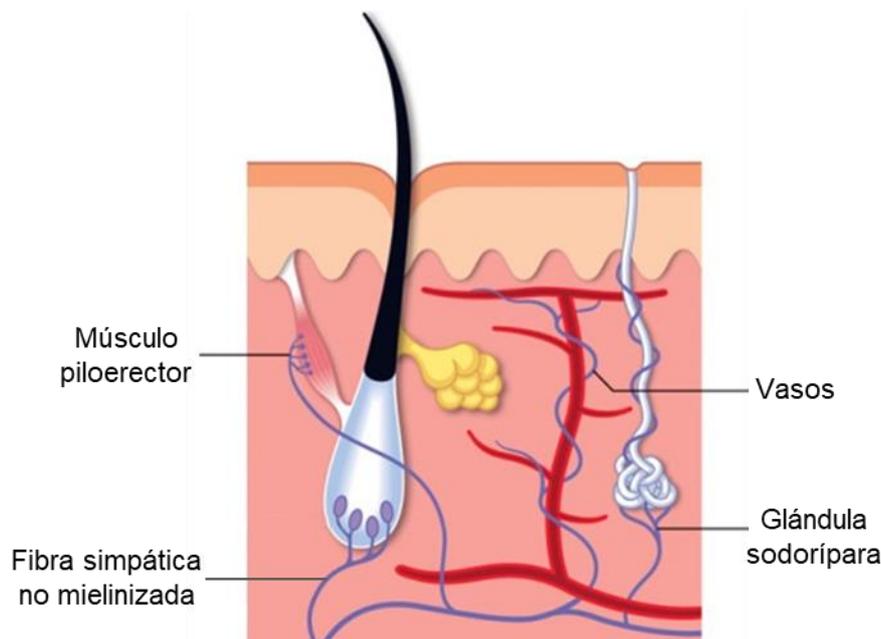


Figura 7. Inervación autónoma de la piel de tronco. En la piel troncal, la inervación autonómica o vegetativa está restringida al sistema nervioso simpático. Las fibras autonómicas son responsables de controlar las funciones de varias estructuras cutáneas; (1) la contracción del músculo erector del pelo, (2) la secreción y la excreción de las glándulas sudoríparas y (3) la permeabilización de los vasos sanguíneos. Imagen adaptada de (Ashrafi y cols., 2016; Misery, 2014).

1.6.4 Inervación sensitiva

Las fibras nerviosas sensitivas constituyen el tipo neuronal más abundante de la piel. La innervación sensitiva se produce de forma segmentaria, delimitando territorios cutáneos denominados dermatomas, definidas como áreas inervadas por fibras procedentes de una única raíz espinal posterior. El sistema somato-sensorial cutáneo está compuesto por fibras de tipo C, A δ y A β (**Tabla 1**), las cuales participan, según combinatorias bien establecidas, en la formación de los receptores sensoriales que perciben los estímulos procedentes del medio externo. Los receptores cutáneos sensoriales se clasifican en función de la naturaleza del estímulo, incluyendo (1) los mecanorreceptores, que perciben los estímulos mecánicos no dolorosos y definen el tacto; (2) los termorreceptores, que registran información sobre la temperatura; (3) los nociceptores, responsables de percibir estímulos dolorosos de uno o varios tipos (denominados nociceptores multimodales); y (4) los receptores de prurito, asociados a la sensación del picor. La distribución de estos receptores es notablemente diferente entre la piel glabra, restringida a la piel palmo-plantar, a los labios y a la mucosa genital, y la piel pilosa, que cubre aproximadamente el 90% de toda la superficie corporal (Misery, 2014; Munger y Ide, 1988; Winkelmann, 1986; Zimmerman y cols., 2014).

Introducción

Entre los diferentes receptores sensoriales cutáneos, los mecanorreceptores reciben una atención particular por llevar a cabo funciones relevantes (como la percepción del tacto) y por haber evolucionado para formar estructuras complejas y altamente especializadas que se adaptan a los distintos tipos de piel. Los mecanorreceptores que responden a estímulos inofensivos se denominan receptores de bajo umbral de activación (en inglés, *low threshold mechanoreceptors*, LTMC), mientras que los que se activan ante estímulos potencialmente peligrosos, se consideran receptores de alto umbral de activación (en inglés, *high threshold mechanoreceptor*, HTMC), incluidos entre los nociceptores. Entre los mecanorreceptores de bajo umbral de activación o LTMCs, a su vez, se distinguen receptores de adaptación lenta (en inglés, *slow adapting*, SA), que se mantienen activos durante todo el transcurso del estímulo, y los de adaptación rápida (en inglés, *rapid adapting*, RA), que responden solo al inicio y al final del estímulo. Los receptores sensoriales pueden estar constituidos por terminaciones nerviosas desnudas o estar rodeadas de capsulas conjuntivas y conformar corpúsculos sensoriales (Abraira y Ginty, 2013; Birch y cols., 2013; Iggo, 1984; Munger y Ide, 1988; Winkelmann, 1986). En la tabla 2 se resumen los diferentes tipos de mecanorreceptores presentes en la piel glabra y piel pilosa, y se definen sus características principales (**Tabla 2**).

Subtipo	Fibra	Tipo de piel	Tipo de terminal	Localización	Estímulo
SAI-LTMR	A β	Glabra	Complejo de Merkel	Capa basal de la epidermis	Textura
		Pilosa	Complejo de Merkel	Alrededor de folículos Guard	
SAII-LTMR	A β	Glabra	Corpúsculo de Ruffini	Dermis profunda	Estiramiento
		Pilosa	Sin definir	Sin definir	
RAI-LTMR	A β	Glabra	Corpúsculo de Meissner	Papilas dérmicas	Movimiento, desviación del folículo
		Pilosa	Terminal lanceolada longitudinal	Folículos Guard y Awl-Auchene	
RAII-LTMR	A β	Glabra	Corpúsculo de Pacini	Dermis profunda	Vibración
Aδ-LTMR	A δ	Pilosa	Terminal lanceolada longitudinal	Folículos Awl-Auchene y Zigzag	Desviación del folículo
C-LTMR	C	Pilosa	Terminal lanceolada longitudinal	Folículos Awl-Auchene y Zigzag	Desviación del folículo
HTMR	A β , A δ , C	Glabra/pilosa	Terminal libre	Epidermis y Dermis	Mecánico nocivo

1.6.4.1 Inervación sensorial de la piel glabra

En la piel glabra, los receptores sensoriales destinados a la percepción de la temperatura (termorreceptores), el dolor (nociceptores, HTMR) y los receptores de prurito, están representados por fibras nerviosas libres intra-epidérmicas de tipo C y tipo A δ . Adicionalmente, y teniendo en cuenta que está restringida a las regiones palmo-plantares, la piel glabra contiene una variedad de

mecanorreceptores especializados en el tacto discriminativo, que permiten distinguir de forma precisa la textura y la forma de los objetos para un buen control del agarre (Misery, 2014).

En la piel glabra se han descrito cuatro tipos de mecanorreceptores de bajo umbral de activación (LTMR), todos se asocian a fibras mielinizadas de tipo A β y forman corpúsculos estructural y funcionalmente complejos; (1) **El complejo de Merkel** está formado por fibras A β ramificadas y por células mecanorreceptoras (células de Merkel) situadas en la capa basal de la epidermis. Los axones que contactan con las células de Merkel pierden su vaina de mielina al penetrar en la epidermis y adquieren una forma de disco aplanado, también denominados disco de Ranvier. Los complejos de Merkel son los receptores con mayor resolución espacial y son sensibles a la indentación de la epidermis, participando en la discriminación de la forma y la textura (Boulais y Misery, 2007; Haeberle y Lumpkin, 2008); (2) **Los corpúsculos de Ruffini**, son los receptores sensoriales más comunes y se sitúan en la dermis reticular, donde las fibras nerviosas se mezclan con fibras de colágeno y conforman una estructura apaisada. Son sensibles al estiramiento de la piel y participan también en la propiocepción; (3) Los **corpúsculos de Meissner**, se localizan justo debajo de la epidermis y están compuestos por una cápsula de colágeno que recubre un grupo de células lamelares aplanadas, entre las cuales se intercalan los terminales nerviosos ramificados y ascienden en forma de espiral. Los corpúsculos de Meissner son responsables de la percepción del movimiento de los objetos sobre la piel; (4) Finalmente, los **corpúsculos de Pacini**, los de mayor tamaño, se localizan en la unión dermo-hipodérmica, donde la fibra nerviosa está recubierta de láminas concéntricas de células tipo Schwann y capas de tejido conectivo (**Figura 8A**) (Munger y Ide, 1988; Purves y cols., 2001; Zimmerman y cols., 2014).

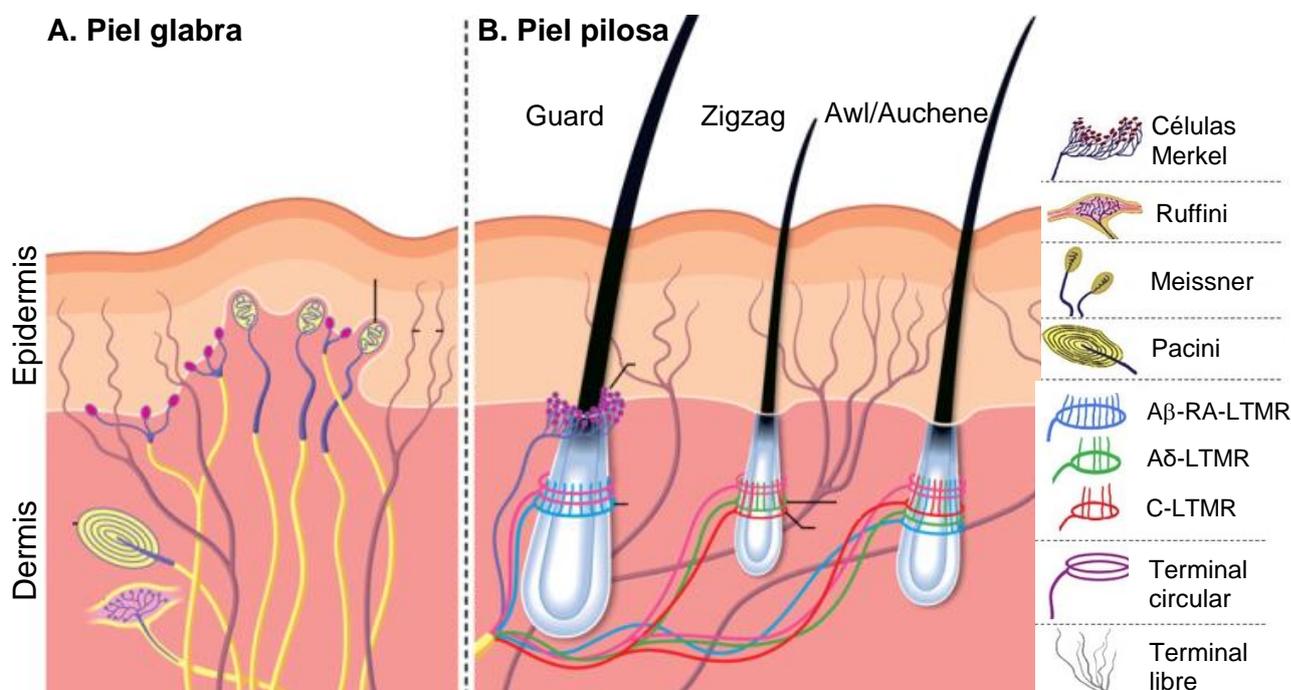


Figura 8. Inervación sensitiva de la piel glabra y pilosa. (A) Inervación sensitiva de la piel glabra. Los termorreceptores, los nociceptores y los receptores de prurito de la piel glabra corresponden a fibras libres tipo C y A δ . Los mecanorreceptores forman corpúsculos sensoriales complejos compuestos por fibras de tipo A β y células especializadas. En la piel glabra existen 4 mecanorreceptores principales de bajo umbral de activación (LTMRs); El complejo de Merkel y los corpúsculos de Ruffini, Pacini y Meissner. (B) Inervación sensitiva de la piel pilosa. Los termorreceptores, los nociceptores y los receptores de prurito de la piel pilosa corresponden a fibras libres tipo C y A δ . Los mecanorreceptores (LTMRs) de la piel pilosa están representados por terminales longitudinales lanceoladas (fibras de tipo C, A δ y A β). Cada tipo de folículo esta inervado por una combinación de LTMRs establecida; los folículos Guard (A β -RA-LTMR), los Awl-Auchene (A β -RA-LTMR, A δ -LTMR y C-LTMR) y los Zigzag (A δ -LTMR y C-LTMR). Adicionalmente, todos los tipos de folículos estan inervados por terminales circunferenciales. Imagen adaptada de (Misery, 2014).

1.6.4.2 Inervación sensorial de la piel pilosa

La inervación de la piel con pelo difiere notablemente de la piel glabra (**Figura 8B**). La mayoría de los estudios de inervación sobre áreas de piel con pelo se han realizado en modelos animales como el conejo, el gato y el ratón, por lo que los resultados no son totalmente extrapolables al humano. En las regiones interfoliculares (libres de folículos), se pueden encontrar estructuras similares a los complejos de Merkel, denominados discos táctiles (en inglés, *touch domes*) y terminaciones nerviosas libres, histológicamente similares a las observadas en la piel glabra. La piel pilosa, no obstante, carece de los corpúsculos sensoriales Meissner, Pacini y Ruffini (Misery, 2014; Zimmerman y cols., 2014).

La piel pilosa por otro lado, se caracteriza por la presencia de folículos, anexos cutáneos densamente inervados, que se consideran verdaderos órganos mecano-sensoriales (Abraira y Ginty, 2013; Lechner y Lewin, 2013a). Como se ha descrito en el apartado 1.2.1, los folículos pilosos presentes en la piel troncal del ratón se clasifican como Guard, Zigzag y Awl/Auchene (Driskell y cols., 2009; Schlake, 2007). Cada tipo de folículo, además de ser morfológicamente distinto, esta inervado por una única combinación de mecanorreceptores de bajo umbral de activación o LTMR. La inervación se produce a la altura de la protuberancia, justo debajo de la glándula sebácea, donde las terminales nerviosas, que pueden ser de tipo C, A γ y/o A β , se combinan para rodear específicamente cada subtipo de folículo piloso (Lechner y Lewin, 2013b; Li y cols., 2011; Rutlin y cols., 2014). Estos mecanorreceptores asociados a los folículos se caracterizan por presentar terminales longitudinales Lanceolados (con forma de lanza) no mielinizadas, que se orientan en paralelo al eje del folículo y perciben los movimientos de deflexión del pelo (Yamamoto, 1966). Los folículos tipo Guard, están exclusivamente inervados por fibras tipo A β , los Zigzag reciben fibras de tipo C y A γ , y los folículos de tipo Awl/Auchene están triplemente inervados por los tres tipos de fibras, C, A γ y A β . En roedores también se han descrito receptores circunferenciales que se enrollan alrededor de las terminaciones longitudinales lanceoladas y parecen encontrarse en todos los tipos de folículos, aunque cumplen una función aún desconocida (**Figura 8B**) (Li y Ginty, 2014; Li y cols., 2011; Misery, 2014; Zimmerman y cols., 2014).

2. ORIGEN EMBRIONARIO DE LA PIEL Y SUS COMPONENTES

Tal y como se ha expuesto en el apartado anterior, la piel es un órgano heterogéneo formado por múltiples tipos celulares. Los diferentes elementos que componen la piel, además de ser estructural y funcionalmente variados, proceden de orígenes embrionarios diferentes. Con el objetivo de definir el desarrollo embrionario de las principales estructuras que forman la piel, en este apartado, se describe el proceso y los mecanismos que regulan la formación de tejidos embrionarios que dan lugar a las principales poblaciones celulares de la piel, la cresta neural, las somitas y el mesodermo de la placa lateral.

2.1 Cresta neural

La cresta neural es una población de células migratorias embrionarias, exclusiva de los animales vertebrados, generada a partir del ectodermo y que contribuye a la formación de múltiples tejidos y tipos celulares. Actualmente, la cresta neural es considerada por algunos autores como el cuarto tejido embrionario, debido al gran número de estructuras que derivan de ella (Hall, 2000).

2.1.1 Especificación de la cresta neural

En las fases finales de la gastrulación, la formación de la cresta neural se inicia en los bordes de la placa neural, en el límite entre el ectodermo neural y no-neural, regiones del ectodermo que darán lugar al SNC y a la epidermis respectivamente (**Figura 9A**). Durante la neurulación, proceso en el que se forma el tubo neural, la placa neural se pliega, a la vez que los bordes de la placa se elevan y comienzan a aproximarse entre sí (**Figura 9B**). Tras el cierre del surco y fusión de los pliegues neurales, la cresta neural se define en el extremo dorsal del tubo neural y se caracteriza por la expresión de marcadores específicos de la cresta neural (**Figura 9C**). Las células precursoras que conforman la cresta neural pierden sus uniones intercelulares y sufren una transición epitelio-mesénquima para convertirse en células migratorias multipotentes con capacidad de desplazarse ampliamente a lo largo de rutas migratorias predeterminadas (Duband, 2010). Una vez alcanzados los tejidos u órganos de destino, las células migratorias de la cresta neural se diferencian y dan lugar a multitud de derivados (**Figura 9D**) (Douarin y Kalcheim, 1999; Dupin y cols., 2006). Esta sucesión de eventos, desde la inducción de la placa, hasta la diferenciación de las células de la cresta neural, está regulada por una compleja red de genes (en inglés, *gene regulatory network*, GRN) (Betancur y cols., 2010; Meulemans y Bronner-Fraser, 2004; Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008).

La inducción del borde de la placa neural está dependiente principalmente de tres vías de señalización, BMP (del inglés, *Bone morphogenetic protein*), Wnt y FGF (del inglés, *fibroblast growth factor*) su coordinación depende de los tejidos embrionarios adyacentes (Aybar y cols., 2002; Prasad y cols., 2012). El mesodermo paraxial regula la señalización de BMP (Marchant y cols., 1998), Wnt (LaBonne y Bronner-Fraser, 1998) y FGF (Monsoro-Burq y cols., 2003), mientras que el ectodermo

no-neural está asociado con la vía de Wnt (García-Castro y cols., 2002). En respuesta a estas señales inductoras, varios factores de transcripción (AP-2, Hairy2, Msx1, Msx2, Dlx3, Dlx5, Pax3 y Pax7) se expresan de forma combinada en el borde de la placa neural y definen la región que da lugar a la cresta neural. Estos factores, conocidos como especificadores del borde de la placa, son responsables de establecer la competencia de la cresta neural y de activar la expresión de otra serie de genes denominados especificadores de la cresta neural (Milet y Monsoro-Burq, 2012). Entre estos factores de transcripción, también conocidos como marcadores de la cresta neural, se encuentran Snai1, Snai2, Sox8 (Schepers y cols., 2000), Sox9 (Barrionuevo y cols., 2008; Cheung y Briscoe, 2003), Sox10 (Southard-Smith y cols., 1998), FoxD3 (Labosky y Kaestner, 1998), Twist y c-Myc. La especificación de la cresta neural define un nuevo estado regulatorio, que permitirá a las células controlar la compleja secuencia de eventos que determinaran su destino. Estos factores controlan cambios relacionados con las propiedades adhesivas, la morfología o la movilidad y regulan la segregación de las células desde el neuro-epitelio, la migración a lo largo de vías estereotipadas o el asentamiento y la diferenciación de la cresta neural (Barembaum y Bronner-Fraser, 2005).

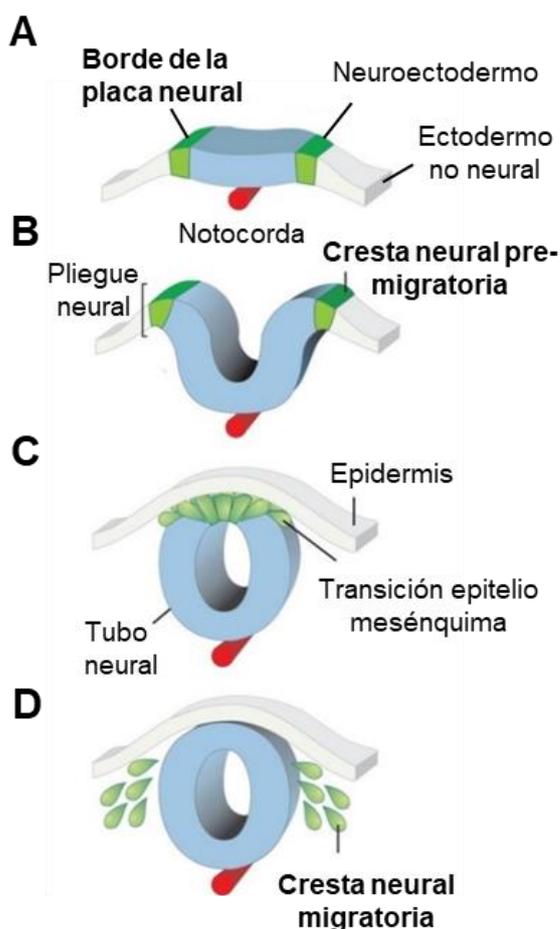


Figura 9. Especificación de la cresta neural. La especificación de la cresta neural se produce durante la neurulación, proceso de formación del tubo neural. Tras la especificación de los bordes de la placa neural (A), la placa neural se pliega y los bordes comienzan a aproximarse hasta completar el cierre y la formación del tubo (B). La especificación de la cresta neural ocurre en el dorso del tubo neural y se caracteriza por la expresión de marcadores específicos que definen la población de la cresta neural (C). Las células precursoras de la cresta neural padecen una transición epitelio-mesénquima para adquirir capacidades migratorias y desplazarse a lo largo de rutas migratorias predeterminadas, alcanzar sus tejidos diana y diferenciarse (D). Imagen adaptada de (Simões-Costa y Bronner, 2015).

2.1.2 Regionalización de la cresta neural

Las células de la cresta neural migran a lo largo del eje rostro-caudal siguiendo una secuencia controlada a nivel espacio-temporal. En base a la posición del eje a partir de la cual emergen las distintas poblaciones celulares, la cresta neural se subdivide en la cresta neural craneal, la cresta neural troncal, la cresta neural vagal y la cresta neural cardíaca, cada una de las cuales dará lugar a una combinación de derivados estandarizada (Douarin y Kalcheim, 1999; Dupin y cols., 2006).

Las células de la **cresta neural craneal**, migran en dirección dorsolateral y producen el mesénquima cráneo-facial, incluyendo el cartílago, los huesos, las neuronas, las células gliales y el tejido conectivo de la cara (Couly y cols., 1992; Graham y cols., 2004; Le Lièvre y Le Douarin, 1975a). Las células de la **cresta neural troncal**, migran siguiendo dos rutas principales, (1) La vía ventrolateral, la ruta temprana, en la que las células migran por la mitad anterior del esclerotoma, para formar el cartílago de las vértebras y dar lugar a neuronas sensoriales de los GRD. Estas mismas células continúan migrando ventralmente para generar los ganglios simpáticos, la médula adrenal y las agregaciones nerviosas que rodean la aorta. (2) La vía dorsolateral, la ruta tardía, transcurre bajo el ectodermo y por encima de las somitas para dar lugar a las células pigmentarias de la piel, los melanocitos (Bronner-Fraser y Fraser, 1989; Dupin y Le Douarin, 2003; Serbedzija y cols., 1994; Thomas y Erickson, 2008). La **cresta neural vagal** y **sacral** migran siempre en dirección ventral y generan los ganglios parasimpáticos del sistema nervioso entérico (SNE), la subdivisión del sistema nervioso autónomo que inerva el aparato digestivo, así como la mesénquima esplácnica del tracto gastrointestinal (Burns y Douarin, 1998; Burns y Le Douarin, 2001; Burns y cols., 2000; Pomeranz y cols., 1991; Wang y cols., 2011). La **cresta neural cardíaca** es una subregión de la cresta neural vagal a partir de la cual se desarrollan los melanocitos, las neuronas, el cartílago y el tejido conectivo del tercer, cuarto y sexto arcos faríngeos. Además de producir el tejido conectivo de las paredes arteriales cardíacas y contribuir al septo que separa la circulación de pulmonar de la aórtica (Hutson y Kirby, 2003; Kirby, 1987; Odelin y cols., 2017; Snider y cols., 2007). En la tabla 2 se recogen los derivados de las dos regiones principales de la cresta neural, la cresta neural craneal y troncal (**Tabla 3**).

Tabla 3. Derivados de la cresta neural craneal y troncal		
	Cresta neural troncal	Cresta neural craneal
Sistema Nervioso		
Sistema nervioso sensitivo	Ganglios espinales Célula satélite de los ganglios sensitivos Células de Schwann	Ganglios de los nervios craneales Célula satélite de los ganglios sensitivos Células de Schwann
Sistema nervioso autonómico	Ganglios simpáticos: celiaco y mesentérico Ganglios parasimpáticos: plexo pélvico y visceral	Ganglios parasimpáticos: cuerpo ciliar, etmoidal, esfeno palatino, submandibular y visceral

Introducción

Meninges		Leptomeninges del prosencéfalo y parte del mesencéfalo
Células pigmentarias	Melanocitos	Melanocitos
Células endocrinas y paraendocrinas	(1) Células cromafines de la médula adrenal; (2) células neuroendocrinas del corazón y los pulmones	(1) Cuerpo carotideo (células tipo I); (2) Células para foliculares de la tiroides
Mesectodermo		
Esqueleto		(1) Huesos del cráneo (parte), nasal, orbital, paladar, maxilar, mandibular, esfenoidal (parte) y trabécula (parte), (2) Cartílago visceral y cartílago del oído externo (parte)
Tejido conectivo		(1) Dermis y grasa de la piel; (2) Cornea del ojo, capa estromal y endotelial; (3) Papila dental, odontoblastos; (4) Tejido conectivo del estroma de las glándulas tiroides, paratiroides, timo, salivar y lagrimal; (5) Adipocitos
Músculo		(1) Músculo ciliar del ojo; (2) Músculo liso de la dermis; (3) Músculo liso vascular

2.1.3 Células pre-migratorias y migratorias de la cresta neural

Tal y como se ha explicado en el apartado anterior, la cresta neural está compuesta por un grupo de progenitores que se dispersan por todo el embrión y dan lugar a multitud de tipos celulares (Douarin y Kalcheim, 1999). Existe cierta controversia sobre si esta amplia capacidad de diferenciación refleja la existencia de células multipotentes individuales, o sí, por el contrario, la cresta neural se compone de una mezcla heterogénea de progenitores de linaje restringidos.

Entre los trabajos que afirman que las células pre-migratorias y migratorias representan una población embrionaria multipotente (Bronner-Fraser y Fraser, 1988a, 1988b; Stemple y Anderson, 1992), destacan los primeros ensayos realizados sobre embriones de pollo *in vivo*. Estos estudios utilizaron un colorante vital (*lysinated rhodamine dextran*, LRD) para marcar individualmente células en el dorso del tubo neural y trazar los derivados procedentes de cada uno de los clones. Basándose en la posición y en la morfología de las células descendientes, los autores concluyeron que las células pre-migratorias y migratorias tenían capacidad de generar derivados neuronales (neuronas simpáticas y sensoriales) y no-neuronales (células de Schwann y melanocitos) y que por lo tanto se trataban de células multipotentes (Bronner-Fraser y Fraser, 1988b). Sin embargo, utilizando un sistema similar para trazar células de la cresta neural en embriones de pollo y codorniz, un trabajo publicado por Krispin y colaboradores, propuso que las células de la cresta neural se organizan dentro de la fracción dorsal del tubo neural de acuerdo a un patrón espacio-temporal específico y que cada célula daba lugar a un solo tipo celular dependiendo del momento y de la localización a

partir de la cual se originaba la migración. Además, al desviar las células de sus rutas estereotipadas e inyectarlas en vías migratorias alternativas, las células adoptaban el fenotipo correspondiente al derivado de la vía inicial, sugiriendo que los progenitores de la cresta neural estaban comprometidos antes de la migración (Krispin y cols., 2010, Nitzan y cols., 2013). Las discrepancias entre ambos trabajos podrían deberse a diferencias técnicas, ya que los estudios iniciales de trazados *in vivo* no hacían uso de marcadores específicos para identificar los diferentes tipos celulares y se guiaban por la morfología celular. Recientemente, basándose en líneas transgénicas de ratón para realizar trazados de linaje de las células de la cresta neural, se ha demostrado que la mayoría de las células de la cresta neural, tanto antes como durante la migración, son multipotentes (Baggiolini y cols., 2015).

2.1.4 Células post-migratorias de la cresta neural

Se considera que las poblaciones embrionarias pre-migratorias y migratorias de la cresta neural pierden su potencial una vez alcanzado su tejido diana. Sin embargo, en la literatura se pueden encontrar multitud de trabajos que defienden la existencia de poblaciones celulares con características similares a las de las células madre de la cresta neural (CMCN) en tejidos embrionarios y también en tejidos adultos. Las aproximaciones experimentales mediante las cuales se han identificado las diferentes poblaciones de CMCN han evolucionado junto al desarrollo de nuevas técnicas empíricas, aún así, por lo general los estudios se han basado en el fenotipo estándar, definido por las propiedades de la cresta neural, como (1) la capacidad de diferenciación multilinaje, incluyendo tipos celulares neurales y mesenquimales, (2) la capacidad de autorenovación *in vivo* e *in vitro*, y (3) la expresión de marcadores canónicos de la cresta neural, Sox10, Sox9, Slug, Twist y Snail, en el tejido *in situ* o tras su aislamiento en cultivo.

La mayoría de las poblaciones de CMCN se han descrito en tejidos que se desarrollan a partir de la cresta neural, como los nervios periféricos, los GRD, la córnea o el SNE. El grupo liderado por el Dr. Sean J. Morrison, se ha dedicado intensivamente a la investigación de las CMCN. En un primer estudio realizado en el año 1999, este grupo aisló por citometría de flujo células con expresión de p75NTR y p0 (realizando marcajes dobles) a partir de nervios ciáticos de ratas embrionarias (E14,5). El cultivo *in vitro* de las diferentes poblaciones demostró que todas tenían capacidad de autorenovación y se diferenciaban a células con fenotipos de neurona, glía y miofibroblasto, siendo la fracción p75NTR+ la única con capacidad de producir clones multipotentes. Adicionalmente se inyectó la población p75NTR+/p0- en regiones migratorias de la cresta neural en embriones de pollo, la cual dio lugar a neuronas y a células gliales, demostrando así su potencial *in vivo*. Este trabajo tuvo implicaciones importantes en la forma de propagar y diferenciar las CMCN, ya que introdujo cambios en los medios de cultivo que permitieron generar más eficientemente derivados de la cresta neural (Morrison y cols., 1999).

Introducción

Este mismo grupo identificó células post-migratorias de la cresta neural con capacidad de autorenovación y diferenciación multilineaje en el SNE, los ganglios simpáticos y los ganglios sensoriales de la raíz dorsal (Bixby y cols., 2002). En un trabajo posterior, el grupo de Sean J Morrison utilizó de nuevo el marcador p75NTR (combinándolo con la integrina) para aislar poblaciones de CMCN embrionarias (E14,5) del intestino y del nervio ciático. Este trabajo reveló que las CMCN (p75NTR+/integrina4+) aisladas del intestino presentaban mayor sensibilidad a factores neurogénicos en comparación a las células aisladas del nervio ciático, las cuales respondían más eficientemente a factores gliogénicos. Este fenotipo podría explicarse por los correspondientes procesos de neurogénesis y gliogénesis que ocurren en el intestino y en los nervios periféricos en ese estadio. Sin embargo, y de acuerdo con el fenotipo *in vitro*, al inyectar las poblaciones p75NTR+/integrina4+ en nervios ciáticos de pollos en desarrollo, las células procedentes del intestino se diferenciaron preferentemente a neuronas y las del nervio dieron lugar exclusivamente a células de tipo glial, sugiriendo que existen diferencias intrínsecas en la respuesta a señales del entorno entre ambas poblaciones de CMCN (Bixby y cols., 2002). El análisis de la fracción p75NTR+ aislada del intestino en estadios posnatales demostró que estas células multipotentes persisten en el tejido adulto pero su potencial de auto-renovación y diferenciación se ven afectados. Así, tras ser trasplantadas en los nervios de embriones de pollo, las células p75NTR+ adultas generaron principalmente glía. Las variaciones en el potencial de diferenciación, sesgados hacia el fenotipo glial, podrían estar causados por cambios en la capacidad de respuesta a factores de determinación del linaje (Kruger y cols., 2002). Años después, este mismo grupo utilizó las líneas transgénicas de ratón *Wnt1-Cre* y *Dhh-Cre* para trazar las células derivadas de la cresta neural, con el propósito de definir el origen de las CMCN caracterizadas previamente en cultivo. Una de las observaciones más interesantes del trabajo fue que los progenitores embrionarios presentes en los nervios a distintos estadios y trazados por ambos constructos (*Wnt1-Cre* y *Dhh-Cre*), generaban fibroblastos endoneuriales además de células de Schwann (Joseph y cols., 2004a).

En esta misma línea, se han identificado varias poblaciones de precursoras de la cresta neural en los GRD (Hagedorn y cols., 1999; Li y cols., 2007; Nagoshi y cols., 2008). En los cultivos de explantes generados a partir del GRD, las células p75NTR+/Nestina+ presentaban capacidad de autorenovación, formando esferas a partir de clones únicos, y daban lugar a tipos celulares neuronales, gliales y de músculo liso. En este caso, realizando ensayos de pulso y caza (en inglés, *pulse/chase*) mediante inyección de BrdU, los autores demostraron que los progenitores responsables del fenotipo *in vitro* se correspondían probablemente con las células satélites residentes en los ganglios (Li y cols., 2007). Un estudio similar llevado a cabo por el grupo de Hideyuki Okano, demostró que las células P0+ (aisladas del ratón transgénico *p0Cre/Floxed^{EGFP}*) crecían en cultivos en suspensión formando esferas y se diferenciaban a neuronas, glía y células musculares lisas. Estas células expresaban *in vitro* los marcadores de cresta neural p75NTR, Sox10, Nestina y Mushashi1 (Nagoshi y cols., 2008). Las células p0+ aisladas de otros tejidos como la médula ósea o el bigote presentaron un fenotipo y capacidad de diferenciación *in vitro* similares.

Teniendo en cuenta que P0 es un marcador específico de células gliales, este trabajo reforzó la idea de que las células relacionadas con los progenitores de la cresta neural en el GRD estaban relacionadas con el linaje glial.

2.2 Células *boundary cap*

Las células denominadas “*boundary cap*” (BC) derivan de la cresta neural y representan una población transitoria de células progenitoras localizadas en la médula espinal, en la zona de entrada de la raíz dorsal (siglas en inglés, DREZ) y en el punto de salida de las neuronas motoras (siglas en inglés, MEP). Las BC se distinguen de las células de la cresta neural y de las precursoras de Schwann por su localización y por la expresión de los marcadores *Krox20* (Maro y cols., 2004) y *Prss56* (Coulpier y cols., 2009; Gresset y cols., 2015). Las BC presentan un potencial de diferenciación similar al de las células precursoras de Schwann (en inglés *Schwann cell precursors*, SCP) y generan células de Schwann en los nervios y en los ganglios periféricos, neuronas nociceptivas y células satélite gliales en los GRD (Maro y cols., 2004). Adicionalmente, las BC migran junto a los nervios embrionarios y contribuyen a la formación de varias poblaciones de células de Schwann asociadas a los terminales nerviosos cutáneos (**Figura 10**) (Gresset y cols., 2015).

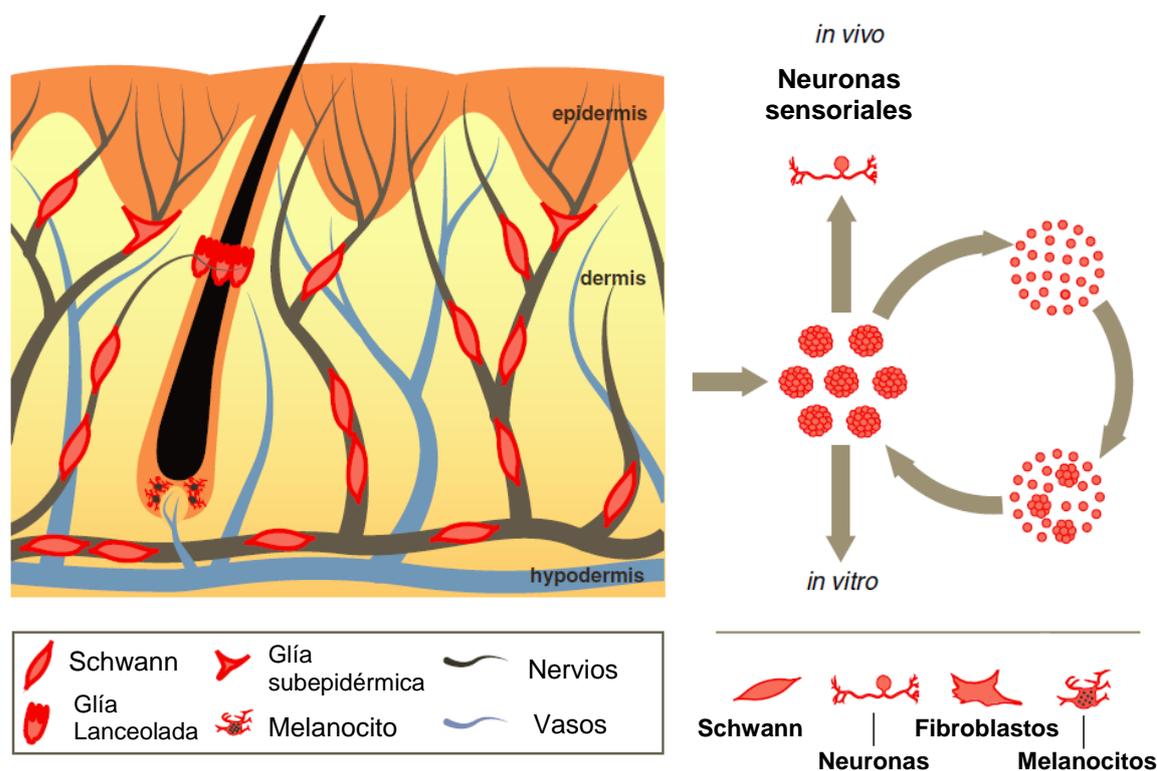


Figura 10. Poblaciones celulares derivadas de células BC en la piel del ratón adulto. Los derivados de las BC (en rojo) corresponden principalmente a las células de Schwann mielinizantes localizadas en la hipodermis y a las células de Schwann no mielinizantes que predominan en la dermis. Las células de Schwann no mielinizantes son altamente heterogéneas y además de las células de Schwann asociadas a los nervios, existen dos tipos más de Schwann terminales; (1) las asociadas a terminaciones nerviosas sensoriales que rodean los

Introducción

foliculos pilosos para formar los complejos Lanceolados (“glía Lanceolada”) y (2) las células que rodean las fibras nociceptivas en la región subepidérmica (“glía subepidérmica”). Entre los derivados dérmicos de las BCC se incluyen también los melanocitos de la matriz del pelo, Las células BC aisladas de la piel en cultivo de esferas, se renuevan de forma seriada y se diferencian en múltiples linajes tanto *in vitro* como *in vivo*. Imagen adaptada de (Radomska y Topilko, 2017).

Las células derivadas de las BC aisladas de la piel han demostrado tener una amplia capacidad de diferenciación *in vitro*, dando lugar a tipos celulares gliales, neuronales y también mesodérmicos (incluyendo células musculares lisas y adipocitos), y generan también neuronas sensoriales al ser inyectadas en el ganglio de la raíz dorsal y el nervio periférico (**Figura 10**) (Gresset y cols., 2015). Así, la capacidad de crecer en cultivos en suspensión formando esferas y el potencial mostrado por las células BC encaja con otras poblaciones multipotentes derivadas de la piel, también relacionadas con la cresta neural (Biernaskie y cols., 2009; Etxaniz y cols., 2014; Jinno y cols., 2010; Wong y cols., 2006).

2.3 Las células de Schwann

Las células de Schwann dérmicas representan una de las poblaciones celulares más relevantes en esta Tesis, y por eso, en esta sección se trata en detalle el proceso de formación de las células de Schwann a partir de la cresta neural, así como varios aspectos relacionados con su desarrollo embrionario y su capacidad de reprogramación en respuesta a lesiones producidas en el nervio. Las células de Schwann son células gliales del SNP responsables de generar la vaina de mielina que cubre las prolongaciones axónicas y de proporcionar soporte trófico y estructural a las neuronas a las que envuelven. Desde las primeras fases del desarrollo del SNP, las células del linaje de Schwann y las neuronas interactúan de forma coordinada e ininterrumpida durante las diferentes fases que comprenden la formación y maduración de los nervios periféricos. Esta interacción se perpetúa hasta la edad adulta y es fundamental para la homeostasis del SNP, ya que las neuronas proporcionan señales esenciales que controlan las funciones de las células de Schwann, mientras que las células de Schwann promueven la supervivencia neuronal, favorecen una transducción del potencial de acción eficiente, y participan activamente en la regeneración del nervio tras una lesión.

2.3.1 Desarrollo del linaje de Schwann

Las células de Schwann se originan a partir de la cresta neural, siguiendo una secuencia de eventos altamente coordinada a lo largo del desarrollo embrionario (**Figura 11**). Antes de que las células gliales del SNC se generen en la médula espinal, los progenitores de la cresta neural dan lugar a las **células precursoras de Schwann** (SCP), transición que se produce junto a los axones de los nervios en crecimiento mientras estos se abren camino para alcanzar sus tejidos diana (E12-13 de ratón). Las SCP representan un estadio intermedio entre las progenitoras de la cresta neural y las **células de Schwann inmaduras** (en inglés, *immature Schwann cells*, iSC), que se forman en los estadios E15-16 y persisten hasta el nacimiento. En etapas post-natales, las iSC se diferencian a

células de Schwann mielinizantes (en inglés, *myelinating Schwann cells*, mSC) y **no-mielinizantes** (en inglés, *non myelinating Schwann cells*, nmSC), en un proceso que depende principalmente del calibre del axón al que se asocia cada célula. Tras la lesión de un nervio, las células de Schwann son capaces de revertir a un estadio de diferenciación similar al de las iSC para actuar en el proceso de reparación, convirtiéndose en células de Schwann reparadoras o **células de Büngner** (revisado por Jessen y Mirsky, 2005; Jessen y cols., 2015a; Mirsky y cols., 2008; Woodhoo y Sommer, 2008a).

La mielinización comienza con la clasificación radial (en inglés, *radial sorting*), en el que las células de Schwann proyectan prolongaciones citoplasmáticas entre los axones para separarlos y establecer una relación 1:1 con ellos (Martin y Webster, 1973; Webster y cols., 1973). De este modo, las células que rodeen axones con diámetros mayores a 1 µm, principalmente motoneuronas y neuronas sensoriales que perciben estímulos mecánicos y propioceptivos, se convertirán en células productoras de mielina. El recubrimiento de mielina lo lleva a cabo una única célula de Schwann alrededor de un único axón y conlleva la producción de una estructura aislante especializada rica en lípidos que permite la rápida conducción de los potenciales de acción a lo largo del axón. Alternativamente, las células que se asocian a axones de menor calibre (diámetros inferiores a 1 µm), se diferenciarán a células no-mielinizantes. En este caso, una célula de Schwann individual rodea múltiples axones al mismo tiempo, separándolos entre sí con una fina capa citoplasmática y formando una estructura denominada **haz de Remak** (Figura 11) (Jessen y Mirsky, 2005; Jessen y cols., 2015a; Mirsky y cols., 2008).

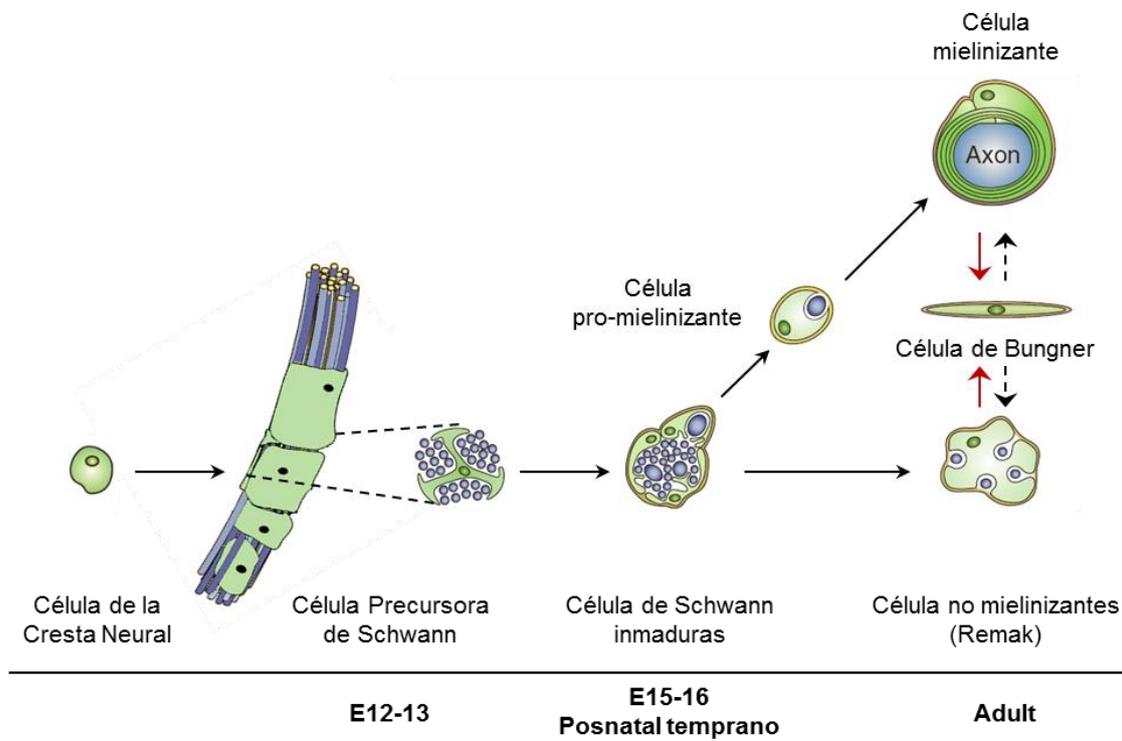


Figura 11. Desarrollo embrionario de las células de Schwann en ratón. Las células de Schwann se originan en la cresta neural. En el estadio E12-13 los progenitores de la cresta neural migratoria se diferencian a células precursoras de Schwann (SCP) y se localizan junto a nervios embrionarios formados por axones fuertemente

Introducción

empaquetados. Consecutivamente, durante los estadios E15-16, las SCP dan lugar a las células de Schwann inmaduras (iSC), las células que rodean los nervios embrionarios hasta el nacimiento. Durante las etapas posnatales tempranas, las iSC se diferencian a células de Schwann mielinizantes (mSC) y no mielinizantes (nmSC). En respuesta a daño, las células de Schwann maduras se reprograman y participan en procesos de regeneración. A estas células especializadas se les denomina células de Büngner o células reparadoras. Imagen adaptada de (Jessen y Mirsky, 2005).

El desarrollo de las células de Schwann sucede en paralelo a la formación y maduración de los nervios periféricos. La especificación de las células de la cresta neural hacia el linaje de Schwann comienza en los nervios embrionarios tempranos, formados por axones fuertemente empaquetados, donde las SCP difícilmente consiguen intercalarse entre las fibras y se depositan en la superficie de los nervios. En este estadio, el espacio extracelular dentro del nervio es prácticamente inexistente y la lámina basal no se ha desarrollado aún. En los nervios embrionarios tardíos, los axones se descompactan ligeramente y se alinean en columnas para ser rodeados por las iSC recién diferenciadas. Dentro de los nervios se crean espacios en los que se genera una matriz extracelular rica en colágeno y aparecen los primeros fibroblastos y vasos sanguíneos. En ese momento, las iSC inician la síntesis de la lámina basal que revestirá las unidades axón-Schwann (Jessen y Mirsky, 2005; Jessen y cols., 2015a; Mirsky y cols., 2002; Wanner y cols., 2006a, 2006b).

2.3.2 Potencial de las SCP durante el desarrollo

Las SCP son consideradas progenitoras embrionarias multipotentes porque además de generar células propias del linaje de Schwann, dan lugar a otros tipos celulares, como melanocitos, neuronas o células mesenquimales. Por un lado, se ha descrito que durante la formación de los nervios cutáneos las SCP contribuyen a la formación de los melanocitos de la piel (Adameyko y cols., 2009, 2012; Ernfors, 2010b). La especificación de los melanocitos requiere disminuir la expresión del factor de transcripción *FoxD3* (Nitzan y cols., 2013), en un mecanismo regulado por *Sox2*, que mantiene el estadio inmaduro de las SCP e interacciona con los factores *Egr2* y *Mitf* para dirigir el compromiso de las SCP hacia linaje glial o melanocítico (Adameyko y cols., 2012). Las SCP también dan lugar a un subgrupo de neuronas parasimpáticas en el SNP craneal (Dyachuk y cols., 2014; Espinosa-Medina y cols., 2014). Durante la formación de los nervios de la cara, las SCP migran junto a las neuronas presinápticas hasta alcanzar los ganglios parasimpáticos donde se diferencian a células de Schwann y a neuronas parasimpáticas postganglionares. Adicionalmente, las SCP tienen la capacidad de diferenciarse a tipos celulares mesenquimales. Así, durante la formación de los nervios periféricos, las SCP se diferencian en iSC, y al mismo tiempo dan lugar a fibroblastos endoneuriales, responsables de formar la cubierta conectiva que rodea cada unidad axón-Schwann (Joseph y cols., 2004b). Por otro lado, se ha demostrado que las células gliales de los nervios embrionarios (SCP) y adultos (células de Schwann maduras) dan lugar a progenitoras mesenquimales que participan en la organogénesis y en la regeneración del diente incisivo de ratón, generando odontoblastos y células de la pulpa dental (Kaukua y cols., 2014). Del mismo modo, se ha descrito que las células de Schwann en estadios posnatales participan en la neurogénesis del

SNE, ya que una pequeña subpoblación de células de Schwann que recubren el intestino delgado adquiere el fenotipo neuronal en las mucosas (Uesaka y cols., 2015).

2.3.3 Mecanismos de regulación de las células de Schwann

2.3.3.1 Factores que contribuyen a la especificación de la glía periférica

La formación de las células de Schwann a partir de la cresta neural está regulada por multitud de señales, sin embargo, la implicación de las diferentes moléculas en la especificación del linaje glial no es siempre directa y algunos autores definen la gliogénesis como un proceso que sucede “por defecto” (en inglés “*default mode*”). Este modelo propone que la activación del desarrollo glial no se produce por vías inductivas clásicas, sino por la supresión de vías alternativas como la neuronal o la melanocítica (revisado en Jessen 2005). De acuerdo con este modelo, el factor de transcripción **FoxD3**, marcador de las células migratorias de la cresta neural, bloquea la determinación hacia el linaje neuronal y el melanocítico, pero es compatible con la diferenciación glial y su expresión se mantiene durante los estadios tempranos del linaje (Nitzan y cols., 2013). **Sox10**, es actualmente el único factor que ha demostrado ser esencial en la especificación del linaje glial. Por eso los ratones nulos para *Sox10* (*Sox10^{lacZ}*) carecen de glía periférica (Britsch y cols., 2001) y las progenitoras de la cresta neural deficientes en *Sox10* crecidas en cultivos *in vitro* son incapaces de adquirir un fenotipo glial, incluso cuando son instruidas por señales gliogénicas (Britsch y cols., 2001; Mollaaghababa y Pavan, 2003; Paratore y cols., 2001). Aun así, la expresión de *Sox10* no es exclusiva de las células gliales y se expresa también en células migratorias y post-migratorias de la cresta neural, así como en los melanocitos (Woodhoo y Sommer, 2008a). Uno de las funciones de *Sox10* es mantener la expresión de ErbB3 (Britsch y cols., 2001), receptor de la **Neuregulina-1** (NRG1), un factor de crecimiento que promueve indirectamente la gliogénesis, por suprimir activamente la neurogénesis (Shah y cols., 1994). La NRG1 es un factor ampliamente implicado en el desarrollo del linaje de Schwann (revisado por Birchmeier y Nave, 2008), sin embargo, varios estudios han demostrado que la NRG1 no es indispensable para la determinación del linaje glial (Garratt y cols., 2000; Lyons y cols., 2005).

2.3.3.2 Señales que regulan la supervivencia de las células de Schwann

La supervivencia de las poblaciones del linaje de Schwann depende de factores variados. La supervivencia de las SCP, por ejemplo, es totalmente dependiente de las señales procedentes de las neuronas a las que están unidas. Se ha observado que la pérdida de contacto axonal o la degeneración de los axones provoca la muerte de las SCP (Dong y cols., 1995). Uno de los factores más relevantes expresados por las neuronas y asociados a la supervivencia de las SCP es la NRG-1, por eso, la inhibición de la NRG-1 reduce masivamente el número de SCP en los nervios en desarrollo (Birchmeier, 2009). Sin embargo, a medida que se restringe el linaje de las células de Schwann, el control de la supervivencia deja de ser dependiente de señales axonales y pasa a estar

Introducción

regulada por un circuito autocrino compuesto por factores como NT3, PDGFR β , IGF1 o LIF (Meier y cols., 1999). La aparición de un mecanismo de supervivencia axón-independiente es totalmente coherente con los procesos de regeneración de los nervios periféricos, que requieren de la presencia y la participación de las células de Schwann separadas de sus axones.

2.3.3.3 Proliferación vs diferenciación

Las células de cresta neural, las SCP y las iSC proliferan rápidamente *in vivo*, exceptuando su entrada en diferenciación que supone la salida del ciclo celular. Incluso en este caso, el cese de la proliferación es reversible, porque las células mielinizantes vuelven a entrar en el ciclo a medida que se desdiferencian en respuesta a un daño en el nervio (Stewart y cols., 1993). Esta proliferación está mediada principalmente por los factores axonales Notch (Woodhoo y cols., 2009) y NRG-1 (Birchmeier y Nave, 2008; Shah y cols., 1994), por factores solubles como TGF β (D'Antonio y cols., 2006) o señales derivadas de la lámina basal (Britsch y cols., 2001). Se ha demostrado que la inactivación de la señalización de Notch en las células de Schwann provoca la reducción de síntesis de DNA *in vivo*, mientras que su activación aumenta considerablemente la proliferación de las células de Schwann *in vitro* (Woodhoo y Sommer, 2008a).

2.3.4 Marcadores de las células del linaje de Schwann

Cada uno de los estadios celulares del linaje de Schwann se caracteriza por expresar una serie de marcadores moleculares, así como por sus respuestas a señales específicas o la interacción con otras células o estructuras adyacentes. Algunos marcadores son compartidos por varias poblaciones del linaje y otros son exclusivos de una sola población (**Figura 12**).

Las células de la cresta neural se caracterizan por la expresión de los marcadores Sox10, Sox9, ErbB3, L1cam, Ngfr, Itga4, Tfap2a y Cdh2. Estos marcadores se mantienen en las SCP que adicionalmente comienzan a expresar los marcadores Gap43, Sox2, Fabp, Dhh, Mpz, Pmp22 y Plp1. Adicionalmente, las SCP expresan la proteína Cdh19 (de forma exclusiva durante este estadio) (Takahashi y Osumi, 2005). La transición de las SCP a iSC conlleva que algunos genes dejen de ser expresados y se activen otros como S100 β , FoxO4, Gfap y Ncam. En etapas postnatales, las células de Schwann se diferencian a células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes, cada una de las cuales se caracteriza por un patrón de expresión específico. Por un lado, las células de Schwann mielinizantes expresan marcadores asociados al programa de mielina como Egr2, Mbp o Mag. Del mismo modo, se reduce la síntesis de las moléculas que caracterizan las iSC, L1cam, Ngfr y Ncam. Por otro lado, las células no mielinizantes mantienen muchos de los marcadores de las iSC y adquieren la expresión de marcadores específicos como la Itga1/Itg β 1 (heterodímero de las integrinas α 1 y β 1) y Galc. En respuesta a daño, las células de Schwann terminalmente diferenciadas se reprograman y adquieren un fenotipo de Schwann reparadoras o células de Büngner, caracterizadas por expresar marcadores propios de estadios inmaduros como Sox2, Jun

y Pou3f1, y marcadores de Schwann no mielinizantes como L1cam, Ngfr, Ncad, Gap43, Gfap, Ncam, Pax3 y Egr1 (Balakrishnan y cols., 2016; Doddrell y cols., 2012; Jessen y Mirsky, 2002, 2005, 2008a; Jessen y cols., 2015a; Mirsky y cols., 2002, 2008; Wanner y cols., 2006b; Woodhoo y Sommer, 2008b).

Cresta neural	Precursora de Schwann	Schwann inmadura	Schwann no mielinizante	Schwann mielinizante	Célula de Büngner
Sox10					
Sox9					
ErbB3 (Her3)					
L1cam (CD171)					
Ngfr (p75NTR)					
Itga4 (CD49d)					
Tfap2a (AP-2)					
Cdh2 (Ncad)					
	Cdh19				
	Gjc3 (Cx29)				
	Gap43				
	Sox2				
	Fabp7 (Bfabp)				
	Dhh				
	Mpz (p0, p-zero)				
	Pmp22				
	Plp1				
	S100β				
	FoxO4				
	Gfap				
	Ncam (CD56)				
	Pax3				
	Jun (AP-1)				
	Reelin				
	Pou3f1 (Oct6)				
			Egr1 (Krox-24)		
			Itga1/Itgb1		
			Galc (twi)		
			Egr2 (krox-20)		
			Mbp		
			Mag		
			Prx (Periaxin)		
			Gjb1 (Cx32)		
			Pmp2 (P2)		

Figura 12. Marcadores del linaje de Schwann. Se representan los marcadores expresados en distintos estadios del linaje de Schwann, así como los marcadores expresados en las células de Schwann reparadoras o células de Büngner. En negrita se representa el símbolo oficial de los genes y en paréntesis se representa el nombre o símbolos alternativo no oficial (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Los cuadros azules indican la

Introducción

expresión de un marcador. Los datos representados se basan en varias publicaciones (Jessen y Mirsky, 2002, 2005, 2008a; Jessen y cols., 2015a; Mirsky y cols., 2002, 2008; Salzer, 2008; Woodhoo y Sommer, 2008b).

2.3.5 Las células de Schwann en la regeneración de nervios periféricos

El SNP debe su sorprendente potencial de regeneración a la capacidad innata de las neuronas y las células de Schwann para adaptar su estado de diferenciación y convertirse en células que participan activamente en la regeneración del nervio tras un daño (Arthur-Farraj y cols., 2011; Barrette y cols., 2010; Bosse y cols., 2006; Doron-Mandel y cols., 2015). Este potencial es exclusivo de los nervios periféricos y no se observa en el SNC, donde tanto las neuronas como los oligodendrocitos no presentan esta capacidad de reprogramación para participar en procesos regenerativos (Brosius Lutz y Barres, 2014; Vargas y Barres, 2007). Entre las principales lesiones del nervio periférico se encuentran la axonotmesis y la neurotmesis (Fisher, 1976). La axonotmesis conlleva la rotura de los axones, manteniendo intacto el tejido conectivo y la lámina basal que recubren las unidades axón-Schwann. En modelos experimentales de ratón, la axonotmesis se genera por contusión del nervio (en inglés *nerve crush*), el cual regenera espontáneamente en 3-4 semanas. La neurotmesis, es una lesión más severa en el que el axón y el tejido conectivo, incluyendo la lámina basal se encuentran fracturados. Este tipo de lesión se recrea experimentalmente seccionando por completo un nervio periférico y aunque todas las estructuras del nervio se restauran por completo en muchos casos, la recuperación funcional es generalmente pobre (Witzel y cols., 2005).

Tras la lesión de un nervio los extremos se retraen y el espacio que queda entre ambos cabos se unen por los brotes axonales que surgen desde la región proximal. Independientemente del tipo de lesión por el cual se haya dañado el nervio, las prolongaciones neuronales que han quedado separadas de sus cuerpos neuronales en el extremo distal son eliminadas en un proceso conocido como degeneración Walleriana. Este proceso conlleva la eliminación de los restos axonales, generando un ambiente permisivo para el crecimiento de los axones (Gomez-Sanchez y cols., 2015; Hirata y Kawabuchi, 2002). Las células de Schwann se separan de los axones afectados, se desdiferencian y se activan en un proceso denominado reprogramación directa (Jessen y cols., 2015a). En ese momento, las células de Schwann entran en ciclo y proliferan rápidamente a la vez que adquieren un nuevo fenotipo que les permite llevar a cabo múltiples funciones en la reparación del nervio. A estas células se les conoce como células de Bungner o células de Schwann reparadoras, y se caracterizan por expresar marcadores típicos de las células de Schwann en estadios inmaduros. En las lesiones en las que el tejido conectivo se mantiene intacto (axonotmesis), las células de Schwann forman estructuras tubulares, bandas de Bungner, dentro de la membrana basal original, que sirven de guía para los axones de nuevo hasta sus tejidos diana.

Tras el corte de un nervio, en ausencia de una envoltura conectiva, los mecanismos de crecimiento y re-direccionamiento axonal son notablemente diferentes y comportan procesos más complejos (Nguyen y cols., 2002). El nervio seccionado se caracteriza por desarrollar entre ambos extremos

un "puente nervioso", compuesto por una mezcla heterogénea de células que se distribuyen en una matriz fibrosa y contribuyen en diferentes fases de la regeneración (**Figura 13**). Inicialmente, tras la llegada de las primeras células inflamatorias al hueco creado en el área lesionada, los macrófagos perciben la falta de oxígeno y secretan VEGF α (siglas en inglés, *vascular endothelial growth factor alpha*) para inducir la angiogénesis y la formación de nuevos vasos. De este modo, se restaura el aporte de oxígeno y se permite la llegada de más células inmunitarias (**Figura 13A**). Las células endoteliales siguen patrones de crecimiento específicos y se colocan en fila y orientadas en paralelo al eje del nervio para guiar a las células de Schwann a lo largo del puente. Así, las células de Schwann se acoplan en las vías creadas por las células endoteliales, formando las denominadas bandas de Bungner, y atraen los axones desde el extremo proximal hasta el extremo distal (Cattin y cols., 2015). Los fibroblastos liberados del tejido conectivo endoneural y perineural también participan en el proceso de regeneración. Los fibroblastos interactúan con las células de Schwann mediante los receptores Efrina-B/Efrina-B2 y dirigen la formación de las bandas de Bungner, al inducir la expresión de la N-cadherina, molécula de adhesión que une las células de Schwann durante su ensamblaje (**Figura 13B**). Este proceso está regulado por el factor de transcripción Sox2, que actúa bajo la señalización de la Efrina-B2 y promueve la translocación de la N-cadherina a la membrana de las células de Schwann (Parrinello y cols., 2010). Recientemente, se ha descrito que el aumento de la señalización de β en la región proximal del nervio dañado contribuye vía el receptor de la Efrina-B2 a la migración colectiva de las células de Schwann. Este mecanismo también está mediado por expresión de la N-cadherina. En este mismo trabajo se revela un patrón de expresión transcripcional diferente entre las poblaciones de Schwann presentes en las áreas próximas y distales a la lesión (Clements y cols., 2017).

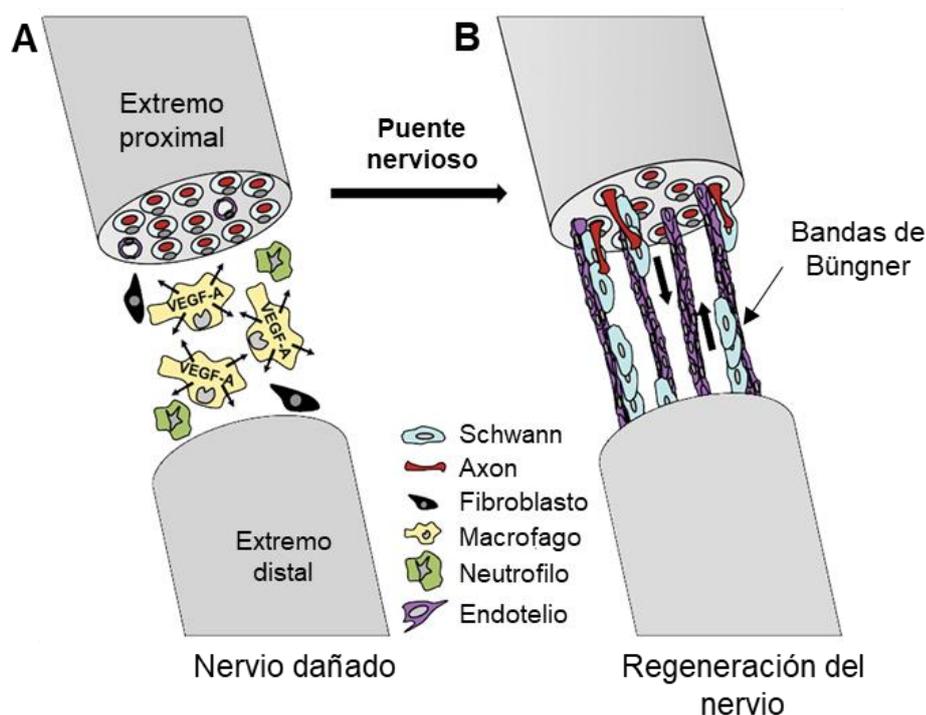


Figura 13. Regeneración del nervio periférico. La regeneración de un nervio periférico representa un proceso complejo en el que múltiples tipos celulares participan y se coordinan para restaurar la estructura nerviosa. **(A)** Inicialmente, entre las distintas células inflamatorias que alcanzan la región afectada, los macrófagos perciben la hipoxia y secretan VEGF-A para promover la angiogénesis y favorecer el aporte de oxígeno. **(B)** Las células endoteliales crecen y se colocan en fila formando las “vías” donde las células de Schwann se van acoplando para generar las bandas de Bungner. Estas estructuras son las responsables de guiar los axones entre los extremos proximal y distal. Imagen adaptada de (Cattin y cols., 2015).

El cambio fenotípico que padecen las células de Schwann para convertirse en células reparadoras de Bungner se resuelve en dos fases; (1) la desdiferenciación, entendida como la pérdida de características propias de las células diferenciadas, y (2) la activación, que implica adquisición de nuevas capacidades pro-regenerativas. Actualmente, al proceso de conversión de las células de Schwann en células reparadoras se le denomina transdiferenciación o reprogramación directa (Arthur-Farraj y cols., 2011; Jessen y cols., 2015a).

En el caso de las células mielinizantes, la desdiferenciación comienza por la disminución de la expresión de genes relacionados con la mielinización, como el factor de transcripción *Egr2*, la proteína básica de la mielina (*Mbp*), proteínas de membrana como la glicoproteína asociada a la mielina (*Mag*) o proteínas estructurales como *P0*. Además de reducir la expresión de genes de diferenciación, las células de Schwann adquieren la expresión de genes propios de las iSC, como *L1cam*, *Ncam*, *Ngfr* o *Gfap*. La desdiferenciación de las células no-mielinizantes es menos acentuada, ya que su fenotipo es muy similar al de las iSC y el número de genes que se ve alterado es menor (Jessen y Mirsky, 2008b; Jessen y cols., 2015a).

La activación conlleva la adquisición de capacidades específicas que definen un nuevo fenotipo dirigido al proceso de reparación. La activación incluye una serie de eventos; (1) la expresión de factores neurotróficos que promueven la supervivencia de las neuronas y favorecen el crecimiento axonal, como BDNF (siglas en inglés, *brain derived neurotrophic factor*), NGF (*nerve growth factor*), o GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) (Fontana y cols., 2012), (2) la expresión de citoquinas inflamatorias para la activación de la respuesta inmune y el reclutamiento de los macrófagos (Martini y cols., 2008), (3) la degradación de los restos de mielina mediada por autofagia (Gomez-Sanchez y cols., 2015; Hirata y Kawabuchi, 2002) y (4) la formación de las vías de regeneración (o bandas de Bungner) y la restauración del tejido dañado.

La transdiferenciación está regulada por varios factores y vías de señalización que controlan la conversión de las células de Schwann diferenciadas en células de Schwann reparadoras. Entre las diferentes señales que regulan la inducción y el mantenimiento del fenotipo activado, destacan la vía de Raf/ERK y los factores de transcripción Notch y c-Jun (Arthur-Farraj y cols., 2011; Napoli y cols., 2012; Woodhoo y cols., 2009). Una de las principales funciones de estas vías es la supresión del programa de mielinización, como parte del proceso de desdiferenciación. Del mismo modo, los factores de transcripción Sox2, Pax3 o Id4 se han descrito como reguladores negativos de la

mielinización (Arthur-Farraj y cols., 2011; Doddrell y cols., 2012; Le y cols., 2005; Parkinson y cols., 2008; Woodhoo y cols., 2009).

2.4 Somitogenesis

2.4.1 Especificación y compartimentación de las somitas

La somitogénesis es el proceso de formación de las somitas a partir del mesodermo presomítico o mesodermo paraxial. Las somitas son segmentos epiteliales generados progresivamente a ambos lados de los órganos axiales en dirección rostro-caudal (**Figura 14A**) (Christ y Ordahl, 1995; Dequéant y Pourquié, 2008). La segmentación del mesodermo presomítico es un evento periódico coordinado por los denominados “genes reloj”, que se expresan siguiendo patrones cíclicos para establecer un “frente de segmentación” que regula la formación de las somitas a nivel espacio-temporal (Dequéant y cols., 2006; Pourquié, 2011). Las somitas son estructuras esféricas formadas por un núcleo de células mesenquimales, el somatocele, rodeado de una pared epitelial (**Figura 14B**). Poco después de su formación, las somitas se diferencian y al mismo tiempo se dividen en varios dominios o compartimentos que dan lugar a diferentes linajes celulares; el esclerotomo, el dermomiótomo y el miotomo (Scaal y Christ, 2004; Scaal y Wiegrefe, 2006). La maduración de las somitas está regulada por multitud de señales que proceden de los tejidos circundantes, como el ectodermo superficial, la notocorda, el tubo neural y el mesodermo de la placa lateral (Christ y Scaal, 2008).

La especificación de las somitas comienza en su mitad ventral, donde las células experimentan una transición epitelio-mesénquima para generar el esclerotomo, el compartimento que da lugar a los huesos y a los ligamentos del esqueleto axial (**Figura 14C**). Este proceso está regulado, entre otras, por señales derivadas de la notocorda, como el factor de transcripción sonic hedgehog (Shh) que induce la expresión de los genes especificadores del esclerotomo, Pax1 y Pax9 (Koseki y cols., 1993; LeClair y cols., 1999; Murtaugh y cols., 1999). Durante la formación del esclerotomo, la región dorsal de la somita se mantiene epitelial de forma transitoria, influenciada por factores de la vía Wnt procedentes del tubo neural y del ectodermo superficial (Ikeya y Takada, 1998; Rodríguez-Niedenführ y cols., 2003; Wagner y cols., 2000).

El epitelio dorsal de la somita define un nuevo compartimento, el dermomiótomo (DM), responsable de generar la musculatura esquelética, la grasa parda y la dermis del tronco dorsal (Christ y cols., 2007; Scaal y Christ, 2004). El DM se caracteriza por expresar los factores de transcripción Pax3 y Pax7 (Stockdale y cols., 2000) y representa una de las regiones más dinámicas de la somita, ya que contribuye activamente a la formación de varios linajes celulares. Durante su especificación, el DM se expande y adquiere una estructura rectangular que se orienta en paralelo al esclerotomo. Seguidamente, los extremos del DM se pliegan ligeramente hacia el interior de la somita para formar los denominados labio dorsomedial (en inglés, *dorsomedial lip*, **DML**), labio ventrolateral (en inglés,

ventrolateral lip, **VLL**) y los labios de los flancos anterior y posterior (**Figura 14C**). Estas estructuras están dirigidas a la formación del miotomo, ya que son las zonas por donde las células precursoras miogénicas ingresan en el compartimento inferior y generan el miotomo. La porción central del DM (DM central) pierde su carácter epitelial para dar lugar a los precursores dérmicos que migran y se alojan bajo el ectodermo, generando la dermis dorsal. El DM central libera también precursores miogénicos que se desplazan ventralmente para incorporarse al miotomo primario (**Figura 14D**) (Christ y Scaal, 2008; Christ y cols., 2007; Scaal y Christ, 2004).

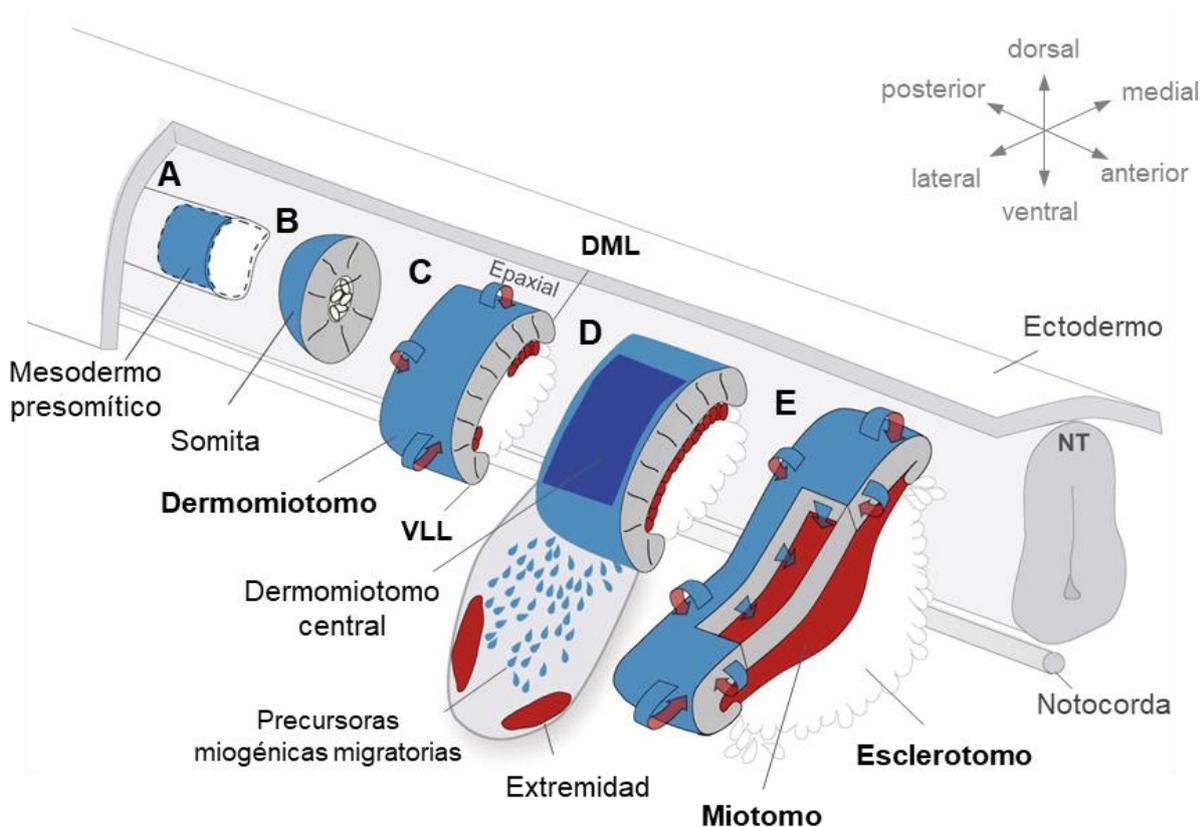


Figura 14. Representación esquemática del desarrollo y la compartimentalización de las somitas. (A-B) Las somitas son estructuras esféricas epiteliales formadas a partir del mesodermo presomítico (PSM) por segmentación. (C) Una vez formada, la somita madura y se diferencia en varios compartimentos; La mitad inferior de la somita sufre una transición epitelio-mesénquima y genera el esclerotomo, compartimento que genera los huesos y los tendones del esqueleto axial. La mitad superior de la somita, el dermomiótomo (DM) pierde progresivamente su identidad epitelial para generar precursores que contribuyen a distintos linajes celulares. Inicialmente, las células migran desde los cuatro extremos del DM y se integran en el compartimento inferior para formar el miotomo. Las células se liberan inicialmente desde el extremo dorsomedial (DML) y seguidamente desde los extremos anterior, posterior y lateral (VLL). El miotomo da lugar a la musculatura esquelética del tronco. (D-E) Posteriormente, las células del extremo lateral del DM (VLL) migran y generan los músculos esqueléticos de las extremidades. La región central del DM da lugar a los precursores de la dermis dorsal y también genera células miogénicas que se integran en el miotomo. Imagen adaptada de (Buckingham y Rigby, 2014).

2.4.2 Desarrollo temprano de los músculos

La mayoría de los músculos esqueléticos del cuerpo (exceptuando los músculos de la cabeza y el cuello, Noden y cols., 1999) se generan a partir de las somitas, concretamente a partir del DM (Scaal y Christ, 2004). La primera manifestación de la diferenciación muscular es la expresión de los factores reguladores miogénicos; Myf5, MyoD, Mrf4 y Miogenina (en inglés, *muscle regulatory factors*, MRFs). De este modo, tras la activación del programa miogénico, las células migran desde el DM y se integran en el compartimento subyacente para formar la primera masa de tejido muscular; el miotomo. La migración sucede en dos fases, en primer lugar ingresan exclusivamente las células del DML y posteriormente lo hacen las células de los extremos posterior, anterior y lateral (VLL) (**Figura 14C**) (Gros y cols., 2004; Kahane y cols., 2002; Scaal y Christ, 2004).

Los músculos generados a partir del DM se clasifican como; músculos epaxiales, los formados a partir de la mitad medial del DM que dan lugar a los músculos de la espalda, y músculos hipaxiales, los derivados de la mitad lateral del DM y responsables de formar los músculos de la pared abdominal, lateral y los músculos de las extremidades (Christ y Ordahl, 1995; Ordahl y Le Douarin, 1992). En la primera fase de miogénesis, la cual sucede en el miotomo, se generan los músculos del tronco dorsal y los de la pared abdominal y lateral. Sin embargo, los músculos de las extremidades no se forman a partir del miotomo, sino a partir de progenitores miogénicos que migran directamente desde el extremo lateral del DM y contribuyen a la formación del blastema muscular en los miembros en desarrollo (**Figura 14D**) (Brohmann y cols., 2000; Vasyutina y Birchmeier, 2006). La delaminación de estos precursores está controlada por señales procedentes del mesodermo de la placa lateral (*scatter factor*, SF/HGF) (Birchmeier y Brohmann, 2000; Scaal y cols., 1999). El programa miogénico se activa parcialmente antes de la migración de los precursores miogénicos por expresión de los factores Myf5, Pax3 y Pax7. Una vez alcanzado el tejido diana, la especificación de las células se completa mediante la activación de los factores de determinación muscular MyoD, Miogenina y MRF4 (Christ y Brand-Saber, 2004; Tajbakhsh y Buckingham, 1994).

2.5 Mesodermo de la placa lateral

El mesodermo de la placa lateral (en inglés, *lateral plate mesoderm*, LPM) es una región del mesodermo embrionario que se localiza junto al mesodermo intermedio (**Figura 15**). En ratón, a E7, pequeños espacios formados en el mesodermo de la placa lateral se fusionan y forman un espacio de mayor tamaño denominado celoma intraembrionario, que da lugar a la cavidad corporal. El celoma intraembrionario divide el mesodermo de la placa lateral en el mesodermo esplácnico, ubicado por encima del endodermo, y el mesodermo somático, ubicado debajo del ectodermo. El mesodermo esplácnico (o esplacnopleura) es responsable de formar el corazón, la capa visceral del pericardio y los vasos sanguíneos. También contribuye a la formación de la musculatura lisa y el tejido conectivo de los órganos respiratorios y digestivos. El mesodermo somático (o somatopleura), da lugar a los huesos, ligamentos, vasos sanguíneos y al tejido conectivo de las extremidades

(Onimaru y cols., 2011). El mesodermo somático participa también en el desarrollo de la dermis ventral y la dermis de los flancos laterales (Fliniaux y cols., 2004; Mauger, 1972; Ohtola y cols., 2008). Se ha demostrado que la supervivencia y la especificación de los progenitores que migran desde la placa lateral durante los estadios E8 y E16,5 es dependiente de la señalización de Wnt/ β -catenina (Ohtola y cols., 2008).

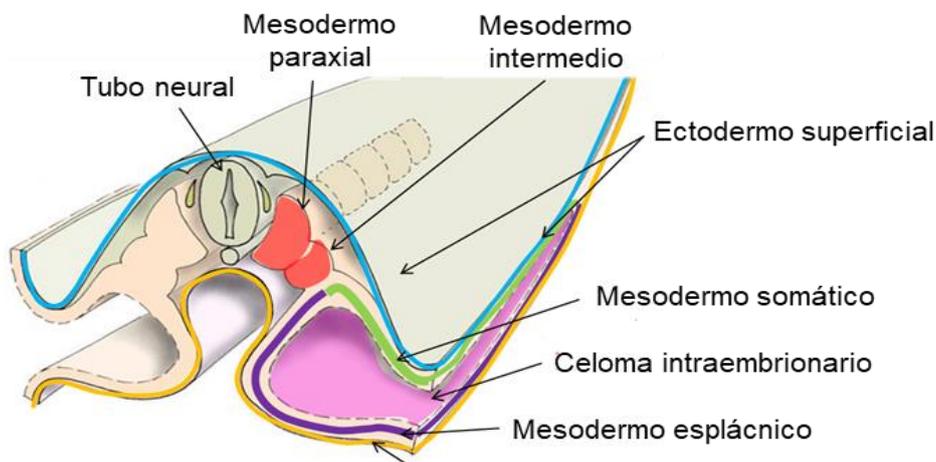


Figura 15. Estructura del mesodermo de la placa lateral. El mesodermo de la placa lateral se divide en dos capas: el mesodermo somático y el mesodermo esplácnico. Los precursores del mesodermo somático migran durante los estadios E8-E16,5 y contribuyen a la formación de la dermis ventral y a la de los flancos laterales. Imagen adaptada de <https://wisc.pb.unizin.org/embryology>.

2.6 Origen embrionario de los componentes de la piel

Esta Tesis está dirigida a caracterizar poblaciones celulares aisladas de la piel, y en concreto poblaciones procedentes del compartimento dérmico. En este apartado se resume el proceso de formación de la dermis y la epidermis, y se analiza en detalle el origen embrionario de los precursores de la dermis. Adicionalmente, se revisa de forma general el origen embrionario de distintos componentes de la piel.

2.6.1 Formación de la dermis y la epidermis

La formación de la dermis y la epidermis depende directamente de la interacción continua entre ambos compartimentos. La comunicación se establece desde las primeras etapas de la morfogénesis cutánea y es fundamental también para la formación de los anejos epidérmicos. El desarrollo de la piel en ratón comienza durante la gastrulación, a E9,5, cuando el embrión está cubierto por una única capa de células ectodérmicas que reposa sobre matriz extracelular. En este estadio, aparecen las primeras células dérmicas como parte de una fina capa mesenquimal en la que se van incorporando progresivamente las precursoras migratorias de la dermis. A E13 se aprecia una dermis de espesor considerable, compuesta por células fibroblásticas que se distribuyen homogéneamente por toda la región subectodérmica. A partir de ese momento, las células más superficiales se agrupan y la dermis se densifica para dar lugar a la dermis papilar (Dhouailly y cols.,

2004; Olivera-Martinez y cols., 2004a). Al mismo tiempo que los precursores dérmicos migran y se diferencian el ectodermo superficial se especifica para dar lugar a la epidermis, proceso que comienza a E8,5. Entre los estadios E9,5 y E16,5, las células epiteliales de la membrana basal proliferan y se diferencian en un proceso conocido como estratificación, para generar las distintas capas que conforman la epidermis. Este proceso es dependiente de señales que proceden de las células dérmicas subyacentes. A E18,5, tras completarse la formación de la epidermis, el peridermo, una fina capa de células endodérmicas escamosas que protegen el ectodermo, se desprende de la superficie del embrión y la piel se cubre de queratina (Fuchs, 2007; Koster y Roop, 2007; Liu y cols., 2013).

La formación de los anejos epidérmicos está directamente relacionada con la estratificación de la epidermis embrionaria. La formación de los folículos pilosos o morfogénesis folicular consta de tres fases principales, la formación de la placa epidérmica, la organogénesis y la diferenciación, fases que se subdividen en ocho etapas morfológicamente distintas (Schmidt-Ullrich y Paus, 2005). Este proceso comienza a E13,5 cuando los fibroblastos papilares se agrupan debajo de las recién formadas placas o placodas epidérmicas, regiones engrosadas de la epidermis, para formar los condensados dérmicos (a E14,5). Ambas agrupaciones celulares establecen una señalización recíproca e inducen y coordinan el crecimiento y la diferenciación de los folículos pilosos. En etapas postnatales, los folículos regeneran de forma continua en un ciclo que consta de una fase de crecimiento (fase anágena), una fase de regresión por apoptosis (fase catágena) y una fase de quiescencia (fase telógena) (Paus y cols., 1999; Stenn y Paus, 2001).

2.6.2 Origen embrionario de los precursores dérmicos

Los precursores que migran a la región subectodérmica para formar la dermis en distintas regiones corporales proceden de orígenes embrionarios diferentes. A principios de los años 70, Le Douarin desarrolló una técnica de trasplante ortotópico entre embriones de codorniz y pollo para analizar la migración y especificación de los progenitores derivados de los distintos tejidos embrionarios durante el desarrollo (Le Douarin, 1973). Los estudios realizados utilizando esta técnica sirvieron para confirmar observaciones previas basadas en análisis histológicos y demostrar que la dermis proviene de varios tejidos embrionarios. Así, la dermis dorsal se origina en el DM de las somitas, la dermis del abdomen, los flancos laterales y las extremidades deriva del mesodermo de la placa lateral y la dermis de la cabeza y el cuello procede de la cresta neural cefálica o craneal (Christ y cols., 1983; Le Lièvre y Le Douarin, 1975b; Mauger, 1972).

Estos resultados han sido corroborados posteriormente utilizando varias líneas transgénicas de ratón que han permitido trazar de forma específica los distintos tejidos embrionarios que dan lugar a los precursores de la dermis (**Tabla 4**).

Tabla 4. Líneas transgénicas de ratón para el trazado de precursores dérmicos			
Dermis	Población trazada	Líneas transgénicas	Referencias
Cabeza	Cresta neural	<i>Wnt1-Cre</i>	(Fernandes y cols., 2004; Jinno y cols., 2010; Kaucka y cols., 2016; Yoshida y cols., 2008)
Dorsal	Dermomiotomo central	<i>En1-Cre, En1-Cre^{ER}, En1-lacZ</i>	(Atit y cols., 2006; Rinkevich, 2015)
	Dermomiotomo	<i>Myf5-Cre</i>	(Jinno y cols., 2010; Naldaiz-Gastesi y cols., 2016)
	Dermomiotomo	<i>Msx1nlacZ</i>	(Houzelstein y cols., 2000)
	Precursores dérmicos	<i>Derma1-Cre</i>	(Johnston y cols., 2013; Krause y cols., 2014)
Ventral	Mesodermo de la placa lateral	<i>HoxB6-Cre, HoxB6-Cre^{ERT1}</i>	(Ohtola y cols., 2008)
	Dermomiotomo central	<i>En1-Cre, En1-CreER</i>	

Además de la variabilidad en el origen de los precursores dérmicos, se ha demostrado que el principal componente celular de la dermis, los fibroblastos, se clasifican en función de su posición a lo largo de tres divisiones anatómicas: anterior-posterior, proximal-distal y dérmica-no dérmica. Esta distribución se ha establecido en base al patrón de expresión de los genes HOX, responsables de especificar la identidad posicional durante el desarrollo y también en el adulto, un patrón que se mantiene en los fibroblastos adultos de la piel (Rinn y cols., 2006, 2008). Dentro de la propia dermis los fibroblastos localizados en la dermis papilar y reticular son morfológica y funcionalmente diferentes (Sorrell y Caplan, 2004; Sorrell y cols., 2004, 2006). Mediante el uso de líneas transgénicas para el trazado de linaje, se ha demostrado, además, que estas poblaciones surgen a partir de progenitores embrionarios distintos.

Durante el desarrollo embrionario temprano, los progenitores que expresan PDGFR α , Lrig y Blimp1 dan lugar a los fibroblastos de la dermis papilar; incluyendo la papila dérmica y el músculo erector del pelo, mientras que los progenitores PDGFR α +Dlk1+/Sca1+ son responsables de la formación de los fibroblastos de la dermis reticular y los adipocitos de la hipodermis. Se ha demostrado que los precursores fibroblásticos de la dermis papilar son necesarios para la formación del folículo piloso y los fibroblastos reticulares están implicados en la cicatrización de heridas (Driskell y cols., 2013). Del mismo modo, Rinkevich y colaboradores describieron la existencia de dos linajes de fibroblastos embrionarios distintos, *Engrailed1+* y *Engrailed1-*, e identificaron la población *Engrailed1+* como la principal responsable de la secretar y organizar el tejido conectivo durante el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas cutáneas, la fibrosis y la formación del estroma tumoral (Rinkevich, 2015).

2.6.3 Origen embrionario de los componentes de la piel

Además de los tipos celulares más abundantes de la piel, los queratinocitos (epidermis), los fibroblastos (dermis) y los adipocitos (hipodermis), el origen embrionario de otras poblaciones de la piel es también diverso. En la **Tabla 5** se describe el origen embrionario de algunos de estos componentes.

Tabla 5. Origen embrionario de los principales componentes celulares de la piel				
		Tejido embrionario		Referencias
		Cabeza	Tronco	
Epidermis	Queratinocitos	Ectodermo		(Forni y cols., 2012; Fuchs, 2007)
	Melanocitos	Cresta neural		(Adameyko y cols., 2009, 2012; Dupin y cols., 2007)
	Células de Merkel	Ectodermo		(Bardot y cols., 2013; Van Keymeulen y cols., 2009)
	Langerhans	Mesodermo		(Gomez Perdiguero y cols., 2015)
Dermis	Fibroblastos	Cresta neural	Mesodermo	(Ohtola y cols., 2008; Santagati y Rijli, 2003)
	Nervios (neuronas y células de Schwann)	Cresta neural		(Dupin y cols., 2007; Jessen y cols., 2015a)
	Endotélío	Mesodermo		(Ferguson y cols., 2005)
	Pericitos	Cresta neural	Cresta neural (50%) Mesodermo (50%)	(Armulik y cols., 2011; Etchevers y cols., 2001; Radomska y Topilko, 2017)
	Adipocitos cutáneos	Mesodermo		(Driskell y cols., 2014)
Hipodermis	Adipocito subcutáneo	Cresta neural	Mesodermo	(Berry y cols., 2013; Billon y cols., 2007)
	Músculo subcutáneo	Mesodermo		(Buckingham y Rigby, 2014; Sambasivan y cols., 2011)

3. TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DEL ORIGEN EMBRIONARIO

3.1 Trazado de linaje

El trazado de linaje de las células y los tejidos que componen un organismo se ha estudiado históricamente aplicando muchas y muy diferentes aproximaciones experimentales. Los estudios iniciales se basaron en la observación directa de pequeños invertebrados por microscopia, trazando el desarrollo embrionario desde las primeras divisiones del cigoto hasta la formación del organismo completo. En los casos en los que la observación directa no ha sido posible, en el estudio de tejidos u organismos de mayor complejidad, se ha recurrido al marcaje celular con colorantes vitales o agentes fluorescentes, así como al marcaje genético mediante la transfección o la infección viral para la inserción de constructos genéticos (plásmidos, BACs) que codifican proteínas reporteras y permiten un marcaje estable del linaje celular. Sin embargo, el análisis del origen embrionario de células y tejidos procedentes de animales vertebrados se ha realizado tradicionalmente por la técnica del trasplante celular, también denominada injerto ortotópico o heteroespecífico. Así, el trasplante de células o fragmentos de tejido entre especies y la creación de quimeras ha servido para investigar la procedencia y el destino de varias poblaciones embrionarias, como es el caso de la cresta neural. Los estudios llevados a cabo por Le Douarin, en los que se trasplantaron células de codorniz en embriones de pollo, permitieron descifrar los mecanismos de migración y diferenciación de las células de la cresta neural (Le Douarin, 1973, 1980). Actualmente, los métodos más avanzados para el trazado de linaje implican el uso de animales transgénicos, generados a partir de constructos genéticos complejos que permiten realizar el seguimiento de poblaciones celulares específicas, de una forma controlada a nivel espacio-temporal (Kretzschmar y Watt, 2012).

3.2 Recombinación genética

La recombinación genética para el trazado del origen embrionario comenzó a utilizarse en los años 90 y desde entonces es la técnica más utilizada. Este método conlleva la expresión específica de la enzima recombinasa para activar la expresión de un gen reportero y trazar genéticamente el linaje celular derivado de la célula marcada. En esta Tesis, el análisis del origen embrionario de los precursores dérmicos se ha realizado con líneas transgénicas de ratón basadas en el sistema de recombinación Cre-LoxP.

3.2.1 Sistema Cre-loxP

El sistema Cre-LoxP es el sistema de recombinación más utilizado para el trazado genético en ratón. Este sistema se basa en la actividad de la enzima Cre recombinasa que reconoce y recombina secuencias cortas denominadas secuencias LoxP, derivadas del bacteriófago P1. El sistema de recombinación Cre-LoxP se utiliza para llevar a cabo eliminaciones, inserciones, translocaciones e inversiones en sitios específicos del ADN. Estas modificaciones genéticas pueden estar dirigidas a

tipos celulares o tejidos concretos, cuando la secuencia del gen *Cre* se inserta bajo promotores específicos. La activación de la *Cre* puede estar controlada también por estímulos externos, como señales químicas o choques térmicos. En general, las distintas estrategias de manipulación genética mediante el sistema *Cre-LoxP* dependen directamente de la colocación de secuencias *loxP*.

La generación de líneas transgénicas para el trazado de linaje se basa en el cruce de líneas transgénicas de ratón que expresan las secuencias *Cre* y *loxP* por separado. Una de las líneas incluye la secuencia *Cre* insertada bajo el control de un promotor específico de tejido o tipo celular (**Figura 16A**), mientras que la segunda línea, tiene una secuencia *loxP-STOP-loxP* que previene la expresión del reportero (**Figura 16B**). Así, al cruzar las dos líneas transgénicas, en los animales que incluyan ambos constructos en su genoma, las células activan la expresión de la recombinasa *Cre* (bajo promotores específicos) y recombinan las secuencias *loxP* eliminando la secuencia *STOP* (**Figura 16C**), permitiendo la expresión del gen reportero (**Figura 16D**). Habitualmente los reporteros se expresan bajo el control de promotores ubicuos, como el *Rosa 26* (R26) y la especificidad del sistema está definida por el promotor de la *Cre*. De este modo la expresión del reportero se produce de forma constitutiva, ya que el *locus* está activo de forma permanente. El primer reportero utilizado fue la β -galactosidasa (codificado por el gen *LacZ*), el cual permite visualizar las células en azul por hidrólisis del sustrato X-gal (Soriano, 1999). Actualmente, se utilizan con mayor frecuencia los reporteros fluorescentes, como el GFP o el EYFP (Srinivas y cols., 2001), que permiten la visualización de las células *in vivo* y la aplicación de técnicas como la citometría de flujo.

La actividad de la *Cre* puede controlarse también a nivel temporal utilizando constructos inducibles. Estos sistemas se han generado típicamente fusionando la *Cre* con el receptor del estrógeno (en inglés, *estrogen receptor*, ER), de modo que, tras la expresión del constructo, la proteína de fusión CreER se mantiene en citoplasma y solo en presencia del ligando, la *Cre* es liberada y traslocada al núcleo donde lleva a cabo la recombinación de las secuencias *loxP* y consecuente expresión del reportero. La secuencia de la *ER* está modificada para prevenir la unión de la hormona endógena e impedir la expresión inespecífica del reportero. Adicionalmente, se han desarrollado constructos, como el *CreER^{T2}*, diseñados para ser sensibles a niveles reducidos del ligando y evitar problemas de toxicidad (Feil y cols., 1997).

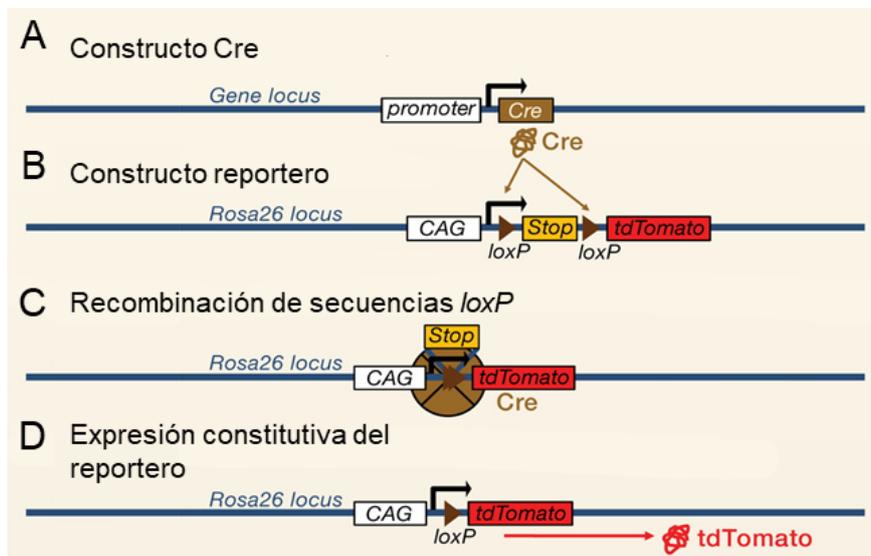


Figura 16. Sistema Cre-LoxP. (A) La recombinasa Cre se expresa bajo el control de un promotor específico de tejido. En las células que activen la Cre, la recombinasa reconoce las secuencias *loxP* del constructo reportero (B) y elimina la secuencia *STOP* por recombinación (C). El reportero (TdTomato) se expresa de forma constitutiva en la célula recombinada y en toda su progenie (bajo el control del promotor *Rosa26*) (D). Imagen adaptada de (Kretschmar y Watt, 2012).

4. MYF5

Myf5 (*Myogenic factor 5*) es un factor de transcripción con un dominio bHLH (siglas en inglés, *basic helix-loop-helix*) de unión a DNA (Murre y cols., 1989). Myf5 pertenece al grupo de factores reguladores miogénicos (MRFs), responsables de controlar la especificación, la migración y la diferenciación de los precursores miogénicos (Pownall y cols., 2002). Myf5 participa principalmente en las etapas tempranas del desarrollo muscular, induciendo la determinación de las células hacia el linaje de músculo esquelético (Cossu y cols., 1996; Tajbakhsh y cols., 1996).

4.1 Expresión de Myf5 durante el desarrollo embrionario

Myf5 se expresa inicialmente en el PSM, antes de la formación de las somitas y la subsiguiente diferenciación de los músculos esqueléticos (Cossu y cols., 1996; Kiefer y Hauschka, 2001; Kopan y cols., 1994). Los primeros estudios basados en técnicas clásicas de hibridación *in situ* no detectaron la expresión de Myf5 en el PSM, y su expresión fue revelada posteriormente aplicando técnicas como la RT-PCR (Kopan y cols., 1994), variantes optimizadas de la hibridación *in situ* (Kiefer y Hauschka, 2001) o utilizando líneas transgénicas de ratón con expresión del gen reportero β -galactosidasa bajo el control del promotor de *Myf5* (Cossu y cols., 1996). De acuerdo con su función en la determinación del linaje muscular, Myf5 se expresa en el DM y se detecta inicialmente en la región dorsomedial del DM (Kiefer y Hauschka, 2001; Ott y cols., 1991; Tajbakhsh y cols., 1996). La expresión de Myf5 se extiende posteriormente a la región ventrolateral del DM y al

miotomo, compartimento en el que se inicia la diferenciación de las fibras musculares embrionarias. Los precursores que migran desde el VLL para formar los músculos de las extremidades, no expresan inicialmente *Myf5* y activan su expresión una vez alcanzado el tejido diana, para activar el programa miogénico (Ott y cols., 1991; Tajbakhsh y Buckingham, 1994).

Durante el desarrollo embrionario de los músculos esqueléticos de ratón, *Myf5* es el primero de los MRFs expresado en torno al estadio E8. A medida que avanza el proceso de diferenciación, su expresión disminuye, y a partir de E11.5 se silencia por completo. Los músculos adultos no expresan *Myf5*, aunque sí lo hacen las células madre quiescentes del músculo esquelético, las células satélite (Beauchamp y cols., 2000; Ott y cols., 1991; Tajbakhsh y cols., 1996; Zammit y cols., 2004). En este caso, la transcripción de *Myf5* se mantiene activa mientras su traducción está bloqueada por la acción de varios microARNs (Crist y cols., 2012). En respuesta a señales inductoras, como las generadas al dañarse un músculo, las células satélite se activan, proliferan y se diferencian para generar nuevas fibras musculares. Como este proceso (la amplificación transitoria de las células satélite), es dependiente de *Myf5*, se considera que la presencia de transcritos en las células satélite representa un mecanismo de respuesta rápida para agilizar la síntesis proteica del factor *Myf5*.

La expresión de *Myf5* se ha detectado también en tejidos no musculares, como en los precursores adipogénicos de la grasa parda (Seale y cols., 2008; Timmons y cols., 2007), y durante el desarrollo embrionario del SNC, en la región ventral del tubo neural (E10.5) (Tajbakhsh y cols., 1994) y en el mesencéfalo del cerebro (E8-10) (Daubas y cols., 2000, 2009; Tajbakhsh y Buckingham, 1995). Aun así, la función de *Myf5* en procesos de especificación neuronal o adipogénica no ha sido explorada.

4.2 Regulación de la expresión del gen *Myf5*

La regulación de la expresión del gen *Myf5* es muy compleja. Su transcripción está principalmente regulada por los potenciadores (en inglés, *enhancers*), secuencias de ADN responsables de incrementar la expresión génica y de definir patrones de expresión específicos. El locus de *Myf5* (cromosoma 10) está regulado por varias secuencias potenciadoras, que se localizan a más de 140kb del punto de inicio de la transcripción y definen la expresión espacio-temporal de *Myf5* (Francetic y Li, 2011). La actividad de los potenciadores está controlada a su vez por un mecanismo dependiente de secuencias equilibradoras de la transcripción (en inglés, *transcription balancing sequences*, TRABS) (Carvajal y cols., 2008). Durante el desarrollo embrionario, especialmente durante la somitogénesis, son muchas las señales que intervienen para controlar la expresión de *Myf5* y la formación de la musculatura esquelética. Muchas de estas señales proceden de los tejidos circundantes, como la notocorda o el tubo neural, mientras que otras señales se expresan en las propias células de la somita (Francetic y Li, 2011).

La activación temprana de *Myf5* en el DM epaxial, por ejemplo, depende de la señalización canónica de Shh y Wnt, los cuales actúan sobre la secuencia potenciadora EEE (del inglés, *early epaxial*

enhancer) (Gustafsson y cols., 2002; Summerbell y cols., 2002; Teboul y cols., 2002). El factor de transcripción *Pax3*, que participa también en la formación de los músculos epaxiales e hipaxiales, actúa directamente sobre las secuencias potenciadoras para activar la expresión de *Myf5* en los músculos de las extremidades (Bajard y cols., 2006), o lo puede hacer indirectamente, activando factores que se unen a secuencias potenciadoras (Sato y cols., 2010). Existen múltiples secuencias potenciadoras que controlan el patrón de expresión de *Myf5* en diferentes tejidos y regiones miogénicas. Así, la expresión de *Myf5* en las distintas poblaciones celulares puede estar regulada por un conjunto diferente de potenciadores y probablemente por diferentes factores de transcripción (Hadchouel y cols., 2003; Summerbell y cols., 2000).

5. CONCEPTOS GENERALES SOBRE LAS CÉLULAS MADRE Y PLASTICIDAD CELULAR

Las células madre (en inglés, *stem cells*), también denominadas células troncales, se definen de forma general como células no especializadas, con capacidad de auto-renovarse indefinidamente y de dar lugar a diferentes tipos celulares del organismo, incluyendo células proliferativas transitorias y células terminalmente diferenciadas. Las células madre cumplen un papel fundamental en la organogénesis del desarrollo embrionario y en el mantenimiento homeostático de los tejidos adultos (Watt y Hogan, 2000). Las células madre se pueden clasificar en base a su potencialidad en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. El término **totipotente** hace referencia a la capacidad de las células para generar un embrión completo, lo cual conlleva la formación de tejidos embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo) y tejidos extraembrionarios (p.ej. la placenta). Las células totipotentes se restringen al cigoto y a las células derivadas del cigoto tras las primeras divisiones. Las células **pluripotentes**, son las células con capacidad de dar lugar a cualquiera de los derivados de las tres capas embrionarias, como, por ejemplo, las células aisladas de la masa celular interna del blastocisto. La mayoría de las células madre adultas se consideran células madre **multipotentes**, células con potencial para diferenciarse a distintos tipos celulares de un mismo tejido embrionario. Finalmente, las células madre **unipotentes** se definen por la capacidad de generar progenie de una única línea o tipo celular (Bonfanti y cols., 2012).

El número de publicaciones describiendo la existencia de poblaciones de células madre y/o progenitoras noveles en el organismo adulto se ha incrementado de forma significativa en los últimos años. Siendo un campo relativamente nuevo, la definición de ciertos términos sigue estando abierta a discusión, y por eso, en este contexto, se quiere aclarar el significado de algunos de los términos que se emplearán a lo largo de la Tesis;

(1) **Célula madre**: Célula indiferenciada con alta capacidad de auto-renovación y diferenciación que persiste durante distintas etapas de la vida de un organismo.

(2) **Progenitor**: Célula que representa un estadio intermedio entre las células madre y las células terminalmente diferenciadas. Presentan una capacidad limitada de auto-renovación y diferenciación, y está restringido a generar ciertos linajes celulares.

(3) **Precursor**: Utilizado de forma general para designar poblaciones celulares con cierto potencial de auto-renovación y diferenciación. El término “precursor” incluye a las células madre y las células progenitoras.

A medida que la investigación en el campo celular avanza, la identificación de nuevos mecanismos de reprogramación celular en el tejido adulto está cambiando radicalmente la forma de entender la biología de las células madre. Actualmente, son muchas las evidencias que demuestran la capacidad de las células adultas para modificar su estado celular (identidad) en respuesta a distintas señales del entorno, adquiriendo, en muchos casos, un fenotipo similar al de las células precursoras adultas, lo que se conoce como plasticidad celular. Habitualmente, la identidad de las células tras la diferenciación se mantiene estable, lo cual es importante para la homeostasis del tejido (**Figura 17A**). Sin embargo, las células adaptan su fenotipo mediante procesos de reprogramación celular, influenciadas por factores exógenos, como los inducidos por las condiciones experimentales, o influenciados por señales endógenas, que a través de mecanismos fisiológicos permiten que las células den respuesta a procesos patogénicos o de daño tisular. La reprogramación que ocurre en condiciones fisiológicas está normalmente regulada por señales locales (originadas en el tejido de origen), donde los procesos están estrictamente regulados para prevenir la inestabilidad celular. Así, la reprogramación celular desencadenada en respuesta a daño representa un mecanismo fundamental en la regeneración del tejido, ya que permite obtener células para el reemplazo celular y generar células que participan transitoriamente en el proceso de reparación. Este fenómeno sucede en múltiples órganos y se conoce como reprogramación celular adaptativa (Eguizabal y cols., 2013; Jessen y cols., 2015b; Merrell y Stanger, 2016).

Los cambios que padecen las células se dividen en dos categorías principales, la desdiferenciación y la transdiferenciación. La desdiferenciación se refiere a revertir el compromiso de una célula diferenciada en una célula con mayor potencial de desarrollo, como un progenitor o una célula madre de un linaje determinado (**Figura 17B**). El ejemplo más acentuado de desdiferenciación, es la inducción de las células madre pluripotentes (en inglés, *induced pluripotent stem cells*, IPS), en el que la sobre-expresión de factores de transcripción específicos puede inducir que células terminalmente diferenciadas se conviertan en células madre pluripotentes (Takahashi y Yamanaka, 2006). La transdiferenciación, por el contrario, se refiere a la conversión de una célula diferenciada en otra, que puede pertenecer al mismo tejido embrionario o no. La transdiferenciación puede ser directa (**Figura 17C.1**) o implicar un paso de desdiferenciación, en el que las células pasan por un estadio inmaduro transitorio (**Figura 17C.2**) (Jopling y cols., 2011; Merrell y Stanger, 2016; Raff, 2003). Por lo tanto, actualmente, la idea de que las células son entidades estáticas o irreversibles ha quedado obsoleta, y se asume que una gran cantidad de células en el organismo adulto

presentan una plasticidad intrínseca que les permite, en ciertas condiciones, dar lugar a tipos celulares con funciones completamente diferentes. Poder determinar cuáles son los mecanismos que controlan los procesos de reprogramación celular en distintos linajes permitirá generar eficientemente poblaciones celulares de interés y mejorar su aplicación en la clínica.

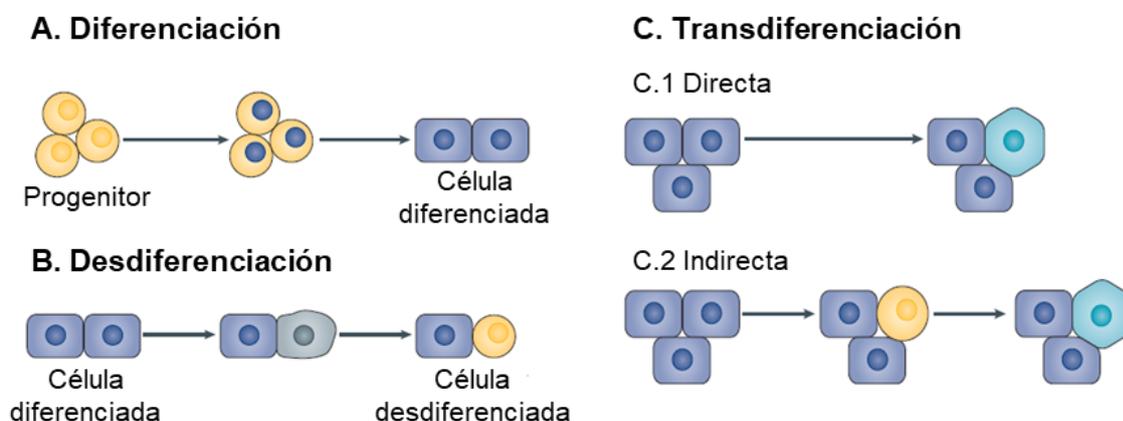


Figura 17. Modelos de diferenciación, desdiferenciación y transdiferenciación. (A) Durante el desarrollo y la homeostasis de los tejidos adultos, los progenitores se diferencian para formar células maduras y diferenciadas. (B) En algunos casos, en condiciones de daño o bajo señales específicas, las células diferenciadas pueden desdiferenciarse, y regresan a fenotipos inmaduros para convertirse en células progenitoras de nuevo, que pueden diferir de la célula precursora de origen. (C) En la transdiferenciación, ciertas señales inducen la conversión de que células diferenciadas adquieran un destino celular diferente. La transdiferenciación puede ocurrir directamente, sin necesidad de revertir a estadios inmaduros (C.1), o puede incluir un paso de desdiferenciación antes de que las células adquieran un nuevo fenotipo (C.2). Imagen adaptada de (Merrell y Stanger, 2016).

6. CÉLULAS MADRE CON POTENCIAL NEURAL DESCRITAS EN LA PIEL

La piel es un tejido en regeneración continua en la que diversos grupos han descrito de forma independiente la existencia de poblaciones multipotentes, tanto en la dermis como en la epidermis. Siendo el interés de esta Tesis esclarecer el origen y la identidad de las células responsables del potencial neural obtenido de la piel, el siguiente apartado se ha centrado en exclusiva a revisar la literatura dirigida al estudio de las poblaciones con capacidad neural.

Las poblaciones con capacidad neural descritas en la piel corresponden fundamentalmente a tres grupos; las **EPI-NCSC** (*epidermal neural crest stem cells*) (Sieber-Blum y cols., 2004), las **células Nestina+** de la protuberancia del folículo piloso (Li y cols., 2003) y las **SKP** (*skin derived precursor cells*) (Toma y cols., 2001). Estas poblaciones han sido aisladas principalmente de regiones cercanas a la protuberancia y de la papila dérmica del folículo piloso, compartimentos en los que se han descrito también otras poblaciones de células madre, como las células madre epidérmicas o las células madre de los melanocitos (Ito y cols., 2005; Nishimura, 2011; Nishimura y cols., 2002; Ohyama, 2007; Taylor y cols., 2000).

6.1 EPI-NCSC

Las **EPI-NCSC** (del inglés, *epidermal neural crest stem cells*) representan una población de células madre multipotente derivada de la cresta neural, tal y como se determinó utilizando la línea transgénica *Wnt1-Cre* (Sieber-Blum y cols., 2004). Las EPI-NCSC han sido aisladas de la protuberancia, en cultivos generados a partir de explantes de folículo piloso. De acuerdo con su origen, prácticamente todas las células que migran del explante a la placa durante los primeros días de cultivo son positivas para la tinción con X-Gal (*Wnt1+*) y expresan el factor de transcripción Sox10. Se ha descrito que las EPI-NCSC se diferencian a células neuronales, células de Schwann, células de músculo liso, melanocitos e incluso células de cartílago (condrocitos), además de presentar capacidad de auto-renovación *in vitro* (Sieber-Blum y Hu, 2008; Sieber-Blum y cols., 2004). Las EPI-NCSC se han aislado principalmente de folículos de bigote de ratón y de rata, aunque también han sido generadas a partir de folículos aislados de la piel de perro (*canine* EPI-NCSC) (Gericota y cols., 2014).

El potencial de las EPI-NCSC ha sido analizado en terapias de reemplazo celular en lesiones de médula espinal generadas por contusión (Hu y cols., 2010; Sieber-Blum, 2010; Sieber-Blum y cols., 2006). En un primer estudio, las EPI-NCSC sobrevivieron y se mantuvieron asociadas a las fibras nerviosas durante un periodo prolongado de 6 meses, aunque no proliferaron ni migraron fuera del área lesionada. Las células implantadas (trazadas por expresión de GFP) desarrollaron largas prolongaciones y se diferenciaron a células positivas para β III tubulina y GAD67 (marcador de neurona GABAérgica), y a oligodendrocitos, positivos para RIP y MBP (Sieber-Blum y cols., 2006). En un estudio similar llevado a cabo posteriormente por el mismo grupo, se demostró que las EPI-NCSC favorecían la recuperación funcional, mejorando la conectividad sensorial (método SpSEP) y la percepción táctil (Test de Semmes-Weinstein) de los animales lesionados y tratados. Aunque la implantación de las células se realizó solo en uno de los laterales de la médula, el tratamiento produjo una mejora bilateral, y la recuperación fue percibida en ambas patas. Los autores concluyeron que el efecto de las EPI-NCSC se debía a la secreción de factores difusibles, ya que se detectó un aumento en la expresión de factores neurotróficos (NGF, BDNF), de factores angiogénicos (VEGF) y de varias metaloproteasas (Hu y cols., 2010).

En el año 2011 Clewes y colaboradores describieron las células madre epidérmicas derivadas de la cresta neural humana (hEPI-NCSC). Estas células se diferenciaron *in vitro* a neuronas, células de Schwann, células musculares lisas, melanocitos y células de hueso y cartílago. El origen embrionario de las hEPI-NCSC fue confirmado por ensayos de expresión génica (RT-qPCR) en los que se analizó la expresión de varios marcadores de la cresta neural (Clewes y cols., 2011). Las hEPI-NCSC fueron expandidas en condiciones de cultivo complejas y dieron lugar a células de Schwann y a neuronas dopaminérgicas. Las células de Schwann obtenidas en cultivo expresaron los marcadores específicos SOX10, EGR2, p75NTR (NGFR), MBP y S100B, y se asociaron a los filamentos axonales en cocultivos con ganglios de la raíz dorsal (Sakaue y Sieber-Blum, 2015). En

otro estudio, las hEPI-NCSC fueron cultivadas en condiciones de diferenciación neuronal, dando lugar a células con expresión de A9, un marcador específico de neurona dopaminérgica (Narytnyk y cols., 2014).

6.2 Población Nestina+

En el año 2003, el grupo de Robert M. Hoffman describió una población de células Nestina+ localizadas próximas a la protuberancia del folículo piloso (Li y cols., 2003). Estas células fueron identificadas en el ratón transgénico ND-GFP (del inglés, *nestin driven-GFP*), en el que la expresión de la proteína GFP está dirigida por secuencias reguladoras del gen *Nestina* (Amoh y cols., 2004, 2005a, 2009a, 2012; Li y cols., 2003; Liu y cols., 2011; Mii y cols., 2013). En este modelo, la señal de GFP+ se detectó en células que rodeaban los folículos pilosos a la altura de la protuberancia y se caracterizaban por presentar un cuerpo celular pequeño y ovalado, a partir del cual se extendían largas prolongaciones en forma de dendrita (**Figura 18A**) (Amoh y cols., 2005b, 2012; Li y cols., 2003; Mignone y cols., 2007). Las células Nestina+ fueron también caracterizadas por expresar los marcadores gliales S100 y p75NTR (**Figura 18B**) (Mii y cols., 2013).

Desde su descubrimiento se han llevado a cabo múltiples estudios entorno a las células Nestina+ de la protuberancia. En los primeros trabajos estas células fueron denominadas “células multipotentes Nestina+ del folículo piloso”, pero posteriormente cuando los estudios dejaron de hacer uso de la línea transgénica ND-GFP, esta denominación fue reemplazada y las células aisladas de la porción folicular cercana a la protuberancia fueron englobadas bajo el término de células madre pluripotentes asociadas al folículo piloso (en inglés, *hair follicle associated pluripotent stem cell*, hfP-SC o HAP-SC). En la Tesis haremos uso del acrónimo en inglés HAP-SC, para hacer referencia a esta población Nestina+ descrita por el Dr. David J. Hoffman.

Las HAP-SC murinas se han obtenido generalmente a partir de los folículos pilosos del bigote y en humano se han obtenido de folículos de cuero cabelludo. En algunos de los estudios, los folículos eran diseccionados, separando la región correspondiente a la protuberancia con pinzas y cultivando el tejido y/o las células desprendidas con el pinzamiento (**Figura 18C.1**). En otros casos, los folículos se cortaron longitudinalmente y los fragmentos seccionados se añadieron directamente a la placa de cultivo (**Figura 18C.2**). Por lo general, las HAP-SC se han crecido en DMEM-F12 suplementado con bFGF (factor básico de crecimiento fibroblástico), B27 y metilcelulosa, condiciones similares a las usadas en el crecimiento de las precursoras neurales, y que favorecen el crecimiento en suspensión y la formación de esferas.

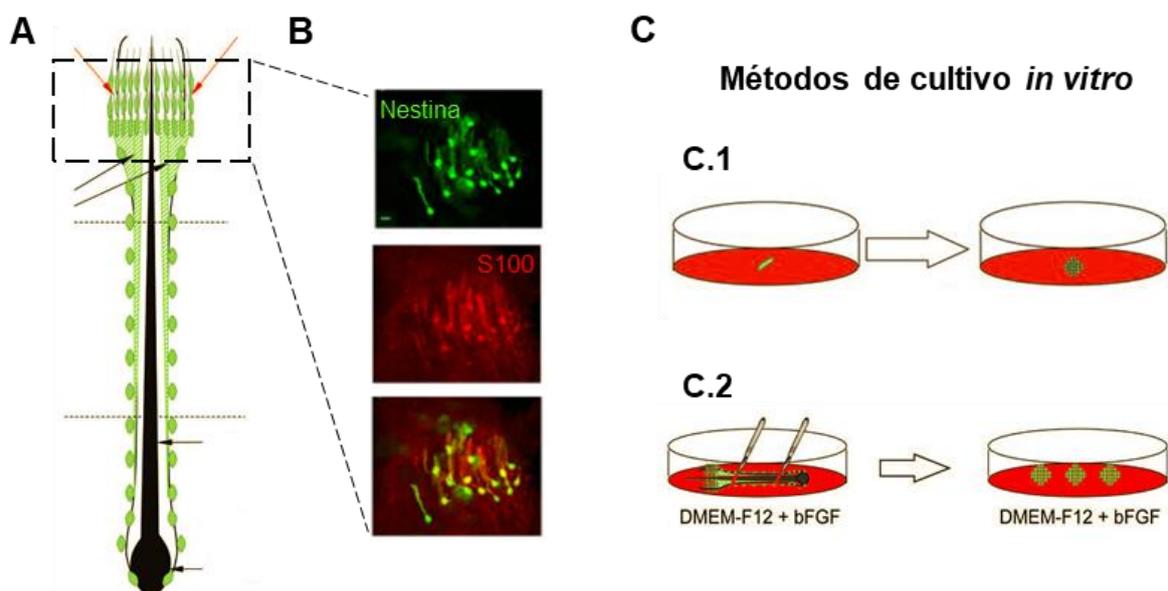


Figura 18. Localización y métodos de aislamiento de las células HAP-SC a partir de folículos pilosos.

(A) Representación esquemática de las células Nestina+ (verde) del folículo piloso, situadas principalmente en la región cercana a la protuberancia (rectángulo con líneas discontinuas) y que se extienden a lo largo del tejido conectivo que recubre el folículo piloso hasta el bulbo. (B) Tinción por inmunofluorescencia de la región de la protuberancia. Las células Nestina+ (en verde) co-expresan el marcador glial S100 y presentan cuerpos celulares reducidos, con finas prolongaciones citoplasmáticas que se extienden paralelas al eje del folículo. (C) Las células Nestina+ se han aislado de la región de la protuberancia por micro-disección (C.1) o se han obtenido directamente de explantes de secciones de folículos pilosos (C.2). En ambos casos las células se cultivan en presencia del factor de crecimiento bFGF, condiciones diseñadas para favorecer la formación de esferas en suspensión. Esta figura se compone de imágenes adaptadas de distintos trabajos publicados por el mismo grupo (Amoh y Hoffman, 2017; Amoh y cols., 2012; Mii y cols., 2013).

Se ha descrito que las HAP-SC tienen capacidad de generar glía, queratinocitos, células de músculo liso e incluso células con fenotipo neuronal, tanto en cultivos generados a partir de folículos humanos (Amoh y cols., 2009b), como en cultivos generados de ratón (Amoh y cols., 2005a, 2012). Recientemente, se ha demostrado que las HAP-SC dan lugar a células con fenotipo de músculo cardíaco *in vitro*. Estas células pulsan espontáneamente en cultivo y expresan el marcador específico de células cardíacas Troponina-T (Yamazaki y cols., 2016a, 2016b; Yashiro y cols., 2015).

Varios estudios han analizado el efecto de las HAP-SC en la regeneración de tejido nervioso (Amoh y cols., 2005b, 2008, 2009c). Los primeros ensayos estuvieron dirigidos a lesiones del SNP, para lo cual se seccionaron el nervio ciático y el tibial, y se implantaron las esferas generadas en el cultivo de HAP-SC. En las lesiones producidas en ambos nervios, la tasa de regeneración y la recuperación de la función nerviosa mejoraron en los nervios tratados, en comparación a los no tratados. El análisis histológico demostró que las células inyectadas se habían diferenciado principalmente en células de Schwann, las cuales expresaban GFAP y se localizaban rodeando axones positivos para BIII-tubulina (Amoh y cols., 2005b). Se obtuvieron resultados similares en lesiones de nervio ciático,

Introducción

al implantar directamente fragmentos de folículos pilosos de bigote de ratón (Amoh y cols., 2010) o al añadir HAP-SC aisladas de folículos humanos (Amoh y cols., 2009c). En esta misma línea, las HAP-SC fueron utilizadas en modelos de daño medular en ratón (Amoh y cols., 2008; Liu y cols., 2011). En estos estudios, las HAP-SC promovieron la reparación del tejido dañado y mejoraron la capacidad locomotora de los ratones. En este caso, la mayoría de las células implantadas también se diferenciaron en células de Schwann (Amoh y cols., 2008).

Además de la protuberancia, la expresión de Nestina se ha descrito también en precursoras derivadas de la papila dérmica de los folículos pilosos (Fernandes y cols., 2004; Toma y cols., 2001). El grupo de Hoffman quiso analizar la relación entre las células Nestina+ identificadas en la protuberancia y las descritas en la papila del folículo. En la línea transgénica ND-GFP se observó que el patrón de expresión de Nestina en la papila estaba restringida a la fase anágena inicial e intermedia, mientras que en la protuberancia, la expresión de Nestina se mantenía constante y no variaba en función de la fase del ciclo capilar (Uchugonova y cols., 2011). Ambas poblaciones Nestina+ se caracterizaban por el reducido tamaño de sus cuerpos celulares, a partir de los cuales se extendían largas prolongaciones citoplasmáticas. Estas poblaciones dieron lugar a células con fenotipo neuronal y glial en cultivos *in vitro*, y mejoraron la reparación del tejido nervioso tras ser trasplantadas en lesiones medulares, facilitando además, la recuperación locomotora de los animales (Liu y cols., 2011).

En estos estudios de caracterización se pudo observar como las células Nestina+ migraban desde la protuberancia hasta la papila dérmica. Con el propósito de analizar en detalle la relación entre las células de ambos compartimentos, se generaron cultivos en 3 dimensiones haciendo uso de la tecnología Gelfoam®. De este modo, el movimiento de las células Nestina+ pudo ser trazado utilizando un microscopio confocal de barrido en los folículos aislados de ratones ND-GFP. Los análisis realizados sobre este sistema de cultivo confirmaron la existencia de un flujo de células Nestina+ desde la protuberancia hasta la papila dérmica, donde el conjunto de las células migratorias adquiriría una estructura fibrilar similar al de un haz nervioso (Duong y cols., 2012). Adicionalmente, las células Nestina+ migraron en dirección al nervio sensitivo que inerva el folículo piloso y había sido seccionado durante la extracción, y migraron también hacía regiones en las que se habían sembrado fragmentos de nervio periférico. Así, se demostró la elevada capacidad de proliferación y migración de las células Nestina+, las cuales parecían responder a estímulos procedentes de las estructuras nerviosas adyacentes. En base a las observaciones realizadas en los cultivos en 3D con Gelfoam® se propuso que las células Nestina+ podían estar implicadas en la regeneración del nervio perifolicular (Mii y cols., 2013).

6.3 SKP

Las SKPs (en inglés, *skin derived precursor cells*, SKPs) fueron descritas por el grupo liderado por la Dr. Freda Miller (Toma y cols., 2001). Esta población de precursoras neurales fue aislada y

expandida aplicando técnicas similares a las utilizadas en el cultivo de precursoras neurales de cerebro (en inglés, *neural precursor cells*, NPCs) (Reynolds y Weiss, 1992). La metodología utilizada para el aislamiento de las NPCs se basa en la generación de cultivos en suspensión donde las células crecen en presencia de factores de crecimiento específicos y forman estructuras esféricas (neuroesferas) con capacidad de auto-renovación *in vitro* (Reynolds y Weiss, 1992). Aplicando un procedimiento similar, la suspensión celular obtenida tras la disgregación de la piel fue sembrada en medio sin suero suplementado con los factores de crecimiento EGF (factor de crecimiento epidérmico) y bFGF para generar cultivos no-adherentes en los que a los 7-10 días se formaron estructuras semejantes a las neuroesferas. Las esferas derivadas de la piel (dermoesferas) fueron positivas para el filamento intermedio Nestina, expresado por precursores neurales y precursores de músculo esquelético. Las SKPs fueron subcultivadas durante pases seriados (> 50 pases) y se diferenciaron a neuronas, glía, células de músculo liso y adipocitos (Toma y cols., 2001). Resultados similares han sido reproducidos posteriormente por multitud de laboratorios, en los que se han generado cultivos de esferas con capacidad de dar lugar a neuronas, glía, células de músculo liso y adipocitos, a partir de piel de humana (Belicchi y cols., 2004; Etxaniz y cols., 2014; Gago y cols., 2009; Joannides y cols., 2004; Toma y cols., 2005), porcina (Dyce y cols., 2004; Lermen y cols., 2010; Zhao y cols., 2009, 2010a, 2010b, 2012), bovina (Xiao y cols., 2016) y canina (Duncan y cols., 2017; Valenzuela y cols., 2008).

Las SKP fueron aisladas de la piel de ratón a partir del estadio embrionario E14. La eficiencia del cultivo, entendida como el número de esferas formadas, aumentó considerablemente en los estadios E15-19, sin embargo, la capacidad de generar SKPs en etapas postnatales se redujo drásticamente, siendo del orden de 10 veces inferior (Fernandes y cols., 2004). En los trabajos iniciales se propuso que las SKP podían ser expandidas *in vitro* durante un largo periodo de tiempo, los cultivos derivados de la piel de ratón se mantuvieron durante al menos 6 meses (Toma y cols., 2001) y los derivados de muestras humanas (piel neonatal) durante casi un año (Toma y cols., 2005). Aun así, en base a un análisis de 102 biopsias humanas procedentes de individuos con edades comprendidas de entre los 8 y 85 años, se demostró que la edad afectaba a la eficiencia del cultivo, siendo más difícil expandir las SKPs derivadas de donantes de mayor edad (Gago y cols., 2009).

6.3.1 Potencial de diferenciación de las SKPs

La capacidad de diferenciación de las SKPs ha sido estudiada en detalle por múltiples grupos. Entre los diferentes estudios, destacan los trabajos dirigidos a caracterizar el potencial neural de las SKPs, entendido como el potencial de generar células neuronales y células de Schwann.

Varios estudios describen la capacidad de las SKPs para generar células con fenotipo de neurona, sin embargo, y a pesar de que en muchos casos la diferenciación neuronal se ha llevado a cabo aplicando métodos específicos, las SKPs han demostrado una baja eficiencia para generar neuronas funcionales (Fernandes y cols., 2006; Gingras y cols., 2007; Higashida y cols., 2010; Kubo

Introducción

y cols., 2009; Zavan y cols., 2010). En uno de los trabajos iniciales se demostró que en presencia de los factores neurotróficos NT3, BDNF y NGF, las SKP expresaban los marcadores universales de neurona BIII-tubulina, MAP2, GAP43 y NFM, además de marcadores propios de las neuronas periféricas, como la TH o p75NTR. Tras ser cultivadas sobre secciones de hipocampo las SKPs sobrevivieron y retuvieron la expresión de marcadores neuronales durante al menos cinco semanas. Sin embargo, la actividad electrofisiológica de las neuronas derivadas de las SKPs fue limitada (Fernandes y cols., 2006).

Por otro lado, las SKP han demostrado tener un potencial extraordinario para diferenciarse en células de Schwann, un potencial que ha sido caracterizado en múltiples estudios (Biernaskie y Miller, 2010; Biernaskie y cols., 2007, 2006; Chen y cols., 2012; Gorio y cols., 2004; Grochmal y cols., 2014; Hunt y cols., 2010; Khuong y cols., 2014; Kumar y cols., 2016; May y cols., 2017; McKenzie y cols., 2006; Walsh y cols., 2009, 2010). En el año 2006, Biernaskie y colaboradores describieron un método para diferenciar y purificar células de Schwann a partir de cultivos de SKPs (SKP-SC) (Biernaskie y cols., 2006). El protocolo desarrollado por este grupo se basa en la adición de los factores Forskolina y Neuregulina-1, implicados en la especificación de la glía periférica (Morgan y cols., 1991; Shah y cols., 1994). Los cultivos generados aplicando este procedimiento presentaron una pureza superior al 95% y expresaron una variedad de marcadores de células de Schwann, incluyendo GFAP, S100 β , P0, MBP, p75NTR, PMP22 y CNPasa (Biernaskie y cols., 2006). Las SKP-SC purificadas y co-cultivadas con explantes de GRD de ratones *Shiverer* (genéticamente deficientes en MBP), se asociaron a los axones sensoriales, proliferaron y expresaron un fenotipo de células de Schwann mielinizante. Resultados similares se obtuvieron en ensayos *in vivo* realizados sobre en este mismo modelo, donde las SKP-SC mielinizaron eficientemente las fibras axonales regenerativas en nervios ciáticos seccionados (McKenzie y cols., 2006). Adicionalmente, las SKP derivadas de piel humana y de ratón, sin haber sido previamente diferenciadas, fueron trasplantadas en cerebro de ratones *Shiverer* y generaron células de Schwann con capacidad de recubrir con mielina los axones no-mielinizados (McKenzie y cols., 2006).

La contribución de las células de Schwann derivadas de las SKP ha sido también ensayada en modelos de daño medular (Biernaskie y cols., 2007; Gorio y cols., 2004). En lesiones generadas por contusión leve, las SKP-SC favorecieron el crecimiento del brote axonal y mielinizaron de forma consistente los axones regenerados, además de reclutar células de Schwann endógenas que favorecieron de la reparación del tejido nervioso (Biernaskie y cols., 2007). Los animales tratados con las SKP-SC mostraron un aumento moderado en la función locomotora respecto a los animales tratados con células madre del SNC. Aun así, la implantación de las células no tuvo ningún impacto en la mejora de la sensibilidad mecánica o térmica (Biernaskie y cols., 2007).

Además del potencial para generar derivados neurales, existen también algunos estudios que han descrito la capacidad de las SKPs, en muchos casos discreta, para dar lugar a células de músculo esquelético (García-Parra y cols., 2014; Qiu y cols., 2010), células murales vasculares (Steinbach y

cols., 2011), células de cartílago y hueso (Kang y cols., 2011; Lavoie y cols., 2009), células germinales (Linher y cols., 2009) e incluso células del linaje hematopoyético (Lako y cols., 2002).

6.3.2 Identidad y origen embrionario de las SKPs

Desde la primera publicación en la que se describió la existencia de las SKPs (Toma y cols., 2001), la capacidad de dar lugar a numerosos tipos celulares y su fácil acceso, puso a las SKPs en el foco de muchos clínicos para su uso en terapias de reemplazo celular y tratamientos de regeneración de heridas cutáneas o de tejido nervioso (Hunt y cols., 2009). Sin embargo, la aplicación clínica segura y eficaz requiere de una buena caracterización celular, y en el caso de las SKPs, la identidad y el origen embrionario fueron cuestiones muy debatidas que no llegaron a establecerse de forma consistente. Las diferencias planteadas por los distintos grupos se debían probablemente a la heterogeneidad del cultivo y a las diferencias en el fenotipo mostrado por las SKPs aisladas de distintas regiones corporales (Fernandes y cols., 2004; Gresset y cols., 2015; Jinno y cols., 2010; Krause y cols., 2014; Wong y cols., 2006).

6.3.2.1 Identificación de las SKPs

Los primeros estudios dirigidos a caracterizar las SKPs plantearon que estas células derivaban de un precursor endógeno y se propuso la papila del folículo piloso como uno de los posibles nichos de las SKPs (Fernandes y cols., 2004; Toma y cols., 2005). En esta misma línea, el grupo de Jeff Biernaskie relacionó las SKPs con las células Sox2+ de la papila dérmica y la vaina de tejido conectivo del folículo piloso (Biernaskie y cols., 2009; Rahmani y cols., 2014). Ambas poblaciones compartían un perfil transcripcional similar y presentaban propiedades funcionales asociadas a las células madre de la dermis, como la capacidad de inducir la morfogénesis del pelo, generar células del linaje neural y mesodérmico o migrar al nicho endógeno (a la papila) tras ser trasplantadas de forma seriada en la piel. Teniendo en cuenta que la papila dérmica y la vaina de tejido conectivo eran los únicos nichos descritos como Sox2 positivos en la piel, los autores propusieron que las SKP derivaban de las células Sox2+ asociadas a folículo piloso (Biernaskie y cols., 2009). Sin embargo, no todas las papilas en ratón son Sox2+, ni todas las células de la papila expresan Sox2, de modo que la papila representaba solo parcialmente un nicho de SKPs (Driskell y cols., 2009). De hecho, en este estudio no se tuvo en cuenta la existencia de otros compartimentos Sox2+ de la piel, como las células gliales del complejo Lanceolado o la expresión de Sox2 adquirida por las células de Schwann en condiciones de daño. Además, el aislamiento de las SKPs a partir de la piel de prepucio humano, es decir, a partir de una región de piel glabra, planteaba la existencia de nichos adicionales y/o alternativos no asociados al folículo piloso, por lo menos en la piel humana (Fernandes y cols., 2004; Gago y cols., 2009; Gorio y cols., 2004; Ruetze y cols., 2013; Toma y cols., 2005). Por otro lado, muchos de los estudios dirigidos a la caracterización de las SKPs pusieron de manifiesto la similitud entre las SKPs y las células precursoras de la cresta neural, debido a que ambas

Introducción

poblaciones presentaban un fenotipo muy similar al ser expuestas a diferentes condiciones experimentales;

1. Se aislaron de la piel a partir a estadios embrionarios E15 y E16 (en ratón) y no antes, de acuerdo con el momento en el que las precursoras de la cresta neural migran a la piel (Fernandes y cols., 2004).
2. Crecieron en cultivos *in vitro* en presencia de factores de crecimiento y formando estructuras esféricas con capacidad de auto-renovarse durante periodos de tiempo prolongados.
3. Expresaron marcadores canónicos de la cresta neural como Sox10, Slug, Snail, Twist y Pax3 (Fernandes y cols., 2004; Toma y cols., 2005; Wong y cols., 2006).
4. Migraron a lo largo de vías estereotipadas de la cresta neural tras ser inyectadas en el tubo neural de embriones de pollo en desarrollo y tras alcanzar los tejidos diana se diferenciaron en células propias de linaje (Fernandes y cols., 2004).
5. Dieron lugar a varios derivados neurales, incluyendo neuronas periféricas y células de Schwann, y a tipos celulares mesodérmicos (Biernaskie y cols., 2007; Fernandes y cols., 2004, 2006; McKenzie y cols., 2006; Toma y cols., 2001, 2005).

Con propósito de definir su identidad, nuestro grupo de investigación dirigió parte de sus estudios a la caracterización de las SKPs derivadas de la piel humana. Este trabajo demostró que las SKPs representan una población heterogénea donde la competencia neural está restringida a las células de Schwann presentes en los cultivos (Etxaniz y cols., 2014). Estas células fueron identificadas por el doble marcaje con p75NTR y CD56 en cultivos de esferas generados a partir de piel de prepucio (Toma y cols., 2005). El fraccionamiento de esta subpoblación celular demostró que las células p75NTR+/CD56+ eran las únicas responsables del potencial neural obtenido *in vitro*. La identidad de las células fue demostrada inyectando las células en la región dorsal del tubo neural de embriones de pollo, donde las células p75NTR+ migraron a través de los GRD, por las vías estereotipadas de la cresta neural, y se diferenciaron a tipos celulares neuronales, tal y como se había descrito en otras poblaciones relacionadas con la cresta neural. Adicionalmente, el análisis de expresión génica de un panel compuesto por 95 genes demostró que las células p75NTR+/CD56+ presentaban un perfil transcriptómico propio de las células de Schwann, ya que expresaban altos niveles de *SOX10*, *ErbB3*, *NGFR*, *L1CAM* y *S100*. Además, la sobreexpresión de genes relacionados con estadios inmaduros y/o precursores del linaje de Schwann, como *CDH19*, *PLP1*, *DHH*, *MPZ* y *SOX2* indicaba que las células aisladas en cultivo presentaban un fenotipo de Schwann desdiferenciadas. Finalmente, la caracterización de la población p75NTR+/CD56+ en preparaciones de tejido dérmico completo, demostró que estas células se correspondían con las células de Schwann dérmicas, confirmando así su identidad.

Así, los estudios llevados con las SKPs derivadas de la piel humana revelaron que el potencial neural observado en cultivos *in vitro* e *in vivo*, procedía exclusivamente de las células de Schwann

presentes en las terminaciones nerviosas de la piel. En base al fenotipo mostrado en cultivo, se propuso que las células de Schwann se reprograman inducidas por las condiciones experimentales (manipulación mecánica) y adquieren un fenotipo propio de las células de Schwann inmaduras (desdiferenciadas). De acuerdo con estos resultados, las precursoras con potencial neural aisladas de la piel han sido relacionadas con las BCC (linaje *Prss56+*), las cuales generan mayoritariamente derivados gliales (Gresset y cols., 2015).

6.3.2.2 Origen embrionario de las SKPs

El origen embrionario de las SKPs ha creado cierta controversia y los resultados publicados por distintos grupos de investigación proponen hipótesis contradictorias. Por un lado, algunos autores afirman que las SKPs recapitulan el origen de la dermis y proceden de orígenes embrionarios distintos, en base a la región corporal. Esta teoría plantea una desconexión entre el potencial asociado al origen y el potencial observado *in vitro*, ya que las SKPs aisladas de piel troncal, de supuesto origen mesodérmico, presentan características propias de las células de la cresta neural (Jinno y cols., 2010). Otros autores afirman sin embargo, que de acuerdo con sus características fenotípicas, las SKPs se originan en la cresta neural (Wong y cols., 2006).

Haciendo uso de líneas transgénicas para el trazado de linaje se describió que las SKP aisladas de piel facial se originan en la cresta neural, coincidiendo con el origen de la dermis y el de muchos otros tejidos mesenquimales de la cabeza, derivados también de la cresta neural (Fernandes y cols., 2004; Hunt y cols., 2010; Jinno y cols., 2010; Wong y cols., 2006). Por otro lado, la dermis del tronco presenta un origen embrionario distinto y se genera a partir del DM en el dorso (Atit y cols., 2006; Christ y Scaal, 2008; Jinno y cols., 2010) y la dermis del flanco lateral y ventral se forma a partir del mesodermo de la placa lateral (Dhouailly y cols., 2004; Ohtola y cols., 2008).

En los estudios dirigidos a determinar el origen de las SKPs aisladas de la piel dorsal, Jinno y colaboradores recurrieron a la línea transgénica *Myf5-Cre^{Sor}*, la cual permitía trazar los precursores de la dermis dorsal por expresión del factor de transcripción *Myf5*. Estos estudios revelaron que las SKPs de tronco dorsal se originaban a partir del DM, ya que las esferas generadas en cultivo (establecido como el método de aislamiento de SKPs) estaban trazadas por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}* (Jinno y cols., 2010). En apoyo a esta idea, y utilizando una segunda línea para el trazado de precursores mesodérmicos (*Dermo1-Cre*), el mismo grupo demostró que las células *Dermo1+* aisladas de la piel generaban eficientemente células con fenotipo glial en cultivo, aunque fisiológicamente estas células no contribuían a la generación de células de Schwann en la piel, ni a la reparación de heridas cutáneas (Krause y cols., 2014).

Utilizando aproximaciones similares basadas en el aislamiento de SKPs a partir de líneas transgénicas para el trazado de linaje, el grupo de Lukas Sommer demostró que en la piel dorsal de ratón las células con capacidad de auto-renovación y potencial de diferenciación neural se

Introducción

correspondían con células derivadas de la cresta neural (trazadas por los constructos *Wnt1-Cre* y *HtPA-Cre*). Estas células fueron detectadas en la región de la protuberancia y en la matriz del folículo piloso, y en base a su localización y a la expresión de los marcadores p75NTR y Sox10, los autores argumentaron que las células multipotentes neurogénicas aisladas de la piel se relacionaban con el linaje glial y melanocítico (Wong y cols., 2006). Estos resultados contrastan con los publicados por Jinno y colaboradores, que apoyan la capacidad de generar derivados neurales a partir de células procedentes de un tejido mesodérmico.

7. SOX2

Sox2 es uno de los miembros de los genes Sox mejor estudiados, familia de factores de transcripción caracterizada por contener un dominio HMG (del inglés, *high mobility group*), que se une a secuencias específicas de ADN (Schepers y cols., 2002). En humano y en ratón se han descrito hasta 20 genes Sox diferentes, que se agrupan en base al porcentaje de homología en su secuencia de aminoácidos. Los genes de un mismo subgrupo comparten características bioquímicas y pueden presentar solapamiento en sus funciones (Wegner, 2011). Sox2, junto a los genes Sox1 y Sox3 conforma el subgrupo SoxB1 (Bowles y cols., 2000).

El gen Sox2 está implicado en la auto-renovación de las células madre embrionarias, así como en el mantenimiento de las células madre adultas y en la regulación de la homeostasis tisular (Feng 2015). Además, Sox2 es uno de los factores utilizado en estrategias de reprogramación de células somáticas para generar células madre pluripotentes inducidas (IPS cells) (Brambrink y cols., 2008; Jaenisch y Young, 2008; Takahashi y Yamanaka, 2006).

7.1 Sox2 regulador maestro del desarrollo embrionario

Durante el desarrollo embrionario, Sox2 se detecta inicialmente en la masa celular interna y en el trofoectodermo (Avilion y cols., 2003), donde se ha observado que pequeñas variaciones en los niveles de expresión de Sox2 son determinantes para definir el destino de las células madre embrionarias (Kopp y cols., 2008). En estos estadios tempranos, Sox2 interactúa con otros factores de transcripción dosis-dependientes, como Oct4 y Nanog, indicativo de que la interacción entre los distintos elementos reguladores debe estar coordinada de forma precisa (Chen y cols., 2008; Kim y cols., 2008). Tras la implantación, la expresión de Sox2 se restringe a poblaciones celulares específicas procedentes de las tres capas embrionarias, el endodermo, el mesodermo y el ectodermo. Debido a la letalidad temprana (post-implantación) de los embriones deficientes en Sox2 (*Sox2^{-/-}*), ha sido necesario utilizar modelos animales condicionales e hipomórficos para estudiar el papel de Sox2 durante el desarrollo. Así, multitud de estudios llevados a cabo en diferentes especies como la rana, el pollo o el ratón, han revelado la implicación de Sox2 en la especificación, morfogénesis, proliferación y diferenciación de múltiples tejidos durante el desarrollo (Sarkar y Hochedlinger, 2013).

Sox2 juega un papel especialmente importante en el desarrollo del SNC, donde interviene en el mantenimiento de las células madre neurales, en las cuales, por lo general, promueve la proliferación y previene la salida del ciclo celular y la consecuente diferenciación (Bani-Yaghoub y cols., 2006; Bylund y cols., 2003; Favaro y cols., 2009; Graham y cols., 2003; Hutton y Pevny, 2011a). El grupo de Larisa Pevny demostró que durante el desarrollo embrionario del SNC en embriones de pollo, la expresión constitutiva de Sox2 impide la diferenciación y mantiene las células en un estadio indiferenciado, mientras que la inhibición de Sox2 provoca la migración de los progenitores de la región ventral del tubo neural, que consecuentemente pierden la expresión de marcadores “*stem*” y comienzan a diferenciarse (Graham y cols., 2003). Este mismo fenotipo ha sido observado al sobreexpresar de forma exógena los factores Sox1 y Sox3 en el tubo neural de embriones de pollo (Bylund y cols., 2003). Del mismo modo, durante la formación de la corteza cerebral en ratón, las precursoras neuronales y gliales proliferativas expresan altos niveles de Sox2. En la corteza la expresión sostenida de Sox2 es incompatible con la neurogénesis, aunque no con la gliogénesis, de modo que los progenitores neuronales reducen la cantidad de Sox2 mediante la actividad de serina proteasas para poder diferenciarse (Bani-Yaghoub y cols., 2006).

Además de mantener el pool de progenitoras en varios nichos del SNC, algunos trabajos han descrito la participación de Sox2 en procesos de diferenciación neuronal. En el modelo hipomorfo $Sox2^{\beta\text{-geo}/\Delta ENH}$ creado por el grupo de Sylvia Nicolis, la disminución en la expresión de Sox2 presenta un defecto en la maduración de las neuronas en varias regiones neurogénicas del cerebro, como la zona ventricular o la zona granular del giro dentado en el hipocampo (Ferri y cols., 2004). En una publicación posterior, este mismo grupo demostró que el compromiso temprano de los precursores neuronales *in vitro* también requiere de Sox2. Así, en los cultivos derivados de animales con fenotipo silvestre, las células indiferenciadas expresaban fuertemente Sox2 y su expresión disminuía a medida que las células se diferenciaban, manteniéndose detectable en algunas neuronas. Sin embargo, en los cultivos generados a partir del modelo $Sox2^{\beta\text{-geo}/\Delta ENH}$, las células presentaban una morfología aberrante y expresaban marcadores de neurona inmadura, evidenciando la importancia de Sox2 en la especificación y/o la maduración de los progenitores neuronales (Cavallaro y cols., 2008a).

Los estudios llevados a cabo con modelos hipomórficos de Sox2 han revelado que los niveles de expresión de Sox2 son determinantes en el mantenimiento y diferenciación de algunas poblaciones progenitoras del SNC. Así, la disminución parcial de Sox2 en la corteza reduce la proliferación de los progenitores neuronales e interfiere en la generación de neuronas (Cavallaro y cols., 2008a; Ferri y cols., 2004). En esta misma línea, el grupo de Larisa Pevny demostró que variaciones en los niveles de expresión de Sox2 influyen en el desarrollo de la retina. En este estudio, se utilizaron varios constructos genéticos con distintas mutaciones alélicas en el locus de Sox2 para generar ratones nulos ($Sox2^{EGFP/LP}$) e hipomorfos ($Sox2^{EGFP/R}$). La caracterización de los diferentes modelos reveló que la función de Sox2 era dosis-dependiente, de modo que su disminución reducía la

Introducción

capacidad de proliferación y diferenciación de los precursores de la retina y causaba un efecto variable de microftalmia, en el que el grado de deficiencia de Sox2 estaba directamente relacionada con la severidad del fenotipo (Taranova y cols., 2006). Estos resultados encajan con el fenotipo observado en humanos, donde varios defectos hereditarios en el ojo y en el hipocampo han sido atribuidos a mutaciones hipomorfias en el gen *SOX2* (Fantes y cols., 2003; Hagstrom y cols., 2005; Zenteno y cols., 2005).

Por lo tanto, Sox2 participa en varios procesos de la morfogénesis del SNC, ya que promueve la proliferación de los progenitores neurales y mantiene el pool de células precursoras, además de controlar la maduración de las neuronas durante su diferenciación, procesos que en algunos casos parecen ser dependientes de la concentración intracelular de Sox2.

Además de su implicación en el desarrollo del SNC, Sox2 participa también en la especificación de varias poblaciones del SNP, como las células de Schwann o los melanocitos. Durante la formación de los nervios periféricos, Sox2 se expresa en poblaciones embrionarias transitorias del linaje de Schwann. La expresión de Sox2 se detecta inicialmente a E12,5, en precursoras Sox10+ que migran a través de los ganglios y los nervios en crecimiento. A E14,5, estadio en el que aparecen las primeras células inmaduras (iSC), la expresión de Sox2 se mantiene en algunas células, pero a medida que las iSC se diferencian, su expresión se va reduciendo hasta que a E18,5, Sox2 deja de detectarse en las células de Schwann (Balakrishnan y cols., 2016). Durante el desarrollo de las células de Schwann Sox2 actúa como un regulador negativo de la mielinización (Le y cols., 2005; Roberts y cols., 2017). Así, la caracterización de la línea transgénica *Egr2^{lo/lo}*, reveló que la disminución parcial de la expresión del factor pro-mielinizante *Egr2*, incrementó el número de células de Schwann proliferativas en los nervios periféricos, las cuales aumentaron la expresión de Sox2 y presentaron un fenotipo propio de estadios inmaduros. Además, la expresión constitutiva de Sox2 en células de Schwann aisladas en cultivo, redujo la expresión de genes asociados con la formación de la mielina e interfirió en la capacidad mielinizante de las células *in vitro* (Le y cols., 2005). Este efecto ha sido confirmado recientemente en la línea transgénica *p0^{Cre}/Sox2^{IRESGFP}*, en la que Sox2 se sobreexpresa de forma continua y específica en las células de Schwann, interfiriendo drásticamente en la mielinización y provocando una disfunción en la capacidad motora y en la percepción sensorial de los animales (Roberts y cols., 2017). Por lo tanto, durante la especificación del linaje de Schwann, el silenciamiento de Sox2 es necesario para activar el programa de mielinización y favorecer la diferenciación de células de Schwann mielinizantes. Por otro lado, Sox2 participa en la especificación de los precursores de la cresta neural hacia el linaje melanocítico (Adameyko y cols., 2012; Cimadamore y cols., 2012). Así, durante la migración y diferenciación de estos precursores, Sox2 interacciona con los factores MITF y EGR2 para determinar el compromiso de las células hacia el linaje melanocítico o el linaje glial, respectivamente (Adameyko y cols., 2012).

Aunque Sox2 se asocia principalmente con poblaciones celulares del SNC y SNP, el desarrollo y el mantenimiento de otros tejidos también requieren de Sox2, como las papilas gustativas de la lengua

(Okubo y cols., 2006), el epitelio del intestino delgado, los pulmones (Ishii y cols., 1998; Que y cols., 2007) o las células sensoriales del oído interno (Dabdoub y cols., 2008; Kiernan y cols., 2005; Puligilla y Kelley, 2017). Del mismo modo, la expresión de Sox2 disminuye a edades avanzadas en múltiples tejidos de ratón y humano (Carrasco-García y cols., 2018).

1.1 Sox2 marcador de células madre adultas

A pesar de que Sox2 ejerce un papel fundamental durante distintas etapas del desarrollo embrionario, con una implicación especialmente relevante en la formación de los componentes neurales del SNC, numerosos tejidos del organismo adulto también expresan Sox2 (Sarkar y Hochedlinger, 2013) (**Figura 19**).

En el SNC la expresión de Sox2 se localiza en tejidos neurales como el giro dentado, la zona subventricular, las células endoteliales del ventrículo lateral o las del canal central. Una vez aislados, estos precursores Sox2+ pueden propagarse *in vitro* en cultivos de esferas en suspensión y diferenciarse a linajes neuronales, astrocíticos y de oligodendrocito (Ellis 2004). Así, a partir de estos estudios, la capacidad de auto-renovación y la diferenciación multipotente de las células aisladas del cerebro de la línea Sox2^{EGFP} han servido para definir Sox2 como un marcador universal de las células madre neurales.

En el año 2011, Arnold y colaboradores llevaron a cabo un estudio completo para definir la expresión de Sox2 en el ratón adulto y determinar su implicación en la homeostasis de distintos tejidos. El trabajo se realizó con el ratón Sox2^{EGFP} (Ellis y cols., 2004) y de acuerdo con observaciones previas, la señal de Sox2^{EGFP} se detectó en varios tejidos de origen ectodérmico y endodérmico, como la zona subventricular, la retina, el epitelio pulmonar (tráquea y bronquios), la lengua o la papila dérmica del folículo piloso. Adicionalmente, y por vez primera, la expresión de Sox2 también fue detectada en el epitelio escamoso que reviste el esófago, el estómago, el ano y el cérvix, así como en el epitelio seminífero y en el epitelio del cristalino. La localización de las células Sox2+ coincidía en muchos casos con nichos de células madre/progenitoras ya descritos, por eso, la ablación de las células Sox2+ provocó el deterioro de varios tejidos epiteliales y la muerte del animal (Arnold y cols., 2011a). Adicionalmente, este grupo utilizó el modelo transgénico Sox2^{CreER} para marcar las células Sox2+ en estadios tempranos (E13,5-E14,5) y trazar el linaje celular derivado de las mismas. De este modo, demostraron que las células adultas con expresión de Sox2, descritas en el modelo Sox2^{EGFP}, se originaban a partir de progenitores embrionarios Sox2+ (Arnold y cols., 2011b).

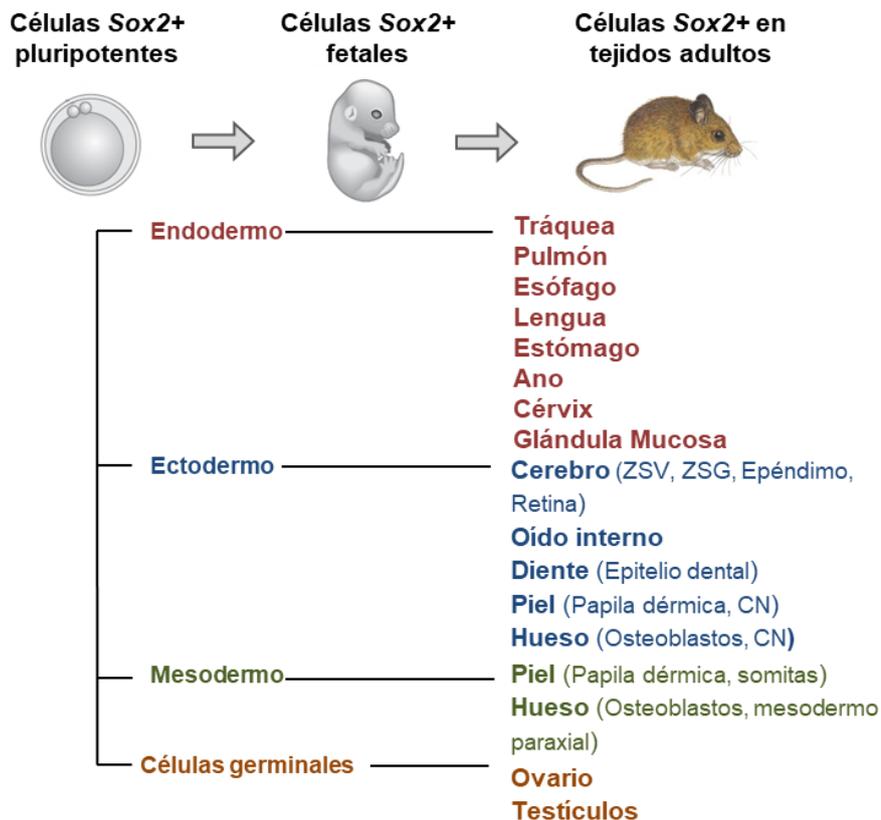


Figura 19. Expresión de Sox2 en diferentes tejidos durante el desarrollo. Sox2 se expresa a lo largo del desarrollo, inicialmente en células pluripotentes del blastocisto y, posteriormente, en los progenitores ectodérmicos, endodérmicos y mesodérmicos, así como en células germinales primordiales. La expresión de Sox2 se mantiene en tejidos fetales y en tejido adultos derivados de las células progenitoras fetales Sox2+. En adulto, Sox2 marca células madre y progenitoras, y en algunos casos también células diferenciadas. Adaptada de (Sarkar y Hochedlinger, 2013).

7.2 Expresión de Sox2 en piel

Sox2 se expresa en varios compartimentos de la epidermis y la dermis, durante el desarrollo embrionario y también en el tejido adulto. En la epidermis, la expresión de Sox2 se localiza en un subgrupo de queratinocitos del estrato basal y en las células sensoriales de Merkel. En la dermis, Sox2 se expresa en varios compartimentos no epiteliales del folículo piloso; en la papila dérmica, en la vaina de tejido conectivo, y en células de Schwann especializadas localizadas en la protuberancia (**Figura 25**).

7.2.1 Expresión de Sox2 en la epidermis

En ratón, Sox2 se expresa exclusivamente en las células de Merkel y su expresión no ha sido detectada en ninguna otra población de la epidermis, ni durante el desarrollo embrionario de la piel, ni en el tejido adulto (Driskell y cols., 2009; Lesko y cols., 2013) (**Figura 22-1**). Las células de Merkel

son mecanorreceptoras de origen epidérmico localizadas en la membrana basal (Morrison y cols., 2009; Van Keymeulen y cols., 2009). Estas células se agrupan para ser inervadas por fibras nerviosas sensitivas y formar receptores cutáneos para la percepción del tacto (Boulais y Misery, 2007; Haeberle y Lumpkin, 2008). La expresión de Sox2 en las células de Merkel se ha relacionado con su diferenciación, ya que la inhibición específica de Sox2 (bajo el control del promotor de la Keratina-14) reduce el número de células de Merkel pero no afecta a su proliferación, ni a su funcionalidad (Bardot y cols., 2013; Lesko y cols., 2013).

En humano, durante el desarrollo embrionario de la piel, al iniciarse la formación de los folículos pilosos (semanas 11-12), la expresión de SOX2 se detecta primeramente en la capa basal, en regiones engrosadas de la epidermis denominadas placas o placodas epidérmicas. Durante las consecuentes etapas de morfogénesis folicular (semanas 13 y 24), las células SOX2+ aparecen dispersas en la capa basal y en el epitelio del infundíbulo, sección del folículo próxima a la protuberancia. En la piel humana adulta la expresión de SOX2 persiste en un pequeño subgrupo de células de la capa basal, localizadas principalmente en las crestas de Rete (**Figura 21-2**) (Laga y cols., 2010).

7.2.2 Expresión de Sox2 en la dermis

En la dermis, la expresión de Sox2 está asociada al folículo piloso, y por lo general, su expresión no se detecta en la dermis interfolicular en homeostasis, a excepción de algunas pocas células SOX2+ observadas durante el desarrollo temprano de la piel humana (Laga y cols., 2010). En el folículo piloso la expresión Sox2 se restringe a tres compartimentos; (1) la papila dérmica, (2) la vaina de tejido conectivo y (3) las células de Schwann asociadas a los terminales nerviosos que inervan el folículo a la altura de la protuberancia (Biernaskie y cols., 2009; Driskell y cols., 2009; Johnston y cols., 2013; Lesko y cols., 2013; Li y Ginty, 2014).

7.2.2.1 Expresión de Sox2 en el folículo piloso

Durante la morfogénesis del pelo, la expresión de Sox2 se detecta inicialmente en los fibroblastos inmaduros que se agregan bajo las placas epidérmicas para formar los condensados dérmicos, estructuras de carácter mesenquimal que dan lugar a las papilas dérmicas. A medida que las células epidérmicas proliferan y se diferencian, las células SOX2+ de la papila migran y se extienden ligeramente en torno al folículo, creando una fina capa de tejido conectivo alrededor del germen folicular primario (**Figura 20A**). Tras la formación del folículo piloso, la expresión de Sox2 se mantiene en las células de la papila y en las células del tejido conectivo que cubren el bulbo. Este proceso sucede de forma similar en ratón y en humano, y en ambos casos, los folículos maduros retienen la expresión de Sox2 en ambos compartimentos (Driskell y cols., 2009; Laga y cols., 2010).

Introducción

Aun así, en ratón, la expresión de Sox2 en la papila y en la vaina de tejido conectivo es dependiente del tipo de folículo piloso. Tal y como se ha descrito en el apartado 1.2.1, la morfogénesis folicular en ratón consta de tres fases consecutivas, cada una de las cuales da lugar a un subtipo de folículo diferente. Así, los folículos formados durante las primeras dos fases (a estadios E14,5 y E16,5), los de tipo Guard y Awl/Auchene, se generan a partir de condensados dérmicos Sox2+, mientras que los folículos zigzag, generados durante la tercera fase de morfogénesis (E18,5), se forman a partir de condensados Sox2- (**Figura 20A y 20B**). De este modo, la expresión de Sox2 queda restringida a las papilas dérmicas de los folículos formados durante las dos primeras etapas, los cuales representan aproximadamente el 30% del total de folículos de la piel (Driskell y cols., 2009). Estos mismos autores describieron que tras la formación de los folículos pilosos, durante los sucesivos ciclos de regeneración capilar que suceden ya en etapas post-natales, Sox2 presenta un patrón de expresión dinámico y es solo detectable durante la fase de proliferación (anágena). En las fases de regresión (catágena) y de reposo (telógena), tanto la papila como la vaina de tejido conectivo disminuyen la expresión de Sox2, manteniendo los niveles reducidos hasta el inicio del siguiente ciclo capilar (Figura C) (Botchkarev y Kishimoto, 2003; Driskell y cols., 2009). Estos resultados, sin embargo, contrastan con los publicados posteriormente por el grupo de Michael Rendl, quienes describieron que la expresión de Sox2 se mantiene constante (y a niveles detectables) durante todas las fases del ciclo capilar (Clavel y cols., 2012).

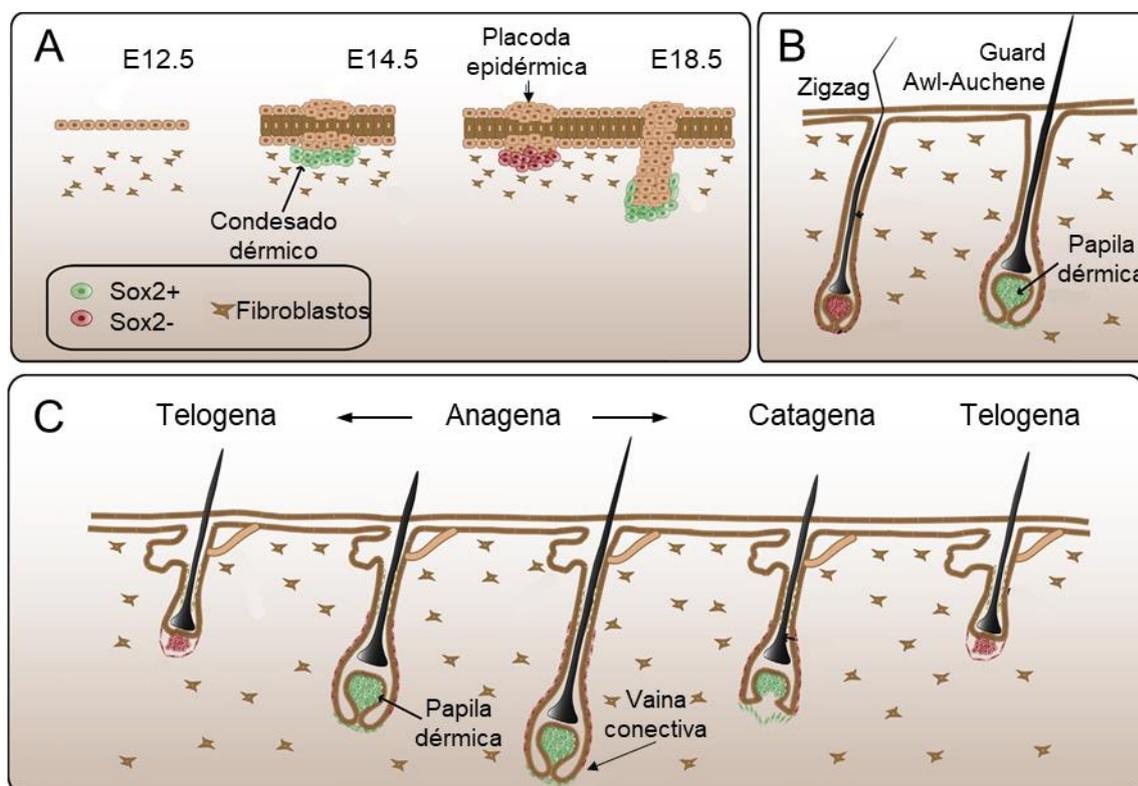


Figura 20. Expresión de Sox2 en la papila dérmica y en la vaina de tejido conectivo del folículo piloso de ratón. (A) La expresión de Sox2 en la papila del folículo piloso es dependiente de la fase de morfogénesis en la que se genera cada subtipo de folículo. Durante la formación de los folículos pilosos, Sox2 se expresa inicialmente en los condensados dérmicos formados debajo de las placas epidérmicas (E14,5). Las células

Sox2+ aumentan de número y a medida que el folículo madura, migran para cubrir la región inferior del bulbo. Los folículos generados en la tercera fase de morfogénesis (E18,5) se forman a partir de condensados Sox2-. **(B)** La expresión de Sox2 se restringe a la papila dérmica y a la vaina de tejido conectivo de los folículos Guard y Auw-Auchene y los folículos tipo Zigzag no expresan Sox2. **(C)** Durante el ciclo de crecimiento del pelo, la papila y la vaina de tejido conectivo presentan una expresión dinámica de Sox2, la cual se detecta exclusivamente durante la fase anágena. Imagen adaptada de (Hisato Kondoh y Robin Lovell-Badge, 2015).

Teniendo en cuenta la variabilidad en la expresión de Sox2 en la papila y en la región peribulbar del folículo, se quisieron caracterizar las distintas poblaciones presentes en este compartimento. Haciendo uso del marcador universal de papila dérmica CD133 (*Prom1*) (Ito y cols., 2007), las fracciones Sox2+/CD133+ y Sox2-/CD133- fueron aisladas para su análisis de expresión génica. Las células Sox2+/CD133+ expresaron genes relacionados con la orientación axonal y se asociaban principalmente con las vías de señalización de Wnt, BMP y FGF (Driskell 2009, Kishimoto 2002). Las células Sox2-/CD133+ presentaron un perfil transcripcional distinto y se asociaban con las vías de señalización de IGF, SHH, Notch e integrina (Driskell 2009). En este mismo estudio, se llevaron a cabo ensayos de reconstitución de piel en los que las células SOX2+ parecían ser responsables de la inducción de los folículos Auw/Auchene. Así, teniendo en cuenta datos previos en los que se describía la expresión de SOX18 en la formación de folículos Zigzag (James 2003), se propuso que los factores de transcripción SRY pueden actuar como especificadores del tipo de folículo piloso durante el desarrollo (Lesko y cols., 2013).

Con propósito de estudiar más específicamente la función de Sox2 en la formación y el crecimiento de los folículos pilosos, el grupo de Rendl hizo uso de la línea transgénica *Tbx18-Cre*, (constructo que permite trazar las células de la papila dérmica desde su aparición en estadios embrionarios tempranos, (Grisanti y cols., 2013), para eliminar selectivamente la expresión de Sox2 en los precursores de la papila dérmica (Clavel y cols., 2012). El análisis del modelo doble transgénico *Tbx18^{Cre}/Sox2^{fl/fl}* reveló que Sox2 no afectaba a la formación de los folículos pilosos, que se mantenían en número y presentaban una progresión del ciclo capilar normal, aunque sí alteraba la longitud de la fibra capilar. Este fenómeno fue únicamente observado en los folículos Guard y Awl/Auchene, que vieron notablemente reducido su tamaño. De acuerdo con la ausencia de expresión de Sox2, los folículos de tipo Zigzag no presentaron variación alguna en su estructura. El trabajo demostró que la disminución en el tamaño de la fibra se debía a una reducción en la velocidad de migración de los progenitores en diferenciación de la matriz. Además, al analizar el perfil transcripcional de las papilas dérmicas nulas para Sox2, se detectó un aumento de expresión del efector BMP6 (vía de BMP) y una disminución en la expresión de *Sostdc1*, inhibidor de la vía BMP y diana directa de Sox2 (Clavel y cols., 2012). Así, al suprimir la expresión de Sox2 y prevenir la activación de *Sostdc-1*, la señalización de la vía BMP se vio aumentada, interfiriendo en la capacidad de migración de las células epiteliales tanto *in vivo* como *in vitro* (Kaiser y cols., 1998). De este modo, en el estudio publicado por Clavel y colaboradores, se propuso que Sox2 regula el crecimiento de la fibra capilar mediante el control de la migración de las células progenitoras de la

matriz por inhibición de la vía de BMP (Clavel 2012). En línea con esta idea, una mayor actividad de BMP endógena detectada en los pelos Zigzag (Sox2-) podría explicar el acortamiento de las fibras capilares.

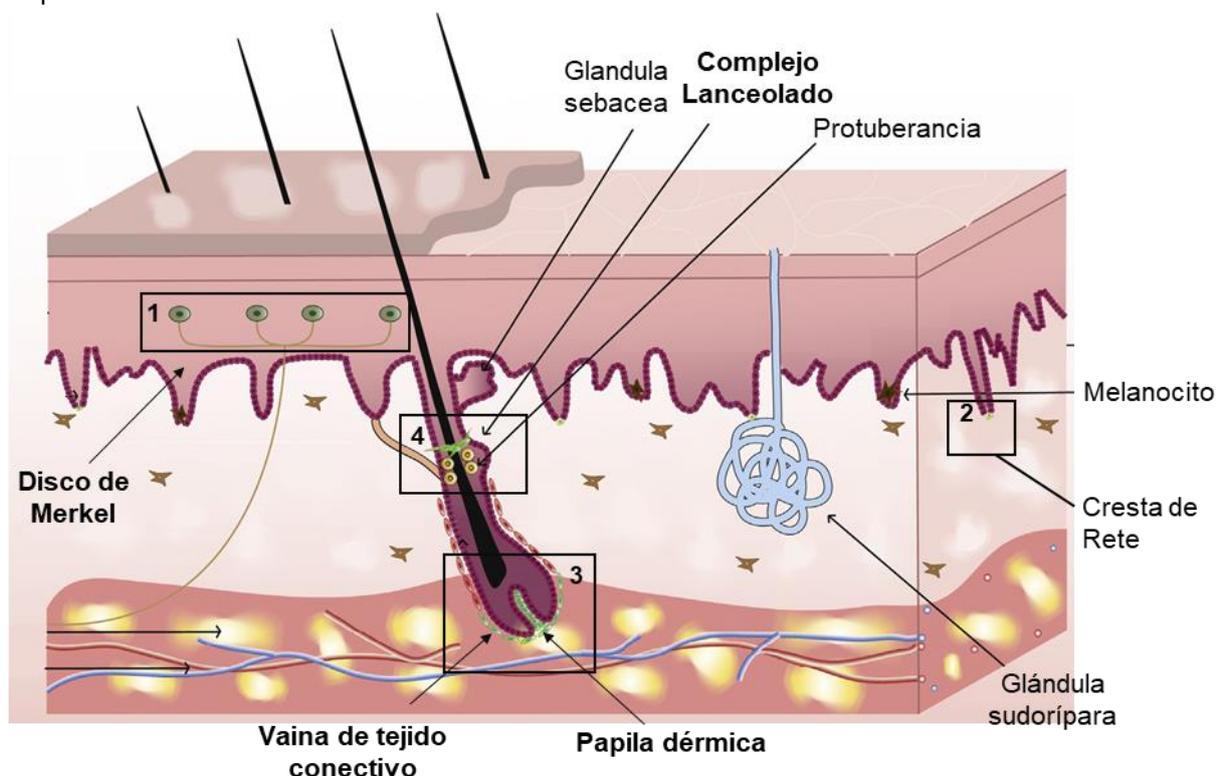


Figura 21. Expresión de Sox2 en la piel adulta. En la epidermis, Sox2 se expresa en las células de Merkel, órganos sensoriales para la recepción del tacto (1) y en algunas células dispersas en la membrana basal, localizadas especialmente en las crestas de Rete (2). En la dermis adulta en homeostasis, la expresión de Sox2 se restringe a tres compartimentos del folículo piloso; la papila dérmica (3), la vaina de tejido conectivo que rodea el bulbo (3) y las células de Schwann del complejo Lanceolado (4), las cuales se asocian a fibras nerviosas terminales para formar receptores sensoriales a la altura de la protuberancia. Imagen adaptada de (Hisato Kondoh y Robin Lovell-Badge, 2015).

Otra de las poblaciones asociadas al folículo piloso en la que se ha descrito expresión de Sox2 es en las células de Schwann que rodean el folículo a la altura de la protuberancia. Estas células se asocian a fibras nerviosas sensitivas (mecanorreceptores de bajo umbral de activación, LTMR) para formar órganos sensoriales denominados complejos Lanceolados (Li y Ginty, 2014; Li y cols., 2011) (**Figura 21-4**). Los primeros trabajos dirigidos a analizar la expresión de Sox2 en la piel obviaron la presencia de estas células Sox2+ en la protuberancia del folículo (Biernaskie y cols., 2009; Laga y cols., 2010) y su existencia fue confirmada posteriormente utilizando la línea transgénica *Sox2^{EGFP}*, en el que las células Sox2+ son trazadas por la expresión del reportero EGFP (Johnston y cols., 2013). En este estudio se demostró que las células Sox2+ del complejo Lanceolado, denominadas por los autores *nerve terminals* (NTs) se originaban en la cresta neural ya que estaban trazadas en el constructo *Wnt1-cre*. Las NTs se colocaban en círculo alrededor de cada folículo y extendían finas prolongaciones con forma de dendrita, las cuales se intercalaban con las fibras nerviosas que

inervaban individualmente cada uno de los folículos. De acuerdo con los marcadores previamente descritos en las células del complejo, las células Sox2+ expresaron los marcadores p75NTR, S100β y Nestina, y retenían la expresión de Sox2 durante todo el ciclo capilar (Johnston y cols., 2013; Li y Ginty, 2014).

7.3 Desdiferenciación regulada por Sox2 y regeneración

Durante el desarrollo embrionario del linaje Schwann Sox2 se expresa de forma transitoria en estadios precursores (SCP) e inmaduros (iSC) y su expresión se pierde en estadios postnatales a medida que las células se van diferenciando (Balakrishnan y cols., 2016). Tras la lesión de un nervio periférico las células de Schwann se reprograman para contribuir en la regeneración del tejido dañado, un proceso en el que las células se desdiferencian y recuperan la expresión de genes asociados con estadios inmaduros, entre ellos Sox2 (Balakrishnan y cols., 2016; Clements y cols., 2017; Parrinello y cols., 2010). Sox2 cumple varias funciones en las células de Schwann reprogramadas de los nervios dañados; (1) Actúa como regulador negativo de la mielinización e inhibe la expresión de genes de mielina, participando en la desdiferenciación de las células de Schwann mielinizantes (Le y cols., 2005; Roberts y cols., 2017). (2) Contribuye en la relocalización de la molécula de adhesión N-cadherina en la membrana de las células de Schwann, favoreciendo la unión entre las células y la formación de las bandas Büngner (filas celulares que facilitan la reconexión de los axones fragmentados) (Parrinello y cols., 2010). (3) Participa en procesos inflamatorios mediados por las células de Schwann. Se ha observado que incluso en ausencia de daño la expresión sostenida de Sox2 en células P0+ del SNP ($P0^{Cre}; Sox2^{IRESGFP}$) aumenta el flujo de macrófagos al nervio y prolonga el estado inflamatorio (Roberts y cols., 2017). (4) Promueve la proliferación de las células de Schwann, durante el desarrollo y en procesos de regeneración (Balakrishnan y cols., 2016; Le y cols., 2005; Roberts y cols., 2017).

Del mismo modo, Sox2 participa en la desdiferenciación de las células de Schwann dérmicas en respuesta a daño (Johnston y cols., 2013). Este fenómeno fue descrito en la línea $Sox2^{EGFP}$ en la cual se observó que tras la generar una herida en la piel, el número de células Sox2+ aumenta considerablemente en el tejido regenerativo. Estas células se originaban en la cresta neural (trazadas por el constructo $Wnt1-Cre$) y fueron caracterizadas por expresar los marcadores gliales p75NTR, Nestina y S100β. Teniendo en cuenta que en la piel en homeostasis las únicas células Sox2+ derivadas de la cresta neural eran las células gliales del complejo Lanceolado, se quiso comprobar si las células Sox2+ presentes en la herida procedían de esta población endógena o tenían un origen celular distinto. Así, utilizando la línea $Sox2^{CreERT2}$ para trazar la expresión de Sox2 antes y después de generar la herida, se demostró que las células Sox2+ presentes en el lecho de la herida no derivaban de las células gliales Lanceoladas, si no que procedían de células negativas para Sox2. En base al origen (cresta neural) y a la localización de estas células, las cuales se detectaron cerca de los nervios cutáneos, los autores propusieron que las células Sox2+ que asistían a la regeneración de la herida se correspondían con las células de Schwann residentes en

la piel, en las cuales la expresión de Sox2 estaba inducida por las condiciones de daño. En este mismo estudio, al eliminar Sox2 durante la cicatrización de la herida, el número de células neurales (p75NTR+) y en el número de células proliferativas (Ki67+) decreció, afectando al cierre de la herida (Johnston y cols., 2013). Este mismo grupo publicó posteriormente que las células de Schwann asociadas a los nervios se desdiferencian e intervienen en la proliferación del blastema y en la regeneración de la punta del dedo de ratón, donde cumplen una función paracrina y secretan factores de crecimiento que promueven la autorrenovación de los precursores mesenquimales. Estos factores fueron identificados como Oncostatina M (OSM) y el factor derivado de las plaquetas AA (PDGF-AA) (Johnston y cols., 2016).

8. NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1

El trastorno de predisposición tumoral neurofibromatosis tipo 1 (NF1) es uno de los desórdenes genéticos más comunes del SN y afecta a 1 de cada 3500 individuos en todo el mundo (Friedman, 1999; Le y Parada, 2007). La enfermedad está causada por la mutación en el gen *NF1* que codifica la proteína supresora tumoral neurofibromina (Gutmann y cols., 1991).

La NF1 es una enfermedad genética autosómica dominante, donde aproximadamente la mitad de los pacientes heredan la mutación y la otra mitad padecen una mutación somática esporádica, sugiriendo que el gen *NF1* representa una región “*hot spot*” en el genoma humano (Cichowski y Jacks, 2001; Trovó-Marqui y Tajara, 2006). Los síntomas y el grado de severidad de la enfermedad son altamente variables, de modo que se propone la implicación de mecanismos de regulación epigenética, así como en el desarrollo de las distintas manifestaciones de la enfermedad (Riccardi VM, 1992).

El *NF1* es un gen de gran tamaño que se localiza en el cromosoma 17q11.2 y codifica la proteína neurofibromina, una proteína activadora de GTPasas (siglas en inglés, GAP). La neurofibromina es una Ras-GAP que acelera la conversión de Ras-GTP (forma activa) en Ras-GDP (forma inactiva) y regula negativamente la vía de señalización p21-Ras (Xu y cols., 1990). Las Ras-GTPasas interactúan, entre otras, con la vía Raf/Mek/Erk, responsable de controlar la proliferación y la diferenciación celular (Le y Parada, 2007). La expresión de la neurofibromina es ubicua, aunque su expresión es más elevada en las células del SNC y SNP (Daston y Ratner, 1992; Daston y cols., 1992; Ratner y Miller, 2015). La pérdida o la reducción en la expresión de la neurofibromina provoca un aumento de la actividad de la proteína Ras, que ha sido asociada con un incremento en la diana de la rapamicina (mTOR) (Dasgupta y cols., 2005; Johannessen y cols., 2005), el cual está relacionado con la formación de gliomas ópticos (Kaul y cols., 2015). Así, en multitud de tumores deficientes en *NF1* se detecta un aumento en los niveles de las Ras-GTP (Guha y cols., 1996; Schubbert y cols., 2007; Sherman y cols., 2000).

El rasgo clínico más característico de la NF1 es el desarrollo de tumores benignos denominados neurofibromas. En el 10-15% de los pacientes un subtipo particular de neurofibromas, los neurofibromas plexiformes, se transforman en tumores malignos (en inglés, *malignant peripheral nerve sheath tumors*, MPNST) (Evans y cols., 2002; Ferner y Gutmann, 2002; Upadhyaya, 2011). Los síntomas no cancerosos de la enfermedad incluyen déficits intelectuales, deformaciones óseas, lesiones benignas del iris (nódulos de Lisch) o defectos en la hiperpigmentación de la piel (mácula café con leche). Debido a que la enfermedad afecta principalmente a tejidos derivados de la cresta neural, la NF1 es considerada una neurocristopatía (Cichowski y Jacks, 2001; Le y Parada, 2007; Zhu y Parada, 2001).

8.1 Tipos de neurofibromas

Se han descrito distintos tipos de neurofibromas, los cuales se han clasificado hasta en ocho subtipos (Riccardi, 1982). Aun así, por lo general, en el ámbito de la investigación, se distinguen dos tipos de neurofibromas principales; los cutáneos y los plexiformes.

Los neurofibromas cutáneos se forman prácticamente en todos los pacientes a partir de pequeñas ramas nerviosas, son de pequeño tamaño y crecen localmente en regiones de la dermis o la epidermis en prácticamente todos los pacientes de NF1. Aparecen inicialmente en la pubertad y aumentan de número con la edad y durante el embarazo, indicando que existe un componente hormonal asociado al desarrollo del tumor. Aunque estos tumores son benignos, los pacientes pueden desarrollar cientos de ellos y dependiendo de su localización y tamaño pueden llegar a ser muy molestos o desfigurantes (Bonnemaison y cols., 2006; Duong y cols., 2011; Ferner, 2007a; Roth y cols., 2008).

Los neurofibromas plexiformes presentan un mayor tamaño, son de origen congénito y se desarrollan de forma temprana a partir de los plexos nerviosos principales (Korf, 1999; Packer y cols., 2002). Aunque estos tumores son inicialmente benignos, un pequeño porcentaje progresa hacia fenotipos malignos y da lugar a los MPNST (Lévy y cols., 2004). A nivel estructural los neurofibromas plexiformes son muy similares a los cutáneos, pero el desarrollo clínico de ambos tipos de tumor es notablemente diferente (Carroll y Ratner, 2008).

A nivel estructural los neurofibromas se componen por todos los tipos celulares normalmente presentes en el nervio periférico, pero en los neurofibromas el número y la distribución de estos componentes se ven alterados (Friedrich y cols., 2012). Los nervios periféricos están compuestos por múltiples fascículos unidos por tejido conectivo. Los fascículos representan agrupaciones de axones rodeados por células de Schwann. Los axones de gran calibre son envainados por una única célula de Schwann mielinizante y los axones de pequeño calibre son rodeados en conjunto por células de Schwann no mielinizantes (estructura denominada haz de Remak). Las unidades formadas por la asociación de axones y células de Schwann se encuentran inmersas en una matriz

extracelular rica en colágeno en cual se localizan también los fibroblastos endoneurales y algunos mastocitos. Todos estos elementos están encapsulados por capas concéntricas de células perineurales formando el fascículo (**Figura 22A**) (Reina y cols., 2000). En los neurofibromas el perineuro se desestructura y el fascículo se encuentra altamente desorganizado. El número de células de Schwann y fibroblastos aumenta considerablemente, y la deposición de colágeno en la matriz extracelular es mayor, además de producirse una infiltración masiva de mastocitos. A diferencia del nervio normal, la mayoría de las células de Schwann en los neurofibromas se encuentran disociadas de axones y se produce una degeneración axonal (**Figura 22B**) (Cichowski y Jacks, 2001).

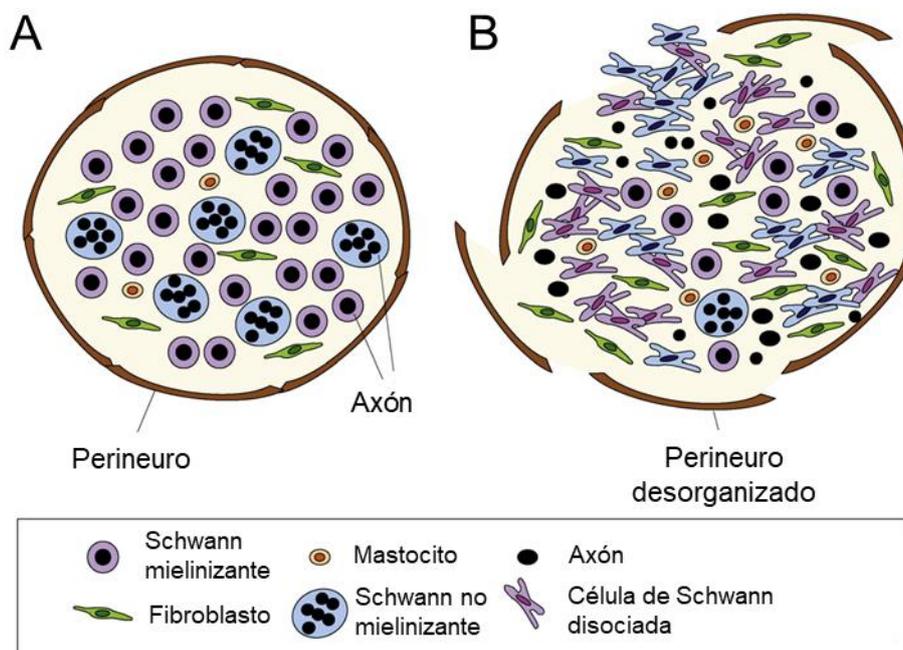


Figura 22. Estructura anatómica de un fascículo nervioso y un neurofibroma. (A) Los nervios periféricos están compuestos por fascículos en los que los axones están rodeados de células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes. Estas unidades Schwann-axón están inmersas en matriz extracelular rica en colágeno, junto a fibroblastos endoneurales y mastocitos. (B) En los neurofibromas, el perineuro y el interior del fascículo se encuentran desorganizados. Los neurofibromas muestran un incremento en el número de distintos componentes celulares; células de Schwann, fibroblastos y mastocitos. Además, las células de Schwann se disocian de los axones, los cuales tienden a degenerar. Imagen adaptada de (Parrinello y Lloyd, 2009).

8.2 Formación de los neurofibromas

8.2.1 Pérdida de heterocigosis (LOH)

En la NF1 la penetrancia es total a los 20 años, aunque el grado de severidad de la enfermedad varía notablemente entre miembros de una familia con una misma mutación (Friedman, 1999). Todos los individuos con NF1 son heterocigotos ($NF1+/-$) y la alteración de un único alelo es suficiente para desarrollar muchos de los síntomas de la enfermedad, un fenómeno que se conoce como haploinsuficiencia. Aun así, la formación de algunas lesiones, incluyendo la formación de los

neurofibromas, requiere de la inactivación (pérdida de función) del segundo alelo, lo cual se produce por una mutación somática en el alelo silvestre (denominado comúnmente en inglés, *second hit mutation*), siendo la pérdida de la heterocigosis (en inglés, *loss of heterozygosity*, LOH) el evento de inactivación más frecuente (García-Linares y cols., 2011; Rasmussen y cols., 2000; Upadhyaya y cols., 2004).

La pérdida de heterocigosis se ha demostrado en varios tumores relacionados con la NF1, como en algunos subtipos de leucemias y astrocitomas (Legius y cols., 1993; Li y cols., 1992). Del mismo modo, múltiples trabajos han demostrado que este fenómeno afecta al desarrollo de los neurofibromas cutáneos (Colman y cols., 1995; Sawada y cols., 1996; Serra y cols., 1997) y también a la formación de los neurofibromas plexiformes (Kluwe y cols., 1999a; Rasmussen y cols., 2000). Por eso, la pérdida funcional de la neurofibromina, por mutación somática en el gen *NF1*, en combinación a la mutación germinal, se propone como el evento patogénico inicial para la formación de los neurofibromas.

Aun así, y debido a que la pérdida del segundo alelo no se confirma en todos los casos, algunos autores afirman que la LOH no es un factor determinante en el desarrollo de los neurofibromas (Shimizu y cols., 1993; Skuse y cols., 1989), y de hecho, los trabajos que identifican alteraciones en el alelo *silvestre*, no consiguen detectarlos en todos los pacientes (Colman y cols., 1995; Rasmussen y cols., 2000; Serra y cols., 1997). Es probable, que en estos casos, la incapacidad de detectar mutaciones somáticas en el gen *NF1* se deba a una limitación experimental, influenciada por la heterogeneidad de los tumores o el hecho de que las mutaciones en el gen *NF1* se producen, en algunos casos, por pequeñas modificaciones en el gen, como mutaciones puntuales, pequeñas deleciones/inserciones o modificaciones epigenéticas, que no siempre son fáciles de percibir (Laycock-van Spyk y cols., 2011; Maertens y cols., 2006; Serra y cols., 2001).

8.2.2 Célula de origen

La NF1 es una enfermedad genética compleja donde se desarrollan tumores heterogéneos compuestos por múltiples tipos celulares. A pesar de la heterogeneidad de los tipos celulares que conforman los neurofibromas, actualmente se acepta que estos tumores se forman a partir de células del linaje de Schwann, ya que, además de ser el tipo celular prevalente en los tumores, se ha demostrado que las células de Schwann son las células que padecen mutaciones bialélicas en el gen *NF1* (Kluwe y cols., 1999b; Maertens y cols., 2006; Rutkowski y cols., 2000; Serra y cols., 2000; Tucker y cols., 2011). El aislamiento en cultivo de las células de Schwann (identificadas como S100β+) ha demostrado que los tumores incluyen poblaciones *NF1*^{+/-} y *NF1*^{-/-}, es decir, que solo un subgrupo de las células pierde el alelo silvestre. Este hecho se puede explicar a través de dos mecanismos: (1) la mutación somática y pérdida del segundo alelo sucede como un evento secundario dentro de un neurofibroma que se ha desarrollado de forma policlonal, y por lo tanto solo una subpoblación de células S100β+ es *NF1*^{-/-}. (2) La pérdida de heterocigosis sucede en una célula

Introducción

madre/progenitora que da lugar a la mayoría de las células del tumor y estimula la proliferación de células no neoplásicas infiltrantes tales como células de Schwann heterocigóticas, mastocitos y fibroblastos (*NF1*^{+/-}).

Aunque son estructuralmente muy similares, la presentación clínica temporal y espacialmente distinta entre los neurofibromas dérmicos y los plexiformes ha respaldado la hipótesis de que ambos tipos de tumor tienen un origen distinto (Ferner, 2007b; Lakkis y Tennekoon, 2000). Por un lado, los neurofibromas dérmicos se localizan en la piel y ocurren en prácticamente en todos los pacientes con NF1, mientras que los neurofibromas plexiformes se desarrollan a lo largo de los plexos nerviosos y ocurren en aproximadamente el 30% de los individuos con NF1. Además, los neurofibromas cutáneos aparecen inicialmente en la pubertad y crecen de forma limitada, mientras que los neurofibromas plexiformes son de origen congénito y aumentan de tamaño progresivamente a lo largo la vida.

Se ha descrito que los neurofibromas plexiformes se originan a partir de precursores embrionarios del linaje de Schwann. Varios estudios llevados a cabo con líneas transgénicas de ratón, como *Plp-Cre^{ER}*, *Krox20-Cre*, *P0-Cre* y *Dhh-Cre*, demostraron que la ablación condicional del gen *Nf1* en distintos estadios del linaje de Schwann era suficiente para inducir la formación de tumores a lo largo de plexo nervioso periférico (Chen y cols., 2014; Le y cols., 2011; Mayes y cols., 2011; Ribeiro y cols., 2013; Wu y cols., 2008; Zheng y cols., 2008; Zhu y cols., 2002). Sin embargo, en muchos casos, la ablación del gen *Nf1* no generó neurofibromas, poniendo de manifiesto la participación de otros factores en el desarrollo tumoral. A este respecto, varias publicaciones revelaron la importancia del fondo genético (*Nf1*^{+/-}) y la participación de las células haploinsuficientes del microambiente, como los mastocitos, los fibroblastos o los macrófagos en la formación de los neurofibromas (Prada y cols., 2013; Yang y cols., 2003, 2008). Así, en la línea *Krox20^{Cre}/Nf1^{flox/-}* las células de Schwann *Nf1*^{-/-} dieron lugar a tumores en un entorno heterocigoto *Nf1*^{+/-}, mientras que estas mismas células aisladas de la línea *Krox20^{Cre}/Nf1^{flox/flox}*, donde la inactivación de ambos alelos de *Nf1* se produjo en un entorno homocigoto (*Nf1*^{+/+}), no dieron lugar a neurofibromas (Zhu y cols., 2002).

Otro de los factores que demostró ser indispensable en el desarrollo de los neurofibromas plexiformes fue el trauma o el daño producido de forma local (Atit y cols., 1999a; Ribeiro y cols., 2013; Riccardi VM, 1992). En un estudio publicado por el grupo de Alison Lloyd, la pérdida del segundo alelo de *Nf1* en células de Schwann adultas (trazadas por la línea *P0-Cre^{ER}*) provocó la formación de neurofibromas en regiones próximas al nervio ciático que había sido parcialmente seccionado, mientras que lejos de la región lesionada, las células de Schwann *Nf1*^{-/-} no desarrollaron tumores y presentaban un fenotipo normal. En este caso, el fondo genético de los animales no tuvo efecto en el desarrollo tumoral, y el número de neurofibromas formados fue similar en los animales con fenotipo silvestre (*Nf1*^{+/+}) y en los heterocigotos (*Nf1*^{+/-}). Basándose en el fenotipo de las células de Schwann *NF1*^{-/-} presentes en el tumor, las cuales fueron positivas para p75NTR y mostraban un aspecto de célula de Schwann no mielinizante y/o inmadura, los autores

propusieron que los tumores formados en los nervios dañados se generaron a partir de las células de Schwann *Nf1*^{-/-} desdiferenciadas en respuesta al daño (Ribeiro y cols., 2013).

Estos estudios no sirvieron para confirmar el origen de los neurofibromas cutáneos, ya que, a excepción del modelo *Dhh*^{Cre}/*Nf1*^{fl/fl} (Wu y cols., 2008), ninguna de las líneas transgénicas utilizadas para analizar la implicación de las células de Schwann *Nf1*^{-/-} en el desarrollo de neurofibromas generó tumores en la piel. La formación de los neurofibromas cutáneos ha sido relacionada con poblaciones multipotentes endógenas de la piel, entre ellas las SKPs (Jouhilahti y cols., 2011; Le y cols., 2009). En un estudio publicado por el grupo de Luis Parada se utilizó la línea transgénica *CMVCre*^{ERT2}/*Nf1*^{fl/fl}/*ROSA26* para inducir la pérdida de la segunda copia del gen *NF1* en las SKPs aisladas in vitro. Así, al implantar las esferas generadas en cultivo directamente bajo la piel se demostró que las SKP (*NF1*^{-/-}) tenían la capacidad de formar tumores subcutáneos, los tumores solo se desarrollaron en hembras preñadas, indicando que el crecimiento tumoral era dependiente del factor hormonal (Riccardi, 1993; Roth y cols., 2008). Del mismo modo, la ablación del gen *NF1* por aplicación tópica de tamoxifeno indujo la formación de neurofibromas cutáneos, demostrando que las células formadoras de tumor residían en la piel (Le y cols., 2009). En línea con este estudio, posteriormente se propusieron las células precursoras multipotentes de la piel humana como las responsables del desarrollo de los neurofibromas cutáneos en pacientes con NF1 (Jouhilahti y cols., 2011). Este resultado se basó en la capacidad de diferenciación de las células *NF1*^{+/-} aisladas de neurofibromas, las cuales dieron lugar a distintos tipos celulares presentes en el tumor, como células de Schwann, fibroblastos o células epiteliales. Estas células fueron asociadas con las células madre del folículo piloso, un compartimento en el que se había detectado el desarrollo de micro-neurofibromas (Jouhilahti y cols., 2011).

Recientemente, se ha generado la primera línea transgénica de ratón que recapitula el desarrollo patológico completo de la NF1. Este modelo se basa en la inactivación del gen *Nf1* en las denominadas *boundary cap* (BC), una población de precursoras embrionarias transitorias que dan lugar a varias poblaciones gliales del SNP, incluyendo las células de Schwann asociadas al plexo nervioso cutáneo. Así, la ablación de *Nf1* en las células BC (trazadas por expresión de *Prss56*) provoca la formación de múltiples tumores difusos en el plexo nervioso profundo (plexiformes) y en la piel (cutáneos), con un aspecto similar al observado en los tumores de pacientes (Radomska y Topilko, 2017).

Por otro lado, teniendo en cuenta que las células de Schwann *NF1*^{-/-} predominan en los neurofibromas cutáneos de pacientes con NF1, y de acuerdo con el origen propuesto para este tipo de tumor, se piensa que la inducción de neurofibromas cutáneos requiere de mecanismos y/o factores adicionales que provoquen la desestabilización de las células de Schwann y la consecuente formación del tumor. Por eso, son necesarios experimentos que confirmen el origen de los neurofibromas cutáneos y definan los mecanismos implicados en la formación de estos tumores, ya que la aparición de estos tumores está determinada por múltiples factores, incluyendo factores

Introducción

genéticos, como la haploinsuficiencia de las células del microambiente, y factores no genéticos, como los cambios hormonales o el trauma local (Atit y cols., 1999a; Le y cols., 2009; Ribeiro y cols., 2013; Riccardi, 2000; Tucker y Friedman, 2002; Yang y cols., 2008; Zhu y cols., 2002).

MATERIAL Y MÉTODOS
GENERAL

En este apartado, se describe el material y los métodos utilizados de forma común en los dos estudios llevados a cabo en la Tesis doctoral. La metodología específica correspondiente a cada uno de los estudios, se detalla en el apartado de material y métodos de cada capítulo.

1. REACTIVOS

Tabla 6. Reactivos		
Reactivo	Referencia	Casa Comercial
2-metilbutano (isopentano) Uvasol®	106.056	Milipore
Ácido hialurónico de alto peso molecular	GRL002	R&D
Agua DEPC (DEPC-treated water)	AM9915G	Ambion
Albúmina sérica bovina (Albumine from Bovine Serum, BSA)	A9418	Sigma
Azida sódica	S2002	Sigma
Clorhexidina Bohmclorh® , solución alcohólica al 0,5%	731250	Bohm Lab
Colagenasa tipo XI (Collagenase type XI from <i>Clostridium histolyticum</i>)	C9407	Sigma
Dimetil Sulfóxido (DiMethyl SulfOxide, DMSO)	D2650	Sigma
Dispasa (Dispase II)	D4693	Sigma
DMEM alto en glucosa (Dulbecco's Modified Eagles medium-high glucose)	D6546	Sigma
Extracto de membrana basal, Cultrex® (Basement membrane extract without phenol red)	343200501	R&D
F12 (Ham's F12 Nutrient Mix)	N4888	Sigma
Factor de crecimiento epidérmico recombinante de rata (rat recombinant Epidermal Growth Factor, rrEGF)	3214-EG	R&D
Factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (human recombinant Epidermal Growth Factor, EGF)	GF-080-8	Austral
Factor de crecimiento fibroblástico básico recombinante de rata (rat recombinant basic Fibroblast Growth Factor, rrFGF)	3339-FB	R&D
Factor de crecimiento fibroblástico básico recombinante humano (human recombinant basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)	PHG0023	Gibco
Factor de crecimiento transformante recombinante humano (human recombinant Transforming Growth Factor- β 3, TGF β 3)	PHG9305	Gibco
Factor neurotrófico derivado de cerebro recombinante humano (human recombinant Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF)	450-02	Peprtech
Fluoro-Gel® , medio de montaje (Fluoro-Gel Mounting Medium)	17985-10	EMS
Forskolina	F6886	Sigma
Fungizone™ antimicótico (Amphotericin B)	15290-018	Gibco
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	14175	Gibco
Heregulinaβ1	100-03	Peprtech
Hidróxido de amonio	320.145	Sigma
High Capacity RNA to cDNA kit	4387406	Applied Biosystems

Material y métodos general

Hixtofix® , formol al	256462	PanReac
Hoescht 33258 (<i>Bisbenzimidide</i>)	861405	Sigma
Isoflurano Forane® , anestesia inhalatoria		Baxter
L-glutamina 200 mM (L-glutamine 200 mM)	G7513	Sigma
Liberasa (<i>Liberasa Dh Research Grade</i>)	5401089001	Roche
Metilcelulosa (<i>Methylcelullose Stock Solution 3%</i>)	HSC-001	R&D
miRNeasy micro kit	217084	Qiagen
miRNeasy mini kit	217004	Qiagen
Netrina-4 recombinante humana (<i>recombinant human Netrin-4</i>)	1132-N4	R&D
Netrina-G1a recombinante de ratón (<i>recombinant mouse Netrin-G1a</i>)	1166-NG	R&D
Neurobasal™-A	10888-022	Gibco
OCT™ compuesto (<i>Optimal cutting temperature compound</i>)	4583	Tissue-Tek®
Paraformaldehido (PFA) al 16%	15710-S	EMS
Penicilina/estreptomicina 100X (<i>Penicillin/Streptomycin solution 100X, P/S</i>)	P0781	Sigma
RNA cell protect®	76526	Qiagen
RNA Later®	R0901	Sigma
Rnase ZAP®	R2020	Sigma
RNeasy plus micro kit	74034	Qiagen
Sacarosa (D(+)-Sucrose)	1.316.211.211	Panreac
Solución de buffer Tris-EDTA	93283	Sigma
Suero bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum, FBS</i>)	F7524	Sigma
Suero bovino fetal (FBS)	DE14-801F	Lonza
Suero bovino fetal (FBS)	302020	ATCC
Suplemento B27 (<i>B27 Supplement</i>) (50x)	17504-044	Gibco
Suplemento N2 (<i>N2 Supplement</i>) (100X)	17502-048	Gibco
SYBR® green Master Mix	4309155	Applied Biosystems
Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-Buffered Saline, PBS</i>) pH7.2 (10X)	44952	Palex
Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-Buffered Saline, PBS</i>) pH7.2 (1X)	20012	Gibco
Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-Buffered Saline, PBS</i>) pH7.4 (1X)	10010-015	Gibco
TaqMan® Master Mix	4369514	Applied Biosystems
TaqMan® PreAmp Master Mix	4391128	Applied Biosystems
Tripan blue 0,4%	T8154	Sigma
Tripsina-EDTA 0,25% (<i>Trypsin-EDTA solution 0,25%</i>)	T4049	Sigma
Triton® X-100	T8787	Sigma
Tween®-20	P2287	Sigma
Vectashield® , medio de montaje	H-1000	Vector laboratories

2. FUNGIBLE

Tabla 7. Material		
Material	Referencia	Casa comercial
Bisturí esteril n°23	510	Swann-Morton
Bolas de acero inoxidable, para Tissue Lyser	69989	Qiagen
Crio-viales (<i>CryoTube™ vials</i>) Nunc™	368632	Thermo Scientific®
Cubreobjetos circulares de vidrio 12 mm	11708701	Menzel®-Gläser
Cubreobjetos rectangulares de vidrio 21 x 26 mm	15707582	Menzel®-Gläser
Cubreobjetos rectangulares de vidrio 24 x 50 mm	11911998	Menzel®-Gläser
Filtro de 0,22 µm	SLGP0033RB	Milipore
Filtros 0,22 µm para botellas (<i>Bottle top filter 0,22 µm</i>)	431118	Corning
Frasco de 175 cm Falcon®	353112	BD
Frasco de 25 cm	430639	Corning®
Frasco de 75 cm	430641	Corning®
Malla celular de 40 µm (<i>40 µm Cell strainer</i>)	352340	BD
Malla celular de 70 µm (<i>70 µm Cell strainer</i>)	352350	BD
Molde para congelación de plástico	4566	Tissue-Tek®
Placas p100 sin tratar Falcon®	351029	BD
Placas p35 sin tratar Falcon®	351008	BD
Placas p60 sin tratar Falcon®	351007	BD
Placas sin tratar de 12 pocillos Falcon®	351143	BD
Placas sin tratar de 24 pocillos Falcon®	351147	BD
Placas sin tratar de 48 pocillos Falcon®	351178	BD
Placas sin tratar de 6 pocillos Falcon®	351146	BD
Placas sin tratar de 96 pocillos Falcon®	351172	BD
Placas tratadas de 4 pocillos Nunc™	176740	Nunc™
Portaobjetos de microscopia	631-1553	Thermo Scientific®
Portaobjetos de microscopia Superfrost®	10417002	Menzel®-Gläser
Sacabocados de 2mm (<i>Biopsy punch</i>)	110496	Swann-Morton
Shandon Coverplate™	72-110-017	Thermo Scientific®
Shandon Sequenza™	73-310-017	Thermo Scientific®
Tapones para tubos de poliestireno Falcon® 5ml	352032	BD
Tubos esteriles de poliestireno Falcon® 5 ml	352052	BD
Tubos esteriles de polipropileno Falcon® 5 ml	352063	BD
Tubos esteriles 15 ml Falcon®	352196	BD
Tubos esteriles 50 ml Falcon®	352074	BD
Tubos libres de Rnasas <i>Safe-Lock</i> de Biopur® 1,5 ml	22363204	Eppendorf®

3. ANTICUERPOS

Tabla 8. Anticuerpos primarios							
Antígeno	Clon	Isotipo	Especie origen	Especie ¹	Casa comercial	Referencia	Dilución ²
Cadherina 19	Policlonal	IgG	Conejo	H, Ra, R	Santa Cruz	(sc-84771)	1/25
CD31 (PECAM-1)	MEC 13.3	IgG2a,k	Rata	R	BD	550274	1/100
DsRed, <i>Discosoma sp. Red fluorescent protein</i>	Policlonal	IgG	Conejo	-	Clontech	632496	1/100
GFAP, <i>Glial fibrillary acidic protein</i>	Policlonal	IgG	Conejo	H	Dako	Z0334	1/500
GFP, <i>Green Fluorescence protein</i>	Policlonal	IgG	Cabra	-	Abcam	Ab6673	1/500
GFP, <i>Green Fluorescence protein</i>	Policlonal	IgY	Pollo	-	Abcam	ab13970	1/500
Integrinα1	A9	IgG2a	Ratón	H, Ra, R	Santa cruz	sc-271034	1/100
MBP, <i>Myelin binding protein</i>	Policlonal	IgG	Conejo	Ra, R	Abcam	Ab40390	1/500
Myh2, <i>Myosin heavy chain all fibers</i>	Monoclonal	IgG2a	Ratón	H, Ra, R	DSHB	A4.1025-c	1/200
Nestina	Policlonal	IgG	Conejo	R	Abcam	Ab24692	1/500
Nestina	Policlonal	IgY	Pollo	Ra, R	Aves labs	NES697985	1/500
NF200, Neurofilamento 200	Policlonal	IgG	Conejo	H, Ra, R	Sigma	N4142	1/500
p75NTR, Receptor neurotrófico p75	Policlonal	IgG	Conejo	H, Ra, R	Promega	G3231	1/500
PDGFRβ, <i>Platelet derived growth factor receptor β</i>	28B1	IgG	Conejo	H, Ra, R	Cell Signaling	3169	1/50
PGP9,5, <i>Protein gene product 9.5</i>	Policlonal	IgG	Conejo	H, Ra, R	Serotec	7863-0504	1/500
S100	Policlonal	IgG	Conejo	H, Ra, R	Dako	z0311	1/400
SOX10	Policlonal	IgG	Cabra	H, Ra, R	Santa cruz	sc17342	1/100
SOX10	20B7	IgG1	Rata	H, Ra	R&D	MAB2864	1/75
SOX2	Policlonal	IgG	Conejo	H, Ra, R	Abcam	ab97959	1/400
TH, Tirosina hidroxilasa	Policlonal	IgG1	Oveja	Ra, R	Milipore	AB1542	1/500
βIII tubulina	Policlonal	IgG	Conejo	H, Ra, R	Abcam	ab18207	1/500
αSMA, <i>Alpha smooth muscle actin</i>	14A	IgG2a	Ratón	H, R	Sigma	A2547	1/500

¹ se indica la especificidad hacia humano (H), rata (Ra) y ratón (R).

² dilución estándar a la que se utilizó cada anticuerpo

Tabla 9. Anticuerpos secundarios							
Nombre	Fluoroforo	Clon	Isotipo	Origen	Especie¹	Casa Comercial	Referencia
Alexa Fluor 488 Cabra anti-Conejo IgG (H+L)	Alexa 488	policlonal	IgG	Cabra	Conejo	Molecular probes	A11034
Alexa Fluor 488 Cabra anti-Rata IgG (H+L)	Alexa 488	policlonal	IgG	Cabra	Rata	Molecular probes	A11006
Alexa Fluor 488 Cabra anti-Rata IgM (u chain)	Alexa 488	policlonal	IgM	Cabra	Rata	Molecular probes	A21212
Alexa Fluor 488 Cabra anti-Ratón IgG (H+L)	Alexa 488	policlonal	IgG	Cabra	Ratón	Molecular probes	A11001
Alexa Fluor 488 Cabra anti-Ratón IgM (uchain)	Alexa 488	policlonal	IgM	Cabra	Ratón	Molecular probes	A21042
Alexa Fluor 488 Conejo anti-Cabra IgG (H+L)	Alexa 488	policlonal	IgG	Conejo	Cabra	Molecular probes	A11078
Alexa Fluor 488 Mono anti-Cabra IgG (H+L)	Alexa 488	policlonal	IgG	Mono	Cabra	Molecular probes	A11055
Alexa Fluor 488 Mono anti-Oveja IgG (H+L)	Alexa 488	policlonal	IgG	Mono	Oveja	Molecular probes	A11015
Alexa Fluor 488 Mono anti-Ratón IgG (H+L)	Alexa 488	policlonal	IgG	Mono	Ratón	Molecular probes	A21202
Alexa Fluor 555 Cabra anti-Conejo IgG (H+L)	Alexa 555	policlonal	IgG	Cabra	Conejo	Molecular probes	A21428
Alexa Fluor 555 Cabra anti-Guinea pig IgG (H+L)	Alexa 555	policlonal	IgG	Cabra	Guinea pig	Molecular probes	A21435
Alexa Fluor 555 Cabra anti-Rata IgG (H+L)	Alexa 555	policlonal	IgG	Cabra	Rata	Molecular probes	A21434
Alexa Fluor 555 Cabra anti-Ratón IgG (H+L)	Alexa 555	policlonal	IgG	Cabra	Ratón	Molecular probes	A21422
Alexa Fluor 555 Conejo anti-Ratón IgG (H+L)	Alexa 555	policlonal	IgG	Conejo	Ratón	Molecular probes	a21427
Alexa fluor 555 Mono anti Conejo igG (H+L)	Alexa 555	policlonal	IgG	Mono	Conejo	Molecular probes	A31572
Alexa Fluor 555 Mono anti Ratón IgG H+L	Alexa 555	policlonal	IgG	Mono	Ratón	Molecular Probes	A31570
Alexa Fluor 555 Mono anti-Cabra IgG (H+L)	Alexa 555	policlonal	IgG	Mono	Cabra	Molecular probes	A21432
Cabra anti-Chicken IgY H&L (DyLightR 488)	DyLight488	policlonal	IgG	Cabra	---	Abcam	ab96947
Conejo anti chicken IgY dylight 488	Dylight488	policlonal	IgY	Conejo	chicken	Abcam	ab96955

¹ se indica la especificidad

4. MEDIOS DE CULTIVO

4.1 Medio para el mantenimiento de la línea celular estable 804-G

El medio para el crecimiento en cultivo de la línea celular estable 804-G, se compone de DMEM (alto en glucosa) suplementado con 1% de L-glutamina 200 mM, 1% de penicilina/estreptomicina y 10% de FBS (Lonza).

4.2 Medio para el crecimiento de cultivos primarios

Se aislaron células de piel a partir de muestras clínicas humanas y líneas transgénicas de ratón. Las células se crecieron en cultivos en suspensión y se expandieron en cultivos en adhesión antes de diferenciarlas a linajes específicos. A continuación, se detallan los medios utilizados para el aislamiento y el crecimiento de las células derivadas de la piel;

4.2.1 Medio de disociación (MD)

El medio para el aislamiento de células a partir de piel, se compone de DMEM alto en glucosa y F12 (mezcladas en proporción 3:1) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina 200 mM.

4.2.2 Medio de proliferación (MP)

El medio para el crecimiento en suspensión de células derivadas de la piel, se compone de DMEM alto en glucosa y F12 (mezcladas en proporción 3:1) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1 µg/ml de Fungizone®, 1% de L-glutamina 200mM, 2% de Suplemento B27 (50X), 40 ng/ml de bFGF, 20 ng/ml de EGF y 0.8% de Metilcelulosa.

4.2.3 Medio Basal (MB)

El medio para el crecimiento en adhesión de células derivadas de la piel, se compone de DMEM alto en glucosa y F12 (mezcladas en proporción 3:1) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina 200mM, 2% de Suplemento B27 (50X) y 1% de FBS (Lonza).

4.2.4 Medio de Joannides (MJ)

El medio para el crecimiento en adhesión de células derivadas de la piel, se compone de DMEM alto en glucosa y F12 (mezcladas en proporción 3:1) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina 200 mM, 2% de Suplemento B27 (50X) y 20% de FBS (Lonza) (Joannides y cols., 2004).

4.3 Medios para la diferenciación de cultivos primarios

Las células de piel aisladas de líneas transgénicas de ratón se diferenciaron a linajes neurales (glia y neuronas) y mesodérmicos. A continuación, se detalla la composición de los medios de diferenciación utilizados.

4.3.1 Medio de diferenciación glial (Medio de Schwann, MS)

El medio de diferenciación glial se compone de DMEM alto en glucosa y F12 (mezcladas en proporción 3:1) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina 200mM, 1% de Suplemento N2 (100X), 5 μ M de Forskolina y 40 ng/ml de Heregulina β 1.

4.3.2 Medio de diferenciación neuronal (MN)

El medio de diferenciación neuronal está compuesto por Neurobasal™ A suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina 200 mM, 2% de Suplemento B27 (100X), 1% de Suplemento N2 (50X), 10% de FBS (ATCC), 50 ng/ml de rrNGF β y 50 ng/ml de rhBDNF.

4.3.3 Medio de diferenciación mesodérmica (MM)

El medio de diferenciación mesodérmica se compone de medio Joannides suplementado con 10 ng/ml de TGF β 3.

5. LÍNEA CELULAR 804-G

La línea 804-G (CVCL_J122), es una línea celular epitelial derivada de un carcinoma escamoso de vejiga de rata (*Rattus norvegicus*) que fue establecida por el grupo de Ryoischi Oyasu (Izumi y cols., 1981). Esta línea celular se caracteriza por secretar una matriz extracelular (MEC) rica en laminina tipo V en cultivos *in vitro* sobre sustratos de plástico o cristal y favorecer la formación de hemidesmosomas maduros en las células sembradas sobre ella (Langhofer y cols., 1993). En los estudios llevados a cabo en esta Tesis, la matriz secretada por las células 804-G se ha empleado en sustitución a la laminina comercial, en ensayos de diferenciación *in vitro* y como sustrato de adhesión de esferas en tinciones por inmunofluorescencia.

5.1 Mantenimiento en cultivo de la línea 804-G

El mantenimiento de los cultivos celulares se hizo bajo estrictas condiciones de esterilidad, haciendo uso de campanas de flujo laminar y utilizando material debidamente esterilizado. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura constante de 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y una humedad relativa del 90%. Se utilizaron incubadoras *Thermo Electron Corporation* dotados con filtros HEPA *Class 100*. La línea celular 804-G se mantuvo en cultivos en adhesión sobre frascos de 75 cm² y

Material y métodos general

175 cm², en el medio de mantenimiento descrito en el apartado 1.1. Los cultivos se pasaron de forma rutinaria tres veces por semana, al alcanzar una confluencia del 80-100%. Para ello, las células se lavaron con PBS y se incubaron 5 minutos con tripsina-EDTA al 0,25%. La actividad enzimática se inactivó añadiendo 3-5 veces el volumen de medio 804-G y la suspensión celular se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Las células se sembraron diluidas 8 o 10 veces en medio 804-G.

5.2 Preparación de matriz rica en laminina a partir de cultivos de la línea 804-G

Para la preparación de matriz rica en laminina, las células de la línea 804-G se sembraron sobre cubres de 12 mm y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 80-100%. Los cultivos se levantaron por medio de choque osmótico, incubándolas durante 10 min con hidróxido de amonio (NH₄OH) 20 mM. Se realizaron tres lavados consecutivos de 10 min en agua miliQ® (agua ultra pura tipo 1) para retirar los restos celulares y limpiar la matriz depositada por las células. Las matrices se almacenaron en PBS a 4°C cubriendo la placa con film de plástico para prevenir la evaporación de líquido.

6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

6.1 Metodología para la extracción de ARN

El ARN es un material biológico delicado, por ser susceptible a ser degradado por las ribonucleasas (RNasas) presentes en el entorno. Por eso, durante la extracción y posterior manipulación de las muestras de ARN, se utilizó material libre de RNasas y se trataron las superficies de trabajo con productos para la eliminación de RNasas (*RNase Zap®*). Durante la realización de la Tesis se han utilizado tres kits de la casa comercial Qiagen® para la extracción de ARN de las diferentes muestras; miRNeasy® mini kit, miRNeasy® micro kit y RNeasy® Plus micro kit. En la tabla 1.5 se resumen las características principales de los kits utilizados, así como el tipo de análisis realizado con cada una de las muestras:

Kit	Tamaño del ARN	Muestra ¹		Capacidad columna	Vol ²	Muestras	Aplicación ³
		Células	Tejido				
miRNeasy® micro kit	>18 nucleótidos	10 ⁶	5 mg	45 µg	14 µl	Células sorteadas	RT-qPCR
miRNeasy® mini kit	>18 nucleótidos	10 ⁷	50 mg	100 µg	30 µl	Tejido	RT-qPCR
RNeasy® Plus micro kit	>200 nucleótidos	10 ⁵	5 mg	45 µg	14 µl	Células sorteadas	Microarrays expresión

¹ cantidad máxima de muestra admitida en el kit.

² volumen de elución.

³ experimento al que se ha destinado el ARN extraído. RT-qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real).

6.1.1 miRNeasy® micro y miRNeasy® mini kit

Los kits de extracción miRNeasy® micro kit y miRNeasy® mini kit, están diseñados para la extracción de ARN total, incluyendo micro ARNs (miARN) y otras moléculas pequeñas de ARN de longitud superior a 18 nucleótidos. Ambos kits combinan una fase de lisis con una solución de fenol y tiocianato de guanidina (Qiazol®), para lisar la muestra y eliminar parte del ADN y proteínas celulares, a la vez que se inhibe la actividad de la RNasas. El procedimiento incluye una fase de purificación a través de membranas de silicato, donde el ARN queda retenido y se eliminan eficientemente los restos de fenol y otros contaminantes. Los kits se diferencian en la cantidad de muestra de la cual parten (limitada por la capacidad máxima de unión de las columnas) y el volumen mínimo de agua en el que se aconseja eluir el ARN extraído. Por eso, las muestras de menor tamaño, como las fracciones celulares separadas por citometría de flujo, fueron extraídas con el kit miRNeasy® micro kit y las muestras de tejido con el kit miRNeasy® mini kit.

6.1.2 RNeasy® Plus micro kit

El kit de extracción de RNeasy plus micro kit está diseñado para la extracción de ARN total, de longitud superior a 200 nucleótidos. El procedimiento permite enriquecer la muestra en ARN mensajero (ARNm), ya que se excluyen selectivamente las moléculas de ARN de menor tamaño, como el ARN ribosómico (ARNr) o los miARNs, que constituyen el 15-20% del ARN total. El kit combina una fase de lisis con una solución de isotiocianato de guanidina (tampón RLT), que permite eliminar parte del ADN y proteínas celulares, además de inhibir la actividad de la RNasas. El procedimiento incluye dos fases de purificación; la primera se realiza pasando la muestra a través de columnas que unen selectivamente el ADN genómico y la segunda a través de membranas de silicato, donde el ARN queda retenido y se limpia de posibles contaminantes. El kit está diseñado para extraer ARN a partir de poca cantidad de muestra y eliminar eficientemente el ADN genómico presente en la muestra. Este kit fue utilizado para la extracción de ARN de muestras destinadas al análisis de expresión génica con Chips o microarrays de ADN por extraer moléculas de ARN de mayor tamaño y favorecer la presencia de ARNm en las muestras.

6.2 Determinación de la concentración y la integridad del ARN

Para determinar la concentración de ARN extraído en cada muestra, se utilizaron técnicas de espectrofotometría (NanoDrop® 1000) y fluorometría (Qubit RNA HS Assay kit). La calidad y/o integridad de las muestras se determinó utilizando el kit RNA 6000 Nano de Agilent.

6.2.1 NanoDrop® (ND-1000)

El NanoDrop® es un espectrofotómetro de amplio espectro (220-750nm) utilizado para medir la concentración de ácidos nucleicos y proteínas. Tras determinar la absorbancia en una muestra en

Material y métodos general

valores de densidad óptica (DO), el software ND-1000 calcula automáticamente la concentración de diferentes tipos de moléculas. Las ratios calculadas a partir de las absorbancias sirven para determinar la pureza de las muestras;

260/280: La ratio de la absorbancia a 260nm y 280nm se utiliza para determinar la pureza de los ácidos nucleicos. La ratio $\sim 1,8$ (o superior) se acepta generalmente para definir como “puras” las muestras de ADN y la ratio de $\sim 2,0$ (o superior) para las de ARN. Valores inferiores a los definidos son indicativos de presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes.

260/230: La ratio de la absorbancia a 260nm y 230nm es una segunda medición de la pureza de los ácidos nucleicos. El valor óptimo de la ratio 260/230 oscila entre 1,8 y 2,2, y valores inferiores sugieren la presencia de contaminantes derivados de la purificación.

6.2.2 Qubit® RNA HS Assay kit

El Qubit® RNA HS Assay kit permite cuantificar la cantidad de ARN de forma exacta y selectiva. Utiliza un colorante fluorescente que se une específicamente al ARN y emite señal fluorescente al contacto con la molécula diana. La señal es detectada por un fluorímetro Qubit®, que utiliza valores de fluorescencia de muestras estándar (con cantidad de ARN conocido) para calcular la cantidad de ARN presente en la muestra. Este método permite discriminar moléculas de ADN y proteínas que puedan contaminar la muestra de ARN. El kit está diseñado para medir bajas concentraciones de ARN, de entre 250 pg/ μ l y 100 ng/ μ l. El Qubit® RNA HS Assay kit se utilizó para determinar la concentración de ARN en muestras destinadas al análisis de expresión con microarrays de ADN; GeneChip™ Mouse Genome 430 2.0 Array.

6.2.3 RNA 6000 Nano kit

El RNA 6000 Nano kit mide la cantidad y la integridad de una muestra de ARN por electroforesis. Se compone de un pequeño dispositivo con varios canales que se llenan con un gel que contiene un compuesto fluorescente para marcar el ARN. La electroforesis, para la separación de las moléculas de ARN en base a su tamaño, y la detección de las bandas fluorescentes, se realizan en el Bioanalyzer 2100 de Agilent. Para determinar la integridad de la muestra, el sistema identifica las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 18S y 28S y aplica un algoritmo para asignar a la muestra un valor arbitrario de integridad, conocido como RIN (del inglés, *RNA integrity number*). El valor del RIN va del 1 al 10, siendo el 10 el valor que indica una integridad máxima. El RNA 6000 Nano kit se utilizó para determinar la calidad de las muestras de ARN destinadas al análisis de expresión con microarrays de ADN; GeneChip™ Mouse Genome 430 2.0 Array.

6.3 Retrotranscripción de muestras de ARN

En biología molecular, la retrotranscripción (RT-PCR) es una técnica que se lleva a cabo utilizando una enzima retro-transcriptasa para generar una cadena de ADN complementario (ADNc) a partir de una cadena de ARN simple. La conversión de ARN en ADNc es necesaria para llevar a cabo ensayos de expresión génica por PCR (del inglés, *polimerase chain reaction*). En la retrotranscripción del ARN son necesarios oligonucleótidos que sirvan de molde para que la enzima retro-transcriptasa genere la cadena completaría de ADN. Estos oligonucleótidos pueden ser secuencias diseñadas al azar (en inglés, *random primers*) o secuencias oligo-(d)T complementarias a la cola de poli-A presente en los ARN mensajeros. La retro-transcripción se realizó utilizando el kit High Capacity RNA to cDNA de Applied Biosystems. Este kit se basa en el uso de cebadores con secuencias generadas al azar que sirven como molde para iniciar la síntesis del ADNc. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante; Se descongelaron los compuestos del kit y las muestras de ARN en hielo y se preparó la mezcla de la reacción como se indica en la **Tabla 11**.

Compuesto	Volumen (μ l)/Reacción	
	RT+	RT-
Tampón de RT (2X)	10	10
Retro-transcriptasa (20X)	1	-
Muestra de ARN	1-9	1-9
Agua libre de RNasas	hasta 20	hasta 20
Volumen total	20	20

Para correr la reacción, se utilizaron tubos de PCR libres de RNasas y se incluyeron condiciones sin retro-transcriptasa como control negativo (RT-). La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un termo-ciclador Thermal-Cycler C1000 de Bio-Rad, aplicando las condiciones de tiempo y temperatura que se indican en la **Tabla 12**. Las muestras de ADNc sintetizado se almacenaron a -20°C .

Programa	Extensión	Desnaturalización
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	37	95
Tiempo (minutos)	60	5

6.4 Pre-amplificación de muestras de ADNc

La pre-amplificación es una reacción de PCR que permite amplificar selectivamente fragmentos de ADNc que se encuentran en pequeña cantidad y así poder analizar su expresión por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR, por sus siglas en inglés). La preamplificación del ADNc se llevó a cabo utilizando el TaqMan® PreAmp Master Mix de Applied Biosystems. Esta tecnología está diseñada para utilizarse en combinación a ensayos de expresión génica por RT-qPCR con sondas

Material y métodos general

TaqMan®. Para realizar la pre-amplificación se siguieron las instrucciones del fabricante; Se descongelaron los componentes del kit y las muestras de ADNc en hielo y se preparó la mezcla para la reacción tal y como se indica en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Mezcla de compuestos para la reacción de preamplificación	
Compuesto	Volumen (µl) /Reacción
Taqman PreAmp Master Mix	25
Pooled assay mix (0,2X)	12,5
Muestra de ADNc	12,5
Volumen total	50

El “*pooled assay mix*”, se preparó diluyendo 1 en 100 las sondas TaqMan® en tampón TE 1X. La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termo-ciclador Thermal-Cycler C1000 de Bio-Rad, aplicando las siguientes condiciones de tiempo y temperatura (**Tabla 14**). Las muestras se recogieron en hielo y se diluyeron 1 en 20 en tampón TE 1X, de acuerdo al número de ciclos de amplificación realizados (14 ciclos). Las muestras de ADNc pre-amplificadas se almacenaron a -20°C.

Tabla 14. Programa de termociclado para la reacción de preamplificación			
Programa	Activación de la enzima	Desnaturalización	Extensión
Temperatura (°C)	95	95	60
Tiempo	10 min	15 seg	4 min
Ciclos (10-14)			

6.5 Análisis de expresión génica por RT-qPCR

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), es una técnica que permite amplificar muestras de ADN y cuantificar de forma simultánea el producto amplificado. La reacción de RT-qPCR, al igual que la PCR convencional, consta de al menos un par de cebadores, desoxirribonucleótidos (dNTs), una enzima ADN polimerasa termoestable y una cadena molde de ADN, todos ellos diluidos en una solución tamponada. En la RT-qPCR, se incluye un elemento para marcar fluorescentemente el ADN y se utilizan termo-cicladores especializados, que contienen láseres para excitar las moléculas fluorescentes y sensores para la detección de la señal emitida. La detección del producto de PCR se realiza comúnmente mediante moléculas fluorescentes que se intercalan de forma no-específica en doble cadena de ADN o mediante sondas marcadas fluorescentemente que se unen a la región específica del ADN que se quiere amplificar. La señal fluorescente generada en cada PCR, se recoge y se procesa posteriormente como señal analógica. En cada reacción de RT-qPCR se genera una curva de amplificación, utilizada para determinar la cantidad de producto amplificado (**Figura 24**). En el análisis de datos, el valor C_q, definido como el ciclo en la curva de amplificación cruza la línea umbral, sirve como medida de expresión.

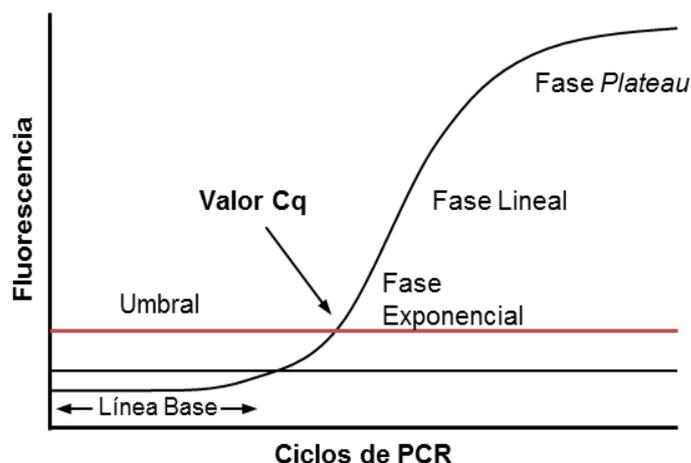


Figura 24. Gráfica de amplificación en la reacción de RT-qPCR. En el eje vertical se representa la cantidad de fluorescencia detectada en el termo-ciclador y en el eje horizontal el número de ciclos de amplificación. La curva de amplificación del producto presenta una fase exponencial, una fase lineal y fase final *Plateau*. La línea base o *baseline*, separa los ciclos iniciales en los que se detecta sólo la fluorescencia basal. El umbral o *Threshold* (marcado con una línea roja), es el punto en el que se produce un cambio de fluorescencia significativo. El corte entre la línea umbral y la curva de amplificación determina el valor *Cq*, utilizado en el análisis de datos para la cuantificar el producto de PCR. El valor *Cq* se obtiene siempre en la fase exponencial.

En el presente trabajo, los ensayos de expresión génica por RT-qPCR se realizaron con las tecnologías SYBR® Green y TaqMan®. Se utilizaron los termo-cicladores LightCycler® 96 de Roche (para placas de 96 pocillos) y 7900 HT Fast Real-time PCR System de Applied Biosystem (para placas de 384 pocillos). A continuación, se detallan los principios teóricos asociadas a cada una de las tecnologías aplicadas, así como el procedimiento llevado a cabo con cada uno de los sistemas.

6.5.1 Tecnología TaqMan®

Esta tecnología se caracteriza por el uso de sondas (en inglés, *probes*) que hibridan de forma específica en la región del ADN que se quiere analizar. Las sondas TaqMan®, incorporan una molécula fluorescente o fluoróforo en su extremo 5' y una molécula extintora (en inglés, *quencher*) en el extremo 3'. Tras la excitación de la molécula fluorescente, los fotones emitidos por el fluoróforo son absorbidos por el extintor mediante el fenómeno conocido como FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*), evitando que se libere señal fluorescente. Durante la reacción de RT-qPCR, la polimerasa amplifica el DNA a la vez que elimina los nucleótidos de la sonda unida a la secuencia diana, mediante su actividad exonucleasa 5'-3'. De este modo el fluoróforo y el extintor quedan libres y al perderse la cercanía necesaria para la absorción de fotones, se genera señal fluorescente (Figura 25).

Material y métodos general

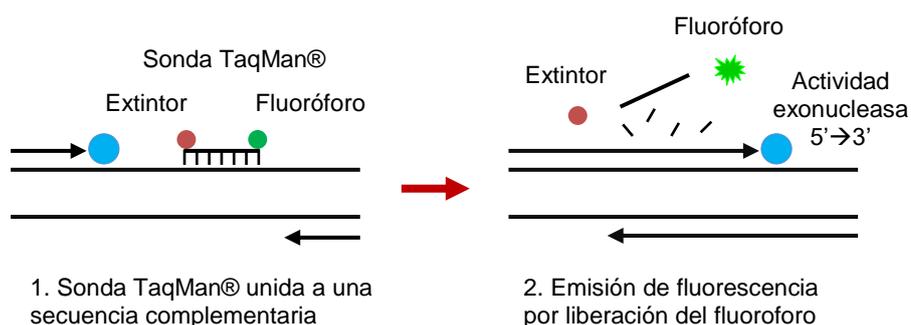


Figura 25. Tecnología Taqman®. (A) La sonda TaqMan® hibrida de forma específica con una región de ADN que será amplificada por un par de oligonucleótidos específicos. (B) A medida que la Taq polimerasa sintetiza la nueva hebra de ADN en sentido 3'-5', la actividad exonucleasa 5'-3' de esta misma enzima degrada la sonda TaqMan®. La degradación de la sonda permite liberar el fluoróforo y alejarlo del extintor, permitiendo la emisión de fluorescencia. La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo liberado y, por lo tanto, a la cantidad de ADN de interés presente en el producto de PCR.

Los ensayos de RT-qPCR con TaqMan® se realizaron con muestras de ADNc pre-amplificadas (ver apartado 3.6.4). Las muestras de ADNc y las sondas se descongelaron en hielo y la mezcla para la reacción se preparó como se indica en la **Tabla 15**.

Compuesto	Volumen (µl)/Reacción
TaqMan® Master Mix	5
Sonda TaqMan®	0,5
Muestra de ADNc	2,5
Agua libre de Rnasas	2
Volumen total	10

En la reacción de RT-qPCR se siguieron las condiciones de tiempo y temperatura indicadas en la **Tabla 16**.

Programa	Activación de la enzima	Desnaturalización	Extensión
Temperatura (°C)	95	95	60
Tiempo (Segundos)	600	15	60
Ciclos (40)			

6.5.2 Tecnología SYBR® Green

La tecnología SYBR® Green utiliza moléculas fluorescentes que se unen de forma específica a la doble cadena de ADN. A medida que una región de ADN es amplificada, las moléculas de SYBR® Green se intercalan entre la cadena molde y la cadena complementaria recién sintetizada, y emiten fluorescencia. Así, en cada ciclo de amplificación, la señal fluorescente aumenta en proporción al número de copias generadas (**Figura 26**).

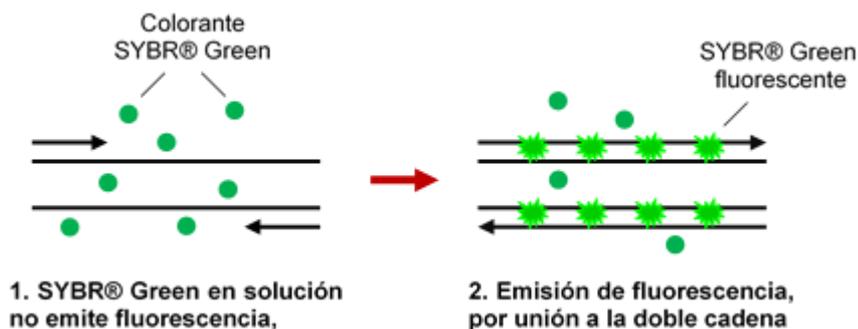


Figura 26. Tecnología SYBR® Green. Las moléculas de SYBR® Green en solución no emiten señal fluorescente. En la reacción de RT-qPCR, la polimerasa amplifica regiones específicas del ADNc y genera una doble cadena donde las moléculas de SYBR® Green se integran y emiten fluorescencia.

SYBR® Green se une de forma no específica a todas las secuencias de doble cadena, de modo que cualquier producto de PCR compuesto por dos cadenas de ADN complementarias, es susceptible de marcarse fluorescentemente. Contaminantes como el ADN genómico (derivados de la extracción de ARN) o los dímeros formados por los cebadores, generan señal fluorescente inespecífica. Por eso, los ensayos de expresión génica con SYBR® Green, requieren de un buen diseño de cebadores (específicos de secuencia y no complementarios entre sí), y de la eliminación completa del ADN genómico.

La eficiencia (E) de cada par de cebadores se determinó realizando una curva de calibrado. Para ello se corrió una reacción de RT-qPCR a partir de diluciones seriadas de una muestra de referencia. Los valores C_q obtenidos en la amplificación de las muestras diluidas y la cantidad de DNA correspondiente a cada una de las muestras, se representaron en una gráfica de dispersión con puntos, a partir de la cual se generó una recta de regresión que sirvió para el cálculo de la eficiencia. La eficiencia se calculó a partir de la pendiente de la ecuación de la recta; $E = 10^{-1/Pendiente}$. En los ensayos de RT-qPCR con SYBR® Green, las muestras de ADNc y la mezcla de los cebadores directo y reverso se descongelaron en hielo y la mezcla para la reacción se preparó como se indica en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Mezcla de compuestos para la reacción de RT-qPCR con SYBR® Green	
Compuesto	Volumen (µl)/Reacción
SYBR® Green Master Mix	6
Mezcla de cebadores 5 pmol/ml	1
Muestra de ADNc	5
Volumen total	12

La reacción de RT-qPCR se llevó a cabo siguiendo las siguientes condiciones de tiempo y temperatura (**Tabla 18**).

Tabla 18. Programa de termociclado para la reacción de RT-qPCR con SYBR® Green

Programa	Incubación	Acti ¹	Separación	Extensión	Separación	Extensión	Separación
Temperatura (°C)	50	95	95	60	95	65	97
Tiempo (Segundos)	120	600	15	60	10	60	1
Ciclos (40)				Ciclo de Melting			

¹ temperatura de activación de la enzima

6.5.3 Cuantificación del producto y análisis de datos

La cuantificación del producto amplificado por RT-qPCR, se realizó en valores relativos. En este caso, se compara el valor Cq del gen objeto de estudio (Cq1) con el valor Cq de uno o varios genes (Cq2) cuya expresión no varíe en las diferentes condiciones del experimento (genes endógenos o *housekeeping genes*). Tras el paso de normalización, el valor ΔCq (Cq1-Cq2) sirve como medida relativa de expresión en comparación a otros valores ΔCq de la misma muestra, o se puede comparar con el valor ΔCq de otras muestras que se usan como referencia ($\Delta\Delta Cq$). Los ensayos de expresión génica por RT-qPCR se analizaron con el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak y Schmittgen, 2001). El valor RQ (del inglés, *relative quantification*) generado de cada análisis, sirvió como medida relativa de expresión. Los ensayos realizados con SYBR® Green, se analizaron con este mismo método, pero se aplicó un método de corrección para normalizar los datos teniendo en cuenta la eficiencia de los cebadores (Pfaffl y cols., 2001).

6.6 Análisis de expresión con chips de expresión o microarrays

El microarray es una plataforma de alto rendimiento que permite analizar miles de genes simultáneamente en una misma muestra, lo que lo convierte en una herramienta muy potente para estudiar ampliamente el patrón de expresión de poblaciones celulares concretas. El microarray consiste en un soporte de vidrio al que se adhieren múltiples sondas (oligonucleótidos) y en el que se añaden muestras previamente procesadas y marcadas. Los oligonucleótidos se sintetizan directamente sobre el soporte mediante la técnica de fotolitografía (Affimetrix), una técnica que se basa en reacciones fotoquímicas. Existen varios tipos de microarray en función de la aplicación, SNP (siglas en inglés, *single nucleotide polymorphism*), citogenética o expresión génica, entre otras. En esta Tesis se han utilizado los microarrays de expresión génica Genechip® Mouse genome 430 2.0 de Affymetrix.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar. El número de réplicas experimentales (n) se indica en cada uno de los experimentos. En los ensayos de expresión génica por RT-qPCR, las media de los valores se obtuvo a partir de los valores RQ correspondientes a cada uno de los ensayos independientes, tal y como se indica en (Livak y Schmittgen, 2001). En los

estudios de diferenciación y análisis de expresión por RT-qPCR, la comparación de las medias de grupos independientes se realizó aplicando el test no-paramétrico de Mann-Whitney. Los valores de significancia estadística aplicados fueron, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,005$ (***). El análisis estadístico se realizó en el programa informático GraphPad Prism versión 5.01.

En el estudio de expresión génica realizado con microarrays la normalización de los datos obtenidos de ficheros.CEL se calculó aplicando el algoritmo RMA (*Robust Multi-array Average*) (Irizarry y cols., 2003). El procesamiento posterior de los datos y la representación de los gráficos se realizaron con funciones internas desarrolladas en Matlab. En el análisis de genes diferencialmente expresados (siglas en inglés, DEG) se seleccionaron los genes con un fold-change superior a 2 ($FC > 2$). El efecto del test múltiple se corrigió controlando la tasa de falsos positivos utilizando la corrección de Benjamini-Hochberg con un nivel de significación de $\alpha = 0,05$.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

En el ratón, las células precursoras dérmicas (SKPs) de la piel facial se originan en la cresta neural y las SKPs de la piel del tronco dorsal se originan en el dermomiótomo (trazadas por la línea *Myf5-Cre^{Sox}*). En el tronco ventral, se asume que las SKPs derivan de la placa lateral del mesodermo, aunque aún no se ha trazado específicamente este linaje celular (Jinno y cols., 2010). Estos resultados plantearon la incógnita de cómo precursores derivados del mesodermo pueden generar progenie neural, que hasta entonces se consideraba que provenía de la cresta neural. Por otro lado, en piel prepuccial humana, nuestro grupo demostró que el potencial neural atribuido a las SKPs humanas procede en realidad de las células de Schwann que residen en la piel, las cuales se reprograman inducidas por la disgregación tisular y/o las condiciones de cultivo, en un mecanismo que es dependiente de los niveles de expresión del factor de transcripción *Sox2* (Etxaniz y cols., 2014).

Así pues, la primera hipótesis de este trabajo fue que las SKPs del tronco del ratón, como sucede en el ser humano, son mezclas celulares complejas en las que la capacidad de diferenciación neural está circunscrita a las células de Schwann reprogramadas, que derivan de la cresta neural, y por tanto que los trazados de linaje realizados por otros grupos podrían haber inducido a error a los investigadores del campo. Así mismo hipotetizamos que en la piel del tronco ventral, la capacidad de diferenciación neural sería dependiente de los niveles de expresión de *Sox2*, tal y como habíamos demostrado previamente que sucede en la piel del tronco dorsal del ratón (Etxaniz y cols., 2014).

Los neurofibromas cutáneos se desarrollan en la edad adulta y a pesar de ser similares a los plexiformes, el origen celular de este tipo de tumor no ha sido aún determinado, habiéndose postulado entre otros las SKPs como célula iniciadora (Gutiérrez-Rivera y cols., 2012). Consecuentemente con lo postulado previamente acerca de las SKPs y la diferenciación neural, nuestra segunda hipótesis de trabajo en esta Tesis fue que células de Schwann *NF1^{-/-}*, habiéndose desdiferenciado en respuesta a estímulos como el daño en los nervios periféricos, podrían ser determinantes en la iniciación de los neurofibromas dérmicos.

Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis doctoral es determinar el origen embrionario de las células con potencial neural obtenidas de la piel ventral del ratón, así como analizar el papel de Sox2 en la capacidad de diferenciación neural de dichas células. Por otro lado, la Tesis pretende estudiar el fenotipo de las células de Schwann asociadas a los neurofibromas cutáneos en la NF1.

Los objetivos específicos que se plantean en esta Tesis son los siguientes:

1. Determinar el origen embrionario de las células con potencial neural aisladas de la dermis ventral a partir líneas transgénicas para el trazado de linaje.
2. Identificar los nichos endógenos de las células con potencial neural en la dermis ventral.
3. Analizar si los niveles de expresión de Sox2 determinan la capacidad de diferenciación neural en cultivos derivados de la dermis ventral.
4. Identificar los nichos endógenos de las células Sox2+ en la dermis ventral.
5. Caracterizar el patrón de expresión de marcadores del linaje de Schwann en neurofibromas cutáneos de pacientes con Neurofibromatosis tipo 1.

CAPÍTULO 1

1. LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE RATÓN

La experimentación con animales se llevó a cabo de acuerdo a las directrices y la aprobación previa del Comité de Bienestar Animal del Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia (IISB), en conformidad con la Directiva Europea 2010/63/UE y el Real Decreto 53/2013.

Se utilizaron diferentes líneas transgénicas de ratón (**Tabla 1.1**), las cuales se mantuvieron en el Animalario del IISB. La instalación del Animalario, contiene dos zonas de estabulación, una de barrera y otra convencional, libre de patógenos específicos mediante estantes (*racks*) ventilados. La comida, el lecho, el agua y las jaulas se esterilizaron previo contacto con los animales, que se mantuvieron en condiciones de alta seguridad biológica, con parámetros sanitarios y ambientales rigurosamente controlados. Los animales se identificaron mediante chips electrónicos que se colocaron bajo la piel en la región inter-escapular después del destete, a las tres o cuatro semanas de edad. Los animales fueron identificados utilizando un lector de chips.

Tabla 1.1. Líneas transgénicas de ratón			
Nombre de la Cepa	Nombre abreviado	Número JAX¹	Ref. Bibliográfica
<i>BAC195AP-Cre</i>	<i>B195AP-Cre</i>	*	<i>Naldaiz y cols., 2016</i>
<i>B6.129S4-Myf5^{3(cre)Sor}/J</i>	<i>Myf5-Cre^{Sor}</i>	7893	<i>Tallquist y cols., 2000</i>
<i>B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos}/J</i>	<i>R26^{EYFP}</i>	6148	<i>Srinivas y cols., 2001</i>
<i>B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm14(CAG-TdTomato)Hze}/J</i>	<i>R26^{TdTomato}</i>	7914	<i>Madisen y cols., 2010</i>
<i>B6;SjL-Tg(Sox10-cre)507McIn/J</i>	<i>Sox10-Cre</i>	13094	<i>Stine y cols., 2009</i>
<i>B6;129S-Sox2^{tm2Hoch}</i>	<i>Sox2^{EGFP}</i>	**	<i>Ellis y cols., 2004</i>

¹ el número de referencia de The Jackson Laboratories (JAX), www.jax.org

* cedido por el Dr. Jaime Carvajal.

** cedido por el Dr. Konrad Hochedlinger.

Se generaron líneas transgénicas constitutivas para realizar estudios de trazado de linaje. Por un lado, las líneas transgénicas con expresión de la recombinasa Cre, *Myf5-Cre^{Sor}*, *Sox10-Cre* y *B195AP-Cre*, se cruzaron con las líneas reporteras *R26^{EYFP}* y *R26^{TdTomato}* (el reportero *R26^{TdTomato}* se cruzó exclusivamente con la línea *Myf5-Cre^{Sor}*). Adicionalmente, la línea doble transgénica *Myf5-Cre^{Sor}/R26^{TdTomato}* se cruzó con *Sox2^{EGFP}* para generar una línea triple transgénica.

2. EXTRACCIÓN, TRANSPORTE Y PROCESADO INICIAL DE MUESTRAS

La extracción de muestras de piel se realizó en salas habilitadas para realizar procedimientos con animales de experimentación. Los animales se anestesiaron con isoflurano antes de sacrificarlos por inhalación de dióxido de carbono. Tras certificar su muerte, los animales se pesaron y se afeitó el pelo, primero con una cuchilla eléctrica, retirando la mayor parte del pelaje, y luego con una cuchilla desechable para apurar bien la superficie de piel a extraer. La piel se desinfectó con gasas empapadas en Clorhexidina al 0.5% y se extrajo con ayuda de pinzas y tijeras estériles, separando con cuidado la piel y el tejido graso subyacente. Las biopsias de piel se recogieron y transportaron de acuerdo al protocolo del experimento al que iban destinadas:

- El tejido destinado al análisis histológico, se troceó en pequeños trozos de 0,5 cm² y se fijó en Histofix® a 4°C hasta el día siguiente. Los fragmentos se lavaron varias veces con PBS (*Phosphate Buffered Saline*), se incubaron a 4°C en un gradiente ascendente de sacarosa (al 5% y al 20%) y se colocaron en moldes de plástico sumergidos en compuesto OCT (*Optimal cutting temperatura compound*), para congelarlos directamente en nieve carbónica o en 2-metilbutano enfriado con nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80°C.
- El tejido destinado al análisis de tejido completo por inmunofluorescencia, se fragmentó en trozos de 1cm² y se incubó a 4°C en dispa a 2 mg/ml durante 14 horas. Las muestras se lavaron en abundante PBS y la epidermis se retiró con ayuda de pinzas. La dermis resultante se dividió en trozos de 0,5 cm² y se fijó a 4°C en paraformaldehído al 4% durante 2 horas. Los fragmentos se lavaron varias veces en PBS y se almacenaron a 4°C en azida sódica al 0,2%.
- Los fragmentos de tejido destinados al aislamiento y al cultivo *in vitro* de células de la piel, se mantuvieron en el tampón HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) suplementado con 2% de penicilina/estreptomina y 1 µg/ml de Fungizona™ en hielo, hasta su procesamiento (ver apartado).

3. MUESTRAS PROCESADAS

Tabla 1.2. Biopsias de piel procedentes de líneas transgénicas de ratón					
Cepa transgénica	Código ratón	Genotipo	Sexo	Peso (gr)	Edad (mes)
BAP195^{Cre}/R26^{EYFP}	BAP195.026-14	Transgénico	Hembra	20,29	2,9
	BAP195.027-14	Transgénico	Hembra	20,5	2,9
	BAP195.029-14	Transgénico	Hembra	17,93	2,8
	BAP195.045-14	Transgénico	Hembra	21,5	2
	BAP195.046-14	Transgénico	Macho	28,15	2,1
	BAP195.047-14	Transgénico	Macho	28,25	2,1
	BAP195.048-14	Transgénico	Macho	27,88	2,1
	BAP195.056-14	Transgénico	Macho	27,5	2,3
	BAP195.057-14	Transgénico	Macho	30,45	2,3
	BAP195.058-14	Transgénico	Macho	28,19	2,3
	BAP195.067-14	Transgénico	Macho	25,57	2,0
	BAP195.068-14	Transgénico	Hembra	17,75	2,0
	BAP195.069-14	Transgénico	Hembra	17,99	2,0
	BAP195.072-14	Transgénico	Macho	27,18	2,1
	BAP195.073-14	Transgénico	Hembra	30,59	2,1
	BAP195.074-14	Transgénico	Hembra	28,81	2,1
	BAP195.075-14	Transgénico	Hembra	21,24	2,1
	BAP195.090-14	Transgénico	Hembra	16,21	2,0
	BAP195.091-14	Transgénico	Hembra	19,65	2,0
	Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}	Myf5.005-13	<i>Wild type</i>	Macho	25
Myf5.006-13		Transgénico	Macho	26,5	1,8
Myf5.010-13		Transgénico	Macho	28,5	2,3
Myf5.017-13		<i>Wild type</i>	Hembra	17,5	2,4
Myf5.018-13		Transgénico	Hembra	16,5	2,4
Myf5.019-13		<i>Wild type</i>	Hembra	17,5	2,4
Myf5.020-13		Transgénico	Hembra	17	2,4
Myf5.022-13		Transgénico	Macho	30,50	3,2

Myf5.025-13	Transgénico	Hembra	22,00	3,0
Myf5.028-13	<i>Wild type</i>	Hembra	15,5	2,0
Myf5.029-13	<i>Wild type</i>	Hembra	15,5	2,0
Myf5.030-13	Transgénico	Hembra	16	2,0
Myf5.031-13	Transgénico	Hembra	16,5	2,0
Myf5.032-13	<i>Wild type</i>	Hembra	-	2,0
Myf5.033-13	<i>Wild type</i>	Hembra	-	2,0
Myf5.034-13	Transgénico	Hembra	16,5	2,0
Myf5.035-13	Transgénico	Hembra	18,5	2,0
Myf5.040-13	Transgénico	Macho	28,00	3,0
Myf5.041-13	Transgénico	Macho	33,00	3,0
Myf5.001-14	Transgénico	Macho	27,80	2,1
Myf5.002-14	Transgénico	Macho	25,00	2,1
Myf5.003-14	Transgénico	Hembra	18,35	2,1
Myf5.004-14	Transgénico	Hembra	19,00	2,1
Myf5.007-14	Transgénico	Hembra	19,10	1,8
Myf5.006-14	Transgénico	Macho	27,41	1,8
Myf5.009-14	Transgénico	Macho	25,82	2,7
Myf5.010-14	Transgénico	Macho	27,23	2,7
Myf5.011-14	Transgénico	Macho	27,32	2,7
Myf5.034-14	Transgénico	Hembra	22,30	2,1
Myf5.035-14	Transgénico	Hembra	20,00	2,1
Myf5.036-14	Transgénico	Hembra	20,00	2,1
Myf5.037-14	Transgénico	Hembra	20,45	2
Myf5.038-14	Transgénico	Macho	27,60	2,0
Myf5.039-14	Transgénico	Macho	28,00	2,0
Myf5.040-14	Transgénico	Hembra	17,00	2,0
Myf5.041-14	Transgénico	Hembra	20,11	2,0
Myf5.042-14	Transgénico	Hembra	17,15	2,0
Myf5.043-14	Transgénico	Hembra	17,50	2,0
Myf5.044-14	Transgénico	Hembra	20,26	2,0
Myf5.049-14	Transgénico	Macho	29,65	2,0
Myf5.050-14	Transgénico	Hembra	23,40	2,0
Myf5.051-14	Transgénico	Hembra	18,70	2,0
Myf5.088-14	Transgénico	Macho	29,30	2,4
Myf5.089-14	Transgénico	Macho	25,35	2,4
Myf5.097-14	Transgénico	Hembra	-	2,2

	Myf5.098-14	Transgénico	Macho	26,6	2,2
	Myf5.109-14	Transgénico	Macho	23,21	2,7
	Myf5.110-14	Transgénico	Hembra	18,35	2,2
	Myf5.126-15	Transgénico	Macho	26,75	2,0
	Myf5.127-15	Transgénico	Macho	26,78	2,0
	Myf5.128-15	Transgénico	Macho	26,72	2,0
Sox2^{EGFP}	Sox2.001-14	Transgénico	Macho	22,54	1,93
	Sox2.002-14	Transgénico	Macho	22,81	1,93
	Sox2.003-14	Transgénico	Hembra	21,84	1,87
	Sox2.004-14	Transgénico	Hembra	26,17	1,87
	Sox2.005-14	Transgénico	Macho	23,91	1,77
	Sox2.006-14	Transgénico	Macho	28,08	1,77
	Sox2.007-14	Transgénico	Macho	26	2,17
	Sox2.008-14	Transgénico	Hembra	20	2,17
	Sox2.009-14	Transgénico	Hembra	18,7	2,17
	Sox2.010-14	Transgénico	Macho	23,38	2,17
	Sox2.011-14	Transgénico	Macho	22,98	2,17
	Sox2.022-14	Transgénico	Macho	26,95	2,07
	Sox2.023-14	Transgénico	Macho	28,93	2,07
	Sox2.024-14	Transgénico	Hembra	-	2,07
	Sox2.025-14	Transgénico	Hembra	23,61	2,43
	Sox2.026-14	Transgénico	Hembra	25,9	2,43
	Sox2.027-14	Transgénico	Hembra	22,28	2,43
	Sox2.028-14	Transgénico	Hembra	25,7	2,47
	Sox2.034-14	Transgénico	Macho	25,6	2,83
	Sox2.035-14	Transgénico	Hembra	17,4	2,83
Sox2.036-14	Transgénico	Hembra	20,13	2,83	
Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/ Sox2^{EGFP}	Triple.003-16	Transgénico	Hembra	24,1	4,10
	Triple.005-16	Transgénico	Macho	36,13	4,10
	Triple.004-16	Transgénico	Hembra	30,5	4,53
	Triple.006-16	Transgénico	Macho	35,8	4,53
	Triple.007-16	Transgénico	Hembra	25,84	3,00
	Triple.008-16	Transgénico	Hembra	24,84	4,30
	Triple.009-16	Transgénico	Hembra	23,13	3,63
	Triple.010-16	Transgénico	Hembra	28,8	3,93
	Triple.011-16	Transgénico	Macho	40,1	4,57

	Triple.012-16	Transgénico	Hembra	23,56	2,40
	Triple.013-16	Transgénico	Hembra	24	2,40
	Triple.014-16	Transgénico	Macho	24,3	2,13
Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}	Sox10.001-13	<i>Wild type</i>	Macho	27,0	1,83
	Sox10.002-13	Transgénico	Macho	27,0	1,83
	Sox10.007-13	<i>Wild type</i>	Macho	27,5	2,27
	Sox10.008-13	Transgénico	Macho	25,0	2,27
	Sox10.009-13	Transgénico	Macho	27,5	2,60

¹ la nomenclatura de las muestras; el nombre del gen modificado en el constructo principal, seguido del número asignado en base al orden de procesamiento y el año. Ejemplo, *Myf5021-14*.

4. CULTIVOS CELULARES

4.1 Aislamiento y cultivo en suspensión de células derivadas de la piel de ratón

Para generar los cultivos en suspensión a partir de biopsias de piel, se utilizó el protocolo descrito por el grupo de Freda Miller (Toma y cols., 2005), modificando alguno de los pasos para optimizar la expansión de las células en suspensión y la formación de esferas (Etxaniz y cols., 2014).

La biopsia de piel recogida y transportada en HBSS suplementado con 2% de penicilina-estreptomicina y 5 µg/ml de Fungizona™, se pasó inicialmente por etanol al 70% y seguidamente se colocó en una placa p100 con F12 donde se retiraron los restos de grasa y sangre con ayuda de unas pinzas y un bisturí. Una vez limpia, la piel se troceó en pequeños fragmentos de 4-6 mm² y se sumergió en una solución enzimática de colagenasa tipo XI a 1 mg/ml (preparada en medio F12) para proceder con la disgregación enzimática. Se utilizaron uno o varios tubos de 15 ml (con 10 ml de colagenasa XI) dependiendo del tamaño de la muestra y se incubaron durante 50-70 minutos a 37°C en agitación, a una velocidad constante de 180 rpm. Pasado este tiempo, la solución de colagenasa XI se neutralizó añadiendo el doble del volumen de medio de disociación (MD, apartado) y se dejó actuar 5 minutos en hielo. La suspensión se centrifugó a 1200 rpm durante 7 minutos para recoger las células y los fragmentos de piel resultantes de la disociación enzimática. El sobrenadante se guardó en hielo (fracción colagenasa) y el pellet, compuesto por células y tejido a medio deshacer, se resuspendió en MD y se disgregó de forma mecánica, aspirando el medio y expulsándolo contra la pared del tubo repetidamente. Tras cada ciclo de disgregación, de 2-3 minutos, los fragmentos de piel se decantaron por medio de una centrifugación corta o spin de 20 segundos a 1200 rpm, y el sobrenadante (fracción mecánica) se recogió en un tubo de 50 ml, filtrándolo por una malla de 40 µm para evitar el paso de agregados celulares. El número de repeticiones de la disgregación mecánica fue variable y proporcional al tamaño de la muestra, realizando entre 5 y 10 ciclos en cada procesamiento. La fracción mecánica se centrifugó durante 7

minutos a 1200 rpm, el pellet se re-suspendió en medio de proliferación (MP) y las células se filtraron de nuevo por una malla de 40 μm , antes del contaje celular. Las células aisladas de la piel, se sembraron a 60.000 – 90.000 células/cm² en placas no tratadas en MP con 0.8% de metilcelulosa, suplementado con 20 ng/ml de EGF y 40 ng/ml de bFGF. Los cultivos se refrescaron cada 2 o 3 días con 2% de Suplemento B27, 20 ng/ml de EGF y 40 ng/ml de bFGF. Los factores se diluyeron en MP, en un volumen del 10 o 20% respecto al volumen total.

4.2 Disgregación de esferas crecidas en los cultivos en suspensión

Las esferas formadas entre los días 7 y 10 del cultivo en suspensión se disgregaron con el objetivo de dar pase al cultivo, diferenciar las células *in vitro* o analizar y separar poblaciones celulares por citometría de flujo. Los cultivos se recogieron en tubos de 15 o 50 ml, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm, se lavaron en PBS y se incubaron durante 3-5 minutos a 37°C con 300-500 μl de tripsina-EDTA al 0,25%. La suspensión se mezcló con ayuda de una pipeta de 200 o 1000 μl , para promover la disgregación de las esferas, y la reacción enzimática se neutralizó con un volumen 5 veces superior al de tripsina. La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm y el pellet se re-suspendió en medio para efectuar el contaje celular. Las células destinadas al cultivo en suspensión de esferas secundarias, se resuspendieron en MP y se sembraron en placas no tratadas a 25.000 células/cm² con 0,8% de metilcelulosa, suplementado con 20 ng/ml de EGF y 40 ng/ml de bFGF.

4.3 Diferenciación *in vitro* de células aisladas de piel ventral de ratón

4.3.1 Diferenciación glial

La diferenciación glial se realizó con fracciones celulares separadas por FACS a partir de cultivos primarios en suspensión. Las células se sembraron en medio Joannides (MJ) sobre cubres de 12 mm tratados con matriz de laminina secretada por la línea 804-G. La concentración de siembra fue de 5.000-10.000 células/cubre, excepto cuando el número de células recogido no era suficiente, reduciendo la concentración de siembra al número de células obtenido en la fracción limitante (y sembrando el mismo número celular en todas las fracciones). Las células se dejaron crecer hasta alcanzar un 60-70% de confluencia, periodo que podía prolongarse varias semanas, debido al daño sufrido por las células durante el proceso de separación. Al alcanzar la confluencia adecuada, el MJ se cambió por el medio de diferenciación glial o medio de Schwann (MS) y los cultivos se mantuvieron diferenciando durante 7-14 días. El MS se refrescó cada 3-4 días, retirando el 50% del medio preexistente y añadiendo ese mismo volumen de medio fresco. Tras la diferenciación, los cultivos se caracterizaron a nivel de expresión génica (por RT-qPCR) y proteica (por inmunofluorescencia);

- Los cultivos destinados a la caracterización por RT-qPCR, se lavaron con PBS y se lisaron directamente en la placa, añadiendo 700 µl de tampón de lisis Qiazol®. Las muestras homogenizadas se recogieron en tubos libre de RNasas, se mezclaron por vortex y se dejaron reposar varios minutos antes de congelarlos a -80°C.
- Los cultivos destinados a la caracterización por inmunofluorescencia, se lavaron con PBS y se fijaron 15 minutos a temperatura ambiente en PFA 4%. Tras lavar las muestras varias veces con PBS, se almacenaron a 4°C.

4.3.2 Diferenciación mesodérmica

La diferenciación hacia linajes mesodérmicos se realizó con células aisladas de cultivos primarios en suspensión. Las esferas a pase 1 día 7 de cultivo, se disgregaron y las células resultantes se sembraron sobre cubres de 12 mm tratados con matriz de laminina secretada por la línea celular 804-G. Las células se sembraron a 10.000 – 20.000 células/cubre en medio de diferenciación mesodérmica (MM) durante 12-14 días. El medio de diferenciación se refresco cada 3-4 días, retirando el 50% de medio preexistente y añadiendo ese mismo volumen de medio fresco, suplementado con doble concentración de TGFβ3, para reponerlo sobre el volumen total. Los cultivos diferenciados se fijaron y mantuvieron como se indica en el apartado 4.3.1, para la caracterización de la expresión proteica por inmunofluorescencia.

4.3.3 Diferenciación neuronal

La diferenciación hacia linajes neurales se realizó con células aisladas de cultivos primarios en suspensión. Las esferas a pase 1 y día 7 de cultivo, se disgregaron y las células resultantes se sembraron sobre cubres de 12 mm cubiertas con matriz extracelular (ECM). Las células se sembraron a 20.000 células/cubre en medio de diferenciación neuronal (MN) durante 12-14 días. El medio de diferenciación se refrescó cada 3-4 días, retirando el 50% de medio preexistente y añadiendo ese mismo volumen de medio fresco, suplementado con doble concentración de BDNF, NGF, N2 y B27, para reponerlos sobre el volumen total. Los cultivos diferenciados se fijaron y mantuvieron como se indica en el apartado 4.3.1, para la caracterización de la expresión proteica por inmunofluorescencia.

Preparación de matriz extracelular (ECM)

La matriz extracelular se elaboró tal y como se describe en el artículo (García-Parra y cols., 2012). La solución de matriz extracelular fue preparada mezclando los reactivos en primer lugar y añadiendo posteriormente PBS (pH 7,4) como diluyente a una dilución 1:3. La solución de matriz extracelular se preparó teniendo en cuenta la concentración del Cultrex dependiente del lote del producto. Los reactivos se atemperaron y se mantuvieron en hielo durante todo el proceso junto a

la solución de matriz extracelular en preparación. La solución final se agitó suavemente para prevenir la formación de burbujas y obtener una mezcla homogénea. Se depositaron aproximadamente 300 μ l de matriz extracelular sobre cubreobjetos circulares colocados en placas estériles de 4 pocillos. La polimerización de la matriz se realizó a 37°C en incubadores de cultivos celulares durante 24 horas. Pasado este tiempo, se retiró el exceso de líquido y se dejó secar la matriz en una campana de flujo laminar durante 15 minutos. Las placas se guardaron a 37°C para su uso inmediato, o a 4°C, para un almacenamiento prolongado.

4.3.4 Cuantificación de la capacidad de diferenciación in vitro de los precursores de piel hacia linaje glial, neuronal y mesodérmico.

Para determinar el porcentaje de células terminalmente diferenciadas, los cultivos se tiñeron por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para la detección de tipos celulares propios de cada linaje, combinados con anticuerpos para marcar las proteínas reporteras EYFP y/o EGFP. Se utilizó el protocolo habitual de inmunofluorescencia para células sembradas sobre cubres (apartado 1.4.4). La detección de los reporteros EYFP y EGFP se realizó con el anticuerpo anti-GFP, ya que ambas proteínas comparten el epítipo reconocido por el anticuerpo. Las células asociadas al linaje glial se marcaron con GFAP (del inglés, *glial fibrillary acidic protein*), las células neuronales con el marcador β III tubulina y las células mesodérmicas con el marcador α SMA (del inglés, *alpha smooth muscle actin*). La tinción se realizó sobre tres cubres de la misma muestra y en cada cubre, se analizaron entre 5 y 10 campos, seleccionados al azar, a una magnificación de 20X. En cada campo, se cuantificó el número total de núcleos y se determinó el número de células positivas para la expresión del gen reportero EYFP o EGFP, así como, para los marcadores de linaje seleccionados, GFAP, β III tubulina y α SMA.

5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Para el análisis de expresión génica se utilizaron técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) y chips de expresión de ADN o microarrays de ADN. En la **Figura 1.1**, se resumen los diferentes ensayos de expresión realizados, detallando el procedimiento llevado a cabo con cada muestra y la tecnología aplicada en cada caso.

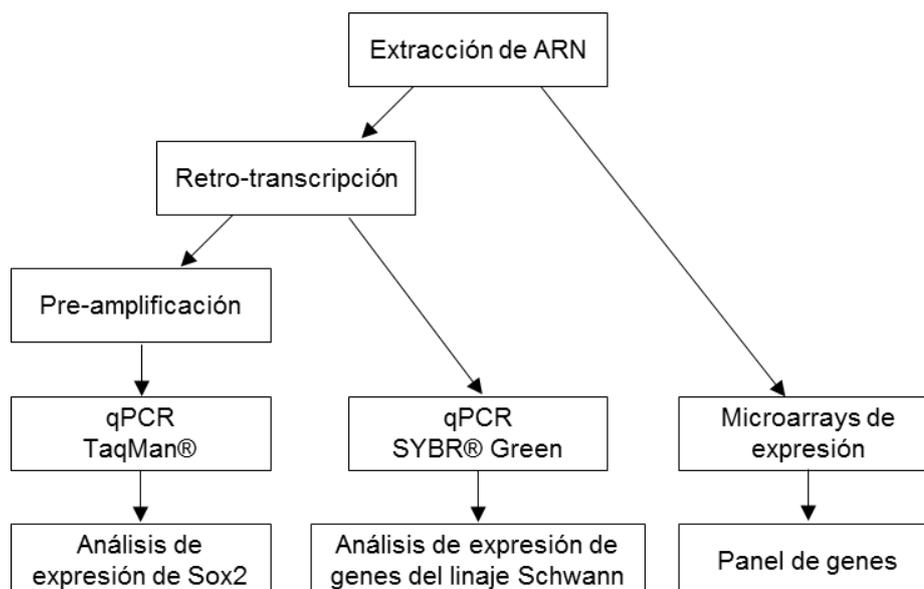


Figura 1.1. Ensayos de expresión génica llevados a cabo en el estudio del capítulo 1 de la Tesis. Los análisis de expresión por RT-qPCR se realizaron con la tecnología TaqMan® (expresión de Sox2) y la tecnología SYBR® Green (expresión de genes asociados con las células de Schwann). El análisis de expresión por microarrays se realizó con la tecnología Genechip® Mouse genome 430 2.0.

5.1 Análisis de expresión génica por RT-qPCR

5.1.1 Extracción de ARN y retrotranscripción de las muestras

La extracción de ARN se realizó con el kit miRNeasy micro kit de Qiagen®. Las muestras se recogieron directamente del cultivo de diferenciación (ver apartado 4.3.1) o tras su separación por citometría de flujo (ver apartado 7.3 de material y métodos capítulo 1). La extracción de ARN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras, congeladas en el tampón de lisis Qiazol®, se descongelaron y se incubaron un par de minutos a 37°C para disolver las sales. Se añadió cloroformo a cada tubo, se mezclaron vigorosamente y se incubaron 2-3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 12.000 rpm (revoluciones por minuto) para promover la separación de las fases. La fase superior acuosa, donde fracciona el ARN, se recogió en un tubo nuevo y se añadió el doble del volumen de etanol al 100% (grado molecular), proporcionando al medio condiciones óptimas para la unión del ARN. Esta solución se pasó a columnas RNeasy minElute spin column y se centrifugó para dejar el ARN unido a su paso a través de la membrana. En este punto se procedió a la digestión del DNA genómico, incubando la membrana durante 15 minutos con una solución de DNasa tipo I (RNase-Free DNase Set). Tras eliminar la enzima, lavando la membrana con el tampón RWT, el RNA unido a la membrana se lavó con tampón RPE y con etanol al 80%. La membrana se secó centrifugando las columnas a 12.000 rpm durante varios minutos y el RNA se eluyó en 14 µl de agua libre de RNasas. Finalmente, se determinó la concentración de ARN en el NanoDrop® (apartado 6.2.1) y las muestras

se almacenaron a -80°C . La retrotranscripción de las muestras de ARN extraídas se realizó con el kit High Capacity RNA to cDNA de Applied Biosystems, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 6.3 de material y métodos general.

5.1.2 Análisis de expresión de genes de linaje de Schwann

El análisis de expresión de genes expresados durante el desarrollo del linaje de Schwann, se realizó con la tecnología SYBR® Green (apartado 6.5.2 de material y métodos general). En cada reacción de RT-qPCR se cargaron 10 ng de ADNc. La secuencia de los cebadores utilizados se recoge en la **Tabla 1.3**.

Tabla 1.3. Secuencia de los cebadores utilizados en el análisis de expresión por RT-qPCR				
Gen	Símbolo Ratón	Cebador	Nombre	Secuencia (5' ---> 3')
S100	<i>S100</i>	Directo	s100_Fw	GCTGAGCAAGAAAGAACTGAA
		Inverso	s100_Rv	AGCCACCAGCACAAACATAC
GAP43	<i>Gap43</i>	Directo	Gap43_Fw	AAGGCAGGGGAAGATACCAC
		Inverso	Gap43_Rv	TTGTTCAATCTTTTGGTCCTCAT
NCAM	<i>Ncam-1</i>	Directo	NCAM_Fw	GGGAGGATGCTGTGATTGTCT
		Inverso	NCAM_Rv	GCAGGTAGTTGTTGGACAGGAC
GFAP	<i>Gfap</i>	Directo	GFAP_Fw	GCACTCAATACGAGGCAGTG
		Inverso	GFAP_Rv	GGCGATAGTCGTTAGCTTCG
p75NTR	<i>Ngfr</i>	Directo	p75_Fw	CCTGGACAGTGTTACGTTCTC
		Inverso	p75_Rv	ACACAGGGAGCGGACATACT
Cadherina 19	<i>Cdh19</i>	Directo	Cadh19_Fw	ATGGCCTTGCCTTAAAGTTTCA
		Inverso	Cadh19_Rv	CAGCGCCAATCCCCAGTAG
Krox20	<i>Egr2</i>	Directo	Krox20_Fw	GCCCCTTTGACCAGATGAAC
		Inverso	Krox20_Rv	GGAGAATTTGCCCATGTAAGTG
Krox24	<i>Egr1</i>	Directo	Krox24_Fw	TATGAGCACCTGACCACAGAG
		Inverso	Krox24_Rv	GCTGGGATAACTCGTCTCCA
HPRT	<i>Hprt</i>	Directo	HPRT_Fw	AGTCCCAGCGTCGTGATTAG
		Inverso	HPRT-Rv	TTTCCAAATCCTCGGCATAATGA

5.1.3 Análisis de expresión del gen Sox2

El análisis de expresión del gen *Sox2* se realizó con la tecnología TaqMan® (apartado 6.5.1 de material y métodos general). El transcrito de *Sox2* es poco frecuente en las muestras analizadas, de modo que antes de realizar la RT-qPCR, se realizó una reacción de pre-amplificación para aumentar selectivamente el número de copias de los transcritos de *Sox2*, *GAPDH* y *TBP*. Para llevar a cabo la reacción de pre-amplificación, se utilizó el kit TaqMan® preAmp Master Mix y se siguió el protocolo detallado en el apartado 6.4 de material y métodos general. Se preamplificaron entre 45 y 90 ng de ADNc y el producto amplificado se diluyó 20 veces antes de cargarlo en la reacción de RT-qPCR. Se utilizaron las sondas TaqMan® que se recogen en la **Tabla 1.4**.

Tabla 1.4. Sondas TaqMan® utilizadas en el análisis de expresión de Sox2

Símbolo de ratón	Referencia del gen	Referencia de la Sonda
<i>Sox2</i>	20674	Mm03053810_s1
<i>Tbp</i>	21374	Mm01277042_m1
<i>Gapdh</i>	14433	Mm99999915_g1

5.2 Análisis de expresión génica con microarrays de expresión

5.2.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó con el kit RNeasy plus micro kit de Qiagen®. Las muestras se recogieron tras su separación por citometría de flujo (ver apartado 7.3). La extracción de ARN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras, congeladas en el tampón de lisis Qiazol®, se descongelaron y se incubaron 2 minutos a 37°C para disolver las sales. Se añadió cloroformo a cada tubo, se mezclaron vigorosamente y se incubaron 2-3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 12.000 rpm para promover la separación de las fases. La fase superior acuosa, donde fracciona el ARN, se recogió en un tubo nuevo y se añadió el doble del volumen de etanol al 100% (grado molecular), proporcionando al medio condiciones óptimas para la unión del ARN. Esta solución se pasó a columnas RNeasy minElute spin column y se centrifugó para dejar el ARN unido a su paso a través de la membrana. En este punto se procedió a la digestión del DNA genómico, incubando la membrana durante 15 minutos con una solución de DNasa tipo I (RNase-Free DNase Set). Tras eliminar la enzima, lavando la membrana con el tampón RWT, el RNA unido a la membrana se lavó con tampón RPE y con etanol al 80%. La membrana se secó centrifugando las columnas a 12.000 rpm durante varios minutos y el RNA se eluyó en 14 µl de agua libre de RNasas. La concentración de ARN fue determinada en el NanoDrop® y con el kit Qubit® RNA Assay. Adicionalmente la integridad del ARN fue analizada con el kit RNA 6000 Nano kit en el Bioanalyzer 2100 Expert de Agilent (apartado 6.2 de material y métodos general). Las muestras se almacenaron a -80°C.

6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTÉICA POR INMUNOFLUORESCENCIA

6.1 Tinción de tejido completo

Las muestras de piel se recogieron y procesaron como se indica en el apartado 2 de material y métodos del capítulo 1. El protocolo de tinción de tejido completo se basa en el protocolo descrito por el grupo de Fiona M. Watt (Fujiwara y cols., 2011) con pequeñas modificaciones. En primer lugar y con ayuda de un sacabocados (*punch*) de 2mm, se obtuvieron pequeños fragmentos de dermis fijada y se colocaron en placas de 48 pocillos para realizar la tinción. Se permeabilizaron las muestras y se bloquearon las uniones inespecíficas con un tampón de permeabilización/bloqueo (Tritón X-100 al 0,5%, FBS al 10% y BSA al 2% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en tampón de permeabilización/bloqueo y se

incubaron toda la noche a 4°C. Se realizaron lavados con Tween-20 al 0,2% en PBS durante 3 o 4 horas, cambiando la solución de lavado cada 20 o 30 minutos. Se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos en tampón de permeabilización/bloqueo y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, en oscuridad. Se realizaron lavados con Tween-20 al 0,2% en PBS durante 3 o 4 horas, cambiando la solución de lavado cada 20 o 30 minutos, y se tiñeron los núcleos con 1 mg/ml de Hoechst 33258 durante 2 minutos. Se realizaron 2 últimos lavados en Tween-20 al 0,2% y las muestras se aclararon en agua deionizada. Para el montaje de las muestras, se colocaron las biopsias de 2mm en portaobjetos y se añadió una gota de medio de montaje Vectashield® sobre cada uno de ellos. Se cubrió el portaobjetos con cubreobjetos rectangulares de 24 x 50 mm y se presionó ligeramente para repartir de forma uniforme el medio de montaje. Se sellaron los bordes del cubreobjetos con laca de uñas y se dejaron secar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las preparaciones se guardaron a 4°C y en oscuridad hasta su análisis por microscopia.

6.2 Tinción de cortes congelados de piel

Las muestras de piel se recogieron y procesaron como se indica en el apartado 2 de material y métodos. Se realizaron cortes de 7 µm de grosor en el criostato de la Plataforma de Histología del Instituto Bionostia (Leica CM 1950) y se depositaron sobre portaobjetos diseñados para favorecer la adhesión de muestras congeladas (Superfrost®). Los cortes de piel se mantuvieron congelados a -80°C. Para la tinción de cortes congelados, se utilizaron Shandon Coverplates™ acoplados a cubetas Sequenza™. La tinción de cortes congelados de piel se basa en el protocolo descrito por el grupo de Freda Miller (Jinno y cols., 2010) con pequeñas modificaciones. En primer lugar, las muestras se atemperaron durante varios minutos a temperatura ambiente, sin dejarlos secar por completo. Los portaobjetos se acoplaron a los Coverplates™ y se insertaron individualmente en los huecos de la cubeta. Una vez colocados, los cortes de piel se permeabilizaron y se bloquearon las uniones inespecíficas con FBS al 10% y Tritón X-100 al 0,3% diluidos en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo (FBS al 10% en PBS) y se incubaron hasta el día siguiente a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS y se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos en tampón de bloqueo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad. Se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS y se tiñeron los núcleos con 1 µg/ml de Hoechst 33258 durante 1 minuto. Se volvieron a lavar los cortes con PBS y se aclararon con agua deionizada. Para el montaje de las muestras se colocó una gota de medio de montaje Fluoro-Gel sobre la muestra y se cubrió con un cubre rectangular de 24 x 50 mm. Las preparaciones se dejaron secar 30 minutos a temperatura ambiente y se guardaron a 4°C y en oscuridad hasta su análisis por microscopia.

6.3 Inmunofluorescencia de esferas

Para la tinción de esferas, es necesario mantener las esferas adheridas o incluidas en algún medio de soporte que evite perderlas durante el proceso de tinción. En este caso, las esferas se colocaron

sobre cubres de 12 mm tratados con matriz de laminina secretada por la línea celular 804-G, sustrato que favorece la adhesión de las esferas. Los cultivos se centrifugaron y las esferas re-suspendieron en un volumen pequeño de medio para depositarlas sobre los cubres tratados, colocados en placas de 24 pocillos. Las placas se incubaron durante 20-40 minutos a 37°C, hasta comprobar que las esferas estaban adheridas al sustrato. A partir de ese momento se tuvo especial cuidado de no incidir directamente sobre las esferas a la hora de añadir o retirar medio líquido. Las esferas se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS, se continuó directamente con la tinción o se guardaron los cubres a 4°C, cubriendo la placa con film transparente para prevenir la evaporación de líquido. Para continuar con la tinción, las esferas se permeabilizaron y se bloquearon las uniones inespecíficas incubando las muestras durante 40 minutos en tampón de bloqueo-permeabilización (FBS al 6% y Tritón X-100 al 0,2% en PBS). Seguidamente, se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos en tampón de bloqueo. Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 45 minutos o 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron dos lavados de 10 minutos con PBS y se tiñeron los núcleos con 1 µg/ml de Hoechst 33258 durante 1 minuto. Se realizó un último lavado con PBS y se aclararon los cubres en agua deionizada. Para el montaje de las muestras se añadieron pequeñas gotas de medio de montaje Vectashield® sobre los portaobjetos, colocando los cubres boca abajo. Las preparaciones se dejaron secar 30 minutos a temperatura ambiente, sellando los bordes de los cubres con laca de uñas. Las muestras se guardaron a 4°C y en oscuridad, hasta su análisis por microscopía.

6.4 Tinción de células

La tinción de células se realizó sobre los cultivos diferenciados in vitro. Estos cultivos se fijaron como se indica en el apartado 2.3.1. Las células se permeabilizaron con 0,5% de Tritón X-100 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se bloquearon las uniones inespecíficas con tampón de bloqueo (FBS al 10% en PBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se añadieron diluidos en tampón de bloqueo y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Después de tres lavados de 2 minutos con PBS, se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos en tampón de bloqueo y se incubaron 45 minutos o 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y se tiñeron los núcleos con 1 µg/ml de Hoechst 33258 durante 2 minutos. Se volvieron a lavar las muestras con PBS y se aclararon los cubres en agua. Para el montaje de las muestras, se añadieron pequeñas gotas de medio de montaje Vectashield® sobre los portaobjetos de vidrio y se colocaron los cubres boca abajo. Las preparaciones se dejaron secar 30 minutos a temperatura ambiente, sellando los bordes de los cubres con laca de uñas. Las muestras se guardaron a 4°C hasta su análisis por microscopía.

6.5 Caracterización de las tinciones de inmunofluorescencia por microscopía

El análisis de las preparaciones se realizó en un microscopio óptico de fluorescencia Nikon Eclipse 80i (con objetivos de 4x, 10x, 20x y 40x) acoplado a una cámara Nikon DSFi1 con Nikon Digital Sight y controlado por el programa informático Nikon NIS-Elements AR versión 3.2. Para un análisis más detallado de las muestras de tejido, se recurrió al servicio de microscopía óptica avanzada de Inbiomed. Se utilizó un microscopio de barrido láser confocal Zeiss LSM 510 META acoplado a un microscopio invertido Zeiss Axiovert200 y controlado por el programa informático ZEN 2008 SP2 versión 4.2. Este microscopio cuenta con las líneas de láser, Diodo (405 nm), Argón (458/477/488/514 nm), Helio-Neón (543 nm) y Helio-Neón (633 nm) y con objetivos de 10x, 20x, 40x (inmersión en aceite), 40x (inmersión en agua) y 63x (inmersión en aceite).

7. CARACTERIZACIÓN Y SEPARACIÓN CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En el presente trabajo, la citometría de flujo se utilizó para analizar la expresión de los genes reporteros EYFP, EGFP y TdTomato, y sirvió para determinar el porcentaje de células positivas, así como para separar las poblaciones en base a la expresión de los reporteros.

7.1 Análisis por citometría de flujo

Las células destinadas al análisis por citometría de flujo (sin separación celular), se disgregaron a partir de los cultivos de esferas y se re-suspendieron en tampón de análisis (FBS al 2%, azida sódica al 0,09% y EDTA a 5mM diluidos en PBS a pH 7,2). La suspensión se filtró por una malla de 40 μ m, para evitar el paso de agregados celulares, y se cuantificó el número de células en la cámara de *Neubauer*, excluyendo las células muertas por tinción con solución de *Trypan Blue* al 0,4%. Las células se pasaron a tubos de poliestireno (adaptables al citómetro) y se mantuvieron en hielo hasta su análisis. El análisis se realizó en la plataforma de citometría de Inbiomed, en un citómetro analizador BD FACSCanto. Este sistema incluye dos fuentes de excitación, un láser azul (488 nm) y un láser rojo (Helio-Neón, 633 nm) y seis detectores de fluorescencia (PMT). La adquisición de datos se realizó con el programa informático FlowJo™ versión 8.8.7.

7.2 Separación celular por citometría de flujo

Las células destinadas a la separación celular por citometría de flujo, se disgregaron a partir de los cultivos de esferas y se re-suspendieron en tampón de separación (BSA al 0.5%, Hepes a 25 mM y EDTA a 5mM diluidos en PBS a pH 7,2). La suspensión celular se filtró por una malla de 40 μ m, para evitar el paso de agregados celulares, y se cuantificó el número de células en la cámara de *Neubauer*. Las muestras se pasaron a tubos de polipropileno (adaptables al separador) y se mantuvieron en hielo hasta su análisis. La separación celular se realizó en la Plataforma de

Citometría de Inbiomed, en un citómetro separador BD FACSAria III. Este sistema incluye tres fuentes de excitación, un láser azul (488 nm), un láser amarillo-verde (561 nm) y un láser rojo (633 nm), y detectores de fluorescencia. La separación se realizó bajo el criterio de máxima pureza. La adquisición de datos se realizó con el programa informático de BD FACSDiva™ versión 6.1.3. y el ajuste automático Drop-delay, que permite aumentar la reproducibilidad de la separación y optimizar la pureza.

7.3 Estrategia de análisis y separación de las poblaciones EYFP y EGFP

Durante la adquisición de datos, se aplicaron varios criterios de exclusión para considerar solo los eventos susceptibles de ser analizados en la determinación de células positivas (**Figuras 1.3 y 1.4**). En primer lugar, se utilizaron los parámetros de tamaño y complejidad definidos por los detectores FSC y SSC, para discriminar los restos celulares o *debris*. La exclusión de las células muertas se realizó con el colorante de viabilidad TO-PRO®, que se incorpora solo en células con la membrana citoplasmática dañada. Finalmente, la representación de las gráficas FSC-H/FSC-W y SSC-H/SSC-W), sirvió para excluir los dobletes, por no poder distinguir la señal fluorescente procedente de cada célula. Las proteínas fluorescentes EYFP y EGFP se excitaron con el láser azul (488 nm) y la señal emitida se detectó en el detector (FMT) FL-1, aplicando un filtro dicróico con paso de banda de B 530/30-A. Las poblaciones EYFP y EGFP positivas se definieron en gráficas “dot blot”, representando el canal FL-2 (B 694/40-A) en el eje vertical y el canal FL-1 (B 530/30-A) en el eje horizontal. Se incluyeron muestras obtenidas de animales con fenotipo silvestre, como control negativo. Esta población sirvió para distinguir la señal fluorescente precedente de las proteínas EYFP y EGFP, de la auto-fluorescencia propia de las células (detectada en el detector FL-2). Las condiciones de separación se mantuvieron constantes en los diferentes experimentos, sin necesidad de incorporar un animal con fenotipo silvestre cada vez. Tras la separación, se comprobó la pureza de las fracciones en un análisis post-separación. Las células destinadas a ensayos de diferenciación *in vitro*, se recogieron en tubos de polipropileno con MJ y las células destinadas al análisis de expresión génica por RT-qPCR se recogieron en tampón de separación, en tubos Eppendorf® de 1,5 ml libres de Rnasas.

A partir de líneas transgénicas con expresión del reportero EYFP, se separaron las poblaciones EYFP+ y EYFP- (**Figura 1.2**). Debido al patrón de expresión observado en las células derivadas de la línea transgénica Sox2^{EGFP}, la separación se realizó en base a los niveles de expresión de la proteína reportera, definiendo las poblaciones con alta expresión de EGFP (ALTA), mediana (MEDIA), baja (BAJA) y negativa (NEG) (**Figura 1.3**).

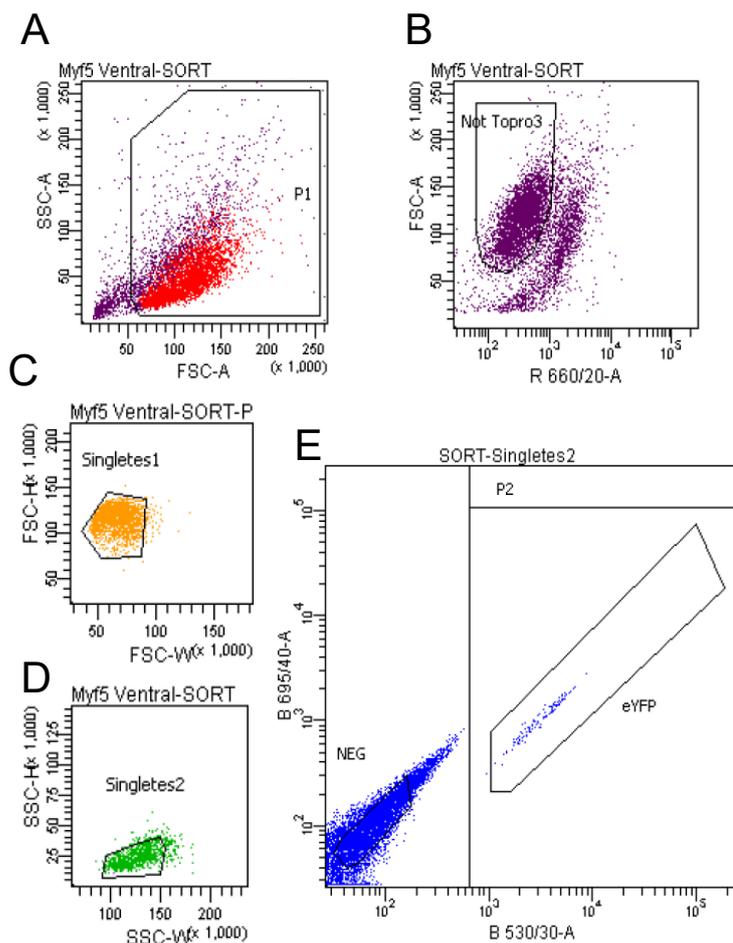


Figura 1.2. Estrategia de análisis y separación de las poblaciones EYFP+ y EYFP- por citometría de flujo. Se muestra un ensayo representativo para la separación de las poblaciones EYFP+ y EYFP-, a partir de cultivos en suspensión de esferas. En el panel A, se seleccionó de la región P1, en base a parámetros de dispersión frontal (FSC-A) y lateral (SSC-A), para retirar los fragmentos celulares o *debris*. En el panel B, se excluyeron las células muertas por tinción con TO-PRO® (marca células muertas). Los paneles C (FSC-H vs FSC-W) y D (SSC-H vs SSC-W), sirvieron para excluir los dobletes (células agregadas). La señal de EYFP se detectó en el FL-1, a través de un paso de banda B 530-30. Las regiones para la separación de las poblaciones EYFP+ y EYFP-, se delimitaron en el panel E.

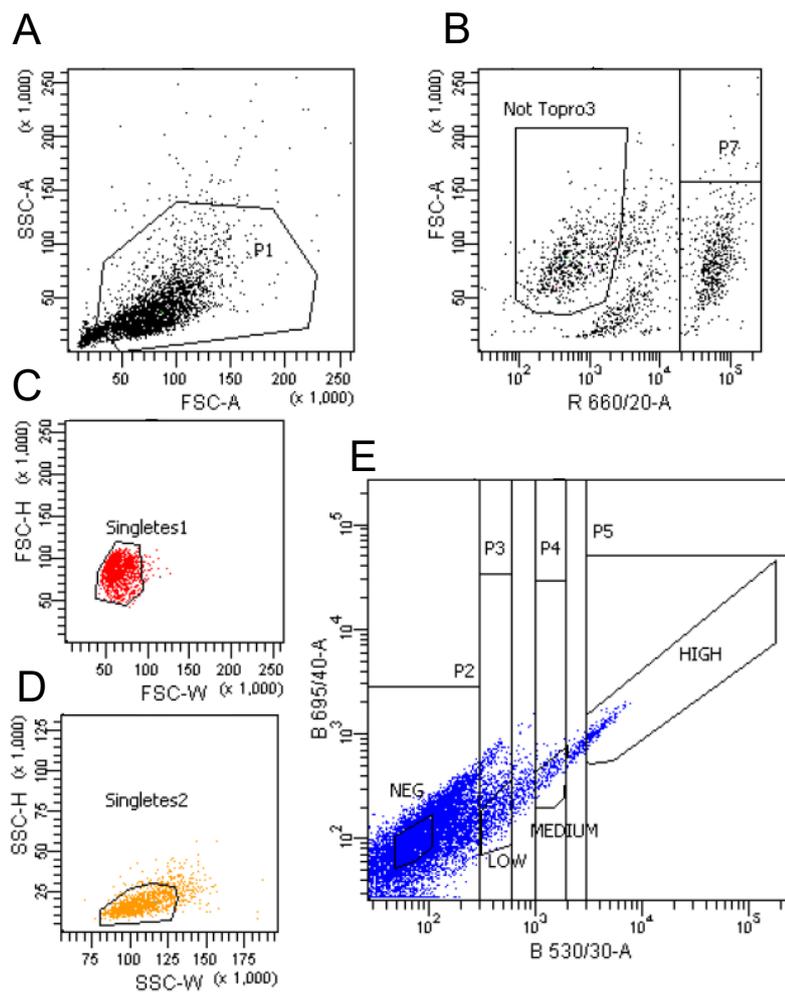


Figura 1.3. Estrategia de análisis y separación de las poblaciones EGFP por citometría de flujo. Se muestra un ensayo representativo de la separación de poblaciones celulares en base a la expresión de EGFP, a partir de cultivos en suspensión de esferas. En el panel A, se seleccionó la región P1, en base a parámetros de dispersión frontal (FSC-A) y lateral (SSC-A), para retirar los fragmentos celulares o *debris*. En el panel B, se excluyeron las células muertas por tinción con TO-PRO® (marca células muertas). Los paneles C (FSC-H vs FSC-W) y D (SSC-H vs SSC-W), se utilizaron para excluir los dobletes (células agregadas). La señal de EGFP se detectó en el detector FL-1, a través de un paso de banda B 530-30. Las regiones para la separación de las poblaciones con alta (HIGH), mediana (MED), baja (LOW) y negativa (NEG) expresión de EGFP, se delimitaron en el panel E.

1. ANÁLISIS DEL ORIGEN EMBRIONARIO DE LAS CÉLULAS CON POTENCIAL NEURAL DE LA PIEL UTILIZANDO RATONES TRANSGÉNICOS PARA EL TRAZADO DE LINAJES ESPECÍFICOS

1.1 Trazado de linaje en las líneas transgénicas *Sox10-Cre* y *Myf5-Cre^{Sor}*

Para el estudio del origen embrionario de las células con potencial neural de la piel, se utilizaron líneas transgénicas de ratón que expresan la proteína Cre recombinasa bajo el control del promotor de los genes *Sox10* y *Myf5* (sistema Cre-loxP explicado en el apartado 3.2.1 de la introducción). Las líneas transgénicas *Sox10-Cre* y *Myf5-Cre^{Sor}*, fueron cruzadas con la línea reportera *R26^{EYFP}* para generar líneas transgénicas que expresaran de forma constitutiva el gen reportero EYFP (siglas en inglés, *enhanced yellow fluorescence protein*). De este modo, y tras la activación del promotor en una célula, todo el linaje celular derivado de esa célula queda marcado por la expresión de la proteína fluorescente EYFP. Las líneas transgénicas resultantes, *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* y *Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}*, se utilizaron para el trazado de las células derivadas del mesodermo (Jinno y cols., 2010; Tallquist y cols., 2000) y de la cresta neural (Stine y cols., 2009; Wong y cols., 2006), respectivamente.

1.1.1 Establecimiento de cultivos en suspensión a partir de piel ventral de ratones transgénicos *Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}* y *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*

En primer lugar, se establecieron cultivos para el crecimiento de las células precursoras de la piel, también conocidas como *SKPs* (del inglés, *skin derived precursors*) (Toma y cols., 2001). La metodología utilizada para el cultivo de esta población precursora, se basa en técnicas dirigidas a aislar células madre neurales de cerebro (Reynolds y Weiss, 1992) y se caracteriza por crecer las células en suspensión en presencia de factores de crecimiento específicos. Con este sistema los cultivos generados a partir de piel son heterogéneos y representan diferentes poblaciones celulares, entre las cuales se encuentran células con capacidad de diferenciación neural (Biernaskie y cols., 2006; Fernandes y cols., 2004, 2006; Toma y cols., 2001, 2005), identificadas por nuestro grupo como las células de Schwann residentes de la piel (Etxaniz y cols., 2014).

Se utilizó el protocolo descrito por el grupo de Freda Miller (Biernaskie y cols., 2006), en el cual se modificaron las condiciones de siembra para mejorar la expansión de las células en suspensión (Etxaniz y cols., 2014), y se generaron cultivos a partir de la piel del tronco ventral de las líneas *Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}* y *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*. Se procesaron ratones transgénicos y en paralelo, a modo de control, se procesaron ratones con genotipo silvestre, denominados comúnmente en inglés ratones *wild type*. Las células aisladas se sembraron en placas sin tratar (para prevenir la adhesión celular) en medio de proliferación (MP) suplementado con los factores de crecimiento *EGF* (del

inglés, *Epidermal Growth Factor*) y *bFGF* (del inglés, *basic fibroblast growth factor*). Entre los 7 y 10 días de cultivo, se formaron agrupaciones celulares con forma de esfera (**Figura 1.4**).

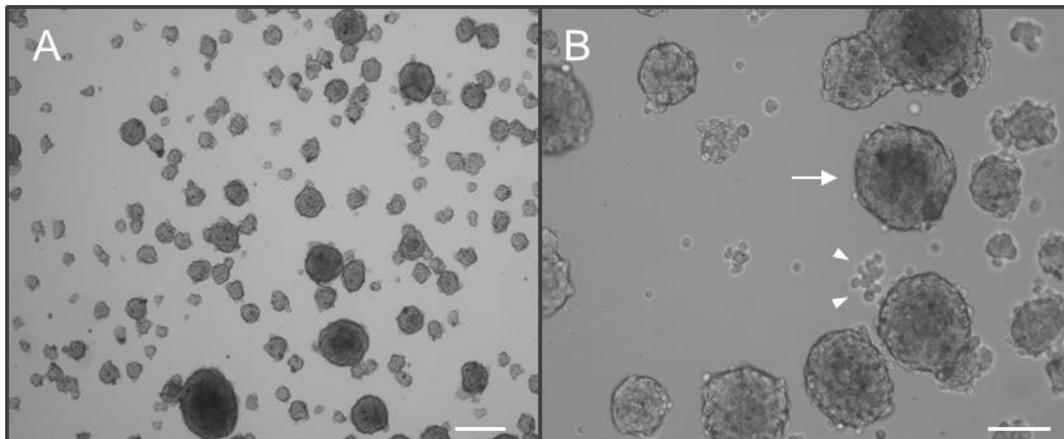


Figura 1.4. Cultivo en suspensión de de esferas a partir de piel ventral de la línea transgénica *Myf5-Cre^{Sor}*. Imágenes representativas de cultivos primarios a pase 0/día 7 generados a partir de piel ventral de ratones transgénicos *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico invertido, aumentadas 4x (**A**) y 10x (**B**). Las barras de tamaño representan, 100 μm (**A**) y 50 μm (**B**).

Los cultivos primarios presentaban esferas de tamaño variable, en las que las esferas más grandes comenzaban a oscurecerse por el interior, debido a la limitación de las células internas para captar los nutrientes del medio (flecha blanca en el panel **B**, **Figura 1.4**). Algunas células se adherieron al fondo de la placa y formaron también pequeños agregados celulares (cabezas de flecha en el panel **B**, **Figura 1.4**). Para el pase del cultivo, las esferas se disgregaron y las células se sembraron en las mismas condiciones de proliferación para la formación de esferas secundarias. Los cultivos se pasaron hasta un máximo de tres veces, aunque la mayoría de los ensayos de caracterización, separación celular y diferenciación de esta Tesis, se realizaron con esferas primarias de pase 0.

1.1.2 Análisis de expresión del gen reportero EYFP en los cultivos de esferas derivados de las líneas *Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}* y *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*

Una vez generados los cultivos, se analizó la expresión del gen reportero EYFP, para determinar la presencia de células derivadas de los linajes *Sox10-Cre* y *Myf5-Cre^{Sor}* en las esferas. En primer lugar, se realizó un análisis por inmunofluorescencia (inmunofluorescencia), en el que la detección del reportero se realizó con el anticuerpo anti-GFP, debido a que la proteína fluorescente EYFP es una variante de la GFP (del inglés, *green fluorescence protein*) y ambas comparten el epítipo reconocido por el anticuerpo.

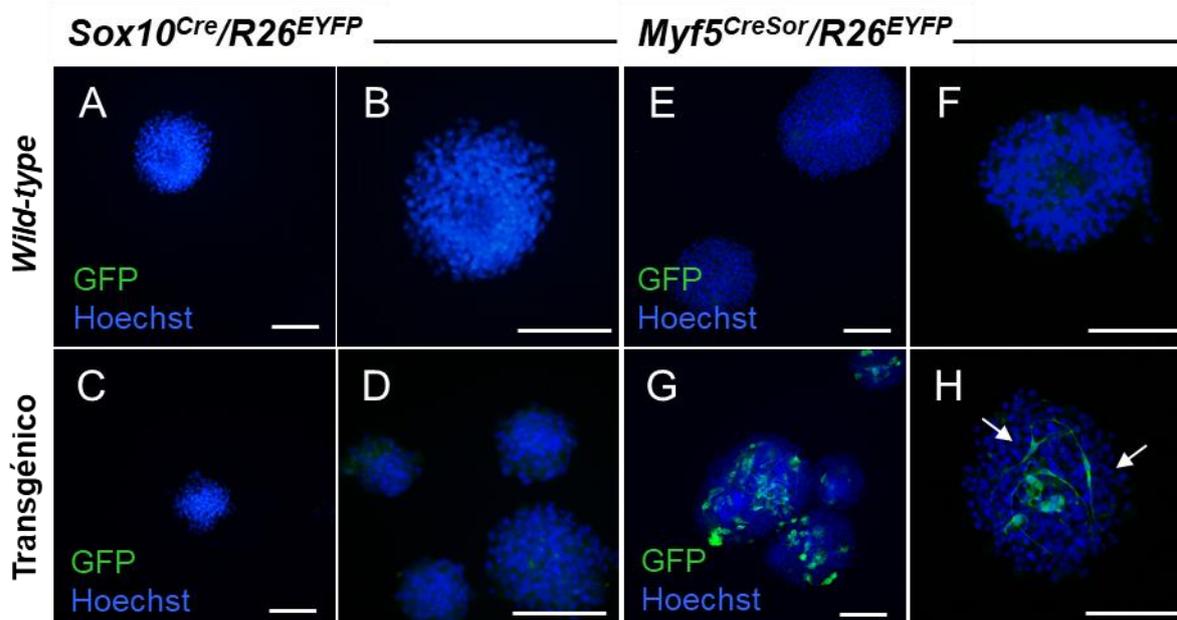


Figura 1.5. Análisis de expresión del reportero EYFP en los cultivos de esferas derivados de las líneas *Myf5-Cre^{Sor}* y *Sox10-Cre* por inmunofluorescencia. La expresión del gen reportero EYFP se analizó por inmunofluorescencia en los cultivos de esferas generados a partir de la piel ventral de los ratones *Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}* y *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*. Se analizaron cultivos procedentes de animales *wild type* y transgénicos. La proteína reportera EYFP se detectó utilizando el anticuerpo anti-GFP, que se marcó posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado con alexa-488 (molécula fluorescente verde). La muestra *wild type* se utilizó para discriminar la señal de fondo de las preparaciones (**A-B** y **E-F**). En los cultivos obtenidos de la línea transgénica *Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}* no se observaron células GFP+ (**C-D**). En las esferas derivadas del ratón *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* se detectó un subgrupo de células positivas para GFP (**G-H**), algunas de las cuales presentaban una morfología bipolar (flechas en H). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 50 μ m en todos los paneles.

Los cultivos derivados de los ratones *wild type*, utilizados como control negativo, sirvieron para discriminar la señal fluorescente de fondo, generada por la unión inespecífica del anticuerpo secundario, o por la propia auto-fluorescencia de las células (paneles **A-B** y **E-F**, **Figura 1.5**). En las esferas derivadas de la línea transgénica *Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}* no se observó ninguna célula GFP+, lo cual indicaba la ausencia de progenie *Sox10+* entre las células que conformaban la esfera (paneles **C-D**, **Figura 1.5**). En el cultivo derivado del ratón transgénico *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*, se detectaron células GFP+, algunas de las cuales presentaban morfología bipolar con finas prolongaciones que se extendían desde el citoplasma (paneles **G-H**, **Figura 1.5**). Este resultado contrastaba con lo publicado previamente, en el que utilizando el mismo constructo genético para trazar las células *Myf5+* (*Myf5-Cre^{Sor}*), no se detectaron células *Myf5+* en esferas derivadas de piel ventral (Jinno y Cols., 2010).

Para confirmar los datos obtenidos por inmunofluorescencia, la expresión del reportero EYFP se analizó también por citometría de flujo (**Figura 1.6**). Las células procedentes de los cultivos *wild-type*, sirvieron para ajustar los parámetros del citómetro, de modo que pudiera distinguirse la señal

procedente del reportero de la auto-fluorescencia propia de las células. La región para determinar el número de células EYFP+, se definió sobre gráficas de dispersión por puntos, en las cuales se representaron los canales FL-2 (eje vertical) y FL-1 (eje horizontal) para un óptimo análisis de la dispersión poblacional. En los cultivos derivados de la línea *Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}* no se detectó prácticamente señal de EYFP, coincidiendo el resultado obtenido por inmunofluorescencia. Cabe mencionar, aun así, que en dos de los ensayos realizados con tres muestras independientes se cuantificaron algunas (muy pocas) células positivas y que por lo tanto el porcentaje exacto de células *Sox10+* en los cultivos fue de $0.0015 \pm 0.0022\%$ [panel A, **Figura 1.6** (n=3)]. Por otro lado, el análisis de expresión de EYFP en los cultivos derivados de la línea *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*, reveló que la población *Myf5+*, detectada por inmunofluorescencia, representaba el $1.9 \pm 2.2\%$ del total de las esferas [panel B, **Figura 1.6** (n=15)]. Estos datos indicaban que los cultivos de esferas derivados de piel ventral no contenían células procedentes de la cresta neural, definidas como células *Sox10+*, y demostraron la existencia de células *Myf5+*, las cuales habían sido omitidas en estudios previos. La población *Myf5+* representaba aproximadamente el 2% del cultivo de esferas y exhibía una morfología propia de las células neuroblásticas. La ausencia de células *Sox10+* en el cultivo contrastaba con lo esperado inicialmente, ya que, basándonos en los estudios llevados a cabo con piel humana, se esperaba encontrar células de Schwann en el cultivo, y que estas estuvieran trazadas por la línea *Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}*.

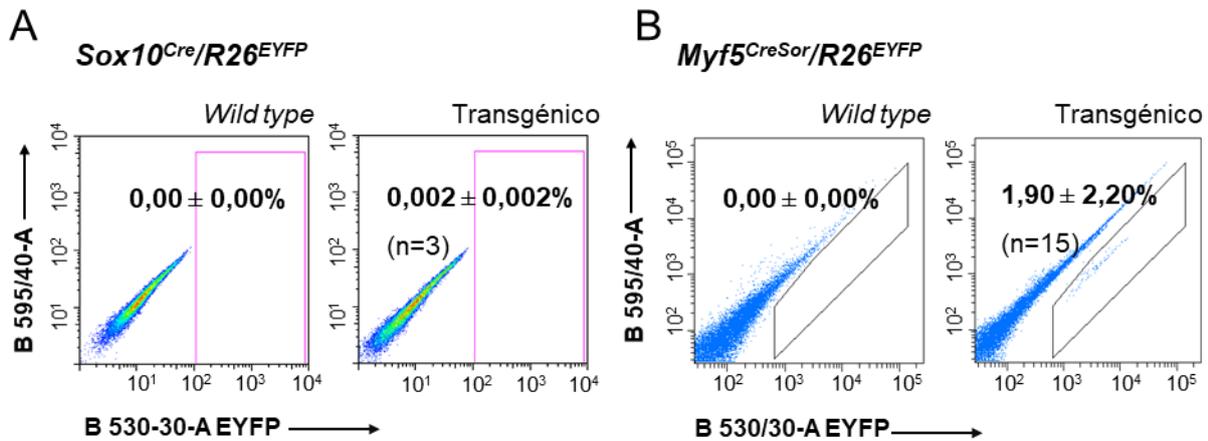


Figura 1.6. Análisis de expresión del reportero EYFP en los cultivos de esferas derivados de las líneas *Myf5-Cre^{Sor}* y *Sox10-Cre* por citometría de flujo. La expresión del gen reportero EYFP se analizó por citometría de flujo en los cultivos de esferas generados a partir de la piel ventral de los ratones *Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}* (A) y *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* (B). Las células se excitaron con el láser azul (a una longitud de onda de 480 nm) y la fluorescencia emitida por las células, se detectó en el canal FL-1, tras aplicar un paso de banda de B 530-30-A. La selección de la población EYFP+ se realizó en gráficas de dispersión por puntos, en el cual se representaron los detectores FL-1 (eje horizontal) y FL2 (eje vertical). El análisis de las muestras procedentes de animales *wild type* permitió distinguir la señal auto-fluorescente y definir la región para la cuantificación de células EYFP+. En los cultivos derivados de animales *Sox10^{Cre}/R26^{EYFP}* no se detectaron prácticamente células EYFP+ [$0,0015 \pm 0,022\%$ (n=3)], mientras que en los cultivos procedentes de la línea transgénica *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*, se detectó un $1,9 \pm 2,2\%$ de células positivas para EYFP (n=15). Se representa la media \pm la desviación estándar.

1.1.3 Caracterización de la población *Myf5*⁺ en cultivos derivados de piel ventral de ratones transgénicos *Myf5*^{CreSor}/*R26*^{EYFP}

Las células *Myf5*⁺ identificadas en los cultivos de piel ventral, resultaron de interés por haber sido omitidas en estudios similares llevados a cabo por otros grupos, y por presentar cierta similitud con la población neurogénica identificada en los cultivos derivados de piel humana (Etxaniz y cols., 2014). Por eso, con el objetivo de definir mejor la población *Myf5*⁺ y analizar su posible relación con las células neurales aisladas de la piel humana, se llevó a cabo una caracterización detallada de las células trazadas por el constructo *Myf5*-*Cre*^{Sor}. A partir de ese momento los ensayos se centraron en el estudio de la línea transgénica *Myf5*^{CreSor}/*R26*^{EYFP}.

1.1.3.1 Caracterización de las células *Myf5*⁺ en los cultivos de esferas, por inmunofluorescencia

En primer lugar, se caracterizó la población *Myf5*⁺ presente en los cultivos de esferas por inmunofluorescencia. Se realizaron tinciones dobles combinando el anticuerpo anti-GFP (para detectar las células *Myf5*⁺) con anticuerpos para la detección de la Nestina y la cadena pesada de la miosina (MyHC, *myosin heavy chain*). La Nestina, es un filamento intermedio expresado en varios tejidos durante el desarrollo embrionario y su expresión se mantiene en algunas poblaciones celulares adultas, considerándose un marcador de precursor neural (Park y cols., 2010). La Nestina ha sido ampliamente utilizada para marcar precursoras neurales en la piel y en cultivos derivados de la misma (Amoh y cols., 2009a; Etxaniz y cols., 2014; Fernandes y cols., 2004; Toma y cols., 2001). La MyHC, se utilizó para analizar la presencia de mioblastos en los cultivos de esferas, ya que *Myf5* es un gen regulador de la miogénesis y se quiso comprobar si las células *Myf5*⁺ detectadas en las esferas representaban células derivadas del tejido muscular (panículo carnoso) de la piel. Además, los precursores miogénicos habían sido previamente descritos en cultivos similares derivados de piel (Naldaiz-Gastesi y cols., 2016).

El análisis de expresión por inmunofluorescencia reveló que las células *Myf5*⁺ expresaban el marcador de precursor neural Nestina (paneles **A-C**, **Figura 1.7**), marcándose muchas, aunque no todas las células de la esfera. Estas células, además, parecían corresponderse con las células de aspecto bipolar observadas previamente en los cultivos (**Figura 1.5**). Por otro lado, el marcaje con el anticuerpo anti-MyHC2, demostró la presencia de algunas células MyHC⁺ en las esferas, incluso se observaron pequeños fragmentos de panículo carnoso formando parte del cultivo (paneles **E-H**, **Figura 1.7**). Sin embargo, y exceptuando algunos restos de tejido y células que se marcaron de forma puntual, las células *Myf5*⁺ no presentaron positividad para el marcaje con MyHC. Así, los resultados relacionaban las células *Myf5*⁺ con la identidad neural y descartaban en gran medida su asociación con las células musculares de la piel, tal y como se esperaba en un principio teniendo en cuenta la función miogénica del gen *Myf5*.

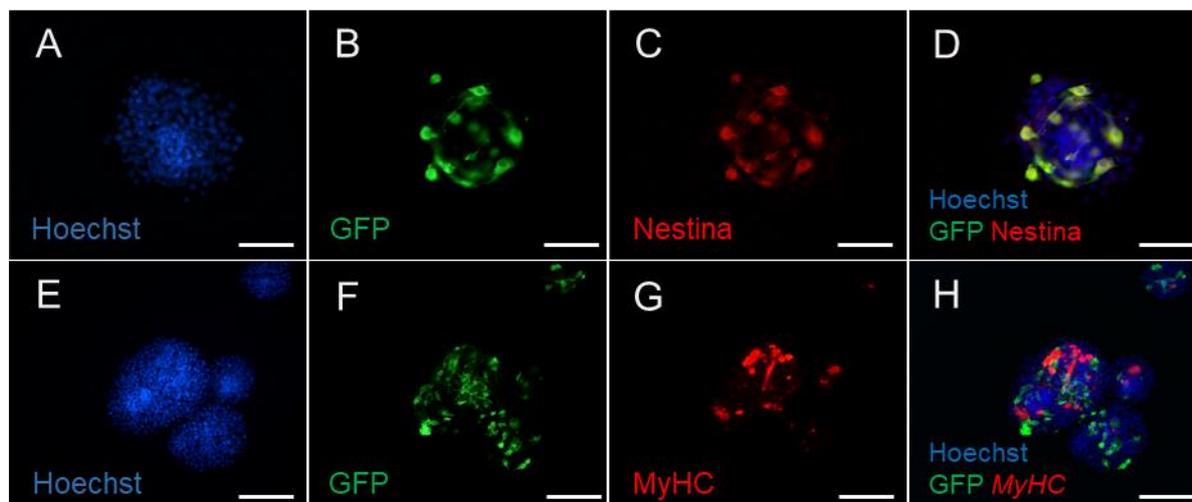


Figura 1.7. Caracterización de las células EYFP+ en el cultivo de esferas derivado de la línea *Myf5-Cre^{Sor}* por inmunofluorescencia. Las células *Myf5*+ se caracterizaron por inmunofluorescencia en esferas generadas a partir de piel ventral del ratón *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*. Se realizó una tinción doble para detectar la expresión del reportero EYFP en combinación a la Nestina y a la cadena pesada de la miosina (MyHC). La proteína EYFP se marcó con el anticuerpo anti-GFP conjugado con el anticuerpo secundario alexa-488 (verde, **B** y **F**). Los anticuerpos primarios utilizados para la detección de las proteínas Nestina y MyHC se marcaron con anticuerpos secundarios conjugados con el secundario alexa-555 (rojo, **C** y **J**). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul, **A** y **E**). El análisis demostró que las algunas células *Myf5*+ (GFP+) expresaban Nestina (**A-D**) y que muy pocas células *Myf5*+ eran positivas para MyHC (**E-H**). Las barras de tamaño representan, 50 μ m (A-D) y 100 μ m (E-H).

1.1.3.2 Análisis de expresión de genes del linaje de Schwann en las células *Myf5*+ presentes en los cultivos de esferas

En este punto, se quiso analizar la relación entre las células *Myf5*+ del ratón y las células con potencial neural identificadas en los cultivos de piel humana, las células de Schwann. Para eso se realizó un análisis de expresión de genes asociados con el linaje de Schwann por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Las esferas primarias derivadas de *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* se disgregaron y las poblaciones *Myf5*+ y *Myf5*- se separaron por citometría de flujo para la extracción y posterior cuantificación del ARN mensajero (ARNm) (**Figura 1.9**). El experimento se realizó sobre las fracciones celulares separadas de dos cultivos independientes, identificadas como muestra 1 (n=1) y muestra 2 (n=2). El análisis de datos se llevó a cabo mediante el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ descrito por Livak y Schmittgen (Livak y Schmittgen, 2001). Este método se basa en la cuantificación relativa del ARNm, en el que se compara la intensidad de señal fluorescente emitida por una muestra (Cq, indicativa de la cantidad de ARNm) con la señal emitida por otra muestra que sirve de referencia. En este caso, los valores de expresión relativa (en inglés, *relative quantification*, RQ) se obtuvieron normalizando los valores Cq de la fracción *Myf5*+ respecto a los de la fracción *Myf5*-.

Se analizaron genes expresados durante el desarrollo embrionario de las células de Schwann y genes expresados en las células de Schwann reprogramadas en respuesta a daño (panel **A**, **Figura 1.8**), ya que los datos obtenidos en humano, y los datos publicados por otros grupos, demostraron que las células de Schwann aisladas en cultivo presentaban un perfil de expresión correspondiente al de las células desdiferenciadas (Etxaniz y cols., 2014; Liu y cols., 2015; Stratton y cols., 2017). Así, se diseñó un pequeño panel de marcadores en el que se representaba el patrón de expresión de distintos estadios del linaje de Schwann (panel **B**, **Figura 1.8**) (Jessen y Mirsky, 2002; Jessen y cols., 2015a; Mirsky y cols., 2008; Woodhoo y Sommer, 2008b).

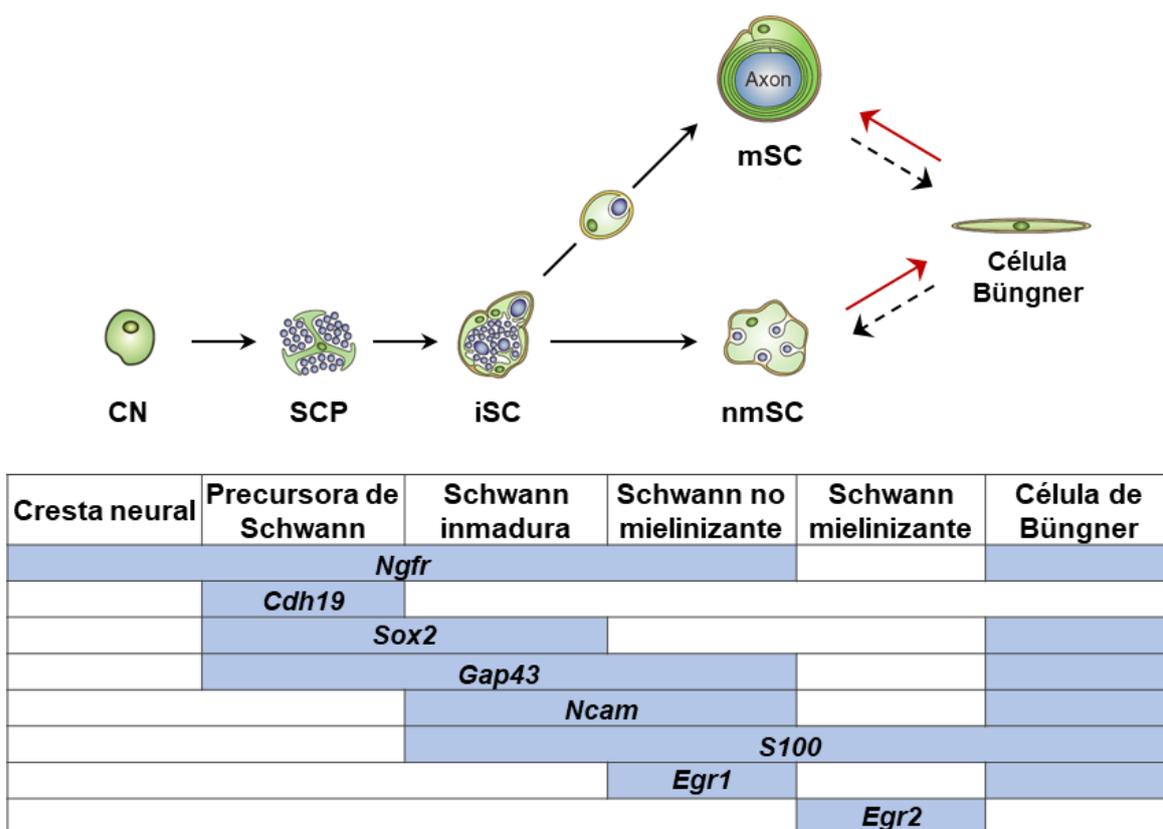


Figura 1.8. Panel de marcadores de genes del linaje de Schwann para el análisis de expresión por RT-qPCR. (A) Representación esquemática de los estadios del linaje de Schwann a lo largo de su desarrollo embrionario y tras su reprogramación. (B) Panel de marcadores seleccionados en representación a cada uno de los estadios del linaje de Schwann.

El análisis por RT-qPCR demostró que la fracción *Myf5+* sobreexpresaba genes propios del linaje de Schwann y las dos poblaciones *Myf5+* analizadas expresaban el mismo conjunto de genes (**Figura 1.9**). Aun así, el nivel de ARNm en las muestras 1 y 2 fue notablemente distinto en algunos casos, como en el gen *Ngfr*, expresado 155,23 veces más en la fracción positiva que en la fracción negativa en la muestra 1 y 47.01 veces en la muestra 2, (panel **A**, **Figura 1.9**). El patrón de expresión de la fracción *Myf5+* se ajustaba al perfil transcripcional de las células de Schwann desdiferenciadas, ya que se detectaron altos niveles del marcador específico de células precursoras *Cdh19* (Cadherina 19) y de los marcadores compartidos por las células precursoras y las células inmaduras de

Schwann, *Sox2* (SOX2) y *Gap43* (GAP43) (paneles **B**, **C** y **D**, **Figura 1.9**). Adicionalmente, las células *Myf5*⁺ expresaron genes propios de células de Schwann no-mielinizantes, como *Ncam1* (CD56) y *Egr1* (KROX24) (paneles **E** y **G**, **Figura 1.9**), y no presentaron diferencias frente a la fracción negativa en el nivel de expresión de los marcadores *S100β* (s100β) y *Egr2* (KROX20) (panel **F** y **H**, **Figura 1.9**). De este modo, y atendiendo al patrón de expresión de los distintos genes analizados, los datos indicaban que al menos algunas células de la fracción *Myf5*⁺ se correspondían con células de Schwann reprogramadas, coincidiendo con el fenotipo observado en los cultivos derivados de piel humana.

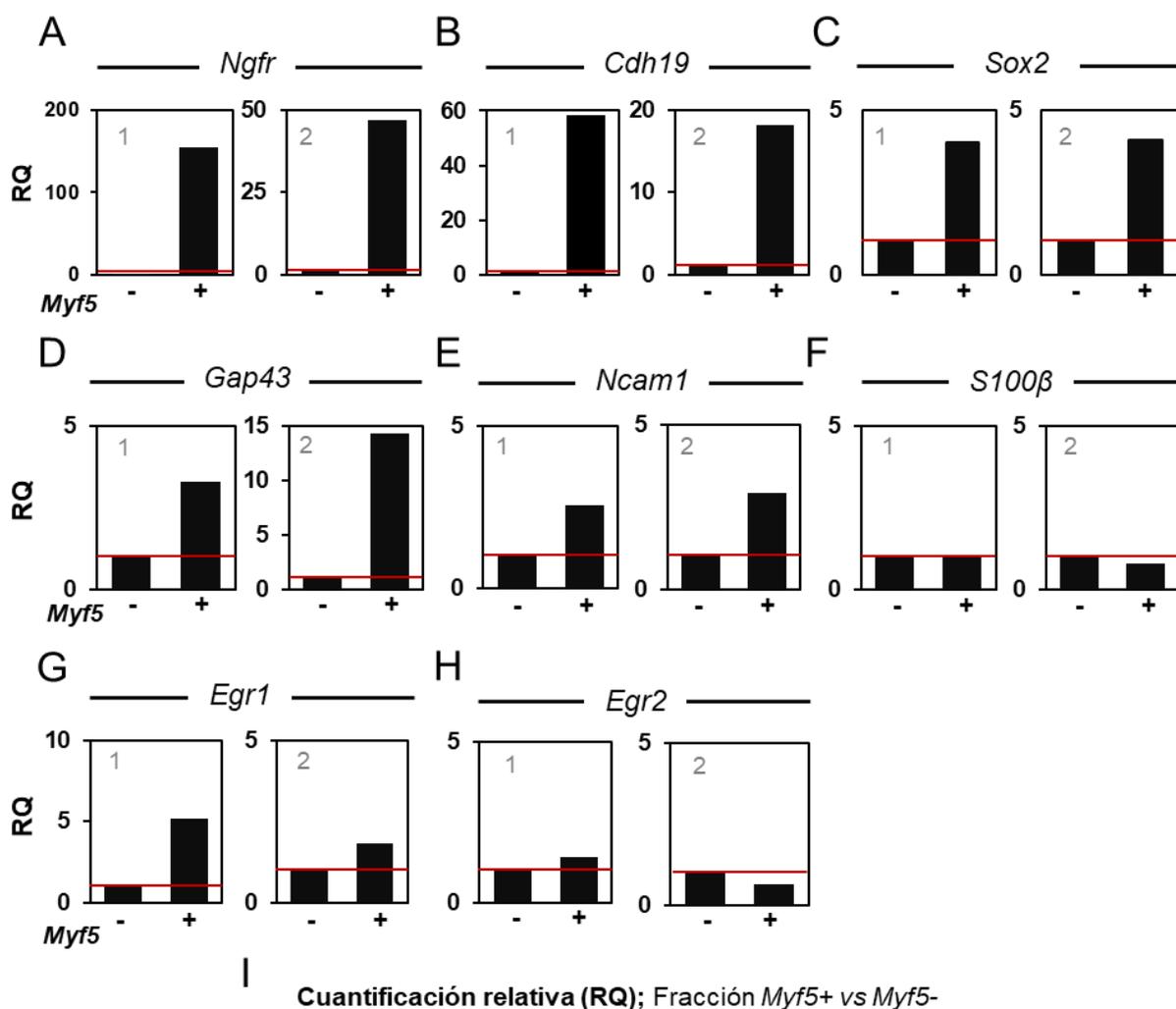


Figura 1.9. Análisis de expresión de genes del linaje de Schwann en la fracción *Myf5*⁺ en el cultivo de esferas. Los niveles de ARN mensajero (ARNm) de los genes seleccionados fueron determinados por RT-qPCR en las fracciones aisladas por citometría de flujo a partir de cultivos de esferas primarias. (**A-H**) La cantidad de ARNm de la fracción *Myf5*⁺ se representa en valores relativos (RQ) con respecto a la muestra de

referencia (fracción *Myf5*⁻). Se analizaron dos muestras, identificadas como 1 y 2, cada una de las cuales se representa en una gráfica independiente. El gen *Hprt* se utilizó como gen endógeno para la normalización de los datos. (I) Tabla con los valores RQ de la fracción *Myf5*⁺ en las muestras 1 y 2.

1.1.3.3 Diferenciación de las fracciones celulares *Myf5*⁺ y *Myf5*⁻ separadas por citometría de flujo de flujo

Tras analizar el patrón de expresión de las células *Myf5*⁺ en cultivo, se quiso ensayar su capacidad de diferenciación hacia linaje glial. Para eso, las fracciones celulares *Myf5*⁺ y *Myf5*⁻ se separaron por citometría de flujo a partir de cultivos de esferas primarias derivadas de la línea transgénica *Myf5*^{CreSor/R26^{EYFP}} y se sembraron sobre cubres tratados con matriz de laminina secretada por la línea celular 804-G. Las células se dejaron crecer varios días en medio de proliferación (MP) suplementado con suero (medio Joannides) para favorecer su proliferación después de la separación por citometría. Tras adquirir una confluencia adecuada, de entorno al 70-80%, la diferenciación de las células se indujo añadiendo medio de diferenciación glial, utilizado también para diferenciar los precursores neurales obtenidos de piel humana (Etxaniz y cols., 2014). Junto a las fracciones *Myf5*⁺ y *Myf5*⁻, a modo de control, se sembraron células disgregadas a partir de esferas, pero no separadas por citometría de flujo (fracción Total).

Durante la fase de proliferación se observaron células con aspecto de fibroblasto y células con el citoplasma expandido y núcleos de gran tamaño (paneles **A-C**, **Figura 1.10**). Tras añadir el medio de diferenciación el cambio morfológico de algunas células se hizo evidente a las 24-48 horas, momento en el que las células comenzaron a reducir su tamaño y a extender finas prolongaciones desde su citoplasma. Los cultivos se mantuvieron en medio de diferenciación glial durante 7 y 14 días, periodo durante en que las células maduraron y adquirieron una morfología totalmente bipolar. Este cambio morfológico fue más pronunciado en las fracciones Total y *Myf5*⁺ (paneles **D-F**, **Figura 1.10**).

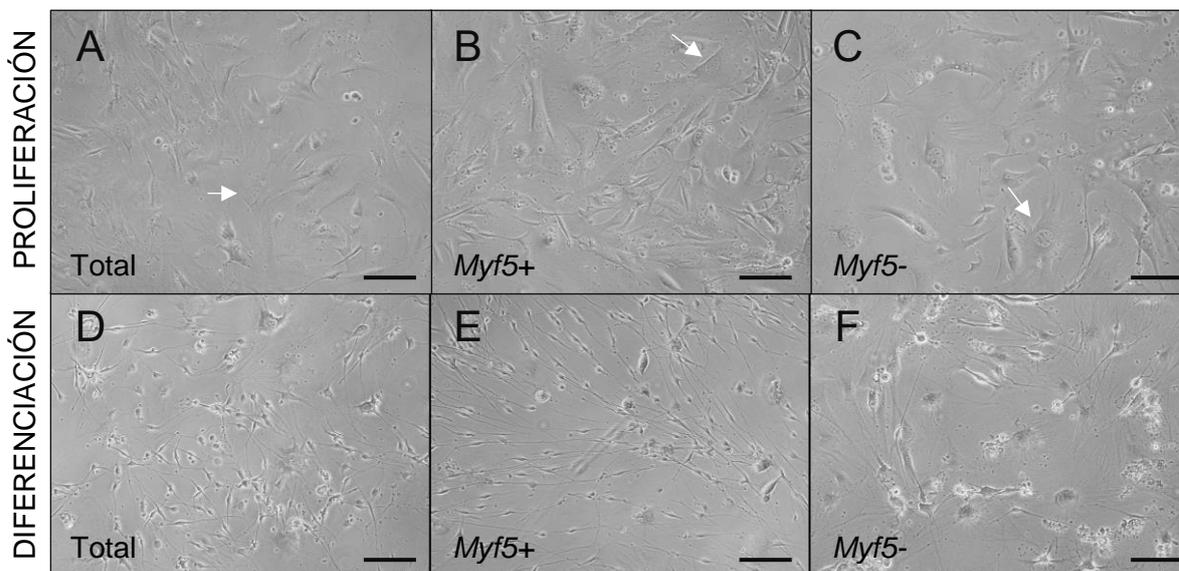


Figura 1.10. Cultivo en diferenciación de las fracciones *Myf5+* y *Myf5-* separadas por citometría de flujo. Las fracciones *Myf5+* y *Myf5-* se separaron por citometría de flujo a partir de esferas primarias derivadas de la línea transgénica *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*. Las fracciones separadas se sembraron junto a la fracción Total sobre cubres tratados con matriz de laminina y se dejaron crecer en medio de proliferación suplementado con 20% de suero (medio Joannides). Al alcanzar una confluencia del 70-80% la diferenciación se indujo cultivando las células en medio de diferenciación glial durante 7–14 días. **(A-C)** Durante la fase de proliferación se observaron células con aspecto de fibroblasto y células con citoplasma expandido y núcleo de gran tamaño (flechas blancas). **(D-F)** Tras el cambio de medio las células adquirieron progresivamente una morfología bipolar, reduciendo su tamaño y extendiendo largas prolongaciones citoplásmicas. Las barras de tamaño representan 50 μm en todos los paneles.

Para evaluar el fenotipo de las células diferenciadas, los cultivos se tiñeron por inmunofluorescencia con el anticuerpo específico de células gliales anti-GFAP. Adicionalmente, se utilizó el marcador β III tubulina para poder comparar los datos obtenidos en este ensayo, con los datos obtenidos previamente en los estudios en humano, en los que se utilizó el marcador β III tubulina para cuantificar las células diferenciadas. El marcador β III tubulina ha sido utilizado de forma preferente en la mayoría de estudios donde se ha analizado la capacidad de diferenciación de las SKPs. Con el objetivo de discriminar las células marcadas de forma inespecífica, además de la señal fluorescente se tuvo en cuenta la morfología de las células, considerando exclusivamente las células GFAP+ y β III tubulina+ con morfología bipolar.

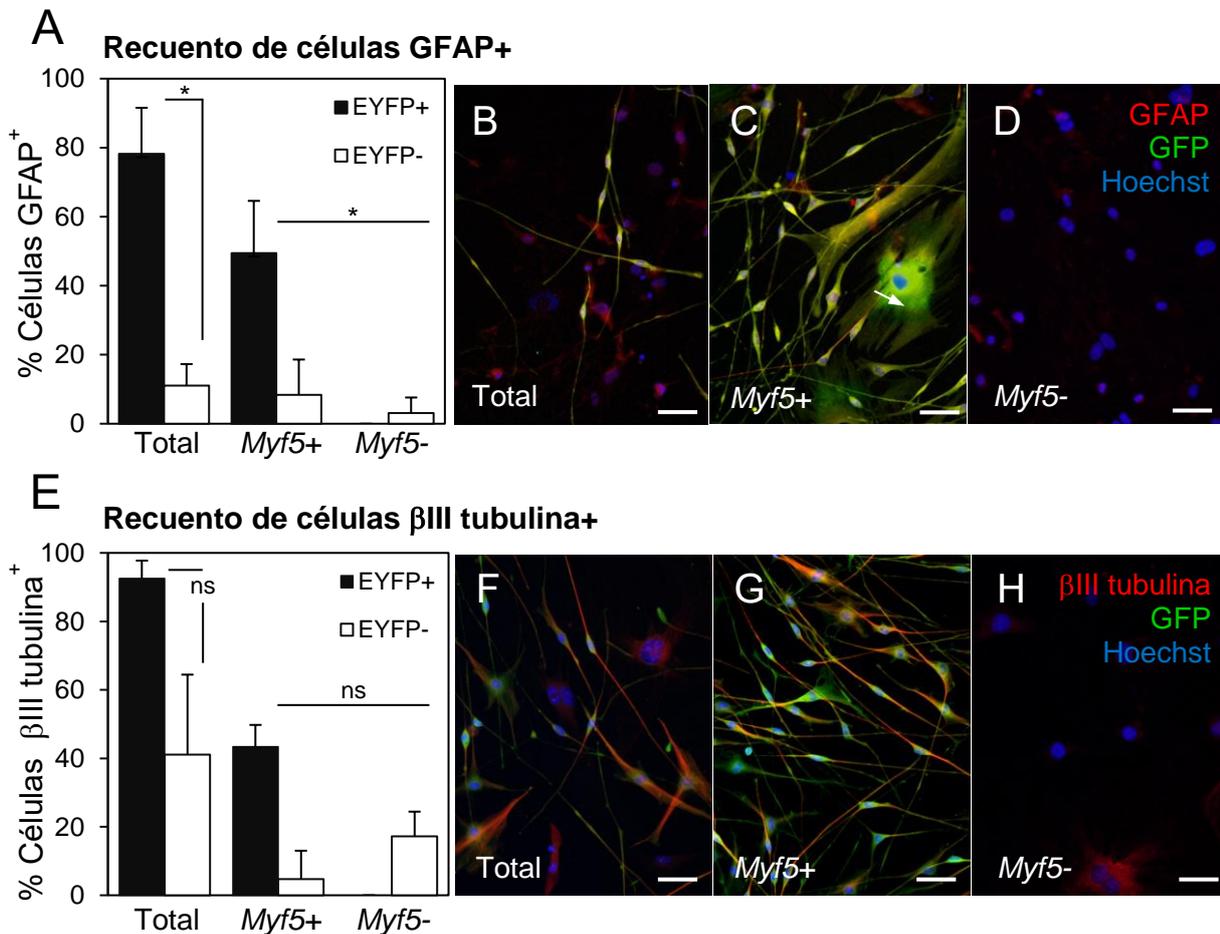


Figura 1.11. Análisis de la capacidad de diferenciación glial de las fracciones *Myf5* + y *Myf5* -. Las fracciones Total, *Myf5*+ y *Myf5*-, diferenciadas *in vitro* en medio de diferenciación de Schwann, se caracterizaron por inmunofluorescencia para analizar la expresión de marcadores específicos de diferenciación. A la izquierda, las gráficas **A** y **E**, representan el porcentaje de diferenciación de las fracciones Total, *Myf5*+ y *Myf5*-, calculado como el número de células GFAP+ (**A**, n=4) y β III tubulina+ (**E**, n=3), respecto al número de células EYFP. Se representa la media \pm la desviación estándar de la media. Los valores de significación estadística se calcularon mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores fueron, en **A**, $p=0,0286$ (*) para la comparación de EYFP+ vs EYFP- en la fracción Total, y $p=0,0286$ (*) para la comparación de EYFP+ (de la fracción *Myf5*+) vs EYFP- (de la fracción *Myf5*-). En **E**, $p=0,1$ (no significativo, ns) para la comparación de EYFP+ vs EYFP- en la fracción Total y $p=0,1$ (ns) para la comparación de EYFP+ (de la fracción *Myf5*+) vs EYFP- (de la fracción *Myf5*-). A la derecha, imágenes representativas de los cultivos teñidos por inmunofluorescencia con anti-GFAP (rojo, **B-D**) y β III tubulina (rojo, **F-H**). La expresión del gen reportero EYFP se detectó con el anticuerpo anti-GFP (verde). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258. Las barras de tamaño representan 50 μ m en todos los paneles.

La cuantificación de células GFAP+ [gráfica **A**, **Figura 1.11** (n=4)] y β III tubulina+ [gráfica **B**, **Figura 1.11** (n=3)], tanto en la fracción Total, como en las fracciones separadas *Myf5*+ y *Myf5*-, reveló que la población *Myf5*+ presentaba una mayor capacidad de diferenciación hacia linaje glial. En la fracción Total, un elevado porcentaje de células *Myf5*+ (EYFP+) se diferenció a células GFAP+ (78,32%) y β III tubulina+ (92,51%), en comparación al 11,06% (células GFAP+) y 41,07% (β III tubulina) observado en las células *Myf5*- (EYFP-). En la cuantificación realizada sobre las fracciones *Myf5*+ y *Myf5*-, el número de células positivas para GFAP y β III tubulina fue menor, debido probablemente al daño sufrido por las células durante la separación por citometría. Aun así, la población *Myf5*+ presentó un incremento significativo ($p=0,029$ *) de 16 veces en el número de células GFAP+ (49,42% vs 3,08%) y un aumento de 2,5 veces ($p=0,1$, no significativo) en el número de células β III tubulina+ (43,46% vs 17,22%). La mayoría de las células marcadas con los anticuerpos seleccionados, presentaban una morfología característica de células de Schwann crecidas en cultivo, aunque también se detectaron células con morfología de fibroblasto teñidas de forma no específica, las cuales fueron excluidas del recuento (flecha blanca panel **C**, **Figura 1.11**).

Además de los marcadores seleccionados para determinar el potencial de diferenciación, GFAP y β III tubulina, se analizó la expresión de varias proteínas asociadas con la identidad de las células de Schwann (**Figura 1.12**). La caracterización de la población *Myf5*+ demostró la expresión de los marcadores gliales S100 (paneles **M-P**, **Figura 1.12**) y p75NTR (paneles **A-D**, **Figura 1.12**), e incluso se observaron células positivas para el factor de transcripción y marcador de progenitor neural Sox2 (paneles **Q-T'**, **Figura 1.12**). En este caso, la señal de Sox2, se detectó de forma más intensa en las células con morfología bipolar y núcleos de menor tamaño (indicadas con flechas en el panel **T'**). El ensayo de diferenciación, demostró que las células *Myf5*+ eran las principales responsables del potencial glial observado en los cultivos derivados de la piel ventral, adquiriendo en cultivo un fenotipo correspondiente al de las células de Schwann. Además, la detección de Sox2 en algunas de estas células sugería que, en condiciones de diferenciación, parte de la población *Myf5*+ se mantenía en un estadio inmaduro (reprogramado).

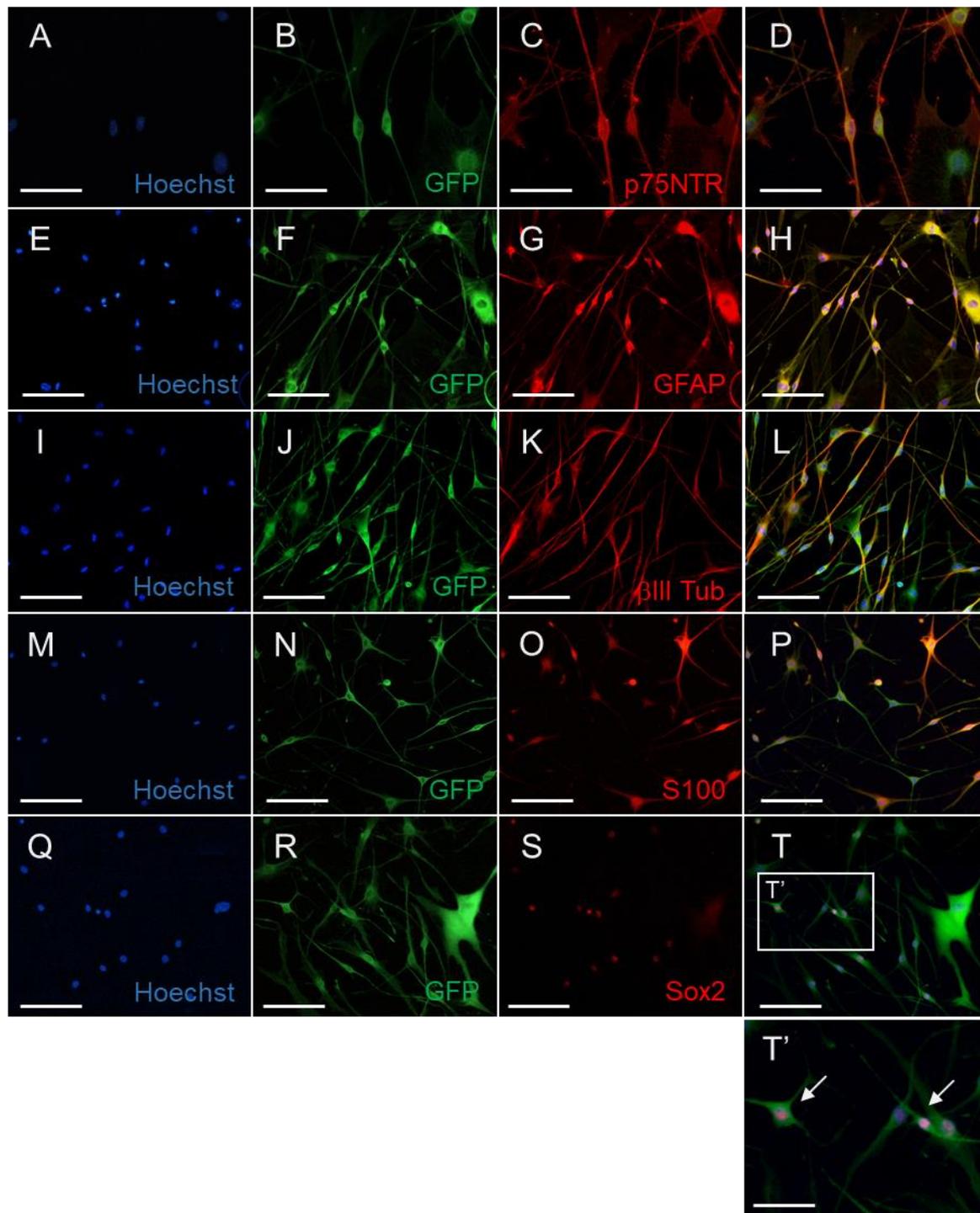
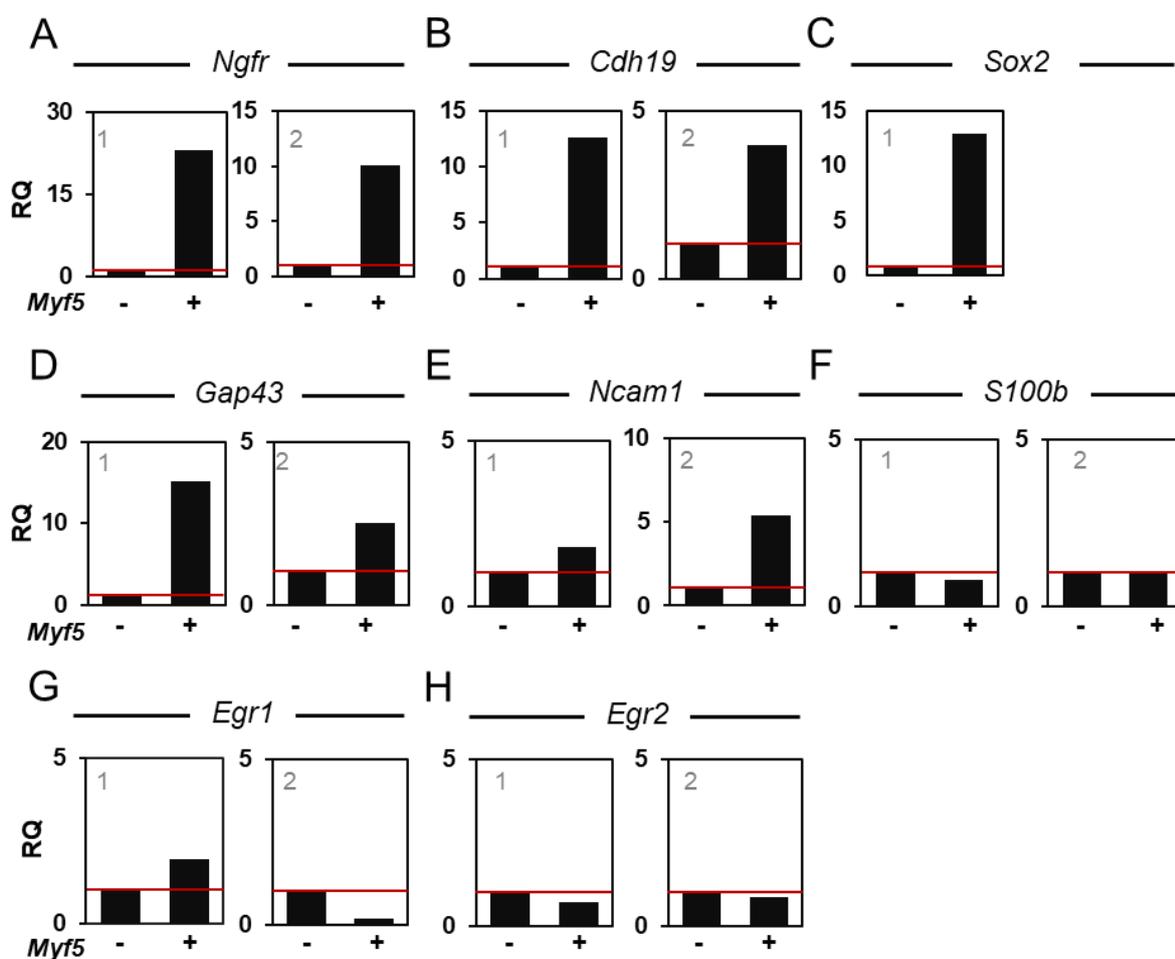


Figura 1.12. Caracterización de la fracción *Myf5*⁺ en el cultivo de diferenciación glial por inmunofluorescencia. Se analizó la expresión de varios marcadores relacionados con la identidad glial en cultivos diferenciados correspondientes a la fracción *Myf5*⁺. Las células se tiñeron con anti-GFP para detectar la expresión del gen reportero EYFP (verde, paneles **B**, **F**, **J**, **N** y **R**) y se combinaron con los marcadores p75NTR (rojo, panel **C**), GFAP (rojo, panel **G**), βIII-tubulina (rojo, panel **K**), S100 (rojo, panel **O**) y Sox2 (rojo, panel **S**). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 50 μm (E-T) y 25 μm (A-D y T').

Al igual que se hizo con la población *Myf5+* presente en los cultivos en suspensión, se quiso caracterizar el patrón de expresión de la población *Myf5+* tras su diferenciación *in vitro*. Para ello, se extrajo el ARN de las fracciones separadas y diferenciadas en condiciones de diferenciación glial, y se analizó la expresión de genes del linaje de Schwann por RT-qPCR (**Figura 1.13**).

El análisis reveló que las células diferenciadas presentaban un patrón de expresión correspondiente al de células de Schwann reprogramadas, similar al observado en las fracciones recién aisladas de los cultivos de esferas (ver **Figura 1.9**). Así, en los cultivos diferenciados de la fracción *Myf5+*, los genes *Ngfr*, *Cadh19*, *Sox2* y *Gap 43* estaban sobreexpresados respecto a la muestra de referencia (*Myf5-*). En este caso, a excepción del gen *Sox2*, los niveles de expresión (RQ) para los distintos genes fueron considerablemente menores que los detectados en las fracciones recién separadas (paneles **A**, **B**, **C** y **D**, **Figura 1.13**). Debido a error técnico durante la realización del ensayo, el análisis de expresión de *Sox2* solo pudo llevarse a cabo en una de las dos muestras. Por otro lado, la expresión del resto de genes analizados, *Egr1*, *Ncam1*, *S100b* y *Egr2*, se mantuvo en un rango de valores parecido al del análisis inicial de las fracciones, donde *Ncam1* y *Egr1* se sobreexpresaban ligeramente respecto a la fracción *Myf5-* (paneles **E** y **G**, **Figura 1.13**), y no se detectaban diferencias en los niveles de expresión de los genes *S100β* y *Egr2* (paneles **F** y **H**, **Figura 1.13**).



Cuantificación relativa (RQ); Fracción *Myf5+* vs *Myf5-*

	<i>Ngfr</i>	<i>Cdh19</i>	<i>Sox2</i>	<i>Gap43</i>	<i>Ncam1</i>	<i>S100B</i>	<i>Egr1</i>	<i>Egr2</i>
1	23,05	12,63	12,88	15,14	1,78	0,81	1,95	0,75
2	10,14	3,99	-	2,51	5,36	1,00	0,19	0,87

Figura 1.13. Análisis de expresión de genes del linaje de Schwann en la fracción *Myf5+* en el cultivo de diferenciación glial. Los niveles de ARNm de los marcadores de Schwann seleccionados se determinaron por RT-qPCR en las fracciones *Myf5+* y *Myf5-* separadas y cultivadas en condiciones de diferenciación glial. (A-H) Los valores de cuantificación relativa (RQ) calculados con respecto a la muestra de referencia (fracción *Myf5-*). El valor RQ=1 se indica con una línea roja. El gen *Hprt* se utilizó como gen endógeno para la normalización de los valores Cq. Se analizaron dos muestras independientes (identificadas como 1 y 2), cada una de las cuales se representa en una gráfica. (I) Tabla con los valores RQ de la fracción *Myf5+* en las muestras 1 y 2.

1.1.4 Análisis de la localización de las células *Myf5-Cre^{Sor}+* en piel ventral de ratón

Los ensayos llevados a cabo con las células aisladas de la piel ventral de la línea transgénica *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* demostraron que la capacidad de diferenciación neural residía principalmente en la fracción *Myf5+*, y que esta población presentaba en cultivo un fenotipo semejante al de las células de Schwann. En este punto, y con el objetivo de identificar la población celular responsable del

potencial neural obtenido en los cultivos *in vitro* y confirmar, si al igual que en el ser humano, estas células se correspondían con las células de Schwann residentes en la piel, se analizaron *in situ* las poblaciones trazadas por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}*. Se analizaron preparaciones de tejido dérmico completo y secciones de piel ventral obtenida de las líneas transgénicas *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* y *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}*, utilizando anticuerpos específicos para la identificación de distintos tipos celulares. En la línea *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* no fue necesario utilizar anticuerpos para el marcaje del reportero TdTomato, ya que, al contrario que el reportero EYFP, la fijación del tejido no altera la conformación de la proteína TdTomato y la emisión de señal fluorescente no se ve afectada. En la línea *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* la detección de la proteína EYFP se realizó con el anticuerpo anti-GFP, tal y como se había hecho en la caracterización de los cultivos.

Tras un análisis exhaustivo de las muestras se determinó que las células *Myf5+* se localizaban principalmente en 5 compartimentos; (1) en el Panículo Carnoso, (2) en el plexo nervioso sub-epidérmico, (3) en el plexo nervioso subcutáneo, (4) en las células gliales del complejo Lanceolado y (5) en los melanocitos ubicados en el la matriz del folículo piloso. Ocasionalmente, las células *Myf5+* se observaron en localización perivascular y en células asociadas a una población SOX2+ de la membrana basal. Los compartimentos dérmicos en los que se detectó expresión correspondiente a *Myf5-Cre^{Sor}* se describen más en detalle en los siguientes subapartados.

1.1.4.1 Músculo panículo carnoso

El marcaje del panículo carnoso se detectó desde los primeros análisis, debido a que la expresión del reportero se observó de forma consistente a lo largo de toda la región subcutánea (Panel **A**, **Figura 1.14**). Este marcaje fue asociado inmediatamente con el panículo carnoso, una capa de músculo esquelético presente en la piel de los mamíferos y localizada en el tejido subcutáneo, por encima de la fascia superficial (Langworthy, 1925). Teniendo en cuenta que el factor de transcripción *Myf5* es un factor regulador de la miogénesis (MRF) y se expresa en células destinadas al linaje de músculo esquelético (Braun y cols., 1989), era esperado que las líneas transgénicas *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}* y *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* expresaran los reporteros TdTomato y EYFP en la musculatura esquelética presente en la piel (Naldaiz-Gastesi y cols., 2016). Los análisis realizados sobre cortes de piel ventral de la línea *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*, mostraron el panículo carnoso como un conjunto de paquetes musculares compactos, de tamaño variable y dispuestos de forma paralela (Panel **B**, **Figura 1.14**). Alrededor de cada una de las fibras se pudo distinguir una fina capa de laminina (panel **C**, **Figura 1.14**), uno de los principales componentes de la membrana basal que rodea el sarcolema. En las regiones cercanas al panículo carnoso se observaron con frecuencia nervios de gran calibre pertenecientes al plexo nervioso subcutáneo (flechas blancas en los paneles **B** y **C**). El análisis a mayores aumentos de las secciones de piel (panel **D**, **Figura 1.14**), permitió apreciar las estriaciones propias de las fibras musculares esqueléticas, así como la posición de los mionúcleos en la periferia de las fibras positivas para *Myf5* (cabezas de flechas en el panel **D**).

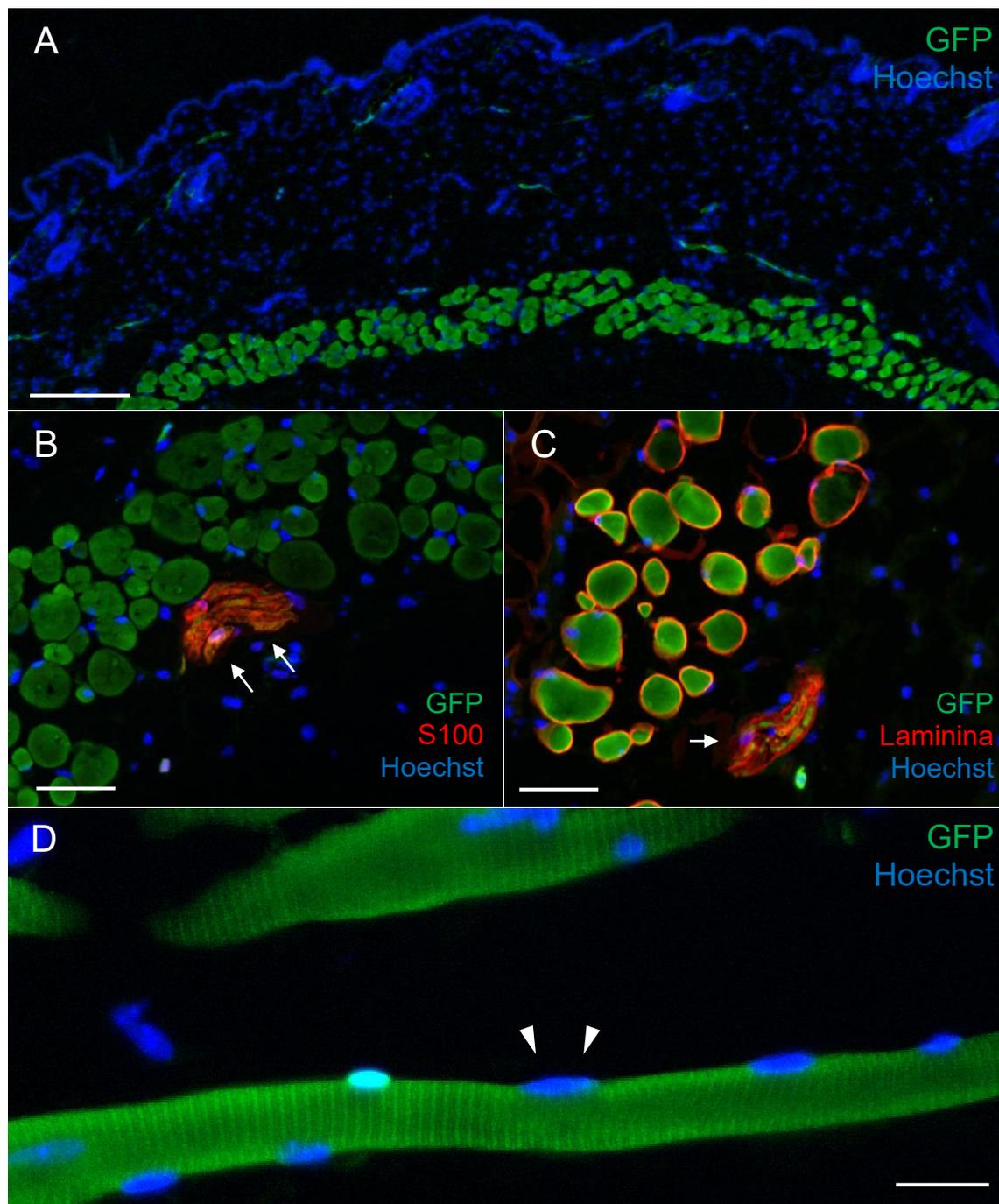


Figura 1.14. Expresión de *Myf5-Cre^{Sor}* en el panículo carnoso. Caracterización de cortes de piel ventral de *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* por inmunofluorescencia. (A) La expresión de *Myf5* se observó a lo largo de toda la capa de músculo esquelético subcutáneo denominado panículo carnoso. (B) Corte transversal de los paquetes musculares (verde, GFP+), localizados sobre un haz nervioso (flechas en B y C) positivo para S100 (rojo). (C) Las fibras del panículo carnoso aparecen cubiertas individualmente por matriz extracelular rica en laminina (rojo). (D) Imagen detallada de las fibras donde se aprecian las estriaciones propias de los filamentos intermedios y los núcleos localizados en la periferia de la fibra (cabezas de flecha). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 100 μm (A), 25 μm (B-C) y 10 μm (D).

1.1.4.2 Plexo nervioso subepidérmico

Las células *Myf5*⁺ que conforman el plexo nervioso subepidérmico se detectaron inicialmente en cortes de piel ventral de la línea *Myf5*^{CreSor/R26}^{TdTomato}, distribuidas a lo largo de toda la dermis papilar y con un aspecto fibrilar similar al de las terminaciones nerviosas superficiales (panel **A**, **Figura 1.15**). Algunas de las células *Myf5*⁺ localizadas bajo la epidermis, extendían largos procesos citoplasmáticos y adquirían una morfología característica de células de Schwann terminales (panel **B**, **Figura 1.15**), descritas por el grupo de Piotr Topilko (Gresset y cols., 2015). La función de estas células es cubrir los nervios que alcanzan la unión dermo-epidérmica y penetran como terminales desnudos en las capas más profundas de la epidermis (Hendrix y cols., 2008; Peters y cols., 2002). La distribución espacial de las células *Myf5*⁺ se pudo apreciar con claridad en preparaciones de tejido completo, donde células multipolares formaban una fina red sub-epidérmica (panel **C**, **Figura 1.15**) y se asociaban a axones periféricos positivos para NF200 (panel **D**, **Figura 1.15**). La población *Myf5*⁺ localizada en la dermis papilar expresó los marcadores gliales p75NTR (Panel **E**, **Figura 1.15**) y S100 (Panel **F**, **Figura 1.15**), e incluso se detectó un subgrupo de células positivas para el factor de transcripción SOX10 (paneles **G-G'**, **Figura 1.15**).

La caracterización de las células *Myf5*⁺ se completó analizando la expresión del marcador MBP (siglas en inglés, *myelin binding protein*), para definir el tipo de célula de Schwann trazada por el constructo. La interpretación inicial de los resultados resultó confusa, ya que la señal del reportero y el marcaje con anti-MBP colocalizaban en los nervios, donde las células estaban fuertemente empaquetadas y el patrón citoplasmático de MBP dentro de las células *Myf5*⁺ resultaba difícilmente distinguible. Aun así, tras la observación detallada de varias preparaciones, se pudo concluir que la línea *Myf5*-*Cre*^{Sor} trazaba células de Schwann mielinizantes (flechas en panel **H**, **Figura 1.15**) y no-mielinizantes (panel **I**, **Figura 1.15**).

Así, en cortes de piel ventral de la línea *Myf5*^{CreSor/R26}^{EYFP} la proteína MBP se detectó en el citoplasma de algunas células *Myf5*⁺ (GFP⁺) (flechas discontinuas, panel **H**), las cuales representaban células de Schwann mielinizantes trazadas por el constructo. Por otro lado, en secciones de piel de la línea *Myf5*^{CreSor/R26}^{TdTomato}, un subgrupo de células *Myf5*⁺ se detectaron en asociación a células MBP⁺ (verde) la cuales no expresaban TdTomato, es decir, eran negativas para *Myf5*. Este resultado sugería que no todas las células de Schwann trazadas por la línea *Myf5*-*Cre*^{Sor} son mielinizantes, puesto que no expresaban el marcador de mielina MBP, y que algunas células de Schwann no son trazadas por el constructo.

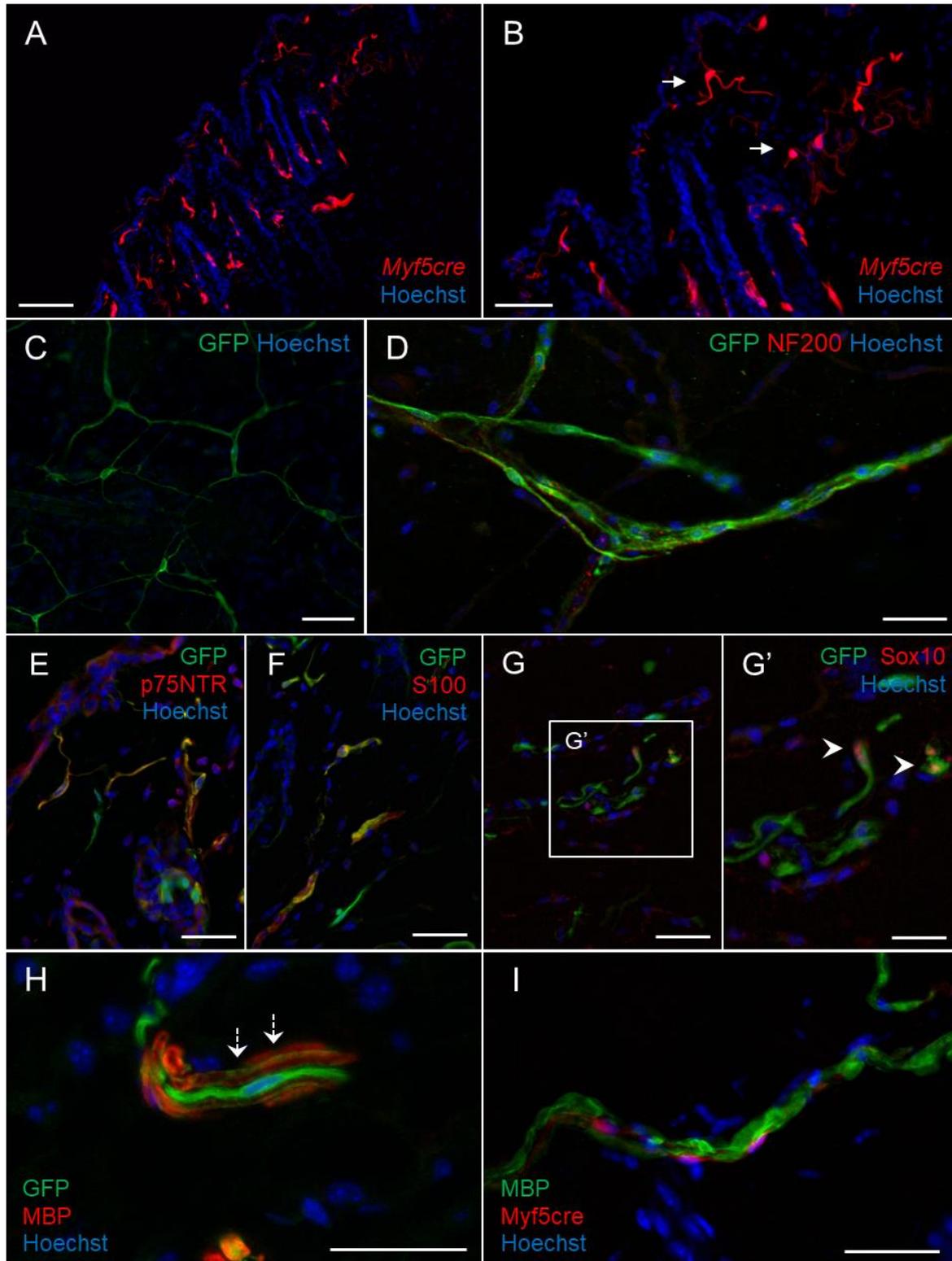


Figura 1.15. Expresión de *Myf5-Cre^{Sor}* en el plexo nervioso subepidérmico. Se analizaron preparaciones de tejido dérmico completo y secciones de piel ventral extraídas de ratones *Myf5^{cre/+}/R26^{EYFP}* y *Myf5^{cre/+}/R26^{TdTomato}*. (A-B) Los cortes de piel ventral de la línea transgénica *Myf5^{cre/+}/R26^{TdTomato}* se analizaron directamente en el microscopio. Estas muestras revelaron la existencia de células *Myf5*+ (rojo, TdTomato+) con morfología fibrilar distribuidas a lo largo de la dermis papilar (flechas blancas en B). (C) En las

preparaciones de dermis completa obtenidas de la línea *Myf5^{cre/+}/R26^{EYFP}* se observaron células *Myf5+* (verde, GFP+) formando una red de células multipolares interconectadas. (D) Las células *Myf5+* (verde, GFP+) junto a axones periféricos NF200+ (rojo). (E-F) En secciones de piel ventral de *Myf5^{cre/+}/R26^{EYFP}* las células *Myf5+* que conformaban el plexo sub-epidérmico se marcaron con p75NTR (rojo, E), S100 (rojo, F) y SOX10 (rojo, G y G'). Los núcleos SOX10+ se indican con cabezas de flecha en el panel G'. (H) En cortes de piel de *Myf5^{cre/+}/R26^{EYFP}* la proteína básica de la mielina (MBP, rojo) se marcó intensamente en el citoplasma de algunas células *Myf5+* (señaladas con flechas discontinuas) y se localizaron junto a células GFP+/MBP-. (I) Preparaciones de dermis completa de la línea *Myf5^{cre/+}/R26^{TdTomato}*. La señal de MBP (verde) no se expresó en células adyacentes a células *Myf5+* (rojo, TdTomato+). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 50 μm (A, C y D), 25 μm (B), 20 μm (E, F, G, H y I) y 10 μm (G').

1.1.4.3 Plexo nervioso subepidérmico grueso

Además de las células gliales del plexo nervioso superficial, se detectaron células *Myf5+* en los haces nerviosos que inervan las áreas más profundas de la dermis y la hipodermis. Estos nervios de mayor calibre forman parte de los plexos nerviosos cutáneo y subcutáneo, y se localizan con frecuencia en regiones próximas al panículo carnoso (flechas blancas en la **Figura 1.16**). La estructura de los haces nerviosos se pudo apreciar con claridad en preparaciones de tejido dérmico completo (panel A) y en secciones de piel ventral (panel B y B') donde las células *Myf5+* (GFP+) se alineaban con axones NF200+ (**Figura 1.16**). El análisis de expresión de varios marcadores demostró que muchas de las células *Myf5+* en los haces nerviosos expresaban los marcadores de Schwann p75NTR (panel C, **Figura 1.16**), S100 (panel D, **Figura 1.16**) y también el factor de transcripción Sox10 (paneles E, **Figura 1.16**). Aun así, en algunas muestras, las células *Myf5+* de los haces nerviosos no parecían corresponderse con células de Schwann sino con células neuronales, ya que se marcaron con los anticuerpos específicos de neurona PGP9.5 y NF200 (paneles F y G, **Figura 1.16**). Este patrón de expresión, observado de forma puntual, fue confirmado en secciones de piel teñidas con la proteína MBP, ya que se pudieron distinguir células *Myf5+* (GFP+) rodeadas por densas vainas de mielina (MBP+), una conformación propia de las fibras que componen los nervios periféricos (panel H, **Figura 1.16**). Aunque algunas de las fibras dentro de los haces nerviosos eran GFP+ (cabezas de flecha en el panel H), no todas las fibras dentro del mismo haz nervioso estaban marcadas, y por eso en algunos puntos las vainas de mielina (MBP+) se encontraban rodeando estructuras "vacías" (flechas en el panel H). Este resultado indicaba que el constructo *Myf5-Cre^{Sor}* trazaba parcialmente las prolongaciones axonales que forman parte de los nervios de la piel.

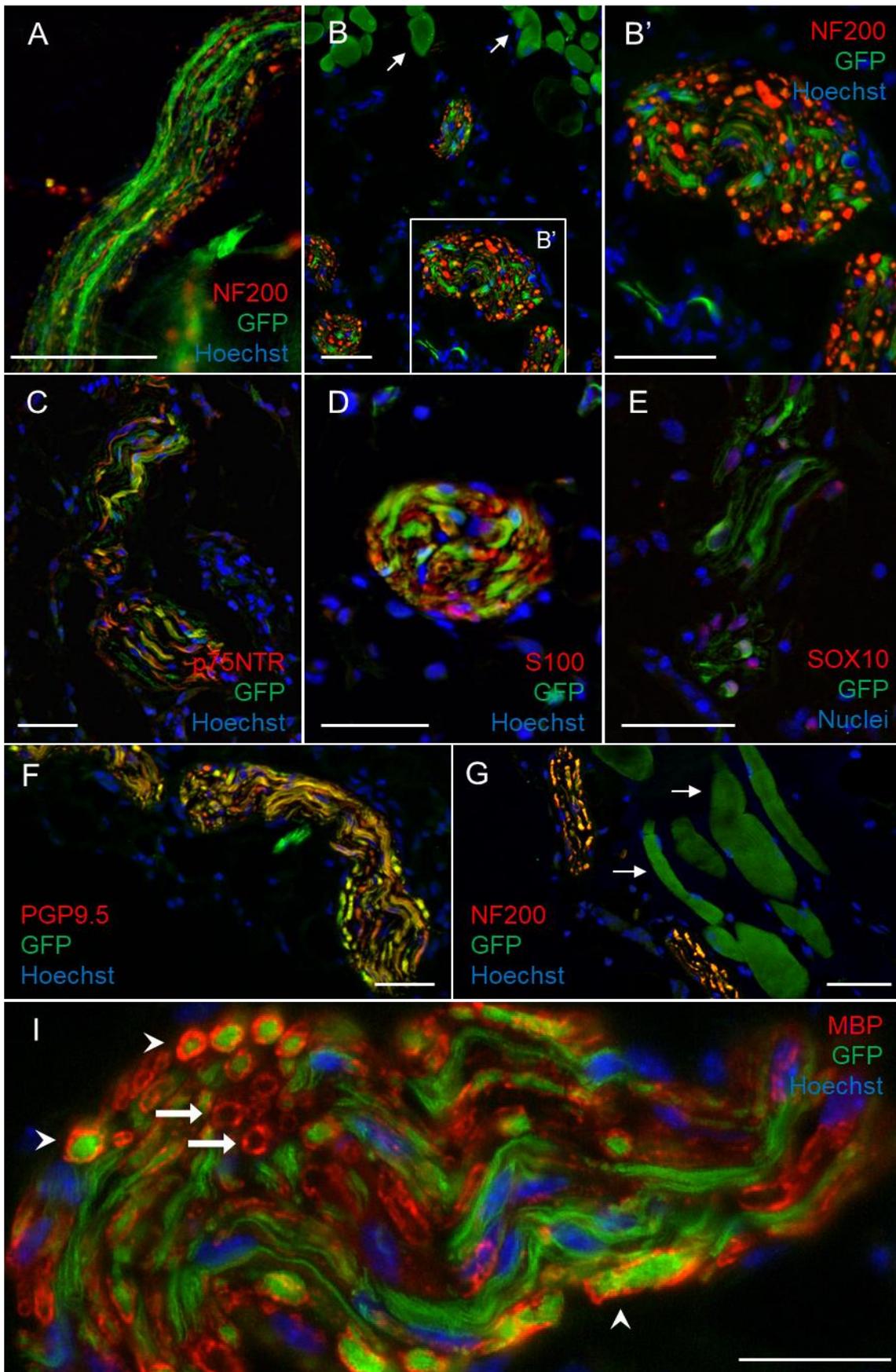


Figura 1.16. Expresión de *Myf5-Cre^{Sor}* en los haces nerviosos localizados a la altura del panículo carnoso. Caracterización de secciones de piel y preparaciones de piel completa de la línea transgénica *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* por inmunofluorescencia. La expresión del reportero EYFP se analizó en todas las muestras con el anticuerpo anti-GFP (verde). (A) Tinción de tejido dérmico completo y (B-B') secciones de piel ventral donde los axones periféricos NF200+ (rojo) de los haces nerviosos subcutáneos se asocian a células *Myf5*+ (verde, GFP+). (C-E) Las células *Myf5*+ en los nervios localizados bajo el panículo carnoso fueron positivas para p75NTR (rojo, C), S100 (rojo, D) y el factor de transcripción SOX10 (rojo, E). (F-H) Las fibras nerviosas en los haces subcutáneos trazadas por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}* (GFP+, verde) se tiñeron con los marcadores neuronales PGP9.5 (F) y NF200 (G). (H) Algunas células *Myf5*+ estaban rodeadas por una vaina de mielina positiva para MBP (cabezas de flecha en H) y en el mismo haz nervioso, algunas las prolongaciones nerviosas no se marcaron con el reportero EYFP (fechas en H). La expresión de *Myf5* en el panículo carnoso (verde, GFP+) se indica con flechas blancas en los paneles B y F. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 50 μ m (A-G) y 25 μ m (H).

Adicionalmente, y en relación a la expresión de *Myf5* en las prolongaciones axonales de los haces nerviosos, la señal de *Myf5* se detectó en asociación a células SOX2+ localizadas en la epidermis (Figura 1.17). En base a su posición y a la expresión de SOX2, estas células fueron identificadas como células de Merkel, células especializadas que forman junto a las fibras aferentes receptores sensoriales que participan en la percepción del tacto (Haeberle y Lumpkin, 2008; Maksimovic y cols., 2014; Maricich y cols., 2009). En este compartimento, la morfología de las células de *Myf5*+ (GFP) se correspondía con el de las fibras sensoriales que crean sinapsis con las células Sox2+ alineadas debajo de la epidermis.

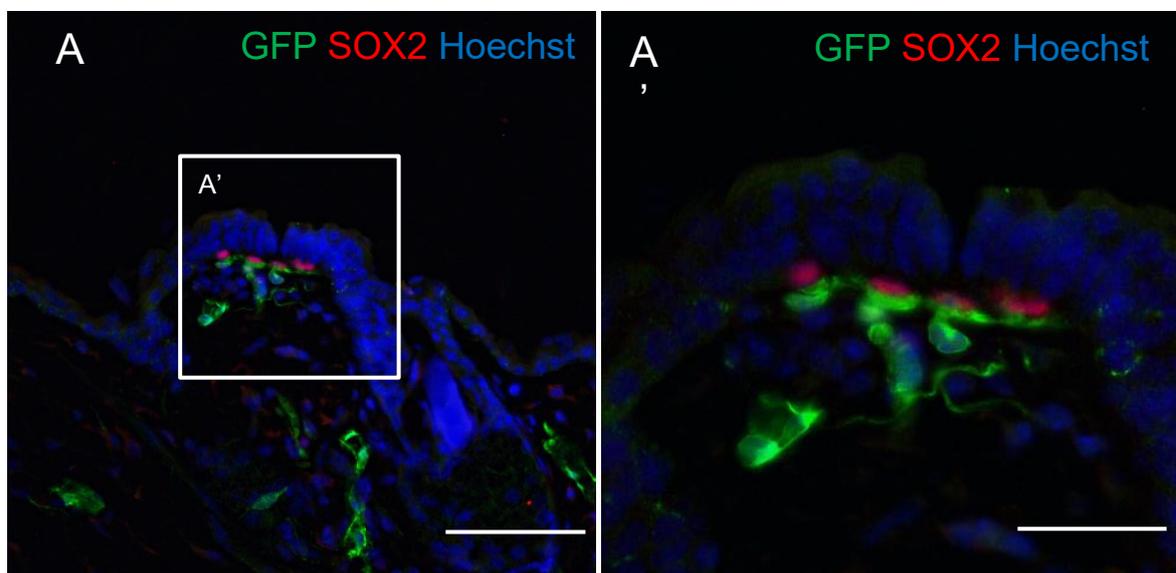


Figura 1.17. Identificación de células *Myf5-Cre^{Sor}*+ asociadas a células SOX2+ subepidérmicas. La expresión de *Myf5* se analizó en cortes de piel ventral de *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*. (A-A') Las células *Myf5*+ (verde, GFP+) se detectaron en asociación a células SOX2+ (rojo) localizadas justo debajo de la epidermis. La morfología y la localización de las células *Myf5*+ se correspondía con las fibras aferentes que se unen a las células de Merkel para conformar receptores para la percepción mecánica. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258. Las barras de tamaño representan 50 μ m (A) y 20 μ m (A').

1.1.4.4 Las células gliales del complejo Lanceolado

De acuerdo con el marcaje observado en otras poblaciones de células de Schwann, la señal de GFP (Myf5) se detectó también en las células de Schwann terminales del complejo lanceolado, un órgano sensorial asociado al folículo piloso (**Figura 1.18**). El complejo Lanceolado está formado por un conjunto de distintas fibras sensitivas que rodean los folículos a la altura de la protuberancia y se asocian a células de Schwann especializadas (denominadas en inglés, *terminal Schwann cells*, TSC) para conformar receptores cutáneos responsables de percibir estímulos mecánicos (Li y Ginty, 2014; Li y cols., 2011).

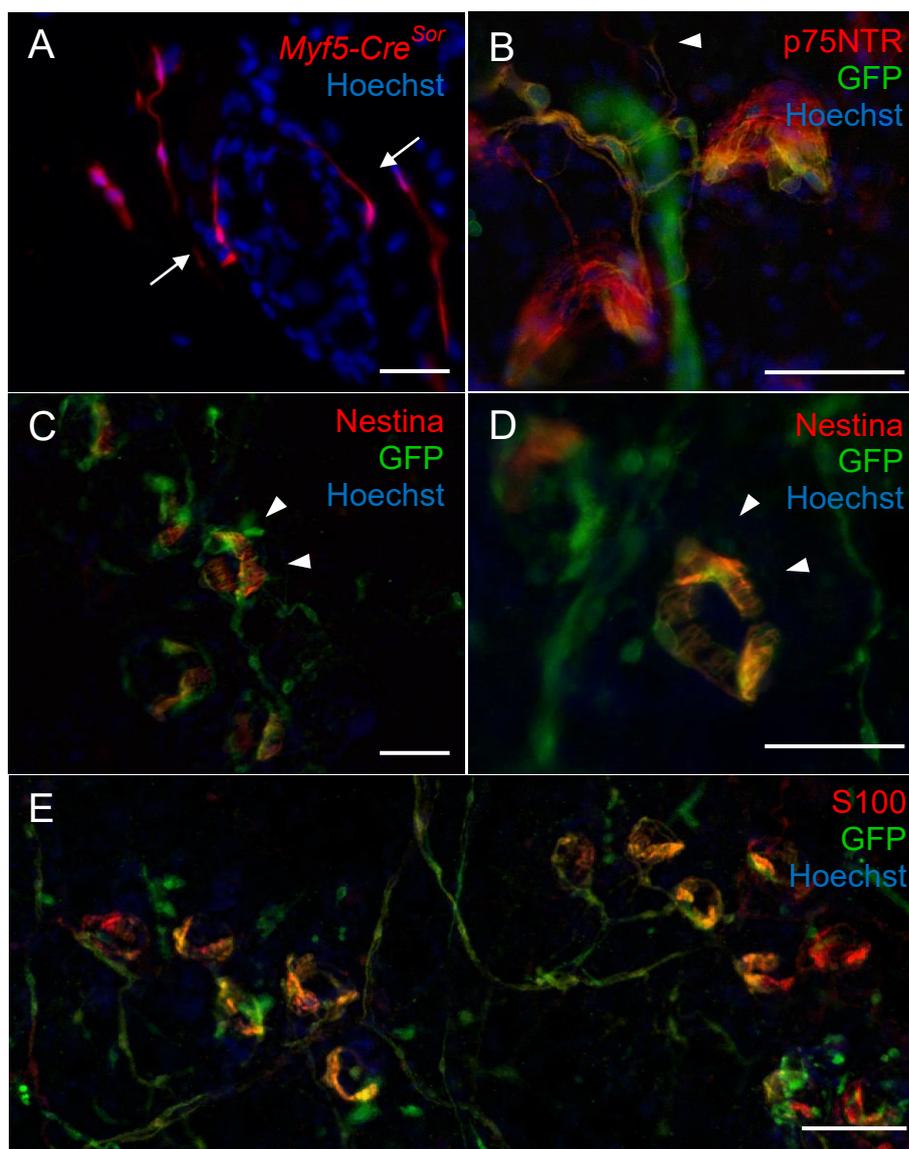


Figura 1.18. Expresión de *Myf5-Cre^{Sor}* en las células de Schwann del complejo Lanceolado. Caracterización de muestras de piel ventral de las líneas transgénicas *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* y *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}* por inmunofluorescencia. (A) El análisis de secciones de piel ventral de la línea *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}* mostró la expresión de *Myf5* (rojo, TdTomato+) en células dispuestas alrededor del

folículo piloso (flechas blancas). **(B-E)** Preparaciones de tejido dérmico completo de *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* donde las células *Myf5+* (verde, GFP+) presentaban prolongaciones en forma de dedo (cabezas de flecha, **B-D**) y expresaban los marcadores p75NTR (rojo, **B**), Nestina (rojo, **C** y **D**) y S100 (rojo, **E**). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 25 μm (A-D) y 50 μm (E).

Las células *Myf5+* (TdTomato+) se detectaron inicialmente a la altura de la protuberancia en estructuras no definidas que rodeaban el folículo piloso (flechas blancas en el panel **A**, **Figura 1.18**). El análisis de preparaciones de tejido completo permitió examinar la distribución de esta población *Myf5+* y apreciar su peculiar morfología, caracterizada por presentar un cuerpo celular ovalado y extender finas prolongaciones citoplasmáticas con forma de dendrita en paralelo al eje longitudinal del folículo (cabezas de flechas en los paneles **B**, **C** y **D**, **Figura 1.18**). La identidad de las células *Myf5+* se confirmó al teñir las células con los anticuerpos específicos p75NTR (panel **B**), Nestina (paneles **C** y **D**) y S100 (panel **E**, **Figura 1.18**), marcadores expresados por las células de Schwann del complejo Lanceolado (Li y Ginty, 2014). Además, estas preparaciones permitieron analizar la distribución de las células *Myf5+* en el plexo nervioso subepidérmico, donde las células se conectaban en red para extenderse entre las distintas estructuras inervadas por las fibras del sistema nervioso periférico (SNP) (panel **B** y **E**, **Figura 1.18**).

1.1.4.5 Compartimento superior de la papila dérmica del folículo piloso

Otra de las localizaciones en las que se observaron células derivadas del linaje *Myf5* fue la matriz del folículo piloso. En este compartimento se encuentran los melanocitos encargados de sintetizar la melanina que aporta color a la fibra capilar (Slominski y cols., 2005). Las células marcadas por el reportero TdTomato (**Figura 1.19**) fueron asociadas inicialmente con los melanocitos residentes en el folículo, por eso, para comprobar la identidad de esta población, se realizaron tinciones con marcadores específicos de linaje; Trp-2 y c-kit. Sin embargo, a pesar de que ambos marcadores fueron testados con varios protocolos, ninguna de las tinciones funcionó y no se pudo confirmar la identidad de esta subpoblación *Myf5+*. Aun así, la ubicación, la morfología y la presencia de partículas de melanina en el mismo compartimento (flechas en el panel **A-A'**, **Figura 1.19**) sugerían que las células *Myf5+* de la matriz del folículo piloso se correspondían con los melanocitos foliculares.

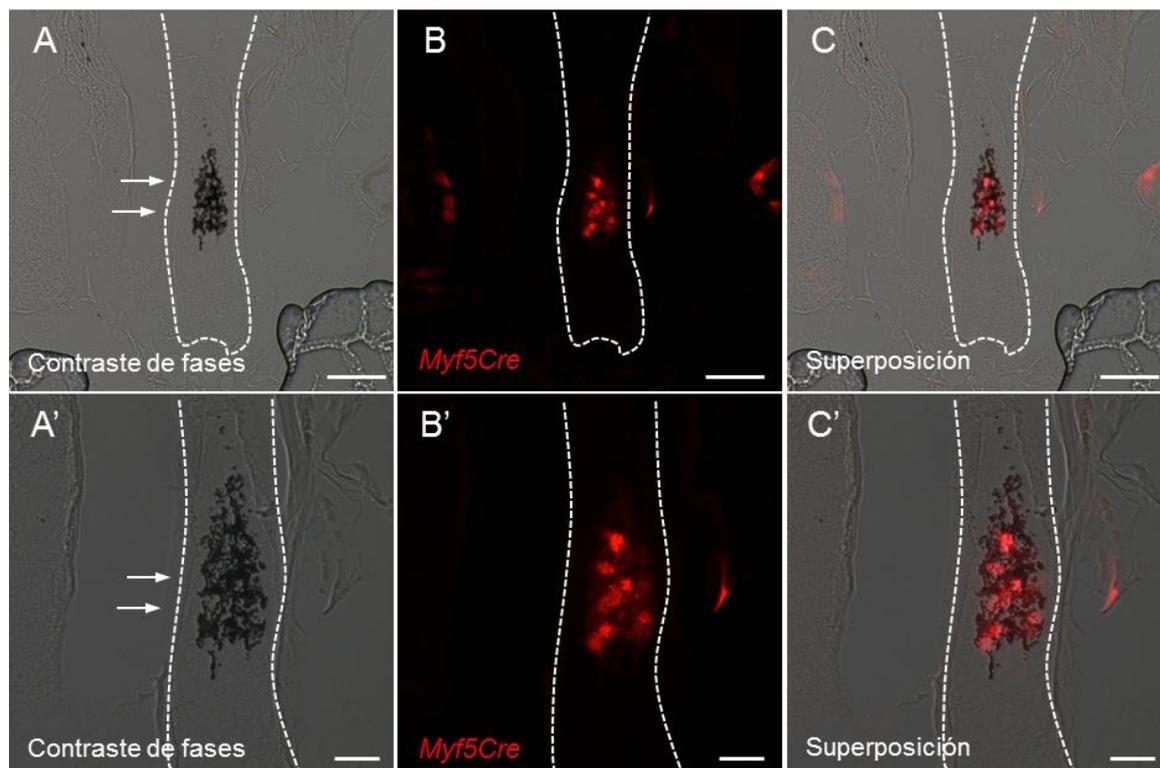


Figura 1.19. Expresión de *Myf5-Cre^{Sor}* en el compartimento superior de la papila dérmica. La expresión de *Myf5-Cre^{Sor}* (TdTomato+) se analizó en cortes de piel ventral del ratón *Myf5^{Cre}/R26^{TdTomato}*. (**A** y **A'**) Imágenes de campo claro con contraste de fases donde se aprecian las vesículas de melanina (melanosomas) secretadas por los melanocitos en la matriz del folículo piloso (flechas blancas en **A** y **A'**). (**B** y **B'**) Las células *Myf5*+ (rojo, TdTomato+) se localizaron en el compartimento superior de la papila dérmica junto a las partículas de melanina. Los paneles **C** y **C'** muestran la superposición de los canales. Las barras de tamaño representan 25 μm (A-C) y 10 μm (A'-C').

1.1.4.6 Las células *Myf5*+ se encuentran ocasionalmente en localización perivascular

Además de los compartimentos en los que frecuentemente se detectaba la expresión correspondiente al constructo *Myf5-Cre^{Sor}*, puntualmente se observaron células *Myf5*+ en localización perivascular. Esta población se detectó inicialmente alrededor de vasos positivos para CD31 (panel **A**, **Figura 1.20**) y mostró un fenotipo consistente con el de las células perivasculares. En cortes de piel de ratones *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* las células *Myf5*+ representaban un pequeño porcentaje de las células PDGFRb+ que se encontraban rodeando los los vasos (panel **B** y **B'**, **Figura 1.20**). La conformación espacial de estas células se pudo apreciar en preparaciones de tejido completo, donde se detectó un subgrupo de células *Myf5*+ positivas para el marcador SMA (siglas en inglés de, *smooth muscle actin*) con una conformación helicoidal muy compacta, alrededor de lo que se intuía como un vaso (cabezas de flecha, panel **C** y **D**, **Figura 1.20**).

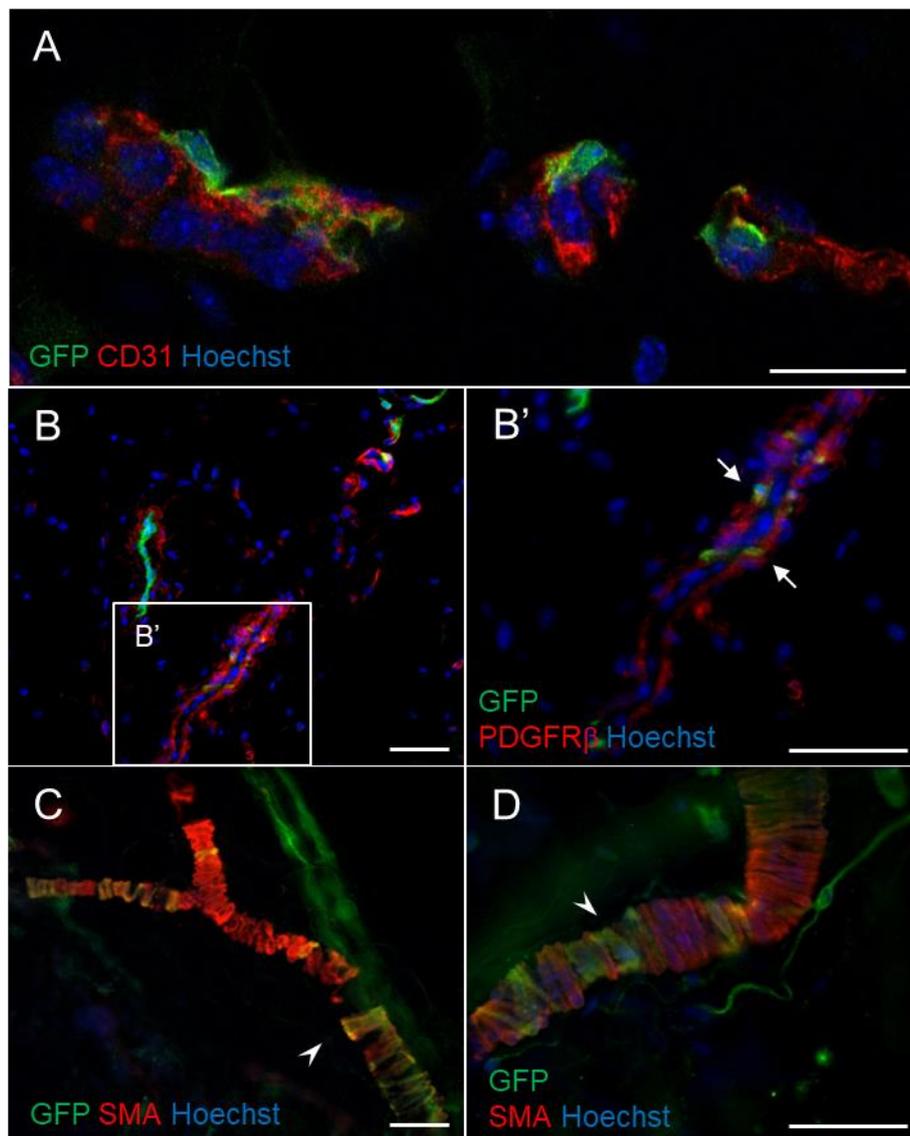


Figura 1.20. Expresión de *Myf5-Cre^{Sor}* en células perivasculares. Análisis por inmunofluorescencia de secciones de piel ventral de la línea transgénica *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*. (A) Las células *Myf5*+ (verde, GFP+) se detectaron alrededor de un vaso sanguíneo CD31+ (rojo). (B y B') Algunas de las células *Myf5*+ (verde, GFP+) que rodeaban estructuras vasculares co-expresaban el marcador de pericito PDGFRβ+ (rojo, flechas en B'). (C y D) Preparaciones de tejido dérmico completo donde un subgrupo de células *Myf5*+ (verde, GFP+) expresaban el marcador de músculo liso αSMA (rojo) y presentaban una conformación propia de las células perivasculares (cabezas de flecha en C y D). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 25 μm (A) y 50 μm (B-D).

La caracterización del constructo *Myf5-Cre^{Sor}* demostró que la población *Myf5*+ en piel ventral se correspondía principalmente con las células de Schwann, aunque también trazaba otras poblaciones derivadas de la cresta neural, como los melanocitos de la matriz del folículo piloso o las prolongaciones axonales de los plexos nervios cutáneos. De forma puntual, las células *Myf5*+ marcaron también células en localización perivascular.

1.2 Estudios de trazado de linaje en la línea transgénica *BAP195^{Cre}*

Los resultados obtenidos con la línea *Myf5-Cre^{Sor}* confirmaban los resultados publicados previamente por nuestro grupo, en los que se demostró que las células con potencial neural aisladas de la piel humana pertenecen al linaje de Schwann (Etxaniz y cols., 2014). Adicionalmente, estos datos indicaban que las células gliales residentes en la piel procedían de un origen embrionario distinto al de la cresta neural y se generaban a partir de precursores mesodérmicos *Myf5+*. Este resultado encajaba con estudios que afirmaban que las precursoras con potencial neural aisladas de la piel troncal (SKPs) derivan del mesodermo (Jinno y cols., 2010; Krause y cols., 2014). Sin embargo, el trazado de las células de Schwann por expresión del gen miogénico *Myf5* era inesperado, ya que está ampliamente demostrado que las células de Schwann se originan en la cresta neural (Douarin y Kalcheim, 1999, 1999; Jessen y Mirsky, 2005; Jessen y cols., 2015a; Le Douarin y cols., 2004). Por eso, se quiso afianzar el resultado obtenido con el modelo *Myf5-Cre^{Sor}* utilizando una segunda línea transgénica para trazar precursores derivados del DM por expresión del gen *Myf5*. Para esto se seleccionó la línea *B195AP-Cre*, una construcción genética caracterizada por expresar la recombinasa Cre bajo el control de todas las secuencias reguladoras del gen *Myf5*, y que permite reproducir el patrón de expresión espacio-temporal completo de *Myf5*. Este modelo transgénico fue amablemente cedido por el Dr. Jaime Carvajal (Carvajal y cols., 2001; Naldaiz-Gastesi y cols., 2016).

1.2.1 Caracterización de la población *B195AP+* en cultivos derivados de piel ventral de ratones transgénicos *B195AP^{CreSor}/R26^{EYFP}*

1.2.1.1 Análisis de la población *B195AP+* en el cultivos de esferas por citometría de flujo

Para analizar el patrón de expresión del nuevo constructo genético, la línea con expresión de la recombinasa Cre (*B195AP-Cre*) se cruzó con la línea reportera *R26-EYFP*, generando la línea doble transgénica *BAP195^{Cre}/R26^{EYFP}*. Con el objetivo de asegurar la comparación de los resultados, se siguió el mismo diseño experimental que el utilizado con la línea *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*. Así, en primer lugar, se establecieron los cultivos para el crecimiento de las células precursoras (SKPs) a partir de la piel ventral del ratón *BAP195^{Cre}/R26^{EYFP}* utilizando el protocolo descrito por el grupo de Freda Miller (Biernaskie y cols., 2006) y aplicando algunas modificaciones puestas a punto en el laboratorio para mejorar el crecimiento de las células en suspensión (Etxaniz y cols., 2014). A los 7 días del cultivo primario, las esferas generadas se disgregaron y la expresión del reportero EYFP se analizó por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células *B195AP+*.

Los cultivos generados a partir de los animales *wild type*, se utilizaron como control para ajustar los parámetros del citómetro y distinguir la señal procedente del reportero (panel **A**, **Figura 1.21**). El análisis de las muestras derivadas de animales transgénicos, reveló que el $0,7 \pm 0,3\%$ de las células que formaban las esferas expresaban EYFP (panel **B**, **Figura 1.21**), un porcentaje menor al

observado en los cultivos derivados de la línea *Myf5-Cre^{Sor}*, con un $1,9 \pm 2,2\%$ de células *Myf5+*. Este resultado, indicaba que la población *Myf5+* trazada en el constructo *B195AP-Cre* estaba más restringida que la trazada por el modelo *Myf5-Cre^{Sor}*.

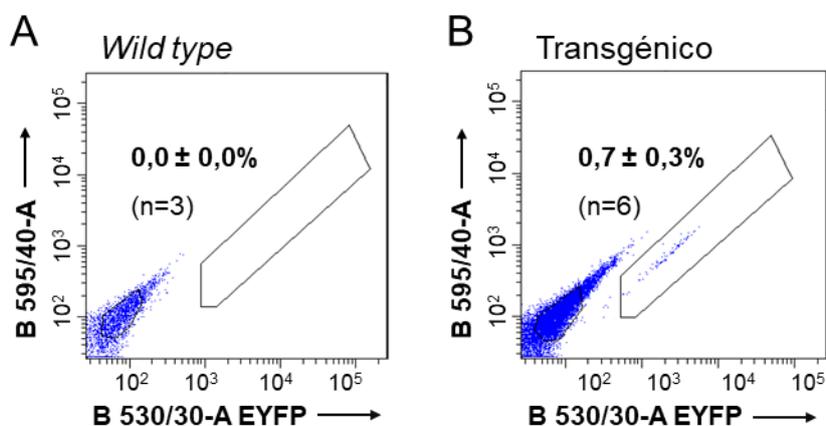


Figura 1.21. Análisis de expresión del reportero EYFP en los cultivos de esferas derivados de las líneas *B195AP^{Cre}/R26^{EYFP}* por citometría de flujo. La expresión del reportero EYFP se analizó por citometría de flujo en cultivos de esferas generadas a partir de piel de la línea *BAP195^{Cre}/R26^{EYFP}*. Las células se excitaron con el láser azul (480 nm) y la fluorescencia fue detectada en el canal FL-1, aplicando un paso de banda B 530-30-A. La selección de la población EYFP+ se realizó en gráficas de dispersión de puntos, representando la señal detectada en el FL-1 (eje horizontal) y en el FL2 (eje horizontal). **(A)** Las muestras procedentes de animales *wild type* permitieron discriminar la auto-fluorescencia y definir la región para la cuantificación de células EYFP+. **(B)** En la línea transgénica *BAP195^{Cre}/R26^{EYFP}* se detectó un $0,7 \pm 0,3\%$ ($n=6$) de células EYFP+. Se representa la media \pm la desviación estándar.

1.2.1.2 Diferenciación *in vitro* de las fracciones celulares separadas por citometría

Tras confirmar la presencia de células *B195AP+* en los cultivos primarios derivados de la piel del tronco ventral de la línea *B195AP^{Cre}/R26^{EYFP}*, se quiso analizar la capacidad de diferenciación glial de las células *B195AP+* *in vitro*. Para eso, las fracciones *B195AP+* y *B195AP-* se separaron por citometría de flujo en base a la expresión del reportero EYFP y se sembraron sobre cubres cubiertos con matriz de laminina en paralelo a la fracción total (células disgregadas no separadas por citometría).

Antes de inducir la diferenciación, las células se mantuvieron varios días en medio Joannides para promover su recuperación y favorecer su proliferación después del daño sufrido durante la separación (paneles **A-C**, **Figura 1.22**). Las células se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia aproximada del 70-80%, tras lo cual el medio de proliferación fue reemplazado por medio de diferenciación glial. Aunque el cambio fenotípico comenzó a hacerse evidente a las 24-48 horas, el aspecto de las células maduró de forma progresiva durante los 7-10 días que se prolongó la diferenciación. Tal y como se había observado en los cultivos de diferenciación generados a partir de la línea *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*, muchas células adquirieron una morfología similar a la observada en las células de Schwann crecidas *in vitro*. Las células bipolares fueron detectadas principalmente en

los cultivos correspondientes a la fracción Total y *B195AP-* (paneles **D** y **F**, **Figura 1.22**), mientras que en la fracción *B195AP+*, se observaron células tubulares similares a los mioblastos crecidos en cultivo (panel **E**, **Figura 1.22**). Algunas de las células *B195AP+* crecieron formando esferas multinucleadas que pulsaban de forma transitoria (datos no mostrados), y que en ocasiones llegaron a desprenderse del fondo de la placa para quedar suspendidas en el medio.

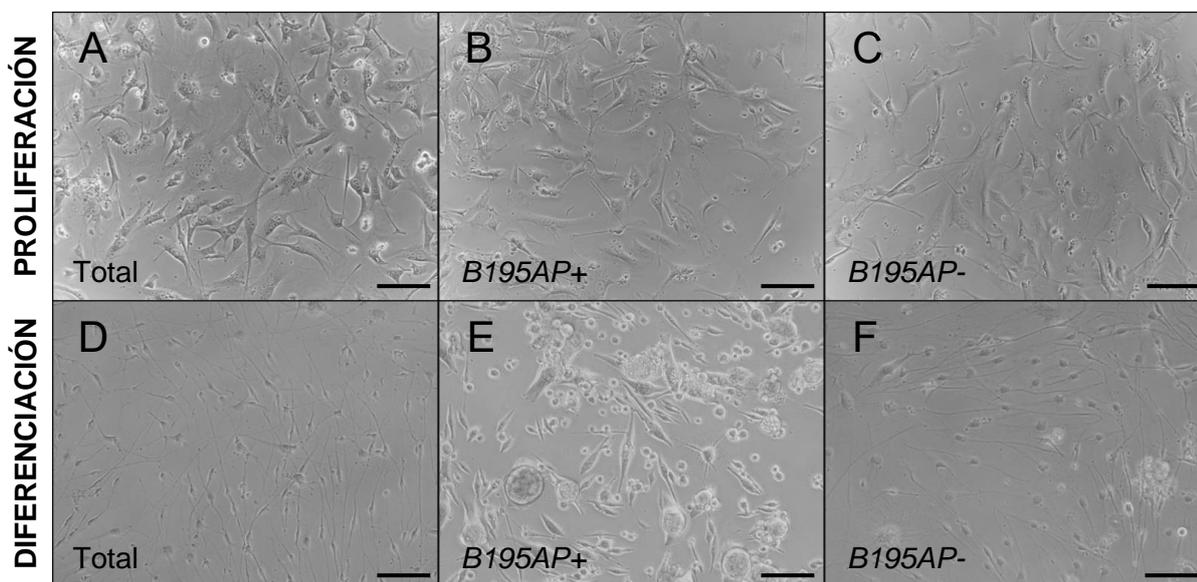


Figura 1.22 Cultivo en diferenciación de las fracciones *B195AP+* y *B195AP-* separadas por citometría de flujo. Las fracciones *B195AP+* y *B195AP-* se separaron por citometría de flujo y se sembraron sobre cubres tratados con matriz de laminina en medio Joannides. Las células se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 70-80% y se cultivaron en medio de diferenciación glial durante 7-10 días. (**A-C**) Durante la fase de crecimiento se observaron células con aspecto de fibroblasto y células con citoplasma expandido y núcleo de gran tamaño. (**D-F**) Tras el cambio de medio, algunas células adquirieron progresivamente morfología bipolar, reduciendo el tamaño de su citoplasma y extendiendo largas prolongaciones desde el cuerpo celular (fracciones Total y *B195AP-*). En el cultivo de la fracción *B195AP+*, se detectaron células multinucleadas de tamaño variable. Las barras de tamaño representan 50 µm en todos los paneles.

Para determinar el porcentaje de células diferenciadas, los cultivos se fijaron y se analizó la expresión del marcador glial GFAP por inmunofluorescencia. Las células trazadas por el constructo *B195AP-Cre* se detectaron por expresión del reportero EYFP, que fue marcado con el anticuerpo anti-GFP. El conteo de las células GFAP+ demostró que la población *B195AP-* tenía mayor capacidad de diferenciación hacia linaje glial, en comparación a las células *B195AP+* (panel **A**, **Figura 1.23**). En la fracción Total, la población *B195AP-* (GFP-) presentó un porcentaje 3 veces mayor de células positivas para GFAP (43,84% vs 14,52%). En las poblaciones separadas por citometría, aunque la cuantificación de células GFAP+ fue notablemente menor, la capacidad de dar lugar a células con fenotipo glial seguía siendo superior en la población *B195AP-*, con un 13,02% de células GFAP+ frente al 6,70% observado en la fracción *B195AP+* (panel **A**, **Figura 1.23**).

Los cultivos diferenciados fueron posteriormente caracterizados por inmunofluorescencia, para analizar el fenotipo de las células diferenciadas. En el cultivo de la fracción *B195AP-* se detectaron células positivas para el factor de transcripción SOX2, tal y como se había observado en los cultivos diferenciados de la fracción *Myf5-Cre^{Sox2}* (Figuras 1.12 y 1.13). En esta ocasión, la expresión de SOX2 no se pudo relacionar con una morfología celular definida, debido a que las células *B195AP-* no quedaban marcadas por expresión del reportero. Aun así, y coincidiendo con el patrón observado en las células *Myf5+*, la señal de SOX2 fue más intensa en las células con núcleos de menor tamaño (flechas blancas en el panel F', Figura 1.23). Por otro lado, en los cultivos de la fracción *B195AP+* diferenciada, muchas de las células se marcaron con el anticuerpo anti-MyHC (panel E, Figura 1.23). Así, teniendo en cuenta la expresión de la proteína MyHC (un filamento intermedio del aparato contráctil de los miotubos) y el aspecto de las células diferenciadas, las células *B195AP+* fueron relacionadas con células musculares o mioblastos crecidos en cultivo.

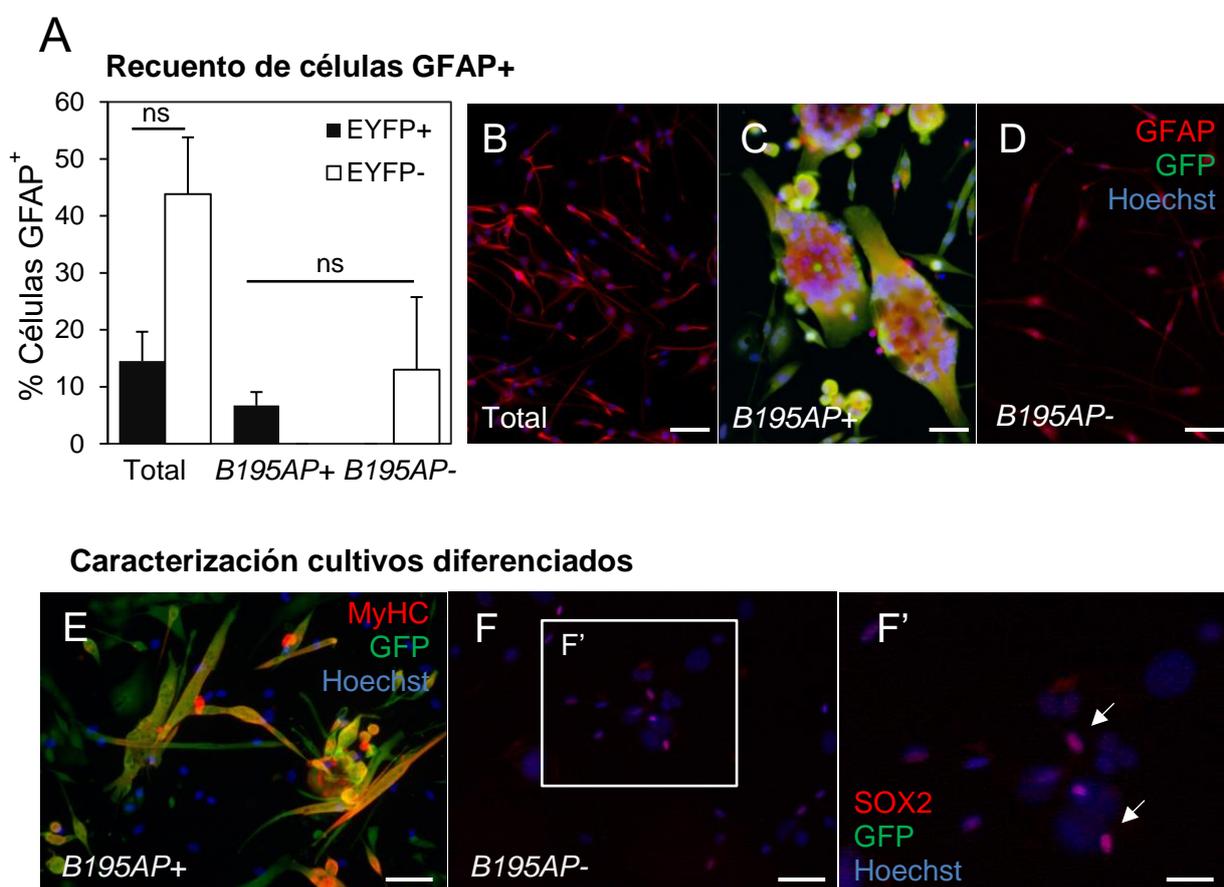


Figura 1.23. Análisis de la capacidad de diferenciación glial de las fracciones *B195AP+* y *B195AP-* en cultivo. Las fracciones Total, *B195AP+* y *B195AP-* diferenciadas *in vitro* en condiciones de diferenciación glial se caracterizaron por inmunofluorescencia para analizar la expresión del marcador GFAP. (A) Porcentaje de diferenciación de las fracciones Total, *B195AP+* y *B195AP-* (media \pm desviación estándar), calculado como el número de células GFAP+ respecto al número de células EYFP (n=3). Los valores de significancia estadística se calcularon mediante el test no paramétrico de Mann Whitney. Los valores fueron, p=0,375 (no significativo, ns) para la comparación de EYFP+ vs EYFP- en la fracción Total, y p=1,0 (ns) para la comparación de EYFP+

(de la fracción *B195AP+*) vs EYFP- (de la fracción *B195AP-*). **(B-C)** Imágenes representativas de las fracciones Total, *B195AP+* y *B195AP-* diferenciadas y teñidas con anti-GFAP (rojo) y anti-GFP (verde). **(E-F)** Caracterización de los cultivos diferenciados. **(E)** Expresión del marcador miogénico Myh2 (rojo) en la fracción *B195AP+* (verde). **(F-F')** En la fracción *B195AP-*, la expresión de SOX2 (rojo) fue detectada en los núcleos de menor tamaño de un subgrupo celular (flechas en **F'**). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 50 μm en todos los paneles, excepto en el panel **F'** (25 μm).

1.2.2 Análisis de la localización de células *B195AP+* en piel ventral de ratón

Para completar la caracterización del modelo transgénico *B195AP-Cre* se analizó la expresión del reportero EYFP *in situ*, en piel, para identificar los distintos tipos celulares trazados por el constructo. En este caso, el estudio se realizó exclusivamente sobre cortes de piel ventral de la línea *B195AP^{Cre}/R26^{EYFP}*. El análisis inicial de las preparaciones reveló que el panículo carnoso estaba marcado por la línea *B195AP-Cre* (paneles **A-C**, **Figura 1.24**). Al igual que en el modelo *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}*, la señal del reportero se detectó en la capa muscular extendida a lo largo de toda la hipodermis. En este mismo compartimento, llamo la atención la presencia de un subgrupo de células marcadas intensamente con GFP. Estas células presentaban un cuerpo celular reducido y se colocaban apaisadas sobre las fibras musculares (cabezas de flechas panel **C**, **Figura 1.24**). Atendiendo a su localización y a su morfología, las células *B195AP+* podrían corresponder a las células satélite del panículo carnoso, sin embargo, la identidad de esta población no llegó a confirmarse por tinción con marcadores específicos, como *Pax7*.

Además del panículo carnoso y de las células localizadas en la superficie del panículo, también se detectaron algunas células *B195AP+* (GFP+) distribuidas de forma homogénea en la dermis. Teniendo en cuenta el fenotipo observado en la línea *Myf5-Cre^{Sor}*, en primer lugar, se quiso comprobar si estas células podían representar tipos celulares neurales de la piel, para lo cual se analizó la expresión de los marcadores PGP9.5, NF200, S100 y p75NTR. En ninguna de las condiciones ensayadas se observó co-expresión entre las células GFP+ y los distintos marcadores seleccionados (paneles **D-F**, **Figura 1.24**), de modo que el constructo *B195AP-Cre* no parecía marcar ni prolongaciones axonales ni células de Schwann, las cuales sí estaban trazadas en la línea *Myf5-Cre^{Sor}*. Del mismo modo, en ninguna de las muestras se detectó señal de GFP+ en la matriz del folículo piloso, por lo que el marcaje de los melanocitos foliculares fue también descartado. Con el objetivo de identificar las células *B195AP+* dispersas en la dermis, las secciones de piel fueron teñidas con varios anticuerpos, como SMA (músculo erector del pelo y células de músculo liso vasculares), PDGFR β (pericitos), CD31 (endotelio) o keratina 8 (células de Merkel). En este segundo ensayo, se comprobó que muchas de las células *B195AP+* del compartimento dérmico se posicionaban adyacentes a las células endoteliales de los vasos sanguíneos (paneles **H-I**, **Figura 1.24**) y no se encontró asociación con el resto de marcadores utilizados (no mostrado).

Así, los resultados obtenidos en la caracterización de la línea *B195AP-Cre* demostraban que las células con capacidad de diferenciación glial se asociaban principalmente con células de la fracción *B195AP-*, las cuales no procedían de precursoras *Myf5+* por no haber activado la expresión del gen durante todo el desarrollo. Además, el análisis de la localización de las células *B195AP+* reveló que las células trazadas por expresión de *Myf5* se correspondían principalmente con derivados del dermomiótomo (DM) y no se marcaban células asociadas con la identidad neural. Por lo tanto, la caracterización de este segundo modelo transgénico sugería que la expresión de *Myf5* en la línea *Myf5-Cre^{Sor}* era aberrante, de modo que el origen mesodérmico de las células de Schwann y de otras poblaciones derivadas de la cresta neural, como las neuronas o los melanocitos, atribuido inicialmente al trazado de *Myf5-Cre^{Sor}* quedaba descartado.

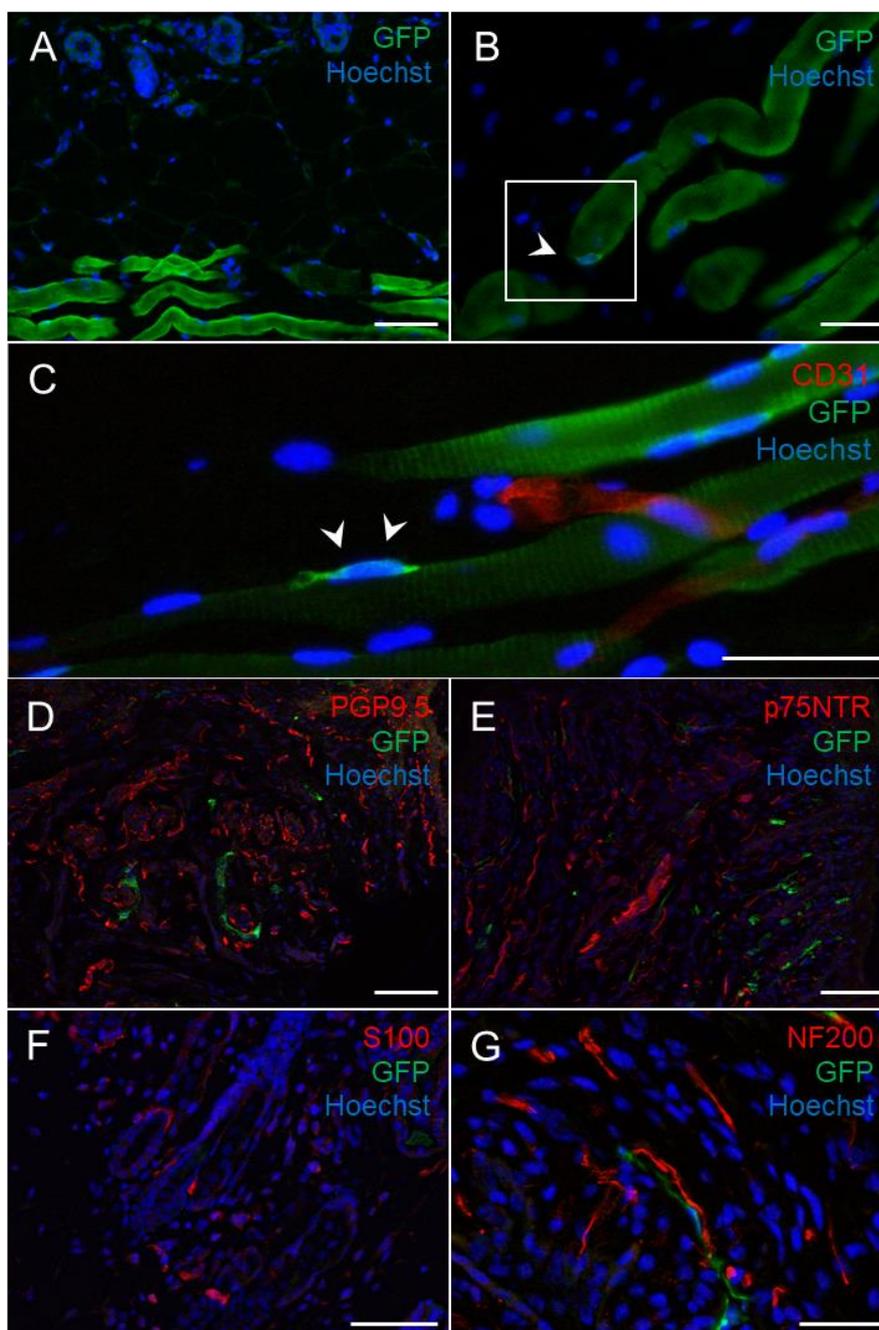


Figura 1.24. Análisis de expresión del reportero EYFP en piel ventral de la línea transgénica *B195AP^{Cre}/R26^{EYFP}* por inmunofluorescencia. Inmunofluorescencias sobre secciones de piel ventral de la línea *B195AP^{Cre}/R26^{EYFP}*. (A-C) La expresión de *B195AP* (verde, GFP+) se detectó en el panículo carnoso y en algunas células localizadas alrededor de las fibras musculares (cabecitas de flecha en C). (D-G) En las secciones analizadas no se observó co-localización entre la señal de *B195AP* (verde, GFP+) y los marcadores neuronales PGP9.5 (rojo, D) y NF200 (rojo, E), y los marcadores gliales s100 (rojo, F) y p75NTR (rojo, G). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 25 μm (B, C y G) y 50 μm (A, D, E y F).

2. ANÁLISIS DEL POTENCIAL NEURAL DE LOS PRECURSORES DE PIEL EN RELACIÓN A LA EXPRESIÓN DE SOX2

Varias de las hipótesis planteadas en la Tesis parten de los datos obtenidos en los estudios realizados con muestras humanas, en los que se identificaron las células de Schwann como las principales responsables del potencial neural derivado de la piel. Las células de Schwann de la dermis humana (p75NTR+/CD56+) fueron caracterizadas como negativas para SOX2 *in situ*, pero expresaron altos niveles de Sox2 tras su aislamiento en cultivo, lo cual fue atribuido a un mecanismo de reprogramación celular inducido por la disgregación mecánica llevada a cabo durante el procesamiento de la piel. Del mismo modo, las células *Myf5+* aisladas de la piel de ratón, en la línea transgénica *Myf5-Cre^{Sor}*, se correspondían principalmente con las células de Schwann residentes en la piel y presentan en cultivo un fenotipo similar al de las células precursoras de Schwann. En este contexto, se quiso analizar el potencial de diferenciación neural de las células aisladas de la piel, en relación a la expresión de Sox2. Para llevar a cabo estos ensayos se recurrió a la línea transgénica *Sox2^{EGFP}* (Ellis y cols., 2004), la cual tiene insertada la secuencia del reportero EGFP (siglas en inglés, *enhanced green fluorescent protein*) en uno de los alelos del locus *Sox2* y permite trazar la expresión de Sox2 en las células.

2.1 Aislamiento y cultivo de precursores a partir de piel ventral de ratones transgénicos *Sox2^{EGFP}*

2.1.1 Caracterización de las células Sox2+ en los cultivos de esferas por inmunofluorescencia

En primer lugar, se establecieron los cultivos para el crecimiento de las células precursoras de la piel, utilizando el protocolo habitual de aislamiento (Biernaskie y cols., 2006), en el que se modificaron las condiciones de siembra para favorecer el crecimiento de las células en suspensión (Etzaniz y cols., 2014). Tras establecer el cultivo, se quiso estudiar el patrón de expresión de Sox2 en las esferas generadas, de modo que los cultivos se fijaron y se analizó la expresión del reportero EGFP por inmunofluorescencia (**Figura 1.25**). El análisis de las muestras demostró que las esferas primarias contenían un número variable de células Sox2+ (*Sox2^{EGFP}*), algunas de las cuales presentaban una morfología bipolar (flechas en paneles B y E, **Figura 1.25**). Además, la intensidad

de la señal fluorescente en las células marcadas con GFP era variable y parecía que las células de las esferas expresaban distintos niveles de expresión de Sox2.

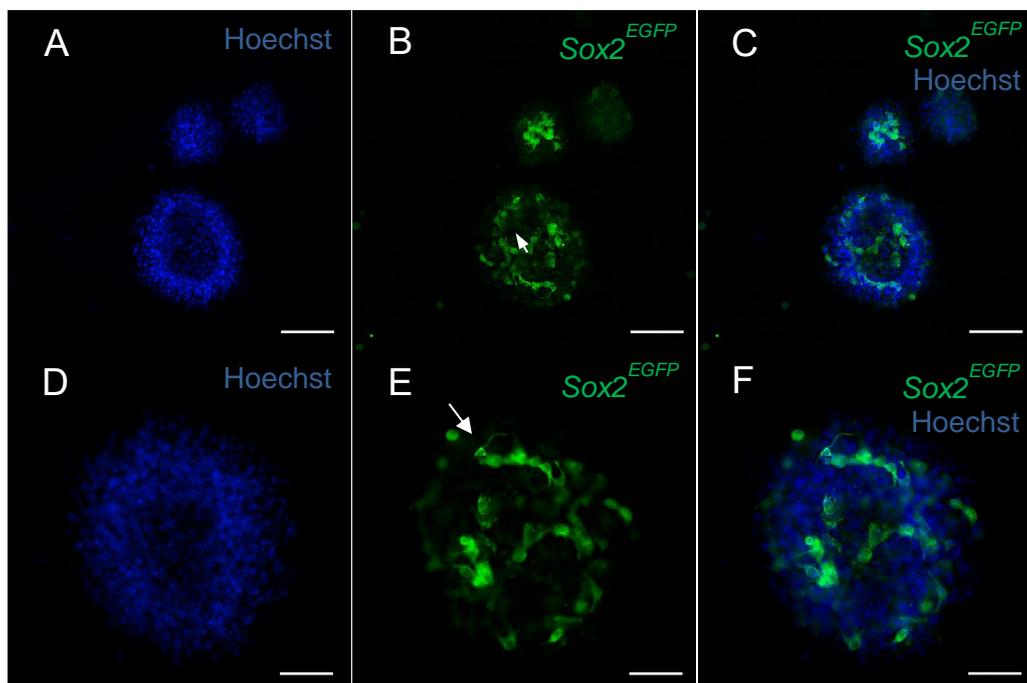


Figura 1.25. Análisis de expresión del reportero EGFP en el cultivo de esferas derivados de la línea Sox2^{EGFP} por inmunofluorescencia. La expresión de Sox2 se analizó por inmunofluorescencia en esferas primarias generadas a partir de la piel ventral de la línea Sox2^{EGFP}. (A-F) El anticuerpo anti-GFP (verde, Sox2^{EGFP}) se utilizó para la detección del reportero EGFP. En las esferas se detectaron varias células positivas para GFP, entre las cuales se distinguieron algunas con morfología bipolar (flecha en E). La intensidad de la señal fluorescente fue variable, indicando que el nivel de expresión de Sox2 en las células marcadas era diferente. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño indican 100 μm (A-B) y 50 μm (D-F).

2.1.2 Diferenciación glial de las fracciones celulares separadas por citometría de flujo en base a la expresión de Sox2

Después de analizar la expresión de GFP en los cultivos derivados de la línea Sox2^{EGFP}, se analizó la capacidad de diferenciación glial de las células en base a su expresión de Sox2. Con este objetivo, las esferas generadas en los cultivos primarios se disgregaron y las células se separaron por citometría de flujo teniendo en cuenta la expresión reportero EGFP (Figura 1.26).

Durante el análisis por citometría de flujo se confirmó que las células aisladas de las esferas expresaban niveles variables de Sox2, ya que, en base a la fluorescencia emitida por las células los eventos se distribuían de forma continua (Figura 1.26). La distribución de los eventos dificultaba la separación de las células EGFP+ de las EGFP-, por eso, el fraccionamiento celular se llevó a cabo siguiendo una estrategia de separación aplicada previamente en el laboratorio, la cual se había realizado con células aisladas de la piel dorsal de este mismo modelo transgénico (Etxaniz y cols.,

2014). De este modo, tal y como se muestra en la **Figura 1.26**, se realizó una división arbitraria de la población Total para separar las células en base a distintos niveles de expresión de EGFP (panel **a''**, **Figura 1.26**). Se obtuvieron fracciones celulares con alta expresión (ALTA, $1,21 \pm 1,67\%$), células con expresión media (MED, $1,20 \pm 0,99\%$), células con baja expresión (BAJA; $9,43 \pm 6,88\%$) y células negativas para la expresión de Sox2 (NEG, $84,64 \pm 9,39\%$). Tras la recogida de las fracciones, la eficiencia de la separación se comprobó cuantificando la cantidad de ARNm de Sox2 por RT-qPCR. Los valores de expresión relativa (LOG_2RQ) se obtuvieron al comparar los valores de expresión de las muestras ALTA, MED, BAJA y TOTAL con respecto a la fracción NEG, utilizada como muestra de referencia. El análisis por RT-qPCR confirmó que el nivel de fluorescencia detectado en cada una de las fracciones (por expresión de GFP) era proporcional a la cantidad de ARNm de Sox2 (panel **B**, **Figura 1.26**).

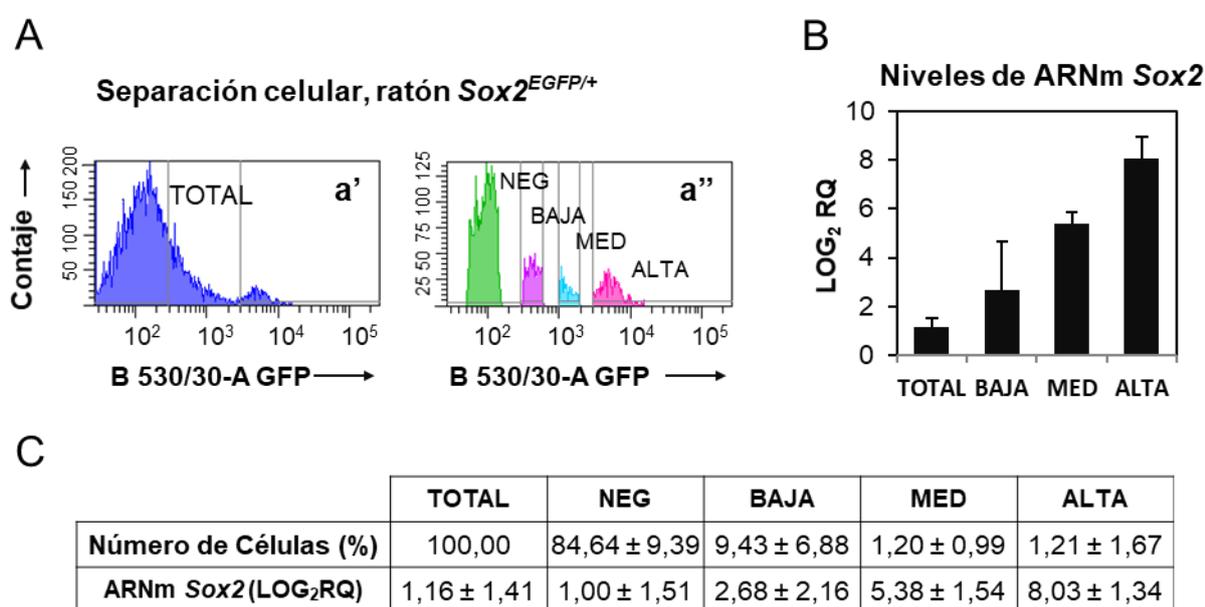


Figura 1.26. Separación de fracciones celulares en base a la expresión de Sox2 por citometría de flujo. (A) Las esferas primarias generadas a partir de la piel ventral de la línea Sox2^{EGFP} se disgregaron y las células se separaron por citometría de flujo en base al nivel de expresión del reportero EGFP. La separación de la población total (panel a') se realizó de forma arbitraria para recoger las fracciones negativa (NEG), baja (BAJA), media (MED) y alta (ALTA) (panel a''). (B) Los niveles de arnm de Sox2 se cuantificaron por RT-qPCR en las fracciones recogidas. Los datos de cuantificación relativa se representan en escala logarítmica con base 2 (LOG_2RQ). La fracción negativa se utilizó como muestra de referencia y se le asignó un valor $\text{RQ}=1$. Las barras indican el valor de la media \pm la desviación estándar de tres ensayos independientes ($n=3$). (C) En la tabla se representa el porcentaje de células Sox2^{EGFP+} en cada una de las fracciones separadas por citometría (media \pm desviación estándar, $n=7$) y los valores de expresión relativa de Sox2 (LOG_2RQ).

Tras la separación, las células se sembraron sobre cubres tratados con matriz de laminina para diferenciarlas en condiciones de diferenciación glial. Además de las fracciones separadas, se sembró también la fracción Total, correspondiente a las células aisladas de las esferas, no separadas por citometría. Al igual que en los ensayos anteriores, las células se sembraron

inicialmente en medio Joannides para promover su proliferación después su paso por el citómetro. Las células se dejaron crecer durante aproximadamente 7 días, hasta alcanzar una confluencia del 70-80%, tras lo cual el medio Joannides fue reemplazado por el medio de diferenciación glial y el cultivo se dejó diferenciar durante otros 7-14 días. Para evaluar el fenotipo de las fracciones diferenciadas, los cultivos se fijaron y las células se tiñeron por inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-GFAP y anti-GFP.

El conteo de células GFAP+ demostró que existía una correlación entre los niveles de expresión de *Sox2* y la capacidad de diferenciación glial (**Figura 1.27**), ya que la capacidad de diferenciación, representada como el número de células GFAP+ respecto al número total de células, se correspondía con el nivel de expresión de *Sox2* de cada fracción [(n=3), panel **A**, **Figura 1.27**]. Así, casi todas las células de la fracción ALTA, separadas por su alta expresión de *Sox2* ($\text{LOG}_2\text{RQ} = 8,03$), dieron lugar a células GFAP+ ($92,11 \pm 1,90\%$), mientras que las células con una expresión intermedia de *Sox2* (fracción MED, $\text{LOG}_2\text{RQ} = 5,38$), presentaban aproximadamente la mitad de células GFAP+ ($46,94 \pm 18,99\%$). Por otro lado, y de acuerdo con los niveles de ARNm *Sox2* cuantificados, en la fracción Total el porcentaje de diferenciación fue del $28,12 \pm 15,45\%$ ($\text{LOG}_2\text{RQ} = 1,16$) y en la fracción NEG del $0,0\%$ ($\text{LOG}_2\text{RQ} = 1$). Sin embargo, y en contra de lo esperado en base al nivel de *Sox2* cuantificado por RT-qPCR ($\text{LOG}_2\text{RQ} = 2,68$), en la fracción BAJA no se detectaron células GFAP+.

En los cultivos teñidos por inmunofluorescencia las células diferenciadas presentaron un aspecto correspondiente al de las células de Schwann crecidas en cultivo, con cuerpos celulares de reducido tamaño a partir de los que se extendían finas prolongaciones (paneles **B-F**, **Figura 1.27**). Por otro lado, la detección del reportero EGFP en los cultivos diferenciados (fracciones TOTAL, ALTA Y MED), indicaba que las células en cultivo mantenían cierta expresión de *Sox2* y permanecían en un estadio no terminalmente diferenciado y/o inmaduro. Este resultado coincidía con el observado en las células *Myf5+* aisladas de la línea *Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}* en las que también se detectó expresión de *Sox2* tras cultivar las células en condiciones de diferenciación glial (**Figura 1.13**).

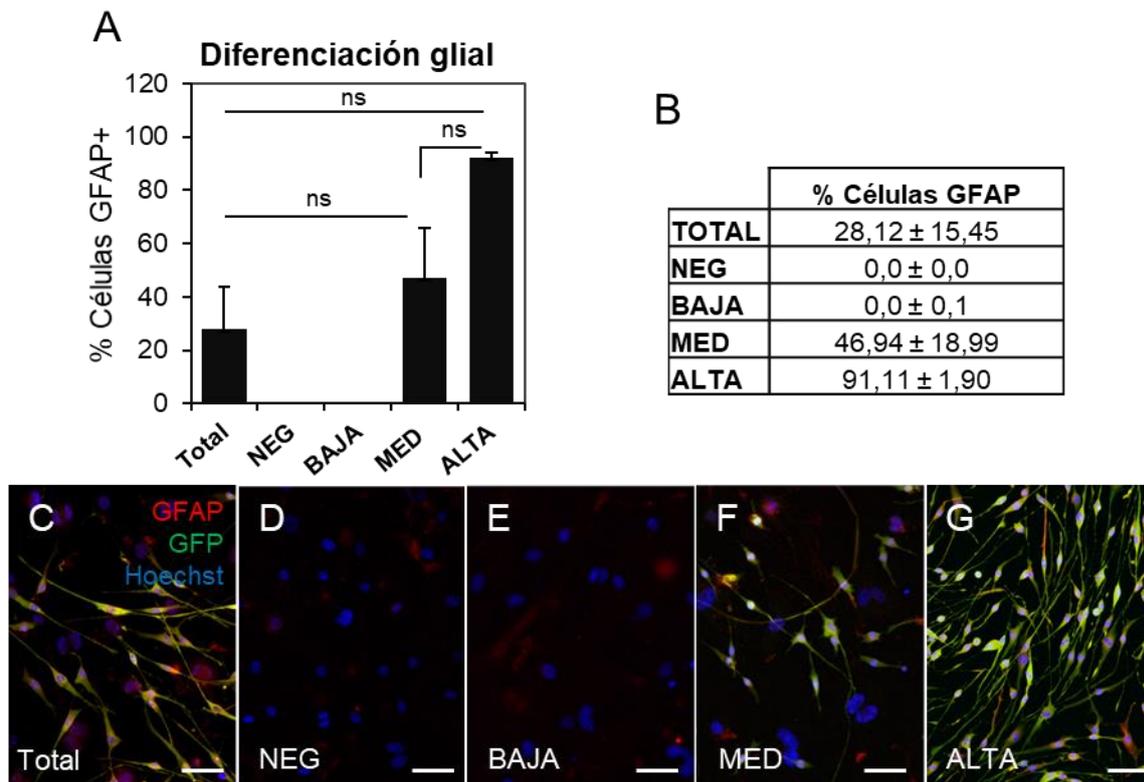


Figura 1.27. Análisis de la capacidad de diferenciación glial de fracciones celulares separadas por citometría de flujo en base al nivel de expresión de Sox2. Las fracciones total, negativa (NEG), baja (BAJA), media (MED) y alta (ALTA), separadas por citometría de flujo a partir de esferas primarias, se diferenciaron *in vitro* en medio de diferenciación glial y se caracterizaron por inmunofluorescencia para analizar la expresión de marcador glial GFAP (rojo). **(A)** Porcentaje de diferenciación de las fracciones Total, NEG, BAJA, MED y ALTA (media ± desviación estándar), calculado como el número de células GFAP+ respecto al número total de células (n=3). La significación estadística se calculó mediante el test no-paramétrico de Mann Whitney. Los valores fueron; p=0,1 (no significativo, ns) para la comparación de ALTA vs MED, p=0,1 (ns) para la comparación de ALTA vs Total y p=0,2 (ns) para MEDIA vs Total. **(B)** En la tabla se representa el porcentaje de células GFAP+ en cada una de las fracciones diferenciadas en cultivo (media ± desviación estándar, n=3). **(C-G)** Imágenes representativas de las tinciones por inmunofluorescencia con anti-GFAP (rojo) y anti-GFP (verde, Sox2^{EGFP}). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 50 μm en todos los paneles.

2.1.3 Diferenciación neuronal de cultivos derivados de la piel ventral de Sox2^{EGFP}

La piel esta densamente inervada por numerosas terminaciones nerviosas, sin embargo, la piel solo contiene prolongaciones axonales y los cuerpos celulares de las neuronas se localizan en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) y en la médula espinal, de modo que no es posible aislar neuronas de la piel. Aun así, la capacidad de generar neuronas ha sido atribuida a varias poblaciones de células precursoras multipotentes aisladas de la piel, como las SKPs (Fernandes y cols., 2004, 2006; Gago y cols., 2009; Gingras y cols., 2007; Joannides y cols., 2007; Kang y cols., 2011; Kubo y cols.,

2009; Toma y cols., 2001, 2005), las EPI-NCSC (Narytnyk y cols., 2014; Sieber-Blum y cols., 2006) o las células Nestina+ de la protuberancia (Amoh y Hoffman, 2017; Amoh y cols., 2005a, 2012).

En esta misma línea, las células de Schwann identificadas en la dermis humana, población p75NTR+/CD56+, demostraron tener la capacidad de generar células neuronales al ser inyectadas en el tubo neural embriones de pollo, migrando por vías estereotipadas de la cresta neural y dando lugar a células β III tubulina+ y tirosina hidroxilasa+. En este caso, teniendo en cuenta la reprogramación que sufren las células de Schwann aisladas en cultivo, tiene sentido pensar que tras su aislamiento las células desdiferenciadas, las cuales adquieren un fenotipo semejante al de las células inmaduras y/o precursoras de Schwann, adquieran la capacidad de dar lugar a varios tipos celulares, puesto que las células precursoras de Schwann se han descrito como una población celular multipotente, al menos en estadios embrionarios. De hecho, varios trabajos han demostrado que durante el desarrollo embrionario de los nervios periféricos, las neuronas de los GRD y las neuronas de los ganglios parasimpáticos craneales derivan directamente de las células precursoras de Schwann (Dyachuk y cols., 2014; Espinosa-Medina y cols., 2014; Maro y cols., 2004). Teniendo en cuenta todos estos resultados, resultaba interesante estudiar más a fondo la capacidad de diferenciación de las células Sox2+, puesto que era un método indirecto para analizar el potencial de las células de Schwann desdiferenciadas de la piel. De este modo, se quiso comprobar si además del potencial de diferenciación glial, estas células presentaban capacidad de dar lugar a otros tipos celulares neurales. Aun así, no se podía descartar que la existencia de otras poblaciones Sox2+ no asociadas con la identidad glial en los cultivos, como las células de la papila dérmica y la vaina de tejido conectivo, fueran responsables de los fenómenos observados.

Para ello, los cultivos primarios derivados de piel ventral del ratón *Sox2^{EGFP}*, se disgregaron y se sembraron sobre cubres tratados con una matriz extracelular (MEC), diseñada para la diferenciación de precursores neurales de hipocampo (García-Parra y cols., 2013) y utilizada también para inducir la diferenciación de precursores dérmicos hacia linaje neuronal (García-Parra y cols., 2012, 2013). En este caso, las células no se separaron por citometría, ya que el reducido número celular obtenido en las fracciones ALTA y MEDIA limitaban la viabilidad del ensayo, al no permitir establecer un número de réplicas consistente. De este modo, las células obtenidas de la disgregación de las esferas se sembraron directamente sobre las matrices en medio de diferenciación neuronal (MN). Al contrario que las células separadas y diferenciadas en condiciones de diferenciación glial, las células cultivadas en MN proliferaron durante el proceso de diferenciación, debido probablemente a la presencia de suero en el medio y a que las células no se habían visto afectadas por un proceso de separación en el citómetro. Tras la diferenciación, los cultivos se fijaron y las células se tiñeron por inmunofluorescencia con el marcador neuronal β III tubulina y el anticuerpo anti-GFP. La cuantificación de las células reveló que el $20,55 \pm 5,69\%$ de las células del cultivo eran positivas para el marcador β III tubulina, las cuales representaban además el $91,60 \pm 3,67\%$ de las células GFP+, es decir expresaban Sox2 [(n=3), **Figura 1.28**]. Las células diferenciadas se alineaban

formando densas redes celulares y extendían prolongaciones de una longitud notablemente superior a la observada en las células diferenciadas en medio glial (**Figura 1.28**).

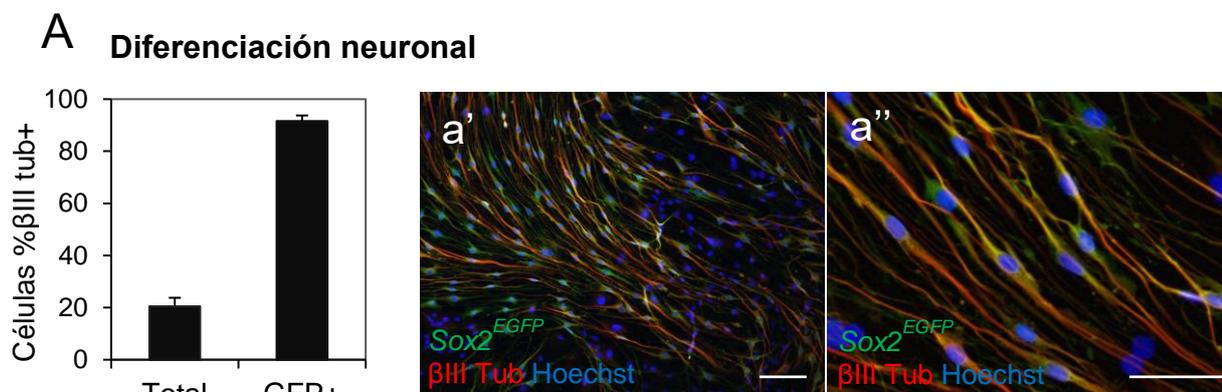


Figura 1.28. Análisis de expresión del reportero EGFP en cultivos diferenciados hacia linaje neuronal por inmunofluorescencia (línea transgénica Sox2^{EGFP}). Los cultivos en suspensión derivados de piel ventral del ratón Sox2^{EGFP} se disgregaron y las células se diferenciaron *in vitro* en condiciones de diferenciación neuronal. En la gráfica se representa el porcentaje de diferenciación, calculado como el número de células βIII tubulina+ respecto al número de total (columna Total) de células y el número de células GFP+ (columna GFP+). Se representa la media ± la desviación estándar de tres ensayos independientes (n=3). A la derecha, imágenes representativas de los cultivos diferenciados y teñidos con anti-GFP (verde) y anti-βIII tubulina (rojo). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (en azul). Las barras de tamaño representan 50 μm.

Además del marcador βIII tubulina seleccionado para el recuento de las células diferenciadas, los cultivos se caracterizaron por inmunofluorescencia analizando la expresión de varios marcadores asociados con la identidad neuronal (**Figura 1.29**). El análisis de las muestras demostró que las células Sox2+ (GFP+) expresaban el marcador universal axonal PGP9.5 (siglas en inglés, *protein gene product 9.5*) (paneles **A-D**, **Figura 1.29**), el marcador de neurona simpática tirosina hidroxilasa (TH, paneles **E-H**, **Figura 1.29**), así como, los marcadores neurales p75NTR (paneles **I-L**, **Figura 1.29**) y Nestina (paneles **M-P** y **R-U**, **Figura 1.29**). Prácticamente la totalidad de las células en los cultivos se tiñeron para los distintos marcadores, demostrando la eficiencia del cultivo. Aun así, los cultivos presentaban también células no trazadas por expresión de EGFP (GFP-) que no expresaban ninguno de los marcadores ensayados.

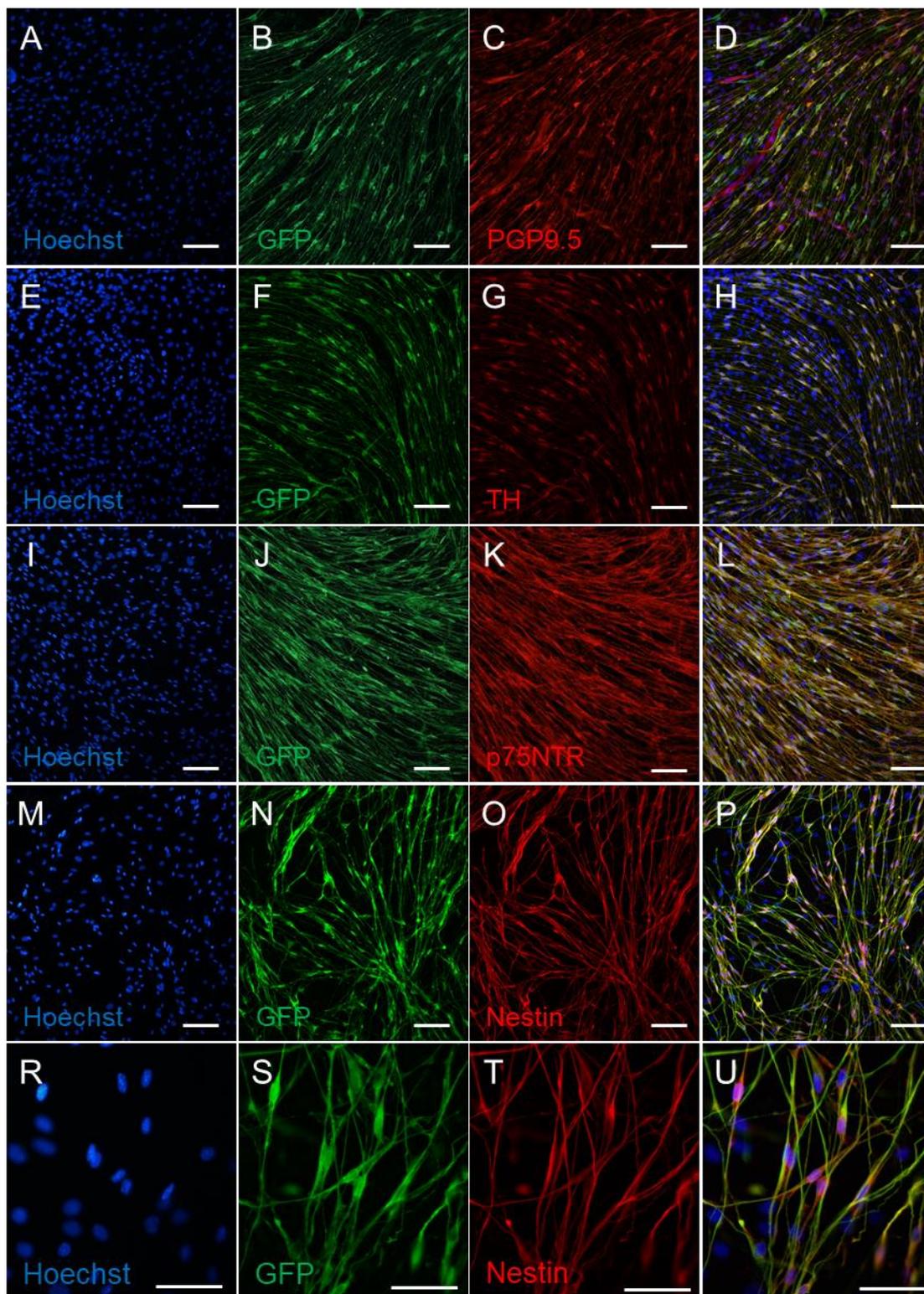


Figura 1.29. Caracterización de los cultivos de esferas diferenciados hacia linaje neuronal por inmunofluorescencia (línea transgénica *Sox2^{EGFP}*). Los cultivos diferenciados, las células con *Sox2+* se detectaron con el anticuerpo anti-GFP (verde) y se tiñeron con varios marcadores neuronales como PGP 9.5 (rojo, **C**), TH (rojo, **G**), p75NTR (rojo, **K**) y Nestina (rojo, **O** y **T**). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan, 50 μ m (A-P) y 25 μ m (R-U).

2.1.4 Diferenciación mesodérmica de cultivos derivados de la piel ventral de Sox2^{EGFP}

De acuerdo con su capacidad de diferenciación multilineaje, las células precursoras de Schwann, además de generar células con fenotipo neural, neuronas y células de Schwann, dan lugar a células mesodérmicas, como a los fibroblastos de la cubierta endoneural o los precursores mesenquimales de la pulpa dental del inci^{Sor} de ratón (Joseph y cols., 2004b; Kaukia y cols., 2014). De acuerdo con este fenotipo, las células de Schwann humanas (p75NTR+/CD56+) también generaron células α SMA+ en cultivos *in vitro* (Etxaniz y cols., 2014).

Por eso, se quiso analizar el patrón de expresión de Sox2 en células inducidas a diferenciarse hacia un fenotipo mesodérmico. Para esto, las esferas primarias derivadas de la piel ventral del ratón Sox2^{EGFP} se disgregaron y se sembraron directamente sobre cubres tratados con MEC (García-Parra y cols., 2013) en medio de diferenciación mesodérmico (MM, suplementado con el factor TGF β 3). La diferenciación se prolongó durante 12-14 días, periodo en el que las células proliferaron considerablemente y cubrieron toda la superficie del cubre, formando una densa capa de células. Tras la diferenciación, los cultivos se fijaron y las células se tiñeron por inmunofluorescencia con el marcador de músculo liso α SMA y el anticuerpo anti-GFP. La cuantificación de las células reveló que el $45.36 \pm 17,33\%$ de las células del cultivo eran positivas para el marcador α SMA, de las cuales ninguna era positiva para GFP, es decir, no expresaban Sox2 [(n=3) **Figura 1.30**]. Estos resultados indicaban que la diferenciación mesodérmica era incompatible con la expresión de Sox2. Por otro lado, resultó sorprendente observar como un alto porcentaje de células GFP+ con morfología bipolar habían crecido sobre las células α SMA+ (**Figura 1.30**). Estas células eran similares a las células diferenciadas en medio neuronal y a pesar de haberlas cultivado en condiciones mesodérmicas, mantenían la expresión de Sox2 y presentaban un aspecto correspondiente al de las células neurales.

B Diferenciación mesodérmica

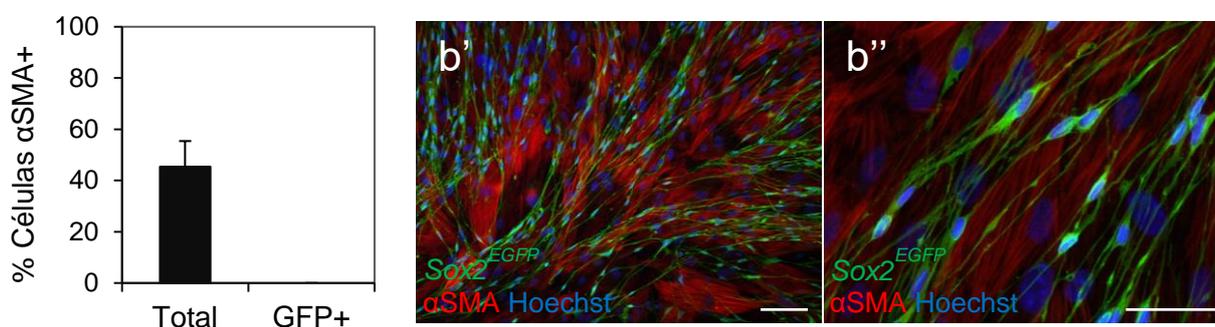


Figura 1.30. Análisis de expresión de Sox2 en cultivos de esferas diferenciados hacia linaje mesodérmico por inmunofluorescencia (línea transgénica Sox2^{EGFP}). Los cultivos en suspensión derivados de piel ventral del ratón Sox2^{EGFP} se disgregaron y las células se diferenciaron *in vitro* hacia el linaje mesodérmico. En la gráfica se representa el porcentaje de diferenciación, calculado como el número de células

α SMA⁺ respecto al número de total de células (columna Total) y el número de células GFP⁺ (columna GFP⁺). Se representa la media \pm la desviación estándar de tres ensayos independientes (n=3). A la derecha, imágenes representativas de los cultivos diferenciados teñidos con anti-GFP (verde) y anti- α SMA (rojo). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (en azul). Las barras de tamaño representan 50 μ m.

2.2 Análisis de la localización de células Sox2⁺ en piel ventral del ratón Sox2^{EGFP}

La caracterización de las células Sox2⁺ en la línea Sox2^{EGFP} demostró que la expresión de Sox2 en las células aisladas en cultivo estaba relacionada con la capacidad de diferenciación neural. Aun así, el origen de estas células seguía siendo desconocido, ya que podían proceder de compartimentos endógenos en los que se había descrito expresión de Sox2, como la papila dérmica o la protuberancia del folículo piloso (Driskell y cols., 2009; Johnston y cols., 2013; Laga y cols., 2010), o, por el contrario, la expresión de Sox2 podía haber sido inducida por las condiciones del cultivo, tal y como se había propuesto en las células de Schwann aisladas de la piel humana (Etxaniz y cols., 2014). Por eso, a pesar de que la expresión de Sox2 en la piel había sido estudiada previamente, se quiso comprobar el patrón de expresión de Sox2 en la piel ventral del ratón Sox2^{EGFP}.

Para eso se realizaron preparaciones de tejido completo donde la expresión del reportero EGFP fue analizada con el anticuerpo anti-GFP y se combinó con varios marcadores para la identificación de distintas poblaciones celulares (**Figura 1.31**). En la piel ventral de ratón, la expresión de Sox2 se detectó en tres compartimentos bien definidos; (1) en las células de Schwann de los plexos nerviosos cutáneos, (2) en células gliales del complejo Lanceolado y (3) en las papilas dérmicas de algunos folículos pilosos. Es importante remarcar que la señal fluorescente procedente de las células del plexo nervioso era mucho menos intensa que la observada en las células del complejo Lanceolado y las papilas dérmicas, pero aún así se observó de manera constante y reproducible.

Las células GFP⁺ del plexo sub-epidérmico presentaban una morfología bipolar y se conectaban en redes que se extendían en un mismo plano (panel **A**, **Figura 1.31**). Esta población Sox2⁺ se encontraba asociada a axones NF200⁺ (panel **B**) y expresaba el marcador glial S100 (panel **C**). Las células Sox2⁺ se localizaban habitualmente en las regiones más superficiales de la dermis, donde los haces nerviosos son más finos, aunque en algunos casos, Sox2 parecía expresarse también en agrupaciones nerviosas de mayor calibre (panel **C**, **Figura 1.31**). En las distintas preparaciones analizadas, esta población se marcaba de forma muy tenue pero constante. Los paneles A-C representan imágenes tomadas en un microscopio confocal donde la exposición del láser ha sido aumentada para distinguir con claridad la morfología y la distribución de las células en este compartimento.

La expresión de Sox2 se detectó también en las células del complejo Lanceolado, las cuales se caracterizaban por presentar una señal muy intensa de GFP, indicando que esas células expresaban altos niveles de Sox2. Como se ha mencionado anteriormente, el complejo Lanceolado está formado

por células gliales especializadas que se asocian a los terminales nerviosos longitudinales para conformar órganos sensoriales para la percepción mecánica (Li y Ginty, 2014). La estructura de los mecanorreceptores se pudo analizar en detalle al teñir las muestras con el marcador axonal NF200 (paneles **D-F**, **Figura 1.31**), ya que permitió apreciar como los folículos eran inervados individualmente por un conjunto de filamentos, a la altura de la protuberancia donde se localizaban las células GFP+. Estas células fueron identificadas como células gliales del complejo Lanceolado por la expresión de los marcadores Nestina (panel **G**, **Figura 1.31**) y S100 (panel **H-H'**, **Figura 1.31**), y también por presentar una morfología específica asociada a esta población, caracterizada por un cuerpo celular ovalado y varias prolongaciones en forma de dendrita extendidas en paralelo al eje del folículo (paneles **G-H'**, **Figura 1.31**).

El tercer compartimento en el que se detectó expresión de Sox2 fue en la papila dérmica de un subgrupo de folículos pilosos. La señal de GFP fue detectada exclusivamente en los folículos de mayor tamaño, en los que el número de células Lanceoladas que rodeaban el folículo era también superior. Estos folículos representaban un pequeño porcentaje del total de folículos de la muestra y se correspondían probablemente con los folículos tipo Guard, que son de mayor tamaño y que están presentes en menor proporción (1-3%). Aunque algunos trabajos han descrito que la expresión de Sox2 en la papila está restringida a la fase anágena de ciclo capilar, en las muestras analizadas parecía que la expresión de Sox2 en las papilas se mantenía durante todo el ciclo, ya que se observó señal de GFP en folículos que morfológicamente parecían estar en fase catágena o telógena.

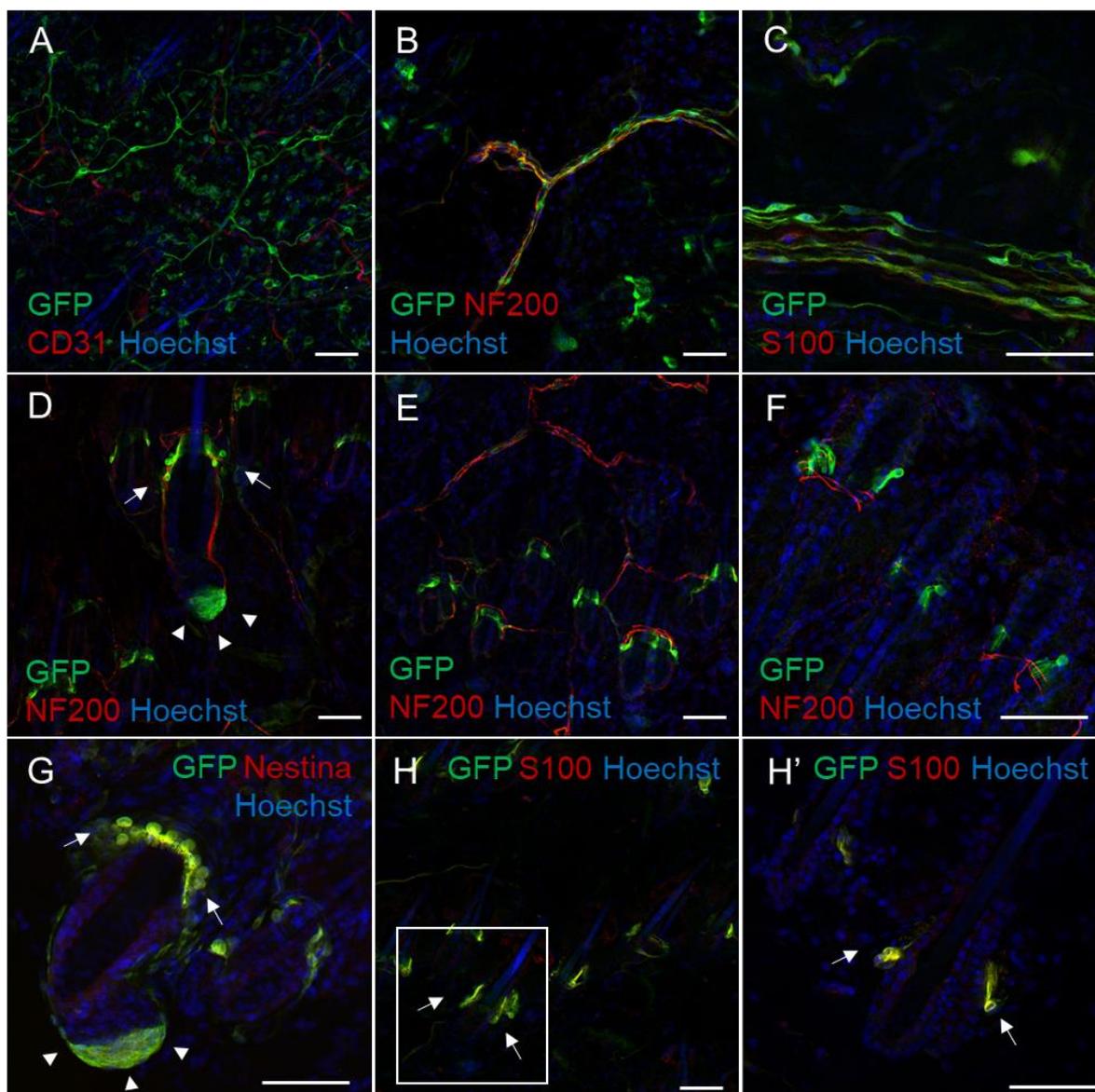


Figura 1.31. Análisis de expresión del reportero EGFP en piel ventral de la línea transgénica $Sox2^{EGFP}$ por inmunofluorescencia. (A-H') Tinciones de inmunofluorescencia sobre preparaciones de tejido completo en la línea transgénica $Sox2^{EGFP}$. **(A)** Las células $Sox2+$ (verde, $Sox2^{EGFP}$) se detectaron en la dermis superficial formando una fina red de células multipolares que trascurrían alrededor de vasos sanguíneos CD31+ (rojo). Las células $Sox2+$ (verde) interconectadas y distribuidas a lo largo de la dermis, se asociaban a axones NF200+ (rojo, **B**) y expresaban el marcador glial S100 (rojo, **C**). **(D)** En los folículos pilosos, la expresión de $Sox2$ fue detectada en las células gliales del complejo Lanceolado (flechas en los paneles **D**, **G**, **H** y **H'**) y en las papilas dérmicas de un subgrupo de folículos (cabezas de flecha en los paneles **D** y **G**). **(E-F)** Las células $Sox2+$ (verde) localizadas en la región de la protuberancia e inervadas por filamentos axonales NF200+ (rojo). **(G-H')** Las células $Sox2+$ presentaban un aspecto característico de las células del complejo Lanceolado, con cuerpos celulares ovalados y prolongaciones citoplasmáticas extendiéndose en paralelo al eje del folículo. Estas células, además, expresaban los marcadores específicos Nestina (rojo, **G**) y S100 (rojo, **H** y **H'**). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño indican 50 μ m en todos los paneles.

3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE SOX2 EN LAS CÉLULAS MYF5+ EN RATONES $Myf5^{CreSor}/R26^{Tdtomato}/SOX2^{EGFP}$

Los ensayos realizados con la línea $Sox2^{EGFP}$ demostraron que la capacidad de diferenciación neural de las células aisladas de la piel estaba relacionada con la expresión de Sox2. La caracterización de este modelo reveló que la expresión de Sox2 en la piel está restringida casi por completo a las células de Schwann, exceptuando las papilas dérmicas de los folículos tipo Guard, las cuales representan el 1-5% del total de folículos. Teniendo en cuenta, además, que la expresión de Sox2 se induce en las células de Schwann aisladas en cultivo (Etxaniz y cols., 2014; Liu y cols., 2015; Stratton y cols., 2017), se podía asumir que prácticamente todas las células Sox2+ aisladas de la piel correspondían a células de Schwann residentes en la piel.

Por otro lado, la caracterización de los modelos transgénicos $Myf5^{CreSor}/R26^{EYFP}$ y $Myf5-Cre^{Sor}/R26^{Tdtomato}$ demostró que las células Myf5+ se correspondían en gran medida con las células de Schwann de la piel, y que estas células eran las principales responsables del potencial neural obtenido *in vitro*. Sin embargo, al no poder reproducir estos resultados en la línea $B195AP-Cre$, la cual trazaba también la expresión del gen $Myf5$, se llegó a la conclusión de que la línea $Myf5-Cre^{Sor}$ marcaba inespecíficamente las células de Schwann y probablemente otras poblaciones asociadas con la cresta neural, como los melanocitos o las prolongaciones axonales de las neuronas periféricas.

En este punto, se quiso afianzar el resultado obtenido en la línea $Myf5-Cre^{Sor}$ y confirmar la identidad de las células Myf5+ trazadas por este modelo, para lo cual, se cruzaron las líneas transgénicas $Myf5^{CreSor}/R26^{Tdtomato}$ y $Sox2^{EGFP}$ y se generó un modelo triple transgénico, $Myf5^{CreSor}/R26^{Tdtomato}/Sox2^{EGFP}$, en el que poder analizar la expresión de Sox2 en las distintas poblaciones trazadas por el constructo $Myf5-Cre^{Sor}$. Así, la expresión de Sox2 fue utilizado como un marcador de las células de Schwann dérmicas.

3.1 Análisis de expresión de Myf5 y Sox2 en la línea triple transgénica $Myf5^{CreSor}/R26^{Tdtomato}/Sox2^{EGFP}$ por citometría de flujo

En primer lugar, tal y como se ha explicado en los apartados anteriores, se generaron cultivos para el crecimiento de células en suspensión aplicando un protocolo descrito por (Biernaskie y cols., 2006). Tras establecer los cultivos, las esferas generadas en los cultivos primarios se disgregaron para analizar la expresión de los reporteros Tdtomato (trazado de $Myf5$) y GFP ($Sox2$) por citometría de flujo (**Figura 1.32**). Las poblaciones celulares identificadas en base a la expresión de estos reporteros se designaron de la siguiente forma; $Myf5+/Sox2-$ (**Myf5+**), $Myf5-/Sox2+$ (**Sox2+**), $Myf5+/Sox2+$ (**Doble+**) y $Myf5-/Sox2-$ (**Doble-**). En el panel B de la **Figura 1.32** se representa la media y la desviación estándar del porcentaje de células correspondiente a cada una de las fracciones ventral (n=4).

El análisis por citometría reveló que las células *Myf5*⁺ que expresaban *Sox2* (población **Doble+**) representaban un pequeño porcentaje del total de las células en el cultivo de esferas derivadas de la piel ventral ($0,25 \pm 0,05\%$). El número de células *Sox2*⁺ no trazadas por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}* (fracción **Sox2+**) fue también reducido y correspondía el $1,28 \pm 0,59\%$ del total de las células de las esferas. En base a estos resultados, se podía afirmar que aproximadamente el 50% de las células *Sox2*⁺ estaban trazadas por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}*.

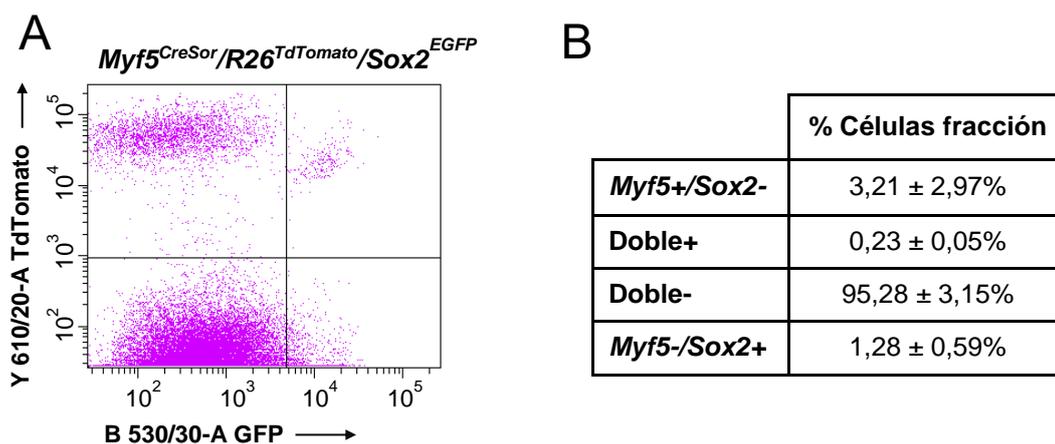


Figura 1.32. Análisis de expresión de los reporteros tdTomato y EGFP en los cultivos derivados de la piel ventral de la línea triple transgénica *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}* por citometria de flujo. (A) Análisis de expresión de TdTomato y EGFP en esferas primarias derivadas de la piel ventral por citometria de flujo. Las células se excitaron con el láser azul (488 nm) y la fluorescencia emitida por los dos reporteros fue percibida en los detectores FL1 (GFP, aplicando un paso de banda B 530/30-A) y FL-2 (Tdtomato, aplicando un paso de banda Y610/20-A). (B) Media \pm desviación estándar del porcentaje de células correspondiente a las fracciones *Myf5*⁺, *Sox2*⁺, **Doble+** y **Doble-** aisladas de piel ventral (n=4).

3.2 Análisis de expresión de *Myf5* y *Sox2* en la línea triple transgénica *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}* por inmunofluorescencia

La caracterización realizada anteriormente con muestras de piel extraídas de las líneas *Myf5-Cre^{Sor}* y *Sox2^{EGFP}* indicaba que ambos modelos coincidían en el marcaje de algunas poblaciones celulares, como las células de Schwann del plexo sub-epidérmico o las células gliales del complejo Lanceolado. Para confirmar si las poblaciones trazadas por estas líneas transgénicas correspondían realmente al mismo tipo celular, se analizó directamente la expresión de los reporteros Tdtomato y GFP en muestras de piel ventral extraídas del modelo triple transgénico *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}*. En esta ocasión, la caracterización se realizó exclusivamente sobre preparaciones de tejido completo (**Figura 1.33**). La señal de *Sox2* fue detectada con el anticuerpo anti-GFP, mientras que la expresión *Myf5* (trazada por el reportero TdTomato) pudo analizarse directamente sin necesidad de teñir la muestra con anticuerpos específicos.

Tal y como se había deducido al analizar las líneas transgénicas *Myf5-Cre^{Sor}* y *Sox2^{EGFP}* por separado, las células *Myf5*⁺ del complejo Lanceolado expresaban *Sox2* (flechas en paneles **A-B**, **Figura 1.33**). Coincidiendo con lo observado previamente, esta población de células gliales se caracterizaba por un pequeño cuerpo ovalado y por varias prolongaciones en forma de dendrita que se extendían en paralelo al eje del folículo. Durante el análisis de estas muestras se pudo comprobar también que no todas las células estaban trazadas por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}*, ya que, en algunos casos, las células del complejo Lanceolado se marcaban únicamente con GFP (expresaban exclusivamente *Sox2*) (cabeza de flecha en panel **B**, **Figura 1.33**). De acuerdo con el patrón de expresión del constructo *Myf5-Cre^{Sor}*, la expresión de *Myf5* (TdTomato) se detectó también en las células de Schwann de los plexos nerviosos cutáneos (paneles **A-A'**, **Figura 1.33**). Sin embargo, y a pesar de que la línea *Sox2^{EGFP}* presentaba cierta expresión de *Sox2* en el plexo nervioso (**Figura 1.31**), en la dermis del ratón triple transgénico no se pudo detectar marcaje de GFP, debido probablemente a la alta intensidad del reportero TdTomato. Por ello, no se pudo analizar si, al igual que ocurría con las células del complejo Lanceolado, las células de Schwann del plexo nervioso sub-epidérmico estaban parcialmente trazadas por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}*. Además de las distintas poblaciones de Schwann, la expresión de *Myf5* fue detectada en varios compartimentos de la dermis que no expresaban *Sox2*, como el panículo carnoso o los melanocitos de la matriz del pelo (no mostrado). La caracterización de las muestras de tejido dérmico completo procedentes del modelo *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}* sirvió para afianzar el patrón de expresión observado previamente en las líneas *Myf5-Cre^{Sor}* y *Sox2^{EGFP}*, y confirmar que existía cierto solapamiento entre las señales procedentes de ambos constructos.

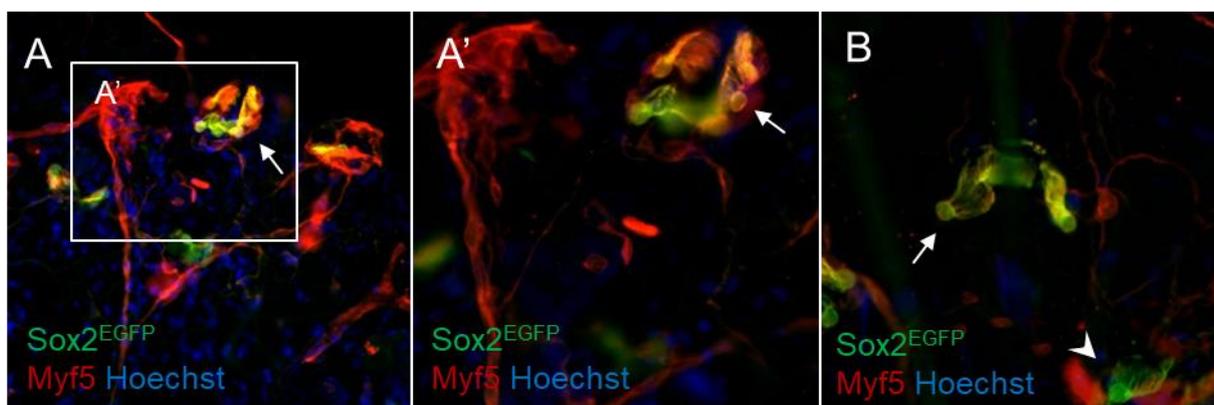


Figura 1.33. Análisis de expresión de los reporteros tdTomato y EGFP en la piel ventral de la línea triple transgénica *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}* por inmunofluorescencia. (A-B) Tinciones de inmunofluorescencia sobre preparaciones de tejido completo en la línea transgénica *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}*. La expresión de *Sox2* fue detectada con el anticuerpo anti-GFP (verde, *Sox2^{EGFP}*) y la expresión de *Myf5* fue directamente visualizada en rojo (TdTomato). La expresión de ambos reporteros se observó en las células gliales del complejo Lanceolado (flechas en los paneles A, A' y B). Las células doble+ presentaban cuerpos celulares ovalados y prolongaciones citoplasmáticas que se extendían en paralelo al eje del folículo. Algunas de las células gliales *Sox2*⁺ (verde, *Sox2^{EGFP}*) del complejo Lanceolado no expresaban el reportero TdTomato (cabeza de flecha en el panel B). La señal de *Myf5* (rojo, TdTomato) se

observó adicionalmente en células bipolares que se unían en extensas redes a lo largo del compartimento dérmico. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño indican 50 μm .

3.3 Análisis de expresión génica utilizando arrays de expresión

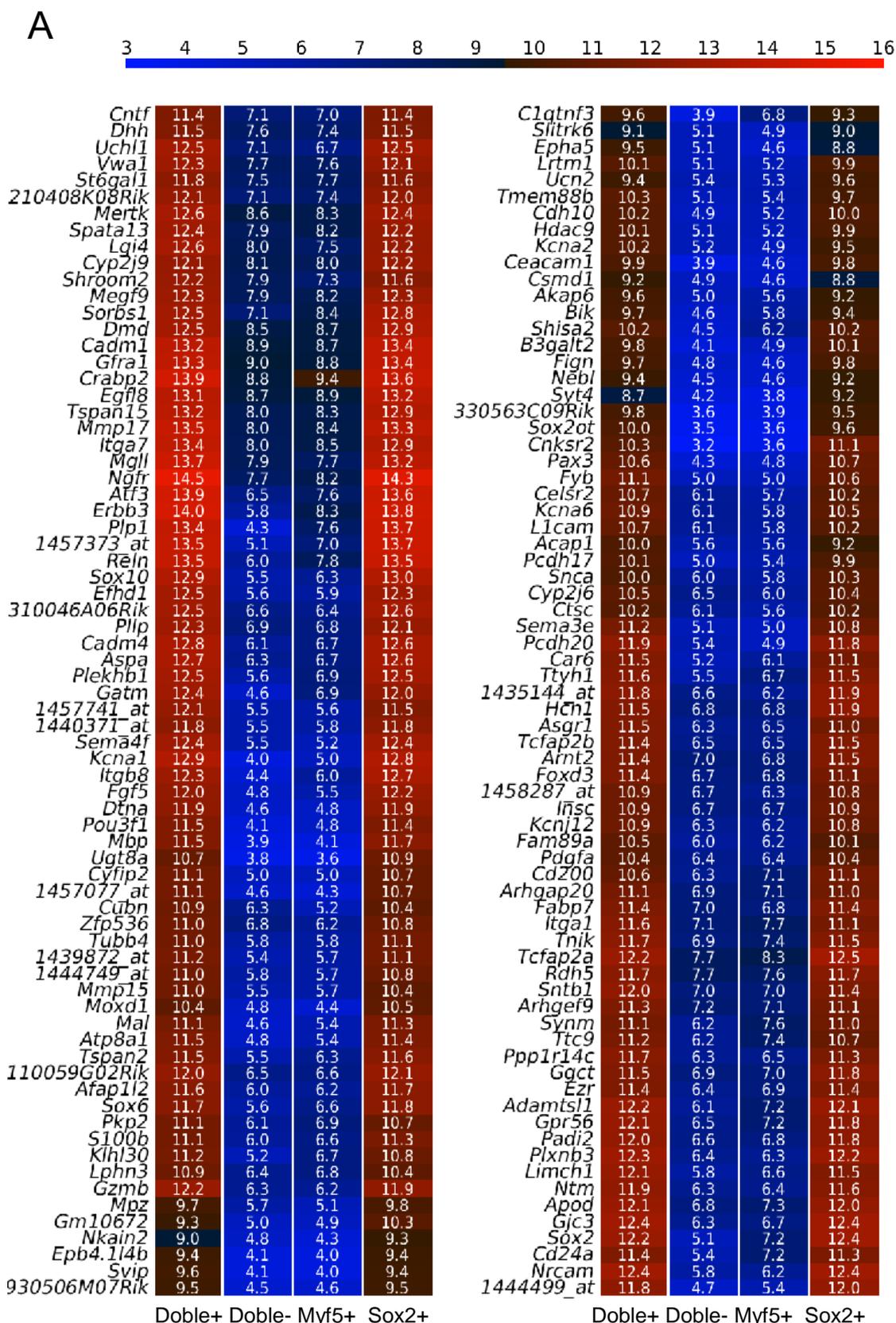
Finalmente, se quiso confirmar la identidad de las poblaciones aisladas y trazadas por los constructos *Myf5-Cre^{Sor}* y *Sox2^{EGFP}* realizando un análisis transcriptómico con microarrays de expresión. El estudio se llevó a cabo con la tecnología GeneChip™ Mouse Genome 430 2.0 Array de Affimetrix. Las fracciones **Myf5+**, **Sox2+**, **Doble+** y **Doble-** fueron aisladas por citometría de flujo de las esferas primarias generadas a partir de la piel ventral de la línea *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}* (**Figura 1.32**).

Como el número de células obtenido en las fracciones Myf5+ y Doble+ era muy reducido se quiso aumentar el número de esferas generadas en cultivo para poder recoger un número mayor de células en las fracciones separadas por citometría. Para esto, se procesó piel extraída de varios animales y se mezclaron las células obtenidas de las distintas muestras en un mismo cultivo. Aun así, el número de células obtenido en las fracciones Myf5+ y Doble+ fue limitado y la cantidad de ARN que se pudo extraer de estas fracciones resultó insuficiente. Para alcanzar la cantidad de ARN necesaria para el microarray fue necesario mezclar el ARN obtenido en varios ensayos independientes. Debido a esto, solo se pudo llevar a cabo un único ensayo de expresión génica con microarrays (n=1). Tras la extracción de ARN, el protocolo de retro-transcripción, marcaje, hibridación y lectura de los chips fue realizado por el personal técnico de la plataforma de Genomika del Instituto de Investigación Bionostia. El análisis de datos se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Marcos J. Araúzo-Bravo, responsable de la plataforma de Biología computacional del Instituto de Investigación Bionostia.

El interés principal de este ensayo era estudiar el perfil transcriptómico de las células de Schwann trazadas por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}*, que en base a los resultados obtenidos hasta el momento fueron identificadas como células Doble+ (*Myf5+/Sox2+*) (**Figura 1.33**). Teniendo en cuenta que las células *Sox2+* trazaban también células de Schwann del plexo nervioso subepidérmico (**Figura 1.31**), en primer lugar, se decidió realizar un análisis de los genes diferencialmente expresados (en inglés, *differentially expressed genes*, DEG) en las fracciones Doble+ y *Sox2+* respecto a las fracciones Myf5+ y Doble- (**Figura 1.34**).

En la representación gráfica ("Heatmaps") de los genes diferencialmente expresados se pudo apreciar que el patrón de expresión de las fracciones Doble+ y *Sox2+* de piel ventral era muy similar, indicando que estas fracciones, las cuales habían sido aisladas de regiones diferentes, podían representar la misma población celular. De acuerdo con la identidad celular asignada a las fracciones Doble+ y *Sox2+*, muchos de los genes sobreexpresados se relacionaban directamente con las células de Schwann; *Sox10*, *Sox2*, *Ngfr* (*p75^{NTR}*), *ErbB3*, *Tcfap2a* (*AP2*), *Plp1*, *S100b*,

Pax3, Reln, Mbp, Mal, Pou3f1 (Oct6), Gjc3 (Cx29), Atf3, Fgf5, Sema4f, Mpz, Dhh, L1cam y *Fabp7*. Así, el patrón de expresión génica de las fracciones Doble+ y Sox2+ demostraba que estas poblaciones eran transcripcionalmente similares y confirmaban su relación con las células de Schwann de la piel.



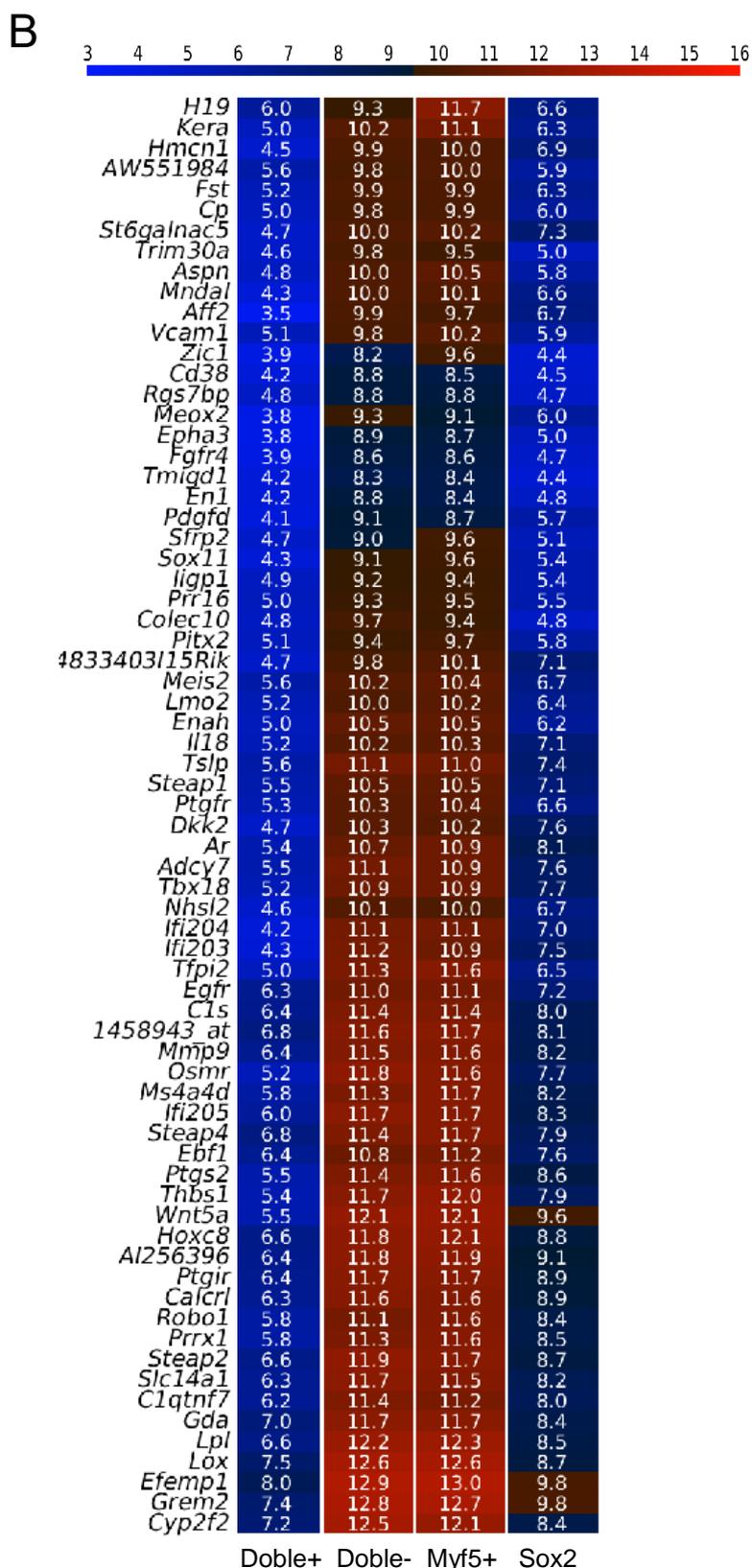


Figura 1.34. Genes diferencialmente expresados en fracciones celulares separadas de cultivos de esferas derivados de la línea triple transgénica *Myf5^{CreSor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}*. Representación gráfica del nivel de expresión (escala de colores en *Heatmaps*) de los genes diferencialmente expresados (*fold-change*>2) en las fracciones Doble+ y Sox2+ en comparación a las fracciones Doble- y Myf5+ aisladas por citometría a partir de cultivos generados de piel ventral. Los genes sobre expresados (144) se representan en el panel (A) y los genes infraexpresados (70) se representan en el panel (B). Lista completa de los genes diferencialmente expresados en el ANEXO I.

Además del análisis de los genes diferencialmente expresados, se quiso estudiar el patrón de expresión de marcadores relacionados específicamente con la biología de las células de Schwann (**Figura 1.35**). Para esto, se seleccionaron genes expresados durante el desarrollo embrionario del linaje de Schwann, (*Sox10*, *Sox9*, *Foxd3*, *ErbB3* y *S100*) y genes expresados durante la reprogramación de las células de Schwann tras un daño (*Sox2*, *c-jun* y *Pou3f1*) Los genes asociados con la reprogramación de las células de Schwann resultaban de especial interés, ya que muchos de los resultados obtenidos a lo largo de la Tesis indicaban que las poblaciones Doble+ y Sox2+ se correspondían con células de Schwann en un estadio desdiferenciado. Así, se pretendía demostrar que el aislamiento en cultivo de las células de Schwann inducía

En este segundo análisis se incorporaron también datos de un estudio en el que se había analizado el patrón de expresión de las células de Schwann utilizando los mismos arrays, *Genechip® Mouse genome 430 2.0* de Affymetrix. Este trabajo estaba dirigido a estudiar la implicación del factor de transcripción c-jun en la especificación del fenotipo de las células de Schwann desdiferenciadas (Arthur-Farraj y cols., 2012). En el estudio se utilizaron nervios ciáticos procedentes de animales control (fenotipo silvestre) y animales transgénicos en los que se había eliminado específicamente la expresión de c-jun en células de Schwann (*PO^{Cre}/c-Jun^{fl/fl}*). El patrón de expresión de los nervios fue analizado antes (no seccionado) y 7 días después de la seccionar el nervio (seccionado).

En primer lugar, atendiendo a las muestras correspondiente al experimento, se pudo comprobar que además de los marcadores de Schwann encontrados entre los genes diferencialmente expresados (**Figuras 1.34**), el nivel de expresión de otros genes propios de las células de Schwann era también mayor en las fracciones Doble+ y Sox2+ en comparación a las células Doble- y Myf5 (*Foxd3*, *Cdh2*, *L1cam*, *Dhh* o *Nestina*). Por otro lado, se observó que muchos de los genes presentaban un nivel de expresión similar en todas las fracciones; algunos de estos genes mostraban un alto nivel de expresión (*Gap43*, *Pmp22*, *Jun* y *Egr1*), otros un nivel de expresión medio (*Etv5*, *Foxo4*, *Itgb1*, *Galc*, *Egr2* y *Yy1*) y también genes que presentaban una baja expresión en todas las fracciones (*Sox9*, *Gfap*, *Ncam1*, *Prx*, *Mag* y *Gjb1*). Estos resultados indicaban que a pesar de que los marcadores seleccionados estaban directamente asociados con las células de Schwann, muchos de ellos no eran exclusivos de esta población y podían expresarse en otros tipos celulares. Además, teniendo en cuenta que algunos de los marcadores seleccionados no se expresaban en ninguna de las fracciones, se podía pensar que las células de Schwann de la piel presentaban un perfil

transcripcional distinto a las células de Schwann de los troncos nerviosos (como el nervio ciático), ya que la mayoría de los estudios caracterizan poblaciones de Schwann presentes en nervios de gran calibre.

Con respecto a los datos publicados por Arthur-Farraj y colaboradores, los resultados demostraban que las muestras de nervio eran transcripcionalmente más similares a las poblaciones Doble+ y Sox2+ que a las fracciones Doble- y Myf5+, ya que había muchos genes que se expresaban en común; *Foxd3*, *Sox10*, *ErbB3*, *L1cam*, *Cdh2*, *S100b* y *Egr1*. Además, al comparar en detalle el patrón de expresión de las distintas muestras de nervio (seccionado y no seccionado), se observó que las células Doble+ y Sox2+ se correspondían principalmente con las muestras de nervio seccionadas, es decir, las células de Schwann desdiferenciadas. Así, coincidiendo con las Doble+ y Sox2+, los genes asociados con la activación o la reprogramación de las células de Schwann tras un daño, como *Gap43*, *Sox2*, *Jun* y *Pou3f1*, estaban más expresados, y los genes relacionados con la formación de la mielina y la diferenciación de las células de Schwann, como *Mal*, *Mpz*, *Pmp22*, *Mbp*, *Prx*, *Cjb1 (Cx32)* y *Egr2*, estaban infra-expresados en los nervios seccionados, en comparación a los nervios intactos.

Adicionalmente, se encontraron genes que se expresaban exclusivamente en las fracciones Doble+ y Sox2+; *Ngfr*, *Tcfap2a*, *Gjc3 (Cx29)*, *Pax3* y *Nestina*. La expresión exclusiva de estos marcadores podía indicar la existencia de diferencias fenotípicas entre las células de Schwann aisladas de los distintos tejidos, o podía deberse simplemente a diferencias en el estadio de las células, ya que el origen, el procesamiento y la manipulación de las muestras difería notablemente entre los distintos estudios.

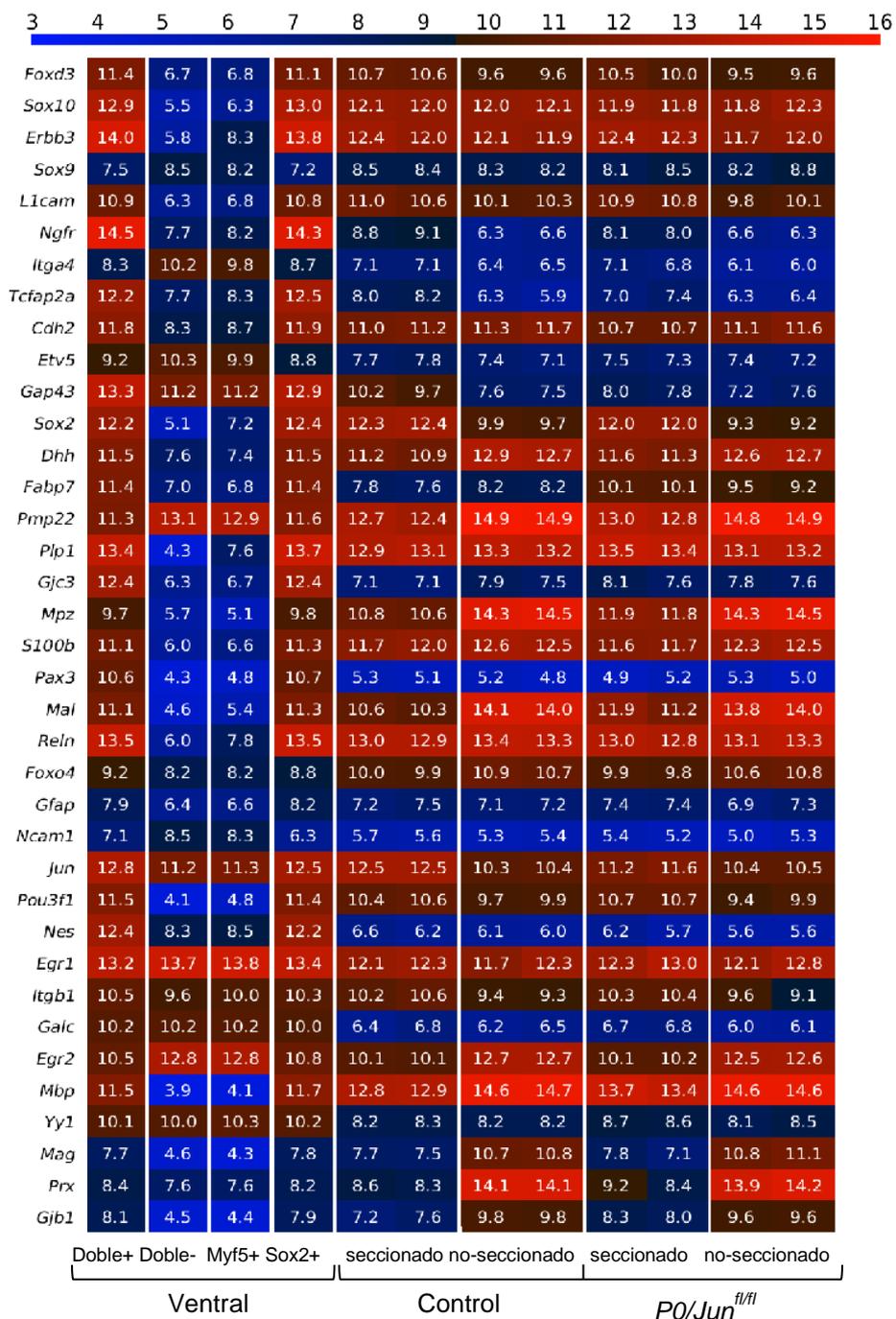


Figura 1.35. Genes del linaje de Schwann expresados en fracciones celulares separadas de cultivos de esferas derivados de la línea triple transgénica *Myf5-Cre^{Sor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}*. Representación gráfica (*Heatmap*) del nivel de expresión de genes asociados con el linaje de Schwann. A la izquierda, fracciones aisladas por citometría de flujo a partir de cultivos de piel ventral (Doble+, Doble-, Myf5+ y Sox2+). A la derecha, datos de un estudio independiente en el que se analizaron muestras de nervio ciático de animales con fenotipo silvestre (Control) y animales transgénicos en los que se eliminó específicamente el factor de transcripción *c-Jun* en células de Schwann (*P0^{Cre}/Jun^{fl/fl}*). En este estudio, el patrón de expresión génica fue analizado en nervios intactos (no seccionado) y 7 días después de seccionar el nervio (seccionado) (Arthur-Farraj y cols., 2012).

CAPÍTULO 2

1. MUESTRAS CLÍNICAS HUMANAS

Para la realización de los ensayos recogidos en este capítulo, se han utilizado neurofibromas cutáneos y biopsias de piel (zonas no afectadas) de pacientes con neurofibromatosis tipo 1 (NF1), así como muestras de piel extraídas de donantes sanos. Las muestras derivadas de pacientes con NF1, fueron facilitadas por el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Donostia (HUD, San Sebastián), y las biopsias de piel de donantes sanos, se obtuvieron a partir de desechos clínicos procedentes de operaciones de circuncisión, facilitadas por el Doctor Juan Pablo Sanz Jaka, especialista en urología del Hospital Universitario Donostia (HUD, San Sebastián). Los experimentos llevados a cabo con muestras derivadas de pacientes con NF1 y de donantes sanos, se engloban en el Proyecto de Investigación titulado "*Aislamiento, expansión y caracterización de precursoras de la piel humana (SKPs); análisis de su relación con la neurofibromatosis tipo 1*", que fue aprobado por el Comité Ético de investigación Clínica del Área Sanitaria de Guipúzcoa el 23 de marzo del 2011.

Todas las muestras se obtuvieron bajo previo consentimiento informado y bajo el estricto cumplimiento de las pautas legales y los principios éticos que regulan la experimentación con muestras biológicas procedentes de seres humanos. Se detallan a continuación;

- La Declaración de Helsinki (1964) promulgada por la Asociación Médica Mundial (AMM), donde se definen los principios éticos que rigen la investigación médica en seres humanos.
- El Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina (1997), también conocido como el "Convenio de Oviedo", impulsado por el Consejo de Europa para la defensa de los derechos humanos en el ámbito de la biomedicina.
- Los principios establecidos por la UNESCO en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (1997), junto a la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos (2003), que definen los principios éticos que rigen la obtención, el procesamiento, la conservación y el uso de los datos genéticos generados a partir de muestras biológicas humanas.
- La Ley 14/2007, publicada el 3 de julio en el boletín oficial del estado (BOE), donde se establecen los requisitos que regulan la protección de datos de carácter personal y los principios bioéticos en el marco de la investigación Biomédica.

2. EXTRACCIÓN, TRANSPORTE Y PROCESADO INICIAL DE MUESTRAS CLÍNICAS

Los neurofibromas fueron obtenidos por escisión quirúrgica y las muestras de piel control de paciente, mediante sacabocados o *punch* de 4mm. Las extracciones se llevaron a cabo bajo anestesia local. Los neurofibromas y las muestras de piel obtenidas de paciente y de donantes sanos, se recogieron y transportaron en medio RPMI suplementado con 2% de penicilina/estreptomicina. Por lo general, cada una de las biopsias se utilizó en varios experimentos, por lo que, tras ser recibidas, las muestras se trocearon y cada fragmento se procesó de acuerdo al protocolo del experimento al que iba destinado;

- Los fragmentos destinados a la extracción de ARN, se incubaron durante toda la noche a 4°C en una solución estabilizadora de ARN (RNA later®). Tras esta incubación, las muestras se lavaron con PBS y se congelaron a -80°C en tubos libres de RNasas.
- Los fragmentos de tejido destinados al análisis histológico, se enviaron en PBS a la unidad de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Donostia. Las muestras se colocaron en moldes de plástico sumergidos en el compuesto OCT (*Optimal Cutting Temperature*) y se congelaron directamente en nitrógeno líquido. Las muestras se mantuvieron congeladas a -80°C.

Los fragmentos de tejido destinados al aislamiento y el cultivo *in vitro* de precursores dérmicos, se mantuvieron a 4°C en medio RPMI + 2% de penicilina/estreptomicina hasta su procesamiento.

3. MUESTRAS PROCESADAS

Código	Tipo de muestra	Zona Donante	Fecha	Número	Sexo	Edad
BP001-12	Piel	Prepucio	3.01.2012	BP001	Varón	3
BP008-12	Piel	Prepucio	23.01.2012	BP008	Varón	9
BP013-12	Piel	Prepucio	3.02.2012	BP013	Varón	3
BP027-12	Piel	Prepucio	2.04.2012	BP027	Varón	3
BP032-12	Piel	Prepucio	9.07.2012	BP032	Varón	2

¹ la nomenclatura escogida para designar las biopsias fue, *BP* (biopsia de prepucio), seguido del número asignado en base al orden de llegada y el año de recepción de la muestra. Ejemplo, BP013-12.

Tabla 2.2. Neurofibromas y biopsias de piel no afecta procedentes de pacientes con NF1					
Código biopsia	Tipo de muestra	Zona Donante	Número	Sexo	Edad
NF001-11/1N	Neurofibroma	Tronco	NF001	Varón	33
NF001-11/1C	Piel sana	Tronco			
NF002-11/1N	Neurofibroma	Tronco	NF002	Mujer	46
NF002-11/1C	Piel sana	-			
NF003-11/1N	Neurofibroma	-	NF003	Varón	53
NF003-11/1C	Piel sana				
NF004-12/1N	Neurofibroma	Cabeza	NF004	Varón	55
NF004-12/1C	Piel sana	Tronco			
NF005-12/1N	Neurofibroma	-	NF005	Mujer	52
NF005-12/1C	Piel sana	-			
NF006-12/1N	Neurofibroma	Tronco	NF006	Varón	63
NF006-12/1C	Piel sana	Tronco			
NF007-12/1N	Neurofibroma	Brazo	NF007	Mujer	21
NF007-12/1C	Piel sana	Brazo			
NF008-12/1NA	Neurofibroma	Abdomen	NF008	Mujer	36
NF008-12/1NB		Espalda			
NF008-12/1NC		Mentón			
NF008-12/1ND		Rama mandibular			
NF008-12/1C	Piel sana	Tronco			
NF009-12/1N	Neurofibroma	-	NF009	Mujer	84
NF009-12/1C	Piel sana	-			
NF010-12/1N	Neurofibroma	Brazo	NF010	Mujer	58
NF010-12/1C	Piel sana	Tronco			
NF011-12/1NA	Neurofibroma	Nalga	NF011	Varón	48
NF011-12/1NB		Brazo			
NF011-12/1C	Piel sana	Tronco			
NF012-13/1C	Neurofibroma	Cara	NF012	Mujer	42
NF012-13/1N	Piel sana	Abdomen			
NF013-16/1NA	Neurofibroma	Pecho	NF013	Varón	-
NF013-16/2NB		Pecho			
NF013-16/1C	Piel sana	Pecho			

¹La nomenclatura de las biopsias de paciente fue, *NF*, seguido del número asignado en base al orden de llegada y el año de recepción de la muestra, además de las iniciales N (tejido tumoral; neurofibroma) y C (tejido control; piel no afecta de paciente) para especificar el tipo de muestra. Ejemplo, NF003-13/N.

4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

4.1 Extracción de ARN y retro-transcripción

La extracción de ARN de tejido proveniente de muestras clínicas humanas, incluyendo muestras de neurofibroma y biopsias de piel extraídas de pacientes y de donantes sanos, se realizó con el kit **miRNeasy mini kit** de Qiagen. Las muestras de tejido se recogieron como se indica en el apartado 3.2 y se siguieron las instrucciones para la extracción de ARN de muestras de tejido indicadas por el fabricante. Las muestras congeladas en seco, se descongelaron a temperatura ambiente y se incorporaron una bola de acero inoxidable y 700 µl de búfer de lisis Qiazol®. Los tubos se colocaron compensados en el Tissue Lyser (Qiagen) y se realizaron de 2 a 4 ciclos de agitación de 2 minutos de duración a 30 hercios. Las muestras se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió cloroformo y se centrifugaron 15 minutos a 12.000 rpm para promover la separación de las fases. La fase superior acuosa (donde fracciona el ARN), se recogió en otro tubo y se añadió el doble del volumen de etanol al 100% (grado molecular), proporcionando al medio condiciones óptimas para la unión del ARN. Esta solución se pasó a columnas de RNeasy mini spin column y se centrifugó para dejar el ARN unido a su paso a través de la membrana. En este punto se procedió a la digestión con la DNasa tipo I, incubando la membrana durante 15 minutos con una solución de DNasa tipo I (RNase-Free DNase Set). Tras eliminar la enzima, lavando la membrana con búfer RWT, el RNA unido a la membrana se lavó con búfer RPE y con etanol al 80%. La membrana se secó centrifugando las columnas a 12.000 rpm varios minutos y el ARN se eluyó en 30 µl de agua libre de RNasas. Finalmente, se determinó la concentración de ARN en el NanoDrop® y las muestras se almacenaron a -80°C. La retro-transcripción de las muestras de ARN extraídas, se realizó con el kit High Capacity RNA to cDNA de Applied Biosystems, siguiendo el protocolo detallado en el apartado de material y métodos general.

4.2 Pre-amplificación y RT-qPCR

El análisis de expresión de genes expresados durante el desarrollo del linaje de Schwann, se realizó con la tecnología TaqMan® (apartado 3.6.5.2 de material y métodos general). Los transcritos de los genes objeto de estudio, se amplificaron para aumentar selectivamente su número de copias. Para llevar a cabo la reacción de pre-amplificación, se utilizó el kit TaqMan® preAmp Master Mix y se siguió el protocolo detallado el apartado 3.6.4 de material y métodos general. Para la reacción de RT-qPCR, se pre-amplificaron 50 ng de ADNc y el producto amplificado se cargó diluido 20 veces. La reacción se realizó con las sondas TaqMan® recogidas en la **Tabla 2.3**.

Gen (Símbolo humano)	Referencia gen ¹	Referencia de la sonda
<i>GADPH</i>	2597	Hs02758991_g1
<i>GAP43</i>	2596	Hs009671387_m1
<i>L1-CAM</i>	999	HS01023894_m1
<i>MCAM</i>	4162	Hs00174838_m1
<i>NCAM</i>	4684	Hs00941830_m1
<i>NF1</i>	4763	Hs01035108_m1
<i>NGFR</i>	4804	HS00609977_m1
<i>POU3F1</i>	5453	Hs00538614_s1
<i>S100b</i>	6285	Hs00902901_m1
<i>Sox10</i>	6663	Hs00366918_m1
<i>Sox2</i>	6657	Hs01053049_s1
<i>Sox9</i>	662	Hs01001343_g1
<i>TBP</i>	6908	Hs00427620_m1

¹ la referencia del gen se obtuvo del *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.

5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA POR INMUNOFUORESCENCIA

5.1 Tinción de cortes congelados de piel

Las muestras de piel se recogieron y procesaron como se indica en el apartado 1.1.2. Se realizaron cortes de 5 µm de gro^{Sor} en el criostato de la unidad de Anatomía Patológica y se depositaron sobre portaobjetos diseñados para favorecer la adhesión de muestras congeladas (Superfrost®). Los cortes de piel se mantuvieron congelados a -80°C. Para la tinción de cortes congelados, se utilizaron Shandon Coverplates™ acoplados a cubetas Sequenza™. Las muestras se dejaron varios minutos a temperatura ambiente, evitando que se secan por completo, y se fijaron. La fijación fue variable y dependiente del anticuerpo primario utilizado, aplicándose los protocolos descritos en la **Tabla 2.4**;

	Fijador	Tiempo	Permeabilizador	Tiempo
Fijación 1	Acetona*	10 minutos	-	-
Fijación 2	Paraformaldehído al 4%	10 minutos	Triton X-100 al 0,1%	10 minutos

* La acetona es un agente permeabilizante.

Una vez fijadas y permeabilizadas, las muestras se acoplaron a los Coverplates™ y se insertaron individualmente en los huecos de la cubeta. Se bloquearon las uniones inespecíficas incubando los cortes con FBS al 10% diluido en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo (FBS al 10% en PBS) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente o hasta el día siguiente a 4°C. Se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PBS 1X y un tercer lavado de 10 minutos con tampón de bloqueo. Se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos en tampón de bloqueo y se incubaron durante 1 hora a temperatura

ambiente, en oscuridad. Se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PBS y se tiñeron los núcleos con 1 mg/ml de Hoechst 33258 durante 1 minuto. Se volvieron a lavar los cortes con PBS y se aclararon con agua. Para el montaje de las muestras se colocó una gota de medio de montaje Fluorogel® y se cubrió con un cubre rectangular de 24 x 50 mm. Las preparaciones se dejaron secar 30 minutos a temperatura ambiente y se guardaron a 4°C hasta su análisis por microscopía.

5.2 Análisis por microscopía

El análisis de las preparaciones (tinciones de inmunofluorescencia) y la adquisición de imágenes se realizaron en un microscopio óptico de fluorescencia Nikon Eclipse 80i (con objetivos de 4x, 10x, 20x y 40x) acoplado a una cámara Nikon DSFi1 con Nikon Digital Sight y controlado por el programa informático Nikon NIS-Elements AR versión 3.2.

1. CARACTERIZACIÓN DE NEUROFIBROMAS CUTÁNEOS EN PACIENTES CON NEUROFIBROMATOSIS TIPO1

1.1 Selección de expresión de marcadores del linaje de Schwann

De acuerdo con la hipótesis planteada en esta tesis, los neurofibromas cutáneos se originan a partir de las células de Schwann desdiferenciadas de la piel. Con el objetivo de determinar el estadio de diferenciación de las células de Schwann presentes en los neurofibromas, se analizó la expresión de marcadores asociados con diferentes estadios del linaje Schwann a nivel génico (por RT-qPCR) y proteico (por inmunofluorescencia) (**Figura 2.1**).

Cresta neural	Precursora de Schwann	Schwann inmadura	Schwann no mielinizante	Schwann mielinizante	Célula de Büngner
SOX10					
SOX9					
NGFR (P75NTR, CD271)					
	CDH19				
	SOX2				
	S100β				
	NCAM (CD56)				
	MCAM (CD146)				

Figura 2.1 Panel de marcadores de genes del linaje de Schwann para el análisis de expresión por RT-qPCR. La imagen superior representa el desarrollo del linaje Schwann y la desdiferenciación de las células en respuesta a daño, dando lugar a células de Schwann reparadoras, también denominadas células de Büngner. Imagen adaptada de (Jessen y Mirsky, 2005). El panel inferior incluye los marcadores seleccionados en representación de los distintos estadios del linaje de Schwann. En la dermis humana, los marcadores *NGFR*, *NCAM* y *MCAM* se expresan también en las células de Schwann mielinizantes (en amarillo). En los nervios periféricos estos tres marcadores (*NGFR*, *NCAM* y *MCAM*) se asocian exclusivamente a las células de Schwann no-mielinizantes (Reinisch y Tschachler, 2012).

1.1.1 Análisis de expresión de marcadores del linaje de Schwann por RT-qPCR

La expresión de los marcadores asociados con el linaje de Schwann se analizó inicialmente por RT-qPCR (**Figura 2.2**) utilizando muestras de neurofibroma y biopsias de piel sana extraídas de pacientes con NF1. Las muestras fueron facilitadas por el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Donostia y fueron donadas bajo consentimiento informado. Las muestras de tejido destinadas al análisis por RT-qPCR fueron debidamente almacenadas en *RNA later* para prevenir la degradación del ARN hasta su procesamiento. La extracción del ARN de los distintos tejidos se realizó con Trizol®, aplicando varios ciclos de disgregación mecánica en el *Tissue Lyser*. En el caso de los neurofibromas, el número de ciclos necesarios para disgregar la muestra fue mayor, debido a que el tejido tumoral era más consistente y contenía una matriz extracelular enriquecida en

colágeno. En varias de las muestras la cantidad de ARNm obtenida fue limitada y para poder analizar todos los genes seleccionados en el estudio se realizó una pre-amplificación del ARNm con el kit pre-Amp Master mix de Applied Biosystems. En el análisis de datos los valores Cq se normalizaron en base a la expresión del gen endógeno *GAPDH* y los valores normalizados (ACq) de los neurofibromas fueron comparados con los valores ACq de muestras de piel procedentes del mismo paciente. Finalmente, el valor de expresión relativa (RQ) de cada uno de los genes fue determinado en aplicando el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ descrito por Livak y Schmittgen (Livak y Schmittgen, 2001).

El análisis de expresión génica reveló que el patrón de expresión de los neurofibromas se correspondía con el de las células de Schwann en un estadio desdiferenciado. Por un lado, los marcadores canónicos de Schwann *SOX10* y *S100β* estaban sobreexpresados en la mayoría de los neurofibromas, confirmando la presencia de múltiples células de Schwann en el tumor (gráficas **A** y **H**, **Figura 2.2**). Sin embargo, el factor de transcripción *SOX9*, expresado también a lo largo de todo el linaje de Schwann, se encontraba infraexpresado en prácticamente todas las muestras de neurofibroma con respecto a la muestra control (gráfica **B**, **Figura 2.2**). Por otro lado, y en relación al estadio de las células de Schwann, los genes *CDH19* y *SOX2*, propios de estadios precursores, y re-expresados durante la desdiferenciación, estaban altamente expresados en el 100% (7/7) y 85% (6/7) de los tumores, respectivamente. De acuerdo con este fenotipo, los genes *NGFR* y *NCAM*, propios de células de Schwann no mielinizantes y expresados también en las células desdiferenciadas, se encontraban sobreexpresados en un número variable de tumores (gráficas **C-F**, **Figura 2.2**).

Por otro lado, el marcador *MCAM*, asociado a las células de Schwann terminalmente diferenciadas de la dermis (Reinisch y Tschachler, 2012), se sobreexpresaba en varias de las muestras, pero en comparación al resto de genes analizados su nivel de expresión era mucho menor (gráfica **G**, **Figura 2.2**). Con el propósito de determinar si existía una disminución en la cantidad de transcrito por la presencia de células homocigotas nulas (*NF1*^{-/-}) en el tumor, se analizó la expresión del gen *NF1*. Los resultados revelaron que en prácticamente todos los pacientes la expresión de *NF1* era similar entre el neurofibroma y la muestra de piel sana (gráfica **I**, **Figura 2.2**). Tal y como sucede en los estudios dirigidos a identificar mutaciones somáticas en el gen *NF1*, la incapacidad de percibir diferencias en la expresión de *NF1*, podía deberse a un enmascaramiento por parte del resto de componentes celulares presentes en el neurofibroma.

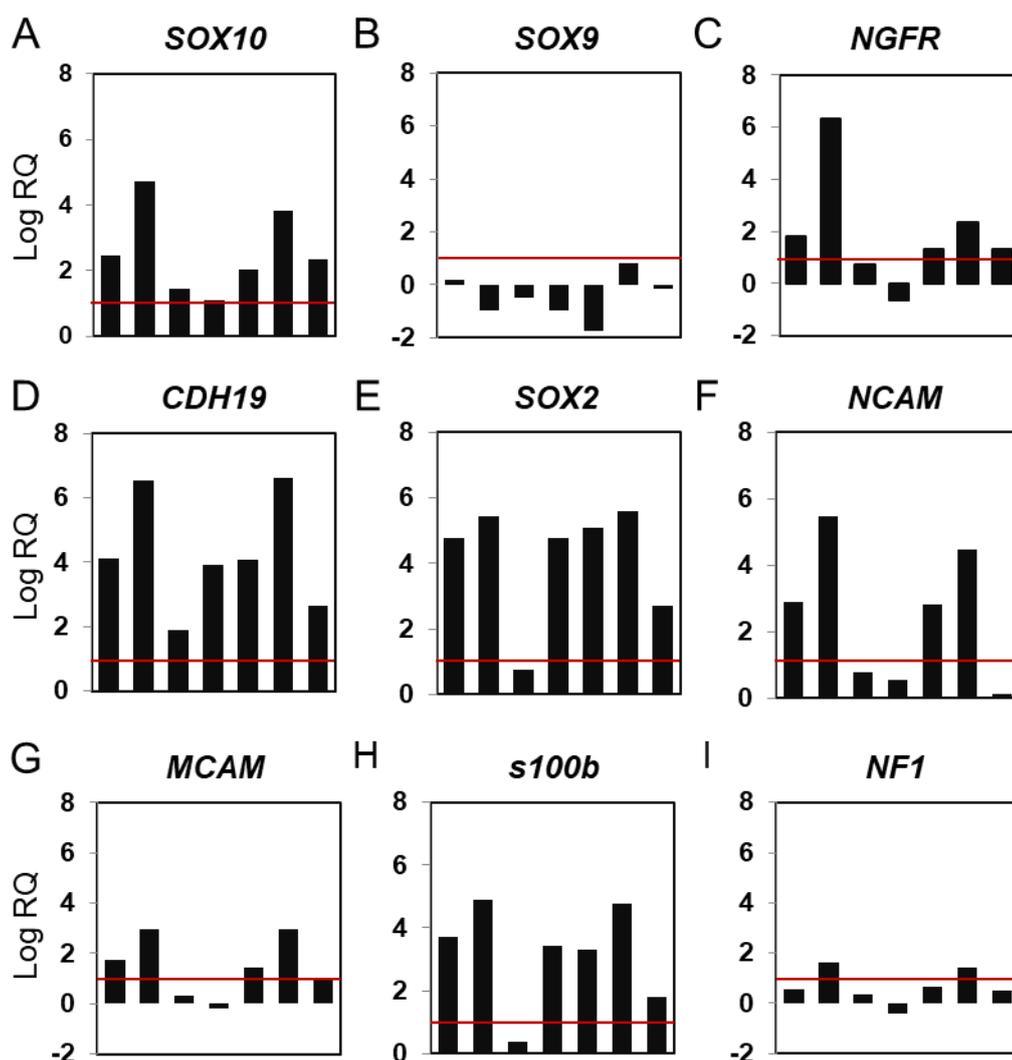


Figura 2.2. Análisis de expresión de genes del linaje de Schwann en neurofibromas cutáneos por RT-qPCR. (A-I) Representación gráfica de los valores de expresión relativa (RQ) en escala logarítmica con base 2 (LOG₂ RQ). Se analizaron un total de 9 genes *SOX10* (A), *SOX9* (B), *NGFR* (C), *CDH19* (D), *SOX2* (E), *MCAM* (F), *NCAM* (G), *S100* (H) y *NF1* (I) en neurofibromas cutáneos procedentes de 7 pacientes. En cada caso, la piel sana del paciente se utilizó como control (muestra de referencia) asignándole un valor RQ=1 (representado con una línea roja). Los valores C_q de cada uno de los genes fueron normalizados respecto al gen endógeno *GAPDH*. Cada una de las barras representa el valor LOG₂ RQ de un único paciente.

1.1.2 Análisis de expresión de los genes sobre-expresados por inmunofluorescencia

Tras el análisis de expresión génica por RT-qPCR, se quiso estudiar el patrón de expresión de los marcadores más expresados en los neurofibromas por inmunofluorescencia. Para esto, se utilizaron muestras de tumor y como control se utilizó piel no afectada de paciente (Piel afectada) y piel procedente de donantes sanos (Donante sano). Se realizaron secciones de las muestras congeladas y se analizó la expresión de los marcadores CDH19, p75NTR, S100, SOX10 y SOX2 por inmunofluorescencia.

Entre los distintos genes sobreexpresados en los neurofibromas, el gen *CDH19* resulto especialmente interesante, por ser un marcador exclusivo de las células precursoras de Schwann y expresarse también en las células de Schwann aisladas en cultivo como resultado de la dediferenciación inducida por las condiciones experimentales (Etxaniz y cols., 2014; Stratton y cols., 2017). La tinción por inmunofluorescencia reveló que la expresión de CDH19 en la piel no era uniforme, y por eso, para comparar su patrón de expresión en las distintas muestras se cuantificó el número de células CDH19+ en las regiones papilar (superior) y reticular (inferior) de la dermis (**Figura 2.3**). En el neurofibroma el límite entre la dermis papilar y reticular era difuso, de modo que se tuvo en cuenta el gro^{Sor} de la dermis papilar de la muestra control para poder establecer las regiones *superior* e *inferior* del tumor. Este ensayo solo se pudo llevar a cabo sobre muestras procedentes de un único paciente, ya que el resto de muestras recibidas fueron destinadas al análisis de expresión por RT-qPCR. El conteo de células CDH19+ reveló que, en la región superior el neurofibroma presentaba un 30% y un 40% más de células positivas que la piel del donante y la piel no afecta del paciente, respectivamente (panel A, **Figura 2.3**). Mientras, en la región inferior del neurofibroma el número de células CDH19+ fue aproximadamente un 70% mayor en comparación a los tejidos control (panel B, **Figura 2.3**). La distribución y la morfología de las células CDH19+ en las muestras de piel control fueron similares y en ambos casos se detectaron pocas células distribuidas principalmente en la dermis papilar (paneles C-F, **Figura 2.3**). En los neurofibromas, las células CDH19+ presentaban un aspecto fibrilar y se repartían de forma uniforme por toda la región superficial y profunda de la muestra (paneles F-J, **Figura 2.3**).

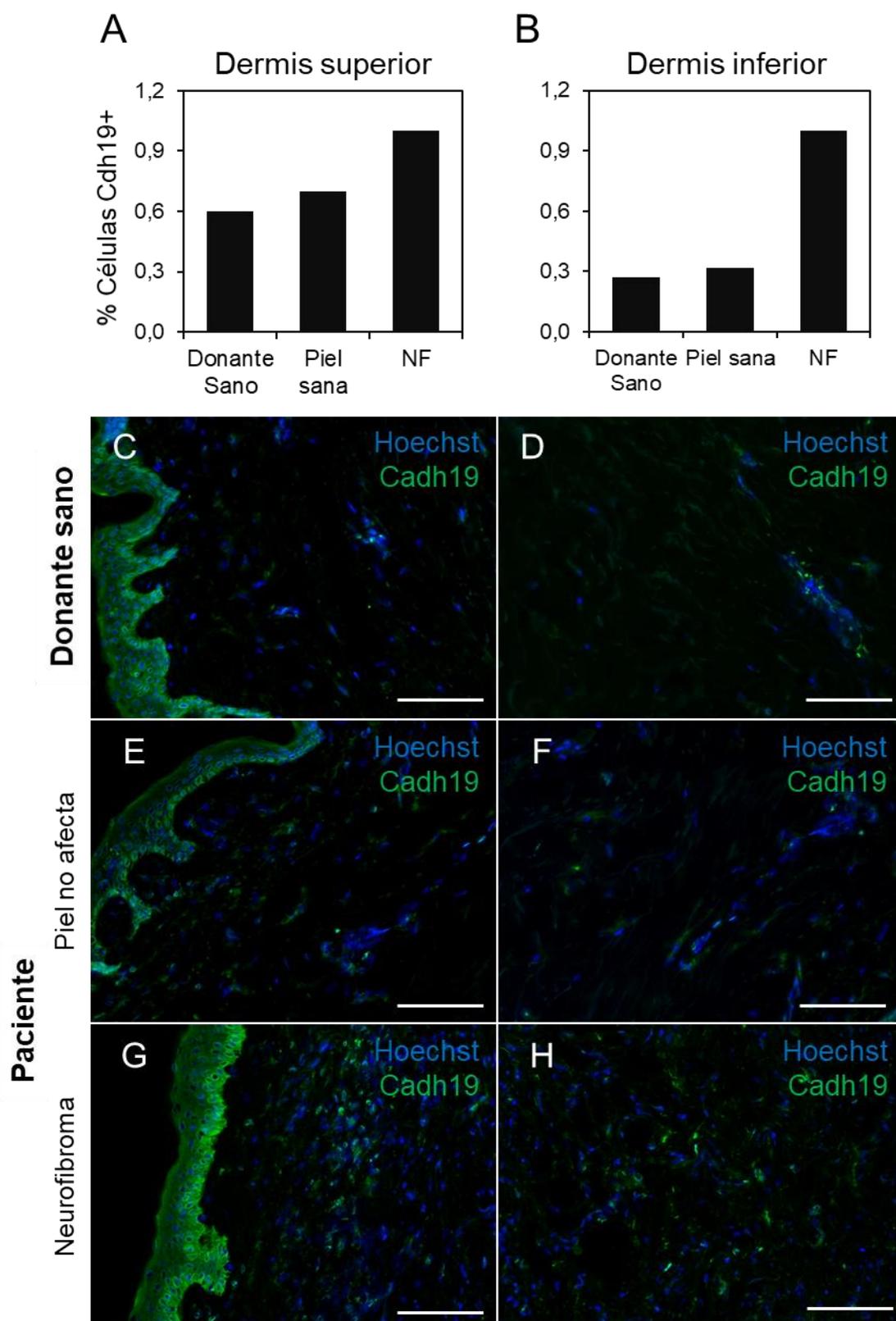


Figura 2.3. Análisis de expresión y conteo de células CDH19+ por inmunofluorescencia. La expresión de CDH19 se analizó por inmunofluorescencia en secciones histológicas de piel de donante sano y en muestras derivadas de un paciente con NF1 (n=1). (A-B) El porcentaje de células CDH19+ en la región superior (A) e

inferior (**B**) del neurofibroma y de las muestras de piel control, se representa como el número de células CDH19+ en las muestras control con respecto al neurofibroma (asignándole un valor=1). (**C-F**) Imágenes representativas de las muestras teñidas con el anticuerpo primario anti-CDH19 y marcadas con un anticuerpo secundario conjugado con alexa-488 (verde). En la piel no afecta de donante y de paciente se observaron muy pocas células CDH19+, tanto en la región superficial, como en la profunda de la dermis. Por otro lado, el número de células positivas para CDH19 fue superior en toda la muestra del neurofibroma, pero el número de células CDH19+ estaba especialmente aumentado en la región interna del tumor. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258. Las barras de tamaños representan 100 μm en todos los paneles.

También se analizó la expresión de los marcadores p75NTR (**Figura 2.4**) y S100 (**Figura 2.5**), utilizados frecuentemente en la caracterización de los neurofibromas. En la piel sana procedente de donante las células p75NTR+ y S100+ presentaban un aspecto bipolar y se encontraban dispersas en la superficie de la dermis (paneles **A-A'**, **Figuras 2.4** y **2.5**), mientras que, en la región interna, las células p75NTR+/S100+ formaban parte del plexo nervioso de la piel (paneles **B-B'**, **Figuras 2.4** y **2.5**). Este mismo patrón fue observado en la muestra de piel no afecta procedente de paciente, donde las células positivas para p75NTR y S100 se distribuían homogéneamente en la dermis papilar y se asociaban a los haces nerviosos cutáneos en las áreas más profundas de la dermis (paneles **C-C'** y **D-D'**, **Figuras 2.4** y **2.5**). En el tumor, el patrón de expresión de estos marcadores fue muy diferente, ya que las células p75NTR+/S100+ se encontraban dispersos por toda la muestra. El tejido tumoral se caracterizaba por ser muy compacto y las células se extendían formando estructuras fibrilares (paneles **E-E'** y **F-F'**, **Figuras 2.4** y **2.5**).

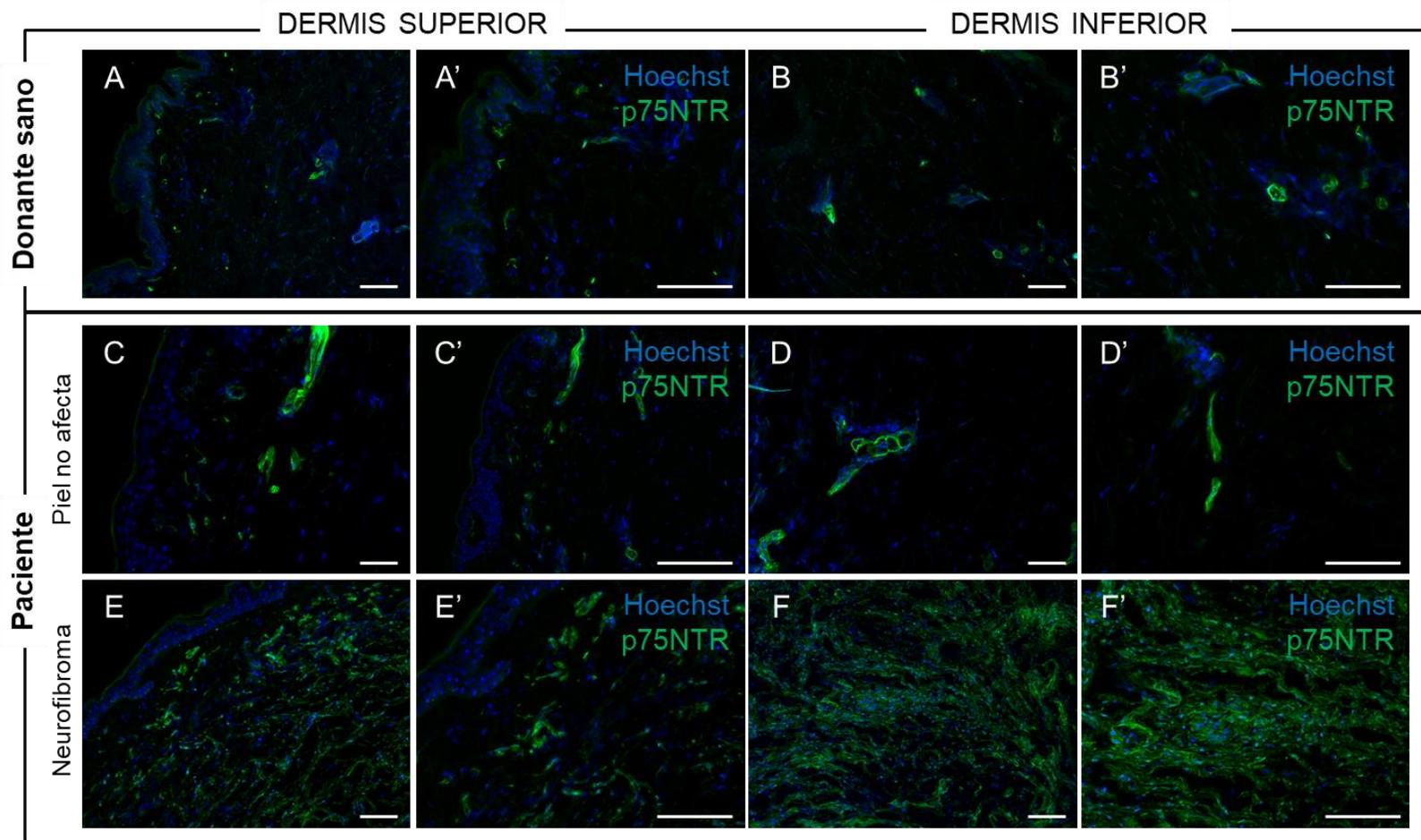


Figura 2.4. Análisis de expresión de p75NTR. La expresión de p75NTR se analizó por inmunofluorescencia en secciones histológicas de piel de donante sano y en muestras derivadas de un paciente con NF1. **(A-B')** Piel sana de donante; las células p75NTR+ (verde) se detectaron dispersas en la dermis superior y en regiones profundas de la dermis. **(C-D')** Piel no afectada de paciente; las células p75NTR+ (verde) se detectaron distribuidas en la dermis papilar y en formando parte de estructuras fibrilares compactas localizadas en varias regiones de la dermis. **(E-F')** Neurofibroma cutáneo; el marcaje con anti-p75NTR (verde) se detectó de forma muy intensa en todo el neurofibroma. Las células p75NTR+ presentaban un aspecto alargado y se extendían por toda la muestra formando estructuras fibrilares muy compactas. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 100 μ m en todos los paneles.

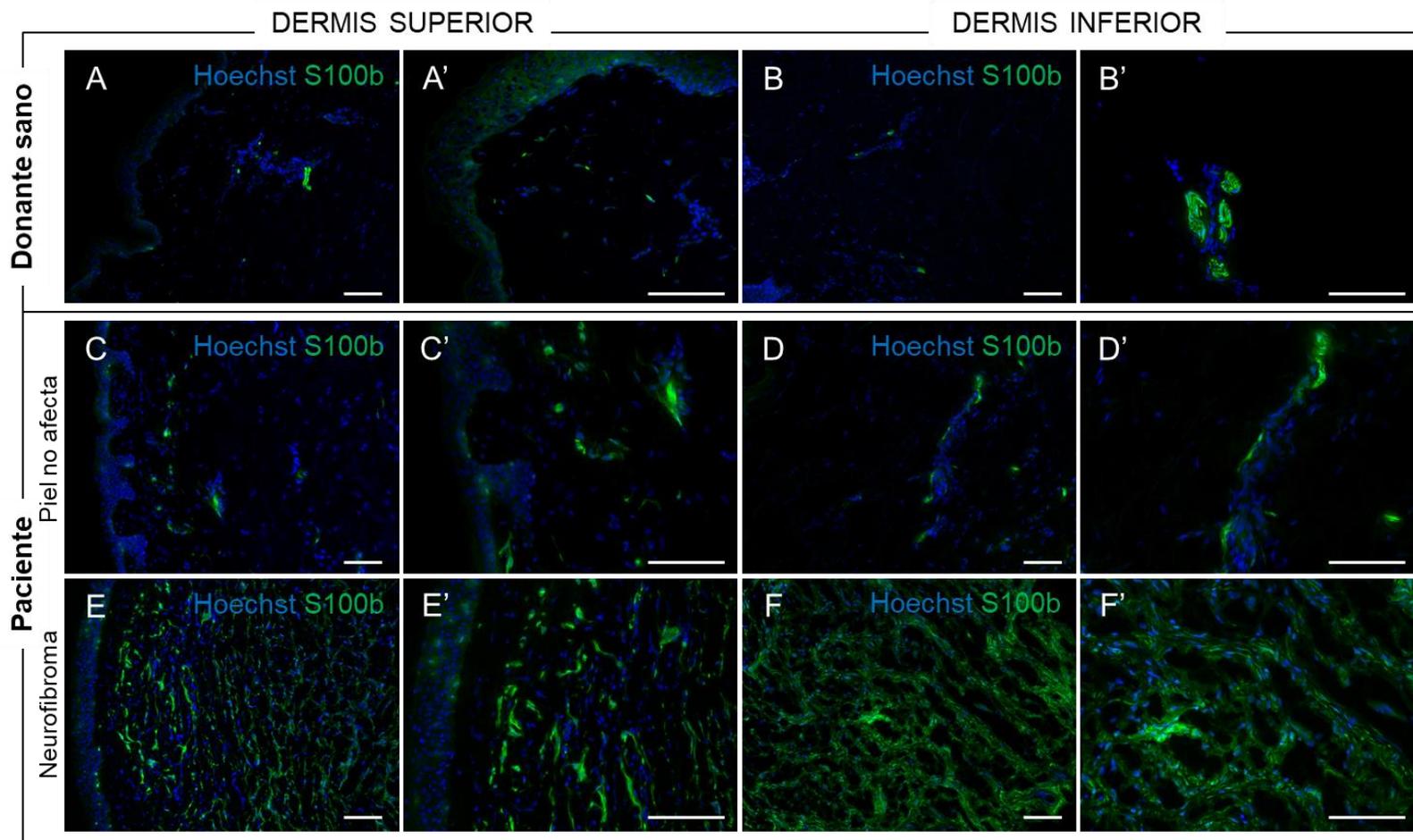


Figura 2.5. Análisis de expresión de S100. La expresión de S100 se analizó por inmunofluorescencia en secciones histológicas de piel de donante sano y en muestras derivadas de un paciente con NF1. **(A-B')** Piel sana de donante; las células S100+ (verde) se detectaron dispersas en la dermis superior y empaquetadas en haces nerviosos localizados en regiones más profundas de la dermis. **(C-D')** Piel no afectada de paciente; las células S100+ (verde) se detectaron distribuidas en la dermis papilar y asociadas a estructuras compactas de la dermis reticular. **(E-F')** Neurofibroma cutáneo; el marcaje con anti-S100 (verde) se detectó de forma muy intensa en todo el neurofibroma. Las células S100+ presentaban un aspecto fibrilar y se extendían por toda la muestra formando estructuras filamentosas muy compactas. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 100 μ m en todos los paneles.

Durante la caracterización de una de las muestras de piel no afecta procedente de un paciente con NF1 se detectó una agrupación de células muy compacta en el área de la dermis reticular. El aspecto del tejido en esta región era similar al observado en los neurofibromas, donde las células se encontraban fuertemente empaquetadas y formaban estructuras filamentosas. Adicionalmente, la tinción de la muestra por inmunofluorescencia reveló una fuerte expresión de los marcadores CDH19 (paneles A-A', **Figura 2.6**), p75NTR (paneles B-B', **Figura 2.6**) y S100 (paneles C-C', **Figura 2.6**). Así, atendiendo al patrón de expresión, a la morfología y a la distribución de las células en esta región de la muestra, se llegó a la conclusión de que podía corresponder a un neurofibroma incipiente desarrollándose en la piel no afecta del paciente (microneurofibroma).

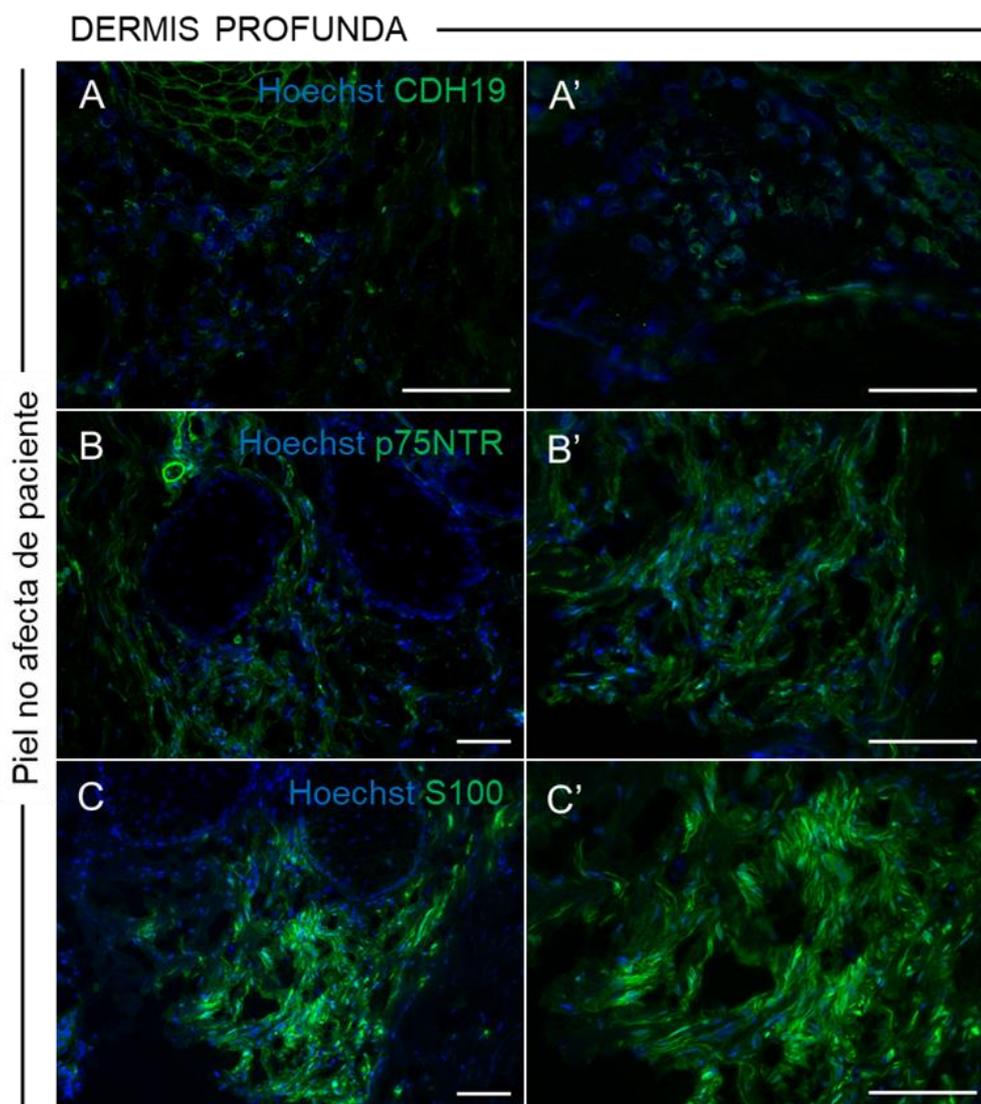


Figura 2.6. Caracterización de un neurofibroma incipiente en piel no afecta de paciente. En una de las muestras de piel control por inmunofluorescencia se detectó una masa celular compacta, con células fuertemente empaquetadas que expresaron los marcadores CDH19 (**A-A'**), p75NTR (**B-B'**) y S100 (**C-C'**). El patrón de expresión y la apariencia de las células eran semejantes a las observadas en los neurofibromas cutáneos, lo cual indicaba el crecimiento de un tumor en la piel no afecta del paciente con NF1. Las barras de tamaño representan 100 μm en todos los paneles.

Para caracterizar más en detalle el tejido tumoral se analizó la expresión de los factores de transcripción SOX10 y SOX2 en las muestras de neurofibroma. De acuerdo con los resultados de expresión llevados a cabo por RT-qPCR, donde ambos factores estaban notablemente sobre-expresados en prácticamente todas las muestras, el análisis por inmunofluorescencia reveló la presencia de múltiples células positivas para SOX10 y SOX2 (**Figura 2.7**). El anticuerpo anti-SOX10 fue combinado con CDH19 y demostró que algunas células co-expresaban ambos marcadores (flechas en el panel **A'**, **Figura 2.7**), aunque este fenotipo no se correspondía con la mayor parte de las células positivas para SOX10 que no parecían expresar el marcador CDH19. Las células SOX10+ se encontraron distribuidas por toda la muestra, pero se agrupaban formando pequeños cúmulos celulares en distintas áreas del neurofibroma. Las células SOX2+ se distribuían también por todo el tumor, con un patrón de expresión semejante al observado con SOX10 (flechas en los paneles **B-C**, **Figura 2.7**).

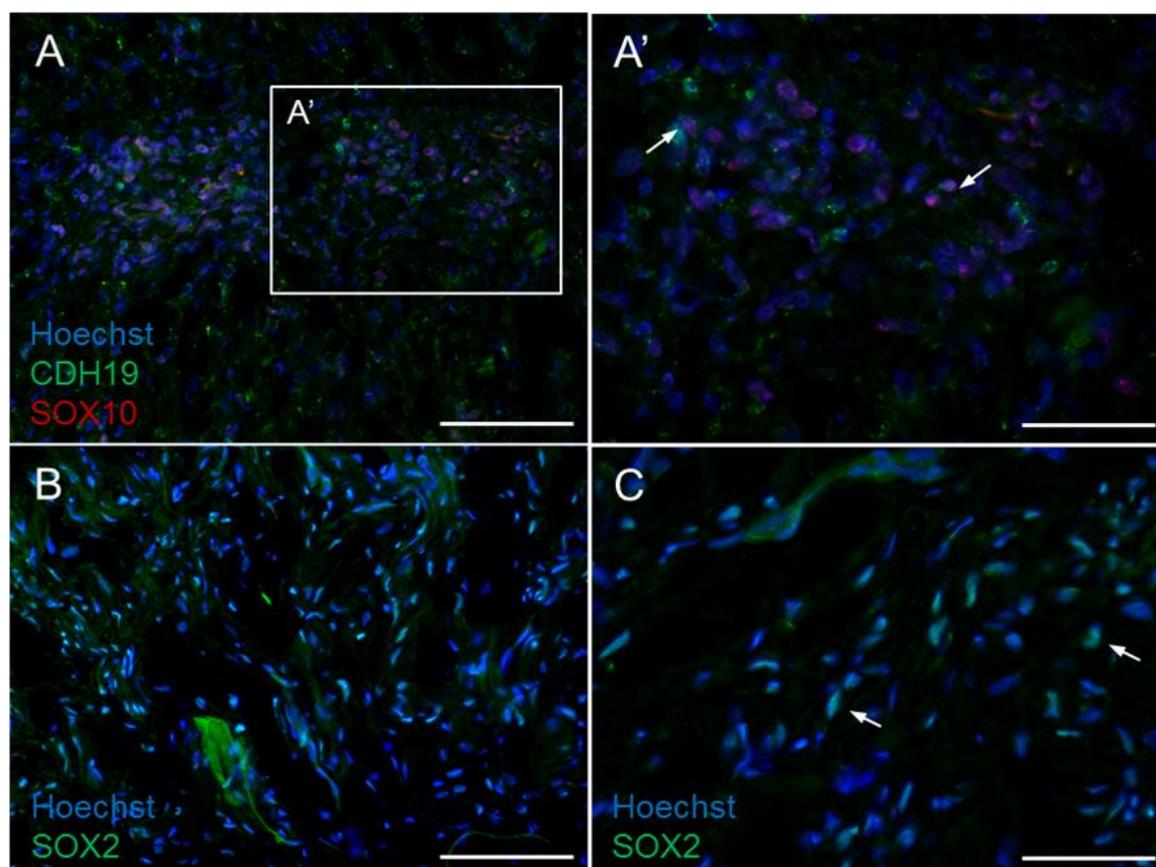


Figura 2.7. Análisis de expresión de SOX10 y SOX2 en neurofibromas. La expresión de los factores de transcripción SOX10 y SOX2 se analizó en secciones de neurofibromas cutáneos por inmunofluorescencia. (**A-A'**) En las muestras teñidas con anti-SOX10 (rojo) y anti-CDH19 (verde) se detectaron células SOX10+ agrupadas en varias regiones de la dermis. Algunas de estas células fueron también positivas para CDH19 (flechas en **A'**). (**B-C**) La expresión nuclear de SOX2 (verde) se detectó en múltiples células distribuidas uniformemente por toda la muestra. Las células SOX2+ se encontraban junto a células que no expresaban SOX2 (cabeza de flecha). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (azul). Las barras de tamaño representan 100 μm en todos los paneles.

DISCUSIÓN

En la piel, y posiblemente en otros tejidos, la identificación de poblaciones celulares “*stem*” o precursoras bajo un excesivo número de denominaciones ha generado confusión en el campo, debido a la reformulación constante de la nomenclatura y a los criterios, muchas veces laxos, por los que se ha considerado una población celular determinada como precursora, y distinta de otras descritas anteriormente. Entre otros muchos problemas, los marcadores específicos de determinadas poblaciones celulares distan de serlo, la pureza de las poblaciones a menudo es muy baja y se atribuyen resultados al “todo” que pueden venir de una parte, sin distinguir además qué resultados provienen de la manipulación *in vitro* de las células y cuáles ocurren en el entorno celular natural, *in vivo*. Así, la ausencia de criterios consensuados, de definiciones precisas y la falta de rigor experimental nos obliga a cuestionar la veracidad de muchos de los trabajos publicados. En nuestra opinión, los resultados obtenidos en esta Tesis contribuyen a clarificar el campo de las células precursoras dérmicas adultas (SKPs), demostrando que algunos de los experimentos de trazados de linaje *in vivo* publicados habían inducido a error a los investigadores del ámbito (Jinno y cols., 2010).

De acuerdo con datos previos del laboratorio respecto a la identidad de las células con potencial neural derivadas de la piel humana (Etxaniz y cols., 2014), esta Tesis demuestra que las células de Schwann de la piel del tronco ventral del ratón reversionan a un estadio progenitor tras su aislamiento en cultivo, en un mecanismo de reprogramación dependiente de los niveles de expresión del factor de transcripción *Sox2*. Postulamos que las células de Schwann reprogramadas son responsables del fenotipo atribuido a varias poblaciones de células progenitoras neurales descritas en la piel (SKPs, EPI-NCSC y HPA-SC), incluyendo también las células madre dérmicas identificadas como células *Sox2+* (Biernaskie y cols., 2009). En relación al origen embrionario de los precursores neurales de la dermis del tronco, los cuales fueron relacionados con un origen mesodérmico (trazados de linaje por *Myf5-Cre^{Sox}* y *Dermo1-Cre*), se demuestra que las células de Schwann dérmicas no pertenecen al linaje celular *Myf5+* y que las células trazadas por la activación del promotor en el constructo *Myf5-cre^{Sox}* (células presuntamente originadas en el dermomiótomo, DM) son en realidad células de Schwann.

Las células de Schwann *NF1^{-/-}* predominan en los neurofibromas cutáneos de pacientes con NF1. De acuerdo con el origen propuesto para este tipo de tumor, se piensa que la inducción de neurofibromas cutáneos requiere de mecanismos y/o factores adicionales que provoquen la desestabilización de las células de Schwann y la consecuente formación del tumor. En esta Tesis, la caracterización de neurofibromas cutáneos revela que las células de Schwann expresan marcadores de dediferenciación, por lo que se propone la activación de las células de Schwann como evento inicial en el desarrollo de estos tumores. Así mismo, en base a nuestros resultados previos, postulamos que la capacidad de formar neurofibromas asociada a las SKPs corresponde realmente a las células de Schwann que forman parte de esta población, y que los neurofibromas cutáneos, al igual que los plexiformes, derivan del linaje de Schwann.

1. CÉLULAS CON POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN A PROGENIE NEURAL DE LA PIEL VENTRAL DEL RATÓN

La piel es un órgano estructural y funcionalmente complejo, altamente regenerativo y de muy fácil acceso, y representa un tejido particularmente atractivo para aislar y caracterizar células con potencial neural. Así, se han descrito varias poblaciones de células madre y/o progenitoras adultas capaces de diferenciarse a glía y neuronas (Biernaskie y cols., 2009; Hoffman, 2016; Sieber-Blum y Hu, 2008), con una capacidad destacada de generar células de Schwann mielinizantes. Imitando el rol de las células de Schwann en la regeneración de los nervios periféricos (Chen y cols., 2007), las células precursoras neurales obtenidas de la piel han sido ensayadas en varios modelos preclínicos de daño nervioso, incluyendo lesiones de médula espinal (Biernaskie y cols., 2007; Gorio y cols., 2004; Sparling y cols., 2015) y de nervio periférico (Grochmal y cols., 2014; Khuong y cols., 2014; McKenzie y cols., 2006; Walsh y cols., 2009, 2010). A pesar del elevado número de estudios dirigidos a caracterizar estas poblaciones precursoras derivadas de la piel, la identidad y la localización endógena de sus nichos no han llegado a definirse de forma clara, lo que constituye una barrera importante de cara a su traslación a clínica.

En esta Tesis, las células de Schwann cutáneas han sido identificadas como las responsables del potencial atribuido a las precursoras dérmicas adultas (SKPs). En la literatura encontramos, además, múltiples evidencias que sugieren que la capacidad de diferenciación neural de otras poblaciones precursoras descritas en la piel también procede de las células de Schwann.

1.1.1 Células precursoras dérmicas adultas (SKP)

Las SKPs fueron las primeras células precursoras con capacidad de generar tipos celulares neurales descritas en la piel (Toma y cols., 2001). Estas células mostraron capacidad de crecer formando esferas y de auto-renovarse en cultivo, manteniendo su potencialidad a lo largo de múltiples pases. El aislamiento de las SKPs no incluye ningún paso de purificación ni de selección celular y los cultivos se generan a partir de mezclas celulares complejas obtenidas como resultado de la disgregación total de la piel (Biernaskie y cols., 2006). Por eso, aunque el proceso está diseñado para favorecer la expansión de las células neurales en cultivo, es evidente que otros tipos celulares participan en la formación de las esferas y contribuyen a enriquecer el fenotipo de las SKPs. De hecho, en esferas generadas a partir de piel de ratón se han detectado melanocitos (Wong y cols., 2006), células de Schwann (Etxaniz y cols., 2014; Gresset y cols., 2015), pericitos (Etxaniz y cols., 2014), células satélite musculares (García-Parra y cols., 2014; Naldaiz-Gastesi y cols., 2016) y fibroblastos (Son y cols., 2008), lo cual demuestra que estos cultivos se componen de múltiples tipos celulares procedentes de la piel. Además, es probable que otros tipos celulares (células endoteliales o células del sistema inmune), e incluso, células en distintos estadios de diferenciación y/o activación, contribuyan a hacer la foto aún más compleja.

En este estudio, las células de Schwann aisladas en el cultivo, las cuales representan el 2-3% de las células de las esferas primarias, han sido trazadas en las líneas transgénicas *Myf5-Cre^{Sor}* y *Sox2^{EGFP}*, utilizadas para analizar la expresión de los genes *Myf5+* y *Sox2*, respectivamente. El fenotipo de estas células ha sido caracterizado mediante ensayos de qPCR e inmunofluorescencia, demostrando que esta población expresa marcadores propios del linaje de Schwann, como *Ngfr*, *Cdh19*, *Sox2*, *GAP43* y *Ncam*. Así mismo, el potencial glial de esta población ha sido ensayado *in vitro*, donde las células diferenciadas han sido definidas en base a la expresión del marcador GFAP y en base a su morfología, considerando exclusivamente las células bipolares con citoplasma de tamaño reducido. Así, se demuestra que el fenotipo de las células de Schwann aisladas de la piel de ratón coincide con el de las células neurales identificadas en los cultivos de SKPs humanas (Etxaniz y cols., 2014).

En los cultivos derivados de la línea *Sox2^{EGFP}* la capacidad de dar lugar a células GFAP+ se ha detectado exclusivamente en las fracciones MEDIA y ALTA (en lo que respecta a la expresión de *Sox2*). En este modelo, las células *Sox2+* identificadas en la piel se corresponden principalmente con células de Schwann, de modo que se asume que las células diferenciadas en cultivo proceden de las poblaciones *Sox2+* que residen en la piel. Aun así, a partir de estos datos no se puede descartar que otros compartimentos *Sox2+* descritos en la piel, como las células de Merkel o las papilas dérmicas de los folículos pilosos, participen en la formación de células GFAP. De hecho, las células *Sox2+* de la papila dérmica se consideran células madre de la dermis, responsables de mantener la homeostasis del tejido y con capacidad de generar derivados neurales *in vitro* (Biernaskie y cols., 2009). Aun así, dos líneas de evidencia indican que las células de Schwann son las responsables del potencial neural obtenido de la piel. En primer lugar, y en contra de lo interpretado por los propios autores de estos estudios, los datos publicados por dos grupos independientes al nuestro (Biernaskie y cols., 2009; Driskell y cols., 2009) muestran que las fracciones celulares *Sox2+* sobreexpresan genes asociados al linaje de las células de Schwann como *NGFR*, *CDH2*, *ERBB3*, *MPZ*, *PLP1*, y *S100B* (Etxaniz y cols., 2014). En segundo lugar, estudios realizados con líneas transgénicas independientes de las anteriores, que trazan las células derivadas de la cresta neural, demuestran que la gliogénesis derivada de la piel del ratón se origina en las células de Schwann (Gresset y cols., 2015).

Del mismo modo, en los cultivos generados a partir de la línea *Myf5-Cre^{Sor}*, las células *Myf5+* han demostrado ser las principales responsables de generar células con fenotipo glial en cultivo, con un aumento de 16 veces en el número de células GFAP+ en comparación a la fracción *Myf5-*. Al contrario que en las fracciones aisladas del modelo *Sox2^{EGFP}*, no todas las células de la fracción *Myf5+* han demostrado tener esta capacidad, y aproximadamente la mitad de las células *Myf5+* no dieron lugar a células GFAP+. Esto se debe a que el constructo *Myf5-Cre^{Sor}* traza un mayor rango de poblaciones no relacionadas con la identidad glial, como las células del pániculo carnoso, los melanocitos de la matriz del folículo y los pericitos. Basándonos en los datos mencionados

Discusión

previamente se puede de nuevo asumir que las células GFAP+ generadas en cultivo proceden de las células de Schwann trazadas por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}*, aunque en este caso, tampoco se puede descartar la contribución de otras poblaciones *Myf5+* distintas de la célula de Schwann.

Los melanocitos asociados al folículo piloso derivan de la cresta neural (Adameyko y Lallemand, 2010; Adameyko y cols., 2009, 2012) y se desdiferencian en cultivo adquiriendo la capacidad de generar células de Schwann y miofibroblastos (Real y cols., 2006). Aunque este fenómeno ha sido descrito de forma puntual, es teóricamente factible que los melanocitos *Myf5+* generen células GFAP+ en cultivo. Del mismo modo, las células *Myf5+* identificadas en localización perivascular podrían presentar capacidad de diferenciación glial *in vitro*, como ocurre en la región cefálica (Dore-Duffy, 2008; Dore-Duffy y cols., 2006). En piel humana, los pericitos y las células de Schwann cutáneas comparten un elevado número de marcadores gliales, siendo la expresión de estos genes menor en la población pericítica (Etxaniz y cols., 2014). Además, recientemente se ha descrito que entre el 30 y el 50% de las células perivascuales del tronco proceden de precursores de la cresta neural, concretamente de las células *boundary cap* (BC) (Radomska y Topilko, 2017). Por ello, cabe la posibilidad de que la conversión pericito-Schwann que nuestro grupo postuló como hipótesis en el ser humano (Etxaniz y cols., 2014), suceda también en las células del ratón, y que los pericitos trazados por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}* den lugar a células GFAP+ en cultivo.

Los resultados obtenidos con los modelos *Myf5-Cre^{Sor}* y *Sox2^{EGFP}* han servido para confirmar los resultados obtenidos en humano y demuestran que las células de Schwann que residen en la piel son las principales responsables del fenotipo neural atribuido a las SKPs (Toma y cols., 2001). Trabajos publicados por otros grupos apoyan indirectamente nuestros datos y afirman que la capacidad formadora de esferas y el potencial de diferenciación a múltiples linajes corresponde exclusivamente a poblaciones que derivan de la cresta neural, como las precursoras de Schwann o las células BC (Gresset y cols., 2015; Radomska y Topilko, 2017; Wong y cols., 2006). Por todo ello, en base a estos nuevos resultados consideramos que el concepto de SKP ha quedado obsoleto y debería abandonarse en el futuro.

1.1.2 Otras poblaciones precursoras con potencial neural descritas en la piel

En la piel, además de las SKPs, la capacidad de generar células neurales ha sido asociada con poblaciones multipotentes aisladas de la protuberancia del folículo piloso, las HAP-SC (del inglés, *hair follicle associated pluripotent stem cells*) (Li y cols., 2003) y las EPI-NCSC (del inglés, *epidermal neural crest stem cells*) (Sieber-Blum y cols., 2004). Estas poblaciones han sido derivadas de varios modelos animales (Amoh y Hoffman, 2017; Sieber-Blum y Hu, 2008) y también a partir de muestras humanas (Amoh y cols., 2009a, 2009b; Clewes y cols., 2011; Narytnyk y cols., 2014; Sakaue y Sieber-Blum, 2015; Sieber-Blum, 2014), siendo objeto de innumerables publicaciones en las que se ha caracterizado ampliamente su capacidad de diferenciación hacia múltiples linajes, incluyendo derivados de la cresta neural, como neuronas, células de Schwann o melanocitos, y derivados

mesodérmicos, como células de músculo liso y condrocitos (Amoh y cols., 2005, 2012; Hoffman, 2007; Sieber-Blum y cols., 2004).

Al igual que se ha descrito en las SKPs, el aislamiento en cultivo de estas poblaciones se basa en métodos mecánicos, realizando explantes de secciones completas de folículo piloso (EPI-NCSC) o sembrando fragmentos de tejido conectivo extraído directamente de regiones adyacentes a la protuberancia (HAP-SC). Estas técnicas no incluyen pasos para la selección y la separación de fracciones celulares específicas, de modo que no aseguran la pureza de los cultivos generados. Atendiendo a la complejidad anatómica del folículo piloso y a los diferentes tipos celulares que conforman su estructura, es probable que el fenotipo atribuido a las HAP-SC y las EPI-NCSC se deba a la presencia de diversos tipos celulares en cultivo. De hecho, en la literatura múltiples evidencias sugieren que el potencial neural asociado a estas poblaciones procede también de las células de Schwann que residen en la piel.

En primer lugar, hay que tener en cuenta que los cultivos de EPI-NCSC y HAP-SC se establecen a partir de fragmentos de folículo que han sido seccionados a la altura de la protuberancia, el área del folículo más densamente inervada, ya que está rodeada por un conjunto de mecanorreceptores de bajo umbral de activación responsables de percibir la deflexión del pelo (Li y cols., 2011; Misery, 2014). Las fibras nerviosas que inervan el folículo están asociadas a células de Schwann especializadas (*terminal Schwann cells*, TSC) que se colocan alrededor del folículo y forman, junto a los terminales nerviosos, los denominados complejos Lanceolados (Li y Ginty, 2014). Nuestra interpretación es que las células de Schwann del complejo Lanceolado y las células de Schwann asociadas a las fibras nerviosas que inervan el folículo son aisladas durante el establecimiento del cultivo, siendo las responsables del potencial neural asociado a estas poblaciones. Además, los cultivos de EPI-NCSC y HAP-SC han sido generados principalmente de bigotes de ratón y rata, anejos cutáneos densamente inervados porque funcionan como verdaderos órganos sensoriales en estos animales (Diamond y cols., 2008; Maklad y cols., 2010).

Las HAP-SC fueron descritas en la línea transgénica ND-GFP (*Nestin driven GFP*) un constructo genético que permite trazar las células Nestina+ por expresión del reportero GFP (Amoh y cols., 2004, 2005, 2009c, 2012). En este modelo, la expresión de Nestina fue detectada principalmente en células bipolares a nivel del plexo subepidérmico y en pequeñas células (S100+ y p75NTR+) que extendían finas prolongaciones y rodeaban los folículos pilosos a la altura de la protuberancia. Estos datos ponen de manifiesto la semejanza de las células Nestina+ con las células de Schwann del plexo nervioso subepidérmico y las que forman parte del complejo Lanceolado. Así mismo, las características fenotípicas de las EPI-NCSC son coincidentes con las de las células de Schwann del complejo Lanceolado, ya que ambas poblaciones se caracterizan por presentar el mismo perfil transcripcional, dan lugar a un mismo rango de derivados celulares y se originan en la cresta neural, siendo trazadas por la línea transgénica *Wnt1-Cre* (Clewes y cols., 2011; Hu y cols., 2010, 2010; Narytnyk y cols., 2014; Sieber-Blum y Hu, 2008; Sieber-Blum y cols., 2006).

Discusión

Basándonos en nuestros resultados y en las evidencias proporcionadas por la literatura, proponemos que las células de Schwann cutáneas son las responsables de generar derivados neurales a partir de piel. La identificación de estas poblaciones se basa en el establecimiento de cultivos heterogéneos, formados a partir de mezclas celulares complejas, que diversifican el fenotipo de las poblaciones aisladas y sirven para justificar su multipotencialidad. Teniendo en cuenta estos datos, postulamos que la aplicación clínica de tipos celulares neurales a partir de piel requiere de aproximaciones metodológicas nuevas, dirigidas a aislar y expandir exclusivamente las células de Schwann que residen en la piel. Estos protocolos permitirán generar cultivos celulares puros y bien caracterizados con potencial para ser aplicados en terapias de reemplazo celular (Izeta, 2018).

Del mismo modo, proponemos la necesidad de revisar la literatura dirigida a caracterizar poblaciones con potencial neural descritas en otros tejidos, ya que creemos que las células de Schwann pueden estar detrás del fenotipo neural asociado a otras poblaciones precursoras, como por ejemplo, en el corazón (El-Helou y cols., 2008; Tomita y cols., 2005), el turbinado inferior (Hauser y cols., 2012), el paladar (Widera y cols., 2009), la médula ósea (Nagoshi y cols., 2008), la córnea (Kikuchi y cols., 2011; Yoshida y cols., 2006) o la pulpa dental (Arthur y cols., 2008; Gronthos y cols., 2002; Janebodin y cols., 2011; Volponi y cols., 2010), entre otros muchos.

2. ORIGEN EMBRIONARIO DE LOS PRECURSORES NEURALES DE LA PIEL

La dermis presenta un origen embrionario distinto en función de la región corporal (Atit y cols., 2006; Mauger, 1972; Ohtola y cols., 2008; Yoshida y cols., 2008). La dermis de la piel facial deriva de la cresta neural (Yoshida y cols., 2008) y la dermis de la piel de tronco dorsal y ventral se forma a partir de precursores que migran desde el DM y el mesodermo de la placa lateral, respectivamente (Ohtola y cols., 2008; Olivera-Martinez y cols., 2001, 2004). De acuerdo con el origen embrionario de la dermis, las SKPs fueron relacionadas con orígenes embrionarios diferentes (Fernandes y cols., 2004; Jinno y cols., 2010; Krause y cols., 2014). Así, haciendo uso de líneas transgénicas para el trazado de linaje, se demostró que las SKPs derivadas de piel facial se originan en la cresta neural (trazadas por la línea *Wnt1-Cre*) y que esta misma población aislada de piel dorsal deriva del DM (trazadas por la línea *Myf5-Cre^{Sor}*). El origen embrionario de las SKP aisladas de piel ventral no ha llegado a demostrarse mediante trazado de linaje, pero teniendo en cuenta el origen de la dermis en esta región, los autores propusieron que esta población tenía su origen en el mesodermo de la placa lateral (Jinno y cols., 2010).

El trabajo publicado por el grupo de Freda Miller describía que las SKPs aisladas de piel dorsal, de supuesto origen mesodérmico, se caracterizaban por generar derivados neurales *in vitro* e *in vivo*, y por presentar un fenotipo muy similar al de las células de la cresta neural (Jinno y cols., 2010). En base a estos resultados, se propuso que las restricciones de linaje definidas por el origen embrionario son más flexibles de lo que se piensa y que células de origen no-neural pueden generar derivados neurales. Sin embargo, considerando nuestros datos en piel humana, los resultados de

Jinno y colaboradores sugerían que las células de Schwann presentes en los cultivos derivados de piel dorsal procedían del mesodermo, lo cual entraba en conflicto con el origen embrionario de esta población, considerada un derivado de la cresta neural (Jessen y Mirsky, 2005).

En esta Tesis se ha analizado el origen embrionario de poblaciones celulares aisladas de la piel ventral de ratón. Los estudios de trazado de linaje se han realizado en la línea transgénica *B6.129S4-Myf5^{tm3(Cre)Sor/J} (Myf5-Cre^{Sor})* utilizada para marcar las poblaciones derivadas del DM (Tallquist y cols., 2000) y la línea *B6.SJL-Tg(Sox10-Cre)507Mcln/J (Sox10-Cre)*, seleccionada para marcar células derivadas de la cresta neural (Stine y cols., 2009).

Los resultados obtenidos con el modelo *Sox10-Cre* (total ausencia de células trazadas por el constructo en las esferas) son inesperados, ya que se esperaba que las células de Schwann identificadas en cultivo, las cuales proceden de la cresta neural y se caracterizan por expresar el marcador *Sox10*, estuvieran trazadas por este modelo transgénico. Este dato contrasta con varias publicaciones en las cuales se detectan derivados de la cresta neural en la piel en otros constructos genéticos utilizados para trazar la expresión de *Sox10*, como *Sox10-Cre* (Matsuoka y cols., 2005), *Sox10-iCreERT2* (Laranjeira y cols., 2011; Simon y cols., 2012). Del mismo modo, líneas transgénicas alternativas utilizadas también para trazar células derivadas de la cresta neural, como *Wnt1-Cre* (Danielian y cols., 1998; Wong y cols., 2006), *Ht-PA-Cre* (Pietri y cols., 2003; Wong y cols., 2006) o *Pip-CreERT2* (Leone y cols., 2003; Parfejevs y cols., 2018), confirman el origen de las células de Schwann cutáneas y demuestran la presencia de estas células en los cultivos de esferas generados a partir de piel (Gresset y cols., 2015; Wong y cols., 2006).

Así pues, los datos sugieren que la línea *Sox10-Cre* puede no trazar fielmente el linaje de la cresta neural en la piel. Al contrario que en otras líneas transgénicas en las que la expresión de la recombinasa Cre se expresa bajo el control de promotores génicos (Laranjeira y cols., 2011; Matsuoka y cols., 2005; Simon y cols., 2012), en este modelo la recombinasa Cre se expresa bajo el control de la secuencia potenciadora MCS4 (*multispecies conserved sequence*), un elemento que regula la transcripción del gen *Sox10*. La caracterización de la línea transgénica *Sox10-Cre* demuestra que la expresión del reportero es específica en muchos de los tejidos derivados de la cresta neural, sin embargo, en este estudio no hay evidencias de que el constructo *B6.SJL-Sox10-Cre* trace adecuadamente las células de Schwann y otros derivados de la cresta neural en la piel (Stine y cols., 2009).

Los resultados obtenidos con el modelo *Myf5-Cre^{Sor}* también han sido inesperados. Por un lado, los cultivos de esferas generados a partir de la piel ventral de este modelo revelan la presencia de una pequeña población de células *Myf5+* que había sido previamente omitida (Jinno y cols., 2010). Además, la caracterización de las células *Myf5+* identificadas en la piel ventral demuestra que la interpretación realizada por Jinno y colegas en relación al origen de los precursores neurales aislados de piel dorsal es errónea. Estos autores describieron que las células *Myf5+* con potencial

Discusión

neural de los cultivos generados a partir de piel dorsal procedían de la papila dérmica y de la vaina de tejido conectivo que rodea el bulbo del folículo, dos compartimentos de origen mesodérmico que fueron descritos como nichos endógenos de las SKPs (Fernandes y cols., 2004; Jinno y cols., 2010).

Hay que tener en cuenta que la línea transgénica *Myf5-Cre^{Sor}* fue diseñada para trazar de forma constitutiva la expresión del gen *Myf5*, un factor de transcripción responsable de regular la especificación y la diferenciación de los precursores miogénicos durante la formación de los músculos esqueléticos (Pownall y cols., 2002) y en las células satélite musculares que han sido activadas (Biressi y cols., 2013; Zammit y cols., 2004). Por eso, el modelo *Myf5-Cre^{Sor}* ha servido para analizar la formación y reparación de los músculos durante el desarrollo embrionario y en la edad adulta (Shin y cols., 2017; Tran y cols., 2012), identificar factores que participan en la especificación de los precursores miogénicos (Matheny y cols., 2015), así como estudiar la biología de las células satélite en condiciones de homeostasis y en respuesta a daño (Abou-Khalil y cols., 2009; Clow y Jasmin, 2010). Además de los precursores miogénicos *Myf5+* que migran al miotomo, *Myf5* se expresa en los precursores que migran a la región subectodérmica para formar la dermis de la piel dorsal (Atit y cols., 2006; Olivera-Martinez y cols., 2004), de modo que el modelo *Myf5-Cre^{Sor}* también ha sido utilizado para trazar células de la dermis dorsal (Jinno y cols., 2010; Naldaiz-Gastesi y cols., 2016).

Nuestros resultados en piel ventral demuestran que, además de derivados mesodérmicos, la línea *Myf5-Cre^{Sor}* traza poblaciones celulares derivadas de la cresta neural, incluyendo células de Schwann, neuronas y melanocitos localizados en la matriz del folículo piloso (Douarin y Kalcheim, 1999). El hecho de que estas poblaciones celulares no fueran identificadas por Jinno y colaboradores, se debe a que la señal del reportero en la piel dorsal del modelo *Myf5-Cre^{Sor}* se extiende en todo el compartimento dérmico y dificulta la identificación de poblaciones celulares minoritarias en las que pueda expresarse el reportero. La dermis de la piel ventral tiene un origen embrionario distinto y no se origina a partir de precursores *Myf5+* que proceden del DM, de modo que este compartimento no queda marcado por expresión del reportero, siendo más fácil detectar y caracterizar otras poblaciones trazadas por el constructo. Por lo tanto, los datos obtenidos al caracterizar la piel ventral en la línea *Myf5-Cre^{Sor}* indican que los resultados publicados en relación al origen de las SKP aisladas de piel dorsal son incorrectos, ya que el origen mesodérmico de esta población se asume de resultados incompletos, en los cuales se desconocía la existencia de tipos celulares neurales marcados por expresión del reportero (Jinno y cols., 2010).

Aunque estos datos podrían indicar un origen alternativo para las células de Schwann, nuestros resultados con la línea *B195AP-Cre*, una construcción genética caracterizada por expresar la recombinasa Cre bajo el control de todas las secuencias reguladoras del gen *Myf5* (Carvajal y cols., 2001; Naldaiz-Gastesi y cols., 2016), demuestran que la expresión del gen *Myf5* en células de Schwann en la línea *Myf5-Cre^{Sor}* no es indicativo de un origen en el DM. De hecho, la línea *B195AP-Cre* traza exclusivamente derivados mesodérmicos *Myf5+* en la piel ventral del ratón, excluyendo

cualquier población relacionada con identidad neural. Además, la población celular trazada por *B195AP-Cre* no genera progenie glial *in vitro*, indicando que las células GFAP+ obtenidas en cultivo no derivan de precursores mesodérmicos *Myf5*+

En la Tesis no se ha investigado si la expresión de *Myf5* en células de Schwann trazadas por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}* es inespecífica o puede reflejar, por ejemplo, la transcripción del gen en ausencia de traducción de la proteína *Myf5*, tal y como sucede en las células satélite musculares. La activación de las células satélite en respuesta a daño es un proceso que depende, entre otros, de la expresión del gen *Myf5*, lo que les permite salir de su estado quiescente para proliferar activamente y participar en la reparación del tejido dañado (Biressi y cols., 2013; Zammit y cols., 2004). En las células satélite quiescentes el programa miogénico se mantiene inactivo mediante un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional que bloquea la traducción de *Myf5* y previene la entrada en ciclo de las células, evitando su diferenciación. Así, en condiciones de daño, el proceso de traducción del ARNm de *Myf5* y la consecuente activación del programa miogénico suceden de forma inmediata, favoreciendo una respuesta rápida y eficaz (Crist y cols., 2012). Este mecanismo de regulación postranscripcional, sin embargo, no tiene sentido en poblaciones neurales trazadas por el constructo *Myf5-Cre^{Sor}*, ya que no intervienen directamente en la reparación del músculo.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que antes de que el programa miogénico se active en el DM, *Myf5* se expresa en el mesodermo presomítico o paraxial (Cossu y cols., 1996; Kiefer y Hauschka, 2001; Kopan y cols., 1994). A pesar de que el mesodermo presomítico no genera derivados neurales, este dato sugiere que la expresión de *Myf5* en el desarrollo embrionario temprano puede ser más ubicua de lo esperado. De hecho, la expresión de *Myf5* ha sido detectada de forma puntual en tejidos de origen neural, como la región ventral del tubo neural o en el cerebro (Daubas y cols., 2000; Tajbakhsh y Buckingham, 1995b; Tajbakhsh y cols., 1994). Además, la expresión del reportero en la línea transgénica *Myf5-Cre^{Sor}* no está restringida al sistema muscular y varias publicaciones revelan que su expresión se extiende a múltiples tejidos, incluyendo el tejido adiposo, el aparato respiratorio, el sistema reproductivo o el sistema nervioso periférico (SNP) (Eppig y cols., 2015). Estas observaciones podrían aclarar el fenotipo observado en *Myf5-Cre^{Sor}*, ya que sugieren que el promotor de *Myf5* se puede activar en precursores neurales que más tarde en el desarrollo participan en la formación de distintos derivados como las células de Schwann de la piel.

Considerando estos datos, es probable que la expresión del reportero en las poblaciones neurales trazadas por la línea *Myf5-Cre^{Sor}* sea inespecífica. Además, atendiendo a los diferentes tipos celulares trazados por este constructo (melanocitos, células de Schwann y neuronas), tiene sentido que la activación del reportero suceda en los precursores de la cresta neural, una población que migra (vía ventrolateral) e interacciona directamente con los precursores miogénicos localizadas en el extremo del DM para regular la formación temprana del músculo (Ordahl y cols., 2001; Scaal y Christ, 2004). Se ha descrito que los precursores de la cresta neural que trascurren junto a las somitas expresan el ligando Delta1 y promueven la expresión transitoria de NOTCH, activando la

Discusión

expresión de *Myf5* en los progenitores musculares del DM y garantizando la diferenciación progresiva de las células que forman el miotomo (Rios y cols., 2011; Sieiro y cols., 2016). Proponemos que la interacción que tiene lugar entre los precursores de la cresta neural y los precursores miogénicos en el extremo dorsomedial del DM puede activar transitoriamente el promotor de *Myf5* en algunas células de la cresta neural, haciendo que estas células y todo el linaje derivado de ellas quede marcado por expresión del reportero. Otra posibilidad es que las señales procedentes de los tejidos adyacentes (el ectodermo o la notocorda) dirigidas a regular la maduración de las somitas, actúen de forma no específica sobre los precursores de la cresta neural que migran junto a las somitas.

Estos mecanismos no explican, aun así, las diferencias fenotípicas observadas entre las líneas *Myf5-Cre^{Sor}* y *B195AP-Cre*, ya que se espera que la señalización que activa la Cre en las precursoras neurales sucedan en ambos modelos. Teniendo en cuenta las diferencias de estas construcciones genéticas, puede que las secuencias regulatorias que controlan la expresión de *Myf5*, las cuales se mantienen intactas en el constructo *B195AP-Cre* y son parcialmente eliminadas en el constructo *Myf5-Cre^{Sor}*, eviten la expresión del reportero en las células de la cresta neural. Así, quedaría pendiente demostrar cual es el mecanismo molecular por el que algunos tipos celulares derivados de la cresta neural quedan trazados en el constructo *Myf5-Cre^{Sor}*.

2.1 Células trazadas por *Myf5-Cre^{Sor}*: ¿son las *boundary cap*?

En la piel ventral del ratón, las poblaciones trazadas por la línea *Myf5-Cre^{Sor}* incluyen diversos tipos de células de Schwann, melanocitos asociados al folículo piloso y neuronas periféricas, tipos celulares que se corresponden con derivados de la cresta neural y específicamente con poblaciones que derivan de las células BC.

Las células BC son una población embrionaria derivada de la cresta neural que migra desde los puntos de entrada y salida de los nervios periféricos para dar lugar a distintos tipos celulares del SNP y de la piel (Golding y Cohen, 1997). Las BC fueron caracterizadas por su localización y por la expresión de los marcadores *Krox20* y *Prss56*, los cuales han sido utilizados para generar líneas transgénicas para el trazado de linaje (Gresset y cols., 2015; Maro y cols., 2004; Radomska y Topilko, 2017). La caracterización de los constructos *Krox20-Cre* y *Prss56-Cre* ha puesto de manifiesto la heterogeneidad de las BC y demuestra que existen varias subpoblaciones de BC con capacidad de generar un rango de derivados diferente. De acuerdo con el destino y la expresión de estos dos marcadores, las BC han sido clasificadas en tres subtipos, las células BC doble positivas (*Prss56+/Krox20+*), las BC *Prss56+* y las BC *Krox20+* (Radomska y Topilko, 2017).

Entre los diferentes tipos celulares trazados por el modelo *Myf5-Cre^{Sor}* la mayoría corresponden a derivados de la subpoblación *Prss56+*, los cuales migran a lo largo de la raíz ventral motora hasta la piel donde generan varios tipos de glía y melanocitos (Gresset y cols., 2015). Así, las células

Myf5⁺ identificadas en la piel coinciden con varias poblaciones gliales derivadas de células *Prss56*⁺, como las células de Schwann asociadas a axones de pequeño calibre, las células de Schwann especializadas asociadas a las terminaciones nerviosas lanceoladas del folículo piloso y las células de Schwann subepidérmicas que se unen a las terminaciones nerviosas nociceptivas (Radomska 2018). Las células gliales identificadas en estos compartimentos corresponden principalmente a células de Schwann no mielinizantes, aunque en la parte inferior de la dermis también se han identificado células mielinizantes rodeando axones de mayor calibre. Las células *Prss56*⁺ también generan la glía asociada al músculo erector del pelo, una población que no ha sido identificada entre los derivados de la línea *Myf5-Cre^{Sor}*. Además, las células *Prss56-Cre*⁺ forman esferas en cultivo y dan lugar a diversos tipos celulares, como neuronas, células de Schwann, miofibroblastos y adipocitos (Gresset y cols., 2015). Así, el fenotipo de las células trazadas por la línea *Prss56-Cre* encaja con el descrito en las células *Myf5*⁺ aisladas en cultivo y refuerzan la hipótesis de que las poblaciones gliales trazadas en la línea *Myf5-Cre^{Sor}* derivan, al menos en parte, de la subpoblación *Prss56*⁺.

Por otro lado, la identificación de células *Myf5*⁺ en localización perivascular sugiere que el modelo *Myf5-Cre^{Sor}* traza también células derivadas de la subpoblación *Krox20*⁺. Las células *Krox20*⁺ migran hacia la piel unidas a las raíces nerviosas y en lugar de permanecer en contacto con las prolongaciones axonales, tal y como lo hacen los precursores *Prss56*⁺, se separan de los nervios para integrarse en el plexo vascular cutáneo, a la vez que activan la expresión de marcadores pericíticos (Radomska y Topilko, 2017).

La subpoblación *Krox20*⁺/*Prss56*⁺ es responsable de generar células de Schwann, células satélite gliales y neuronas sensoriales en varios puntos del SNP, en las raíces motoras y en los ganglios de la raíz dorsal (GRD), pero no en la piel, por lo que sería necesario caracterizar estructuras del SNP para confirmar si los derivados de la subpoblación *Krox20*⁺/*Prss56*⁺ son trazados por la línea *Myf5-Cre^{Sor}*. En nuestros ensayos, exceptuando el plexo nervioso cutáneo, no se han analizado otras regiones del SNP, sin embargo, la detección de marcadores neuronales en algunas de las células *Myf5*⁺ localizadas en los haces nerviosos cutáneos sugieren que el modelo *Myf5-Cre^{Sor}* marca las prolongaciones axonales de las neuronas que proceden de la raíz ventral motora o de los GRD.

Así, postulamos que la línea transgénica *Myf5-Cre^{Sor}* traza poblaciones celulares derivadas de distintas subpoblaciones BC. Este resultado sugiere que la activación del promotor *Myf5* sucede probablemente en un precursor común localizado en los puntos de entrada y salida de la medula espinal, antes de que los diferentes subtipos de BC migren, se diferencien y definan su nuevo destino. Será necesario realizar más experimentos para corroborar esta hipótesis.

2.2 Células trazadas por *Sox2^{EGFP}* y los distintos niveles de expresión

Discusión

En la piel de ratón, la expresión de *Sox2* ha sido descrita en las células de Merkel, en las papilas dérmicas de los folículos pilosos de tipo Guard y Awl/Auchene y en las células de Schwann del complejo Lanceolado (Biernaskie y cols., 2009; Driskell y cols., 2009; Johnston y cols., 2013; Lesko y cols., 2013).

Nuestros resultados con la línea transgénica *Sox2^{EGFP}* confirman que *Sox2* se expresa en las células del complejo Lanceolado y en las papilas dérmicas de un pequeño subgrupo de folículos pilosos. Atendiendo a las características morfológicas y a la prevalencia de los distintos tipos de folículos pilosos descritos en ratón, hipotetizamos que las papilas dérmicas en las que se detectó expresión de *Sox2* corresponden a los folículos de tipo Guard y Awl/Auchene (Driskell y cols., 2009). La caracterización del modelo *Sox2^{EGFP}* no ha permitido, sin embargo, confirmar si *Sox2* se expresa en las células de Merkel. Esto se debe, probablemente, a que la mayoría de los análisis se han realizado sobre preparaciones de tejido dérmico completo, muestras en las que la epidermis se retira mediante métodos enzimáticos pudiendo dañar y/o alterar la estructura de estos mecanorreceptores que se localizan en la unión dermo-epidérmica. Aun así, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la línea *Myf5-Cre^{Sor}*, se puede confirmar que las células de Merkel también expresan *Sox2*, ya que durante la caracterización de una de las muestras de piel procedentes de este modelo se identificó un conjunto de células SOX2+, colocadas en fila debajo de la membrana basal y asociadas a estructuras fibrilares semejantes a las terminaciones nerviosas subepidérmicas.

Además de las poblaciones *Sox2+* descritas previamente en la literatura, nuestros estudios sugieren que *Sox2* también se expresa en las células de Schwann de las terminaciones nerviosas. En este compartimento la señal de la proteína reportera GFP se extiende uniformemente a lo largo de todo el plexo nervioso, aunque su intensidad es considerablemente menor que en el resto de poblaciones *Sox2+* identificadas en la piel. Asumiendo que el nivel de expresión de GFP se corresponde con el nivel de expresión de *Sox2*, se puede afirmar que *Sox2* se expresa a nivel intermedio en las células de Schwann que se asocian a las fibras nerviosas cutáneas. A pesar de que *Sox2* no se expresa en las células de Schwann maduras (Balakrishnan y cols., 2016; Jessen y cols., 2015a), la detección de GFP en este compartimento puede tener sentido si se tiene en cuenta que *Sox2* participa en la reprogramación de las células de Schwann, regulando su desdiferenciación y su conversión en células de Schwann reparadoras tras un daño (Balakrishnan y cols., 2016; Clements y cols., 2017; Johnston y cols., 2013; Le y cols., 2005; Parrinello y cols., 2010; Roberts y cols., 2017). Por lo tanto, se puede pensar que en condiciones de homeostasis estas células mantienen las zonas reguladoras del gen *Sox2* en un estado de alerta o semiactivo, provocando una expresión baja, pero mantenida del reportero, lo que tendría sentido dada la posición de estas células en primera línea del SNP respecto a posibles noxas externas. De hecho, utilizando este mismo modelo transgénico, Johnston y colaboradores demostraron que, tal y como ocurre en la reparación de los nervios periféricos, las células de Schwann de la piel sobreexpresan *Sox2* y se separan de los nervios para migrar al lecho de la herida y contribuir a la cicatrización de heridas cutáneas (Johnston y cols., 2013). Este

constructo genético permite detectar la expresión del reportero incluso cuando mecanismos de regulación postranscripcional y/o postraduccionales intervienen para evitar la formación de la proteína. Por eso, a pesar de que estos sistemas facilitan el trazado de poblaciones celulares que expresan uno o varios genes de interés, es importante tener presente que en estos modelos la expresión del reportero no refleja necesariamente la presencia de un transcrito y/o proteína, que es la que ejerce la función.

La caracterización de la línea *Sox2^{EGFP}* ha revelado que las células de Schwann asociadas al plexo nervioso cutáneo y las células de Schwann del complejo Lanceolado representan la mayoría de las células *Sox2+* de la piel. Estas observaciones han sido decisivas para confirmar que, tal y como se ha discutido previamente, las células de Schwann que residen en la piel son las principales responsables de generar células con fenotipo glial *in vitro*. En este contexto, sería interesante determinar la contribución de cada una de estas subpoblaciones a la formación de las células GFAP+, es decir, cuál de las subpoblaciones gliales identificadas en la piel es la responsable de proliferar y de diferenciarse activamente para dar lugar a células de Schwann que participan en el mantenimiento del sistema nervioso cutáneo y en procesos de reparación tisular, como puede ser la cicatrización de heridas de piel. Utilizando un sistema para trazar la expresión de *Sox2* de forma inducible, Johnston y colaboradores demostraron que, durante la cicatrización de heridas, prácticamente todas las células *Sox2+* que migraban al lecho de la herida derivaban de las células de Schwann asociadas al plexo nervioso cutáneo, mientras que la contribución de las células del complejo Lanceolado era mínima. En base a estos resultados, se puede pensar que las células GFAP+ obtenidas en los cultivos de diferenciación se generan principalmente a partir de las células de Schwann que se unen a los terminales nerviosos. Además, considerando que la cicatrización sucede en regiones de piel con pelo y sin pelo, tiene sentido que las células de Schwann del plexo nervioso cutáneo sean las principales responsables de llevar a cabo procesos de reparación, ya que estas células están presentes en todo el organismo, mientras que las células de Schwann del complejo Lanceolado son exclusivas de la piel pilosa (Misery, 2014).

La línea transgénica utilizada para el análisis de expresión de *Sox2* (*Sox2^{EGFP}*) tiene insertada una copia del reportero fluorescente EGFP en el *locus* de *Sox2* (cromosoma 3) (Ellis y cols., 2004). Un estudio reciente demuestra que la estrategia de clonaje utilizada para generar el vector de recombinación que inserta la EGFP en este *locus* elimina un elemento regulador que reprime la expresión de *Sox2* en la epidermis, lo cual da lugar a una expresión aberrante de *Sox2* (Chi y cols., 2015; Salz y Driskell, 2017). Así, en ausencia de esta secuencia reguladora, la señal inespecífica de GFP se detecta en el infundíbulo, región de la epidermis que carece de expresión endógena de *Sox2*, y aproximadamente en el 50% de las papilas dérmicas, en las cuales tampoco se espera expresión de *Sox2*.

En las muestras de piel analizadas en nuestro estudio no se ha observado señal de GFP en ninguno de los compartimentos identificados como inespecíficos por Salz y colaboradores. Por un lado,

Discusión

exceptuando la señal de fondo que habitualmente adquiere la epidermis, no se ha observado expresión de GFP en la región del infundíbulo. Por otro lado, en relación a la expresión aberrante de GFP en la papila dérmica, nuestros datos muestran que *Sox2* se expresa exclusivamente en un pequeño porcentaje de los folículos, lo cual coincide con datos previos en los que la expresión de *Sox2* se restringe a un subtipo particular de folículos (Biernaskie y cols., 2009; Driskell y cols., 2009). Así, el patrón de expresión aberrante de *Sox2* no parece afectar a la piel ventral de la línea *Sox2^{EGFP}*. Puede que el elemento de regulación epigenética que se elimina durante la generación del modelo *Sox2^{EGFP}* no controle la expresión de *Sox2* en piel ventral, ya que estas secuencias pueden ejercer un control de la expresión a nivel espacio-temporal.

3. NIVELES DE EXPRESIÓN DE SOX2 Y POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN A PROGENIE NEURAL Y MESODÉRMICA

En estudios previos se ha demostrado que en cultivos de esferas derivados de piel humana existe una correlación entre la expresión de *SOX2* y la capacidad de diferenciación neural (Etxaniz y cols., 2014). Así, las células de Schwann cutáneas (identificadas como p75NTR+/CD56+) se caracterizan por expresar altos niveles de *Sox2* y son las únicas células que presentan potencial neural tras ser aisladas de la piel, mientras que las células perivasculares (p75NTR+/CD56-), a pesar de ser fenotípicamente muy similares a las células de Schwann, expresan menores niveles de *Sox2* y pierden la capacidad de generar células con fenotipo neural. En este mismo estudio se demuestra que la capacidad de diferenciación mesodérmica (formación de células α SMA+) es superior en fracciones con baja expresión de *Sox2*.

En esta Tesis, la correlación entre los niveles de expresión de *Sox2* y la capacidad de diferenciación neural ha sido confirmada en cultivos generados a partir de piel ventral de la línea transgénica *Sox2^{EGFP}*, un modelo en el que las poblaciones celulares con distintos niveles de expresión de *Sox2* han sido separadas en base a la intensidad EGFP. Nuestro estudio demuestra que prácticamente la totalidad de las células separadas en la fracción ALTA se diferencian a células con fenotipo de Schwann (GFAP+), mientras que aproximadamente la mitad de las células de la fracción MEDIA, con un 33% menos de expresión de *Sox2*, dan lugar a células con este fenotipo. Estos datos son consistentes con otros sistemas celulares en los que la pérdida de la capacidad de diferenciación neural se produce cuando la expresión de *Sox2* está por debajo del umbral del 40% de los niveles máximos. En este experimento, la fracción BAJA estaría por debajo de dicho umbral, y por eso no se observa la formación de células GFAP+ en cultivo. Este resultado coincide con datos obtenidos previamente en cultivos de esferas generados a partir de piel dorsal del modelo *Sox2^{EGFP}* (Etxaniz y cols., 2014).

La identificación de fracciones celulares con distintos niveles de expresión de *Sox2* puede deberse a la existencia de poblaciones celulares con distintos niveles endógenos de *Sox2* o puede representar la expresión dinámica de *Sox2* en una única población celular. La caracterización de las

distintas poblaciones trazadas por la línea Sox2^{EGFP} demuestra que Sox2 se expresa en distintas poblaciones gliales de la piel, siendo su expresión variable en estos compartimentos (ver apartado 2.2). Así, las células de Schwann del complejo Lanceolado presentan una alta expresión de Sox2 (alta intensidad de EGFP), mientras que las células de Schwann del plexo cutáneo presentan una expresión menor (intensidad de EGFP atenuada). Por lo tanto, es posible que la fracción ALTA este formada exclusivamente por las células de Schwann del complejo Lanceolado y que la fracción MEDIA y BAJA estén formadas por las células de Schwann del plexo nervioso cutáneo. Sin embargo, teniendo en cuenta que Sox2 es un factor que participa en la reprogramación de las células de Schwann y su expresión aumenta considerablemente en estas células en situaciones de daño (Balakrishnan y cols., 2016; Etxaniz y cols., 2014; Johnston y cols., 2013), es probable que las fracciones con distintos niveles de expresión de Sox2 (EGFP) correspondan a diferentes estadios de activación de las células de Schwann que han sido reprogramadas por las condiciones del cultivo. Aun así, esta hipótesis no puede ser confirmada, ya que se desconoce los tipos celulares que conforman cada una de las fracciones.

Las variaciones en la expresión de Sox2 se producen en muchos contextos celulares durante el desarrollo embrionario, como en las células precursoras de Schwann, que disminuyen la expresión de Sox2 para dar lugar a células no proliferativas maduras que forman parte de los haces nerviosos periféricos, e incrementan la expresión de Sox2 en condiciones de daño, para revertir a un estado proliferativo indiferenciado que les permite participar en el procesos de reparación tisular (Balakrishnan y cols., 2016; Jessen y cols., 2015a; Johnston y cols., 2013, 2016). Del mismo modo, en el SNC, el nivel de expresión de Sox2 define si las células madre neurales se mantienen en un estadio precursor o se diferencian en neuronas maduras. En general, la sobreexpresión de Sox2 inhibe la neurogénesis y se requiere disminuir Sox2 para que los progenitores se diferencien adecuadamente (Bani-Yaghoub y cols., 2006; Bylund y cols., 2003; Cavallaro y cols., 2008; Favaro y cols., 2009; Ferri y cols., 2004; Graham y cols., 2003). Haciendo uso de animales modelos hipomórficos, muchos de estos trabajos ponen de manifiesto la estricta regulación que ejercen los niveles de Sox2 en procesos relacionados con el mantenimiento y la diferenciación de poblaciones precursoras (Cimadamore y cols., 2011; Hagey y Muhr, 2014; Hutton y Pevny, 2011b; Kopp y cols., 2008; Taranova y cols., 2006).

El efecto que el nivel de expresión de Sox2 ejerce en la capacidad de diferenciación de las células puede deberse al grado de activación que ejerce Sox2 sobre sus genes diana, tal y como se ha observado en las células ciliadas de la cóclea, en las que la expansión y la diferenciación de las células ciliadas está controlado por *Atoh1*, un gen cuyo nivel de activación depende directamente del grado de unión del factor de transcripción Sox2 a una secuencia potenciadora (Kempfle y cols., 2016). Así, controlar la expresión de Sox2 en sistemas celulares *in vitro* e incluso en el tejido *in vivo*, puede servir para modular de forma precisa procesos de autorenovación y diferenciación celular, incluso en protocolos de reprogramación de células somáticas para la generación de IPS (*Induced*

Discusión

Pluripotent Stem Cells), en los cuales es crítico establecer un nivel de expresión de Sox2 determinado (Okita y cols., 2007; Wernig y cols., 2007).

En cuanto la relación entre el nivel de expresión de Sox2 y el potencial mesodérmico, nuestros datos indican que la expresión de Sox2 no es compatible con la diferenciación hacia el linaje mesodérmico, considerada en este estudio como la capacidad de generar células α SMA+. Teniendo en cuenta que el ensayo de diferenciación mesodérmica se realizó directamente con las esferas generadas en cultivos en suspensión, lo más probable es que las células α SMA+ identificadas en el cultivo de diferenciación procedan de células de origen mesodérmico (fibroblastos, células musculares o pericitos) presentes en la piel. Por otro lado, la presencia de células bipolares Sox2+ (GFP+) en estos mismos cultivos sugieren que los factores de inducción mesodérmica (TGF β 3) no afectan al fenotipo de las poblaciones neurales, que mantienen su morfología y la expresión de Sox2. Así, proponemos que la expresión de Sox2 no está directamente relacionada con procesos de diferenciación mesodérmica e interviene principalmente en la capacidad de diferenciación neural de las células gliales aisladas de la piel.

4. RELACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS SOX2+ DE LA DERMIS DEL TRONCO VENTRAL Y LAS CÉLULAS TRAZADAS POR LA LÍNEA TRANSGÉNICA *Myf5-Cre^{Sor}*

La caracterización de las líneas transgénicas *Myf5-cre^{Sor}* y *Sox2^{EGFP}* revela que ambos constructos trazan distintas poblaciones gliales en la piel. El solapamiento entre estas poblaciones ha sido confirmado directamente en muestras de piel ventral del modelo triple transgénico *Myf5-Cre^{Sor}/R26^{TdTomato}/Sox2^{EGFP}*, en las que las señales de TdTomato (*Myf5+*) y GFP (*Sox2+*) han sido detectadas en un mismo subgrupo de células de Schwann. Además de preparaciones de tejido dérmico completo, las poblaciones celulares trazadas por la línea triple transgénica han sido analizadas por citometría de flujo en cultivos en suspensión de esferas. Este estudio demuestra que los cultivos contienen un 0,23 \pm 0,05% de células *Myf5+/Sox2+* (fracción Doble+) y un 1,28 \pm 0,59% de células *Myf5-/Sox2+* (fracción *Sox2+*). Teniendo en cuenta que el potencial neural se relaciona con la expresión de Sox2, este resultado parece contrastar con la capacidad de diferenciación neural observada en las fracciones *Myf5+* y *Myf5-*, ya que se esperaría que las células de Schwann no trazadas por el constructo *Myf5-cre^{Sor}* (*Myf5-/Sox2+*), las cuales representan 5 veces el número de células *Myf5+/Sox2+*, dieran lugar a células GFAP+ y β III tubulina+ en los cultivos de diferenciación de la fracción *Myf5-*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este análisis las células no se han separado en base a la expresión de distintos niveles de Sox2+ (EGFP), de modo que las células con media y baja expresión de Sox2, las cuales presentan una menor capacidad de diferenciación neural, están consideradas dentro de la fracción *Sox2+*. Además, el porcentaje de células de Schwann *Sox2+* en la fracción *Myf5-* es mucho menor que en la fracción *Myf5+*, ya que el número de células no trazadas por el constructo (*Myf5-*) incluye la mayoría de los tipos celulares presentes

en la piel. De modo que las células Sox2+ son una minoría de las células separadas en la fracción *Myf5*- viéndose afectado el porcentaje de diferenciación.

Por otro lado, la detección de células Sox2+ negativas para *Myf5*- indica que el modelo *Myf5-cre^{Sor}* no traza todas las células de Schwann cutáneas. Este fenotipo tiene sentido al proponer que la activación del promotor del gen *Myf5* en este modelo sucede de forma inespecífica. Así, aunque en algunos modelos transgénicos la detección de una población celular trazada parcialmente por expresión del reportero se asocia a un problema de penetrancia incompleta, en este caso, proponemos que la ratio entre el número de poblaciones *Myf5*+/*Sox2*+ y *Myf5*-/*Sox2*+ refleja el número aproximado de precursoras de la cresta neural que activan la expresión de la recombinasa Cre en la línea *Myf5-Cre^{Sor}*.

5. FENOTIPO DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN TRAZADAS POR *Myf5-Cre^{Sor}* EN CULTIVO

5.1 Reprogramación de las células de Schwann y reparación

Una de las cuestiones fundamentales en biología, con implicaciones particularmente relevantes en el ámbito de la medicina regenerativa, radica en el origen de las células responsables de llevar a cabo el mantenimiento y la regeneración de los tejidos adultos. La regeneración es un término que engloba varios procesos, como el reemplazo regular de células en condiciones de homeostasis y durante el envejecimiento de los tejidos, denominada regeneración fisiológica, o la restauración completa de un tejido u órgano tras un daño, denominada regeneración reparativa (Gilbert, 2000). A pesar de que el mantenimiento homeostático de los tejidos sucede de forma regular en todos los vertebrados, como la renovación de los tejidos epiteliales, la generación de células sanguíneas en la médula ósea o la neurogénesis cerebral (Barker, 2014; Blanpain y Fuchs, 2009; Spalding y cols., 2013), la capacidad de regenerar un tejido u órgano por completo es exclusiva de algunas pocas especies. En general, los tejidos son reparados por reemplazo, un proceso que conlleva la formación de un tejido fibroso rico en colágeno (cicatriz) que repara el tejido original e impide, en muchos casos, la recuperación estructural y funcional del tejido u órgano de origen (Krafts, 2010).

En la naturaleza existen varios organismos que se caracterizan por su amplio potencial de regeneración, como los urocordados coloniales que se regeneran por completo a partir de restos minúsculos de tejido vascular, un fenómeno conocido como regeneración de cuerpo completo (en inglés, *whole body regeneration*) (Rinkevich y cols., 1995, 2007). En los animales vertebrados este potencial es más limitado, aunque algunos vertebrados inferiores, como las salamandras y los tritones (orden *Caudata*), pueden restaurar apéndices completos tras su amputación (Monaghan y Maden, 2013). En mamíferos, tal y como demuestran varios estudios realizados en ratones y humanos, la regeneración de múltiples tejidos está restringida a la punta del dedo, la cual regenera exclusivamente tras la amputación del extremo distal (Han y cols., 2008; Johnston y cols., 2016;

Discusión

Rinkevich y cols., 2011; Vidal y Dickson, 1993). Recientemente, también se ha demostrado que los ratones espinosos (del género *Acumys*) y algunos conejos, son capaces de restaurar por completo la región auricular de la oreja sin formación de tejido cicatricial (Gawriluk y cols., 2016; Seifert y Muneoka, 2018).

En los vertebrados la capacidad de regenerar por completo una parte del cuerpo, denominada regeneración epimórfica, se caracteriza por la formación del blastema, una masa de células indiferenciadas que proliferan activamente y se diferencian para reconstruir un miembro amputado (Brockes y Kumar, 2005; Bryant y cols., 2002). En los urodelos, se ha demostrado que las células del blastema surgen a partir de la desdiferenciación de las células terminalmente diferenciadas y por el reclutamiento de células precursoras específicas de tejido (Brockes y Kumar, 2008). En mamíferos, el blastema también está compuesto por células progenitoras derivadas de distintos linajes, aunque se desconoce si estas células se generan por desdiferenciación o a partir de poblaciones precursoras que residen en el tejido. Independientemente de su origen, estos estudios han demostrado que el blastema está formado por una mezcla heterogénea de progenitores de linaje restringidos, los cuales dan lugar exclusivamente a tipos celulares propios de su linaje (Kragl y cols., 2009; Lehoczky y cols., 2011; Rinkevich y cols., 2011).

Los estudios dirigidos a analizar la regeneración de miembros completos han revelado que la inervación juega un papel fundamental en el proceso regenerativo, ya que la denervación de un miembro antes de ser amputado previene su regeneración y provoca la formación de una cicatriz fibrosa (Kumar y Brockes, 2012; Singer, 1952). Durante la regeneración los nervios secretan múltiples moléculas, como neuropéptidos, factores de crecimiento o moléculas inflamatorias, que actúan favoreciendo la expansión del blastema y participan en la inflamación (Kumar y cols., 2007; Monaghan y cols., 2009; Saha y cols., 2016; Satoh y cols., 2016). Aunque la dependencia nerviosa se ha asociado principalmente con el efecto que ejercen las terminaciones nerviosas sobre el blastema, varios trabajos destacan el papel que ejercen las células de Schwann asociadas a los nervios en el proceso regenerativo. La contribución de las células de Schwann fue inicialmente descrita en urodelos (Kumar y Brockes, 2012, Kumar y cols., 2007) y ha sido posteriormente confirmada en mamíferos (Rinkevich y cols., 2014, Takeo y cols., 2013, Mohammad y Neufeld, 2000). En un estudio publicado en el año 2016, Johnston y colaboradores demostraron que las células de Schwann de los plexos cutáneos secretan factores (OSM y PDGF-AA) que favorecen el crecimiento del blastema, tal y como se había demostrado en modelos de amputación de miembros en vertebrados inferiores, y que la ablación condicional de estas células prevenía la reparación de la de la punta del dedo en ratón (Johnston y cols., 2016).

La plasticidad de las células de Schwann ha demostrado ser también un factor clave en la reparación de los nervios periféricos, ya que estas células se reprograman para adquirir competencias que les permiten participar de forma eficiente en la reparación de los nervios periféricos (Jessen y cols., 2015a, 2015b). A pesar de que la conversión de las células de Schwann ocurre a través de un

mecanismo de reprogramación directa y sucede sin pasar por un estadio progenitor intermedio, el cambio fenotípico que padecen las células de Schwann se resuelve en dos fases bien definidas: la desdiferenciación y la activación (Arthur-Farraj y cols., 2012; Jessen y cols., 2015b). La desdiferenciación conlleva la regulación negativa de genes asociados con la formación de la mielina y la sobreexpresión de genes propios de las células precursoras y/o inmaduras de Schwann. Aun así, es importante destacar que el patrón de expresión de las células de Schwann reparadoras es único y no se corresponde con el perfil transcripcional de ninguna población del linaje de Schwann. De acuerdo con el fenotipo que presentan las células de Schwann durante la reparación de los nervios periféricos, las células de Schwann asociadas a los plexos nerviosos cutáneos también se desdiferencian, proliferan y migran al lecho de la herida para contribuir a la cicatrización de heridas en la piel (Johnston y cols., 2013, 2016). Un estudio publicado por Johnston y colaboradores demuestra que la ablación condicional de las células de Schwann (utilizando la línea *Sox2^{fl/fl}*) aumenta el área de la herida y retrasaba el cierre del compartimento dérmico (Johnston y cols., 2013, 2016). Aunque actualmente se sabe poco acerca de las funciones que las células de Schwann cumplen en el proceso de cicatrización, recientemente se ha descrito que la glía periférica activada entra en el lecho de la herida, donde aumenta la expresión de factores que regulan la cicatrización y promueve la diferenciación de los miofibroblastos a través de la señalización de TGFβ. Así, al eliminar específicamente las células de Schwann (*Plp^{CreERT2}/Sox10^{lox/lox}*) se retrasa la re-epitelización y emperora el cierre de la herida por contracción (Parfejevs y cols., 2018b).

5.1 Las células de Schwann se reprograman inducidas por las condiciones del cultivo

Los resultados que se recogen en la Tesis demuestran que las células de Schwann aisladas en cultivo se corresponden fenotípicamente, al menos en parte, con las células de Schwann reparadoras. Así, en las poblaciones celulares procedentes de la línea triple transgénica, las fracciones identificadas como células de Schwann en preparaciones de tejido dérmico completo (Doble+ y *Sox2*+) expresan genes del linaje Schwann entre los que destacan los que se activan en respuesta a daño, como *Sox2*, *Pax3*, *Pou3f1* (*Oct6*) o *Egr1* (Balakrishnan y cols., 2016; Doddrell y cols., 2012; Le y cols., 2005). Además de los genes relacionados con el proceso de reprogramación, las células de Schwann cutáneas expresan genes exclusivos de poblaciones precursoras y/o inmaduras de Schwann, como *Tfap2a* (*AP-2*), *Fabp7* y *Dhh* (Jessen y Mirsky, 2005). Aunque estos genes no han sido relacionados con el fenotipo de las células reparadoras, su expresión es indicativa de que las células se encuentran en un estadio inmaduro, no terminalmente diferenciado. Así se confirma que el fenotipo de las células de Schwann aisladas en cultivo coincide con el descrito en las células de Schwann activadas en respuesta a daño en el nervio (Gomez-Sanchez y cols., 2017; Jessen y cols., 2015b). En base a los resultados obtenidos se propone que las células de Schwann cutáneas se reprograman durante el establecimiento del cultivo de SKPs, inducidas por la

Discusión

disgregación de la piel, un procedimiento que recrea una situación de daño fisiológico, estimulando la desdiferenciación y la activación de las células de Schwann al ser extraídas de su nicho endógeno.

Por otro lado, el fenotipo de las células de las fracciones Doble+ y Sox2+ aisladas en cultivo coincide con el fenotipo descrito para las células de Schwann humanas aisladas en cultivo, las cuales expresan genes como *SOX10*, *SOX9*, *AP2A1*, *CDH19*, *EGR1*, *ETV5*, *PAX3*, *SOX2*, *CX32*, *DHH*, *NECL4*, *NFATC4*, *POU3F1*, *S100B* y *YY1* (Stratton y cols., 2017). En esta misma línea, en un trabajo reciente se demuestra que las células de Schwann aisladas de la piel son fenotípicamente similares a las células de Schwann aisladas de nervios en los cuales se ha generado un daño agudo, las cuales proliferan más rápidamente, promueven un mayor crecimiento axonal *in vitro* y presentan mayor capacidad de mielinización *in vivo* (Kumar y cols., 2016). Así, a pesar de que el fenotipo de las células de Schwann no ha sido caracterizado por completo en nuestro estudio, atendiendo al fenotipo descrito por otros grupos en relación al fenotipo de las células de Schwann aisladas de la piel, se puede afirmar que las poblaciones Doble+ y Sox2+ corresponden a células de Schwann reprogramadas.

En relación al fenotipo de las células de Schwann aisladas y diferenciadas en cultivo, la caracterización de las células diferenciadas demuestra que las células *Myf5+* mantienen un patrón de expresión propio de las células de Schwann reprogramadas, manteniendo la expresión de algunos genes como *Cdh19*, *Sox2* y *Ncam1*, aunque de manera menos elevada. Es posible que este fenotipo se deba a la presencia de Heregulina y Forskolina en el medio de diferenciación, ya que ambos factores promueven la entrada en ciclo y contribuyen a que las células se mantengan parcialmente activadas, previniendo su completa maduración (Casella y cols., 1996; Cowell y cols., 2008; Rahmatullah y cols., 1998). Además, las células de Schwann endógenas se encuentran generalmente asociadas a fibras nerviosas y se separan de los axones exclusivamente para atender a procesos de reparación. Por eso, puede que las células de Schwann aisladas en cultivo no puedan completar su maduración y se mantengan en un estadio indiferenciado, de modo que sea necesario incorporar componentes nerviosos al cultivo, como explantes de GRD, que sirvan de soporte para las células y generen señales necesarias para su diferenciación terminal (Li y cols., 1996).

Estos resultados tienen implicaciones importantes en relación al fenotipo de las poblaciones que se caracterizan tras su aislamiento en cultivo y sustentan nuestra idea de que la plasticidad fenotípica de algunas células adultas es responsable del potencial atribuido a algunas poblaciones de células madre y/o progenitoras específicas de tejido. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la regeneración de miembros completos en urodelos se resuelve mediante la cooperación de poblaciones progenitoras específicas de tejido y células somáticas reprogramadas en respuesta a señales de daño (Kumar y Brockes, 2012). Así, aunque no se puede descartar que las precursoras endógenas intervengan en otros procesos de reparación, se refuerza la idea de que las células de Schwann representan una población particularmente relevante en la reparación de los tejidos adultos. Esto explica que las células de Schwann hayan sido ensayadas en múltiples modelos de

daño nervioso y también en cicatrización de heridas cutáneas, en los cuales han demostrado jugar un papel fundamental, no solo en la restauración de los nervios, sino también en otros procesos de reparación.

6. ORIGEN DE LOS NEUROFIBROMAS DÉRMICOS EN LA NF1

6.1 Células de Schwann reprogramadas como origen de los neurofibromas cutáneos

La formación de neurofibromas es uno de los principales rasgos clínicos de la neurofibromatosis tipo 1 (NF1), tumores complejos en los que prevalecen las células de Schwann, formando el 40-80% de la masa tumoral (Carroll, 2012). A nivel estructural los distintos tipos de neurofibroma son similares, aunque la localización y la aparición clínica de estos tumores ES notablemente diferente. Los neurofibromas cutáneos se forman en la edad adulta en prácticamente todos los pacientes con NF1 y alcanzan un tamaño limitado, mientras que los neurofibromas plexiformes, de origen congénito, se generan durante el desarrollo embrionario en aproximadamente el 30% de los pacientes con NF1 y siguen creciendo a lo largo de toda la vida. En un 10-15% de los casos, además, los neurofibromas plexiformes pueden dar lugar a tumores malignos de la vaina de nervio periférico (MPNST). A pesar de que no se ha demostrado cual es la población responsable de formar los neurofibromas y aún quedan por identificarse muchos de los mecanismos que subyacen este proceso, actualmente se acepta que los neurofibromas se originan a partir de células de Schwann *NF1*+/- que inactivan la segunda copia del gen *NF1*.

Los estudios realizados con líneas transgénicas de ratón utilizadas para eliminar específicamente el gen *Nf1* en diferentes estadios del linaje de Schwann, han servido para confirmar el origen de los neurofibromas plexiformes, ya que estos animales desarrollaron múltiples tumores a lo largo del plexo nervioso periférico (Chen y cols., 2014; Joseph y cols., 2008; Le y cols., 2009; Mayes y cols., 2011; Ribeiro y cols., 2013; Wu y cols., 2008; Zheng y cols., 2008; Zhu y cols., 2002). Estos estudios, sin embargo, no han servido para determinar el origen de los neurofibromas cutáneos, ya que prácticamente ninguna de estas líneas transgénicas desarrolla tumores en la piel. Así, este fenotipo ha dado pie a algunos autores para afirmar que los neurofibromas cutáneos tienen un origen distinto a los plexiformes y han atribuido la formación de neurofibromas dérmicos a las precursoras derivadas de la piel (SKPs) (Jouhilahti y cols., 2011; Le y cols., 2009).

No obstante, atendiendo a nuestros datos con respecto a la identidad de las SKPs, estos datos apoyarían indirectamente la implicación de las células de Schwann en la formación de los neurofibromas en la piel. Además, múltiples evidencias sugieren que estos tumores se originan a partir de la desdiferenciación de las células de Schwann terminales *NF1*-/+ que han sufrido una mutación somática en el segundo alelo del gen *Nf1*: (1) Los neurofibromas cutáneos de pacientes con NF1 se caracterizan por contener células de Schwann *NF1*-/- (Kluwe y cols., 1999; Maertens y

Discusión

cols., 2006; Rutkowski y cols., 2000; Serra y cols., 2000; Sherman y cols., 2000). (2) Las células de Schwann terminalmente diferenciadas tienen la capacidad de desdiferenciarse y adquirir un fenotipo de célula inmadura, similar al de las células precursoras (SCP) y/o inmaduras de Schwann (iSC), para asistir a procesos de regeneración tisular. Este fenómeno comprende a las células de Schwann asociadas a los nervios periféricos, las cuales actúan en respuesta a daño en el nervio (Clements y cols., 2017; Gomez-Sanchez y cols., 2017; Hung y cols., 2015; Jessen y cols., 2015b; Kim y cols., 2013; Napoli y cols., 2012; Parrinello y cols., 2010), y a las células de Schwann dérmicas que participan en la cicatrización de heridas cutáneas (Johnston y cols., 2013, 2016; Parfejevs y cols., 2018b). (3) Los neurofibromas presentan una estructura similar a la observada en los nervios regenerativos y se componen de una mezcla heterogénea de células, donde abundan los fibroblastos y las células de Schwann, se produce una infiltración masiva de células inmunitarias y las distintas capas de tejido conectivo se encuentran desestructuradas. Además, al igual que sucede en el tejido dañado, las células de Schwann aparecen separadas de los axones y expresan marcadores de Schwann inmaduras. De hecho, algunos autores describen los neurofibromas como heridas no reparadas (Parrinello y Lloyd, 2009; Ribeiro y cols., 2013; Riccardi VM, 1992). (4) En el ratón adulto se ha demostrado que el trauma local contribuye generar un microambiente permisivo y favorece la desdiferenciación de las células de Schwann mielinizantes y la formación de tumores en el plexo nervioso periférico (Ribeiro y cols., 2013). Del mismo modo, el trauma es un factor asociado al desarrollo de los neurofibromas cutáneos en pacientes con NF1 (Riccardi, 2000). (5) Los tejidos haploinsuficientes muestran un defecto en la cicatrización de heridas, debido a la disfunción del supresor tumoral neurofibromina (Atit y cols., 1999).

Recientemente, un trabajo publicado por el grupo de Piotr Topilko, demuestra que los neurofibromas dérmicos se forman a partir de células de Schwann subepidérmicas que derivan de las células BC (Radomska y Topilko, 2017). En este trabajo se presenta por primera vez un modelo transgénico en el que la inactivación de la segunda copia del gen *NF1* en la población *Prss56+*, una subpoblación de las células BC, induce la formación de múltiples tumores en el plexo nervioso subcutáneo y en la dermis. Adicionalmente, este estudio pone de manifiesto la implicación de los factores no genéticos en el desarrollo de los neurofibromas cutáneos y demuestra que las lesiones generadas en la piel aumentan la formación de este tipo de tumor, debido a que las señales activadas por el daño inducen la reprogramación de las células de Schwann cutáneas, incrementando su proliferación y la de otros componentes que conforman los neurofibromas.

En esta Tesis, se ha analizado la expresión (RT-qPCR) de marcadores de Schwann en biopsias de piel no afecta y en neurofibromas dérmicos de pacientes con NF1. Los datos de expresión génica obtenidos en este análisis han sido altamente variables, debido probablemente a la heterogeneidad de los neurofibromas, tumores formados por múltiples tipos celulares, en los que la expresión de cada uno de los genes representa la cantidad de ARN mensajero procedente del conjunto de poblaciones celulares presentes en esa muestra. Aun así, este estudio revela que los tumores

expresan marcadores propios de las células de Schwann en un estadio activado, apoyando nuestra hipótesis de que los tumores se desarrollan a partir de la dediferenciación de las células de Schwann de la piel.

Por un lado, el análisis de expresión génica demuestra que prácticamente todas las muestras sobreexpresan los marcadores canónicos de Schwann *SOX10* y *S100β*, confirmando que las células de Schwann son el componente celular principal de estos tumores. Estos genes se expresan a lo largo de varios estadios del linaje de Schwann y son responsables de la especificación, la proliferación y la mielinización de las células (Britsch y cols., 2001; Finsch y cols., 2010; Fujiwara y cols., 2014), y han sido utilizados ampliamente en el diagnóstico de múltiples neoplasias de tejidos blandos, incluyendo tumores derivados de la cresta neural como los neurofibromas o los Schwannomas (Karamchandani y cols., 2012; Zheng y cols., 2008). Así mismo, los neurofibromas cutáneos sobreexpresan marcadores asociados con las células precursoras de Schwann, como *CDH19* y *SOX2*, y marcadores que en los nervios periféricos se consideran exclusivos de las células de Schwann no-mielinizantes, como *NGFR* (*p75NTR*) y *NCAM* (*CD56*). Es importante tener en cuenta, aun así, que en la piel, estos marcadores (junto a *L1CAM* y *MCAM*) se expresan tanto en células de Schwann mielinizantes como en no-mielinizantes (Reinisch y Tschachler, 2012), de modo que su expresión no es indicativo del tipo de célula de Schwann presente en los neurofibromas cutáneos. Sin embargo, considerando que los marcadores *NGFR* y *NCAM* se expresan en las células de Schwann reprogramadas, su sobreexpresión puede indicar la activación de las células de Schwann en el tumor.

En relación al patrón de expresión de *SOX9*, aunque se ha descrito como un marcador del linaje de Schwann en ratón (Balakrishnan y cols., 2016), se considera un marcador de células diferenciadas en humano (Etxaniz y cols., 2014), de modo que la disminución en la expresión de este marcador en los tumores encaja con los datos de expresión de los marcadores de dediferenciación, como *SOX2* o *CDH19*. Además, en la piel humana varios tipos celulares no relacionados con las células de Schwann expresan *SOX9*, como los queratinocitos de la epidermis y la capa radicular externa del folículo piloso (Shi y cols., 2013; Vidal y cols., 2005), por lo que es posible que la expresión de *SOX9* en estas poblaciones (más abundantes en la piel no afecta) interfiriera en la expresión relativa de *SOX9*. Por otro lado, hay que considerar que *SOX9* se expresa en varios tipos de cáncer, como el cáncer ovárico (Malki y cols., 2007), el cáncer colorrectal (Matheu y cols., 2012) o el glioma (Gao y cols., 2015), y se expresa también en algunos tumores de la vaina del nervio periférico, principalmente en los tipos histológicos más agresivos (MPNST) (Carbonnelle-Puscian y cols., 2011; Miller y cols., 2006, 2009). Sin embargo, la expresión de *SOX9* no se asocia con los neurofibromas cutáneos y el número de células *SOX9+* en este tipo de tumor es inferior al 5%, mientras que en los neurofibromas plexiformes y en los MPNST las células *SOX9+* pueden representar más del 50% del tumor (Carbonnelle-Puscian y cols., 2011). De modo que, a pesar de ser un marcador de células de Schwann en ratón, *SOX9* no es un marcador de los neurofibromas cutáneos en el ser humano.

Discusión

El patrón de expresión de *CDH19* en los neurofibromas (altamente expresado en el 100% de los tumores) ha resultado particularmente interesante por ser un marcador expresado exclusivamente en las células precursoras de Schwann (Jessen y Mirsky, 2005). A pesar de no ser un gen comúnmente utilizado para caracterizar las células de Schwann de los neurofibromas, varios estudios han demostrado que *CDH19* se expresa específicamente en los neurofibromas cutáneos y que su expresión se reduce notablemente en los neurofibromas plexiformes y deja de expresarse en los MPNST (Holtkamp y cols., 2004; Martínez y cols., 2017). Así mismo, el marcador *SOX2* presenta un perfil transcripcional similar al de *CDH19* y se expresa fuertemente en prácticamente todas las muestras analizadas. La expresión de *SOX2* durante el desarrollo embrionario del linaje de Schwann es transitoria (Balakrishnan y cols., 2016) y su expresión se activa en las células de Schwann reprogramadas que participan en la reparación de nervios periféricos y heridas de piel (Balakrishnan y cols., 2016; Johnston y cols., 2013; Le y cols., 2005; Parrinello y cols., 2010; Roberts y cols., 2017), confirmando de nuevo el estadio celular en que se encuentran las células de Schwann que conforman los neurofibromas dérmicos. Aunque *SOX2* es un gen que se expresa en algunos tipos de tumor de la piel (Boumahdi y cols., 2014; Siegle y cols., 2014), no se han encontrado evidencias que describan la expresión de *SOX2* en neurofibromas cutáneos y actualmente su expresión se relaciona exclusivamente con los MPNST, en los que las células *SOX2+* representan el 18-32% de las células del tumor (Pekmezci y cols., 2015).

Con propósito de detectar la pérdida del segundo alelo funcional, además de genes relacionados con el linaje de Schwann, se ha analizado la expresión del gen *NF1*. En este estudio no se ha llegado a detectar la disminución en la expresión de *NF1* en ninguna de las muestras. Aunque las células de Schwann son el principal componente de los neurofibromas, la presencia de otras poblaciones celulares con genotipo *NF1+/+* y *NF1+/-* interfiere probablemente en el análisis de expresión del gen *NF1*, por lo que sería necesario analizar la expresión de este gen en poblaciones aisladas o genotipar directamente las células de Schwann presentes en el tumor.

El análisis de expresión de los marcadores sobreexpresados por inmunofluorescencia en secciones de neurofibroma ha permitido apreciar la estructura de las células que forman el tumor, las cuales se caracterizan por tener una morfología fusiforme y formar densas agrupaciones celulares orientadas en un mismo plano. La expresión de *CDH19* en el tumor demuestra que el número de células *CDH19+* aumenta especialmente en la región interna de la muestra, sugiriendo que las células de Schwann reprogramadas que inducen la formación de los tumores, se localizan probablemente en esta región de la piel.

Durante la caracterización de una muestra de piel sana correspondiente a uno de los pacientes se ha detectado el crecimiento de un pequeño neurofibroma en la región profunda de la dermis. Esta masa celular compacta está formada por células positivas para los marcadores p75NTR, S100 y *CDH19* y presentan además una morfología fibrilar semejante a la observada en las muestras de neurofibroma. La formación de neurofibromas incipientes en muestras de piel aparentemente sanas

de pacientes con NF1 ha sido previamente descrita en varios estudios. Uno de estos trabajos reveló que el 40% de las muestras correspondientes a piel sana de paciente presentaban un incremento considerable en la expresión de S100 y que estas regiones se encontraban en áreas cercanas a folículos pilosos y estaban enriquecidas en colágeno (Karvonen y cols., 2000).

6.2 Demostración experimental del origen celular de los NF cutáneos

Los datos obtenidos en relación al estadio de las células de Schwann que forman los neurofibromas cutáneos son consistentes con el fenotipo que las células de Schwann reprogramadas cumplen en la regeneración de la dermis. Sin embargo, para confirmar nuestra hipótesis sería necesario realizar ensayos adicionales que demuestren la implicación de estas células en la inducción de los neurofibromas dérmicos en la piel humana. Del mismo modo, sería interesante analizar los mecanismos moleculares que subyacen la reprogramación de las células de Schwann durante el desarrollo de estos tumores.

Porponemos que la implicación de las células de Schwann *NF1*^{-/-} humanas reprogramadas en el desarrollo de los NF cutáneos humanos podría analizarse en un modelo de xenotrasplante. Las células de Schwann *NF1*^{+/-} humanas (NGFR⁺ y NCAM1⁺) podrían ser aisladas de áreas de piel no afectas de pacientes con NF1 y las fracciones celulares negativas para NGFR y NCAM1 (que no son células Schwann, ni células perivasculares) se utilizarían de control. La expresión del gen *NF1* podría silenciarse en estas fracciones celulares para posteriormente trasplantar las células *NF1*^{+/-} y *NF1*^{-/-} en hembras *NF1*^{+/-} embarazadas inmunocomprometidas para evaluar el desarrollo de NF en la piel. Prevedemos que solo las células NGFR⁺/NCAM1⁺ que han perdido la expresión de neurofibromina (*NF1*^{-/-}) tendrán capacidad de formar neurofibromas. Por otro lado, la implicación de los niveles de expresión de SOX2 en la reprogramación de las células de Schwann podría demostrarse tratando las células NGFR⁺/NCAM1⁺ con un vector viral que silencie la expresión endógena de SOX2 (short hairpin pLKO.shSox2), evitando que las células de Schwann desdiferencien y contribuyan a la formación de los neurofibromas.

CONCLUSIONES

1. En cultivos *in vitro* generados a partir de piel ventral de ratón, se ha detectado una población celular trazada por *Myf5-cre^{Sor}*, compuesta mayoritariamente por células de Schwann. Esta población es la responsable del fenotipo neural obtenido en condiciones de diferenciación glial a partir de estos cultivos.
2. La línea transgénica *Myf5-cre^{Sor}* traza derivados de la cresta neural en la piel ventral del ratón, incluyendo diversos tipos de células de Schwann, melanocitos asociados al folículo piloso y neuronas periféricas.
3. La línea transgénica *B195AP-Cre* traza derivados mesodérmicos *Myf5+* en la piel ventral del ratón, excluyendo las células de Schwann. La población celular trazada por *B195AP-Cre* no genera progenie glial *in vitro*, indicando que ésta no deriva de precursores mesodérmicos *Myf5+*.
4. En cultivos *in vitro* generados a partir de piel ventral de ratón, la competencia neural correlaciona con los niveles de expresión de *Sox2*, siendo la expresión de *Sox2* incompatible con la diferenciación hacia linajes mesodérmicos.
5. En la piel ventral del ratón transgénico *Sox2^{EGFP}*, la proteína reportera traza diversos tipos de células de Schwann y células de la papila dérmica en un subgrupo de folículos pilosos, solapando parcialmente con las células trazadas por *Myf5-cre^{Sor}*.
6. Los datos de transcriptómica y de expresión de marcadores *in vitro* sugieren que las células de Schwann aisladas en cultivos en suspensión adquieren un fenotipo inmaduro y/o reprogramado.
7. Los neurofibromas cutáneos en pacientes con Neurofibromatosis tipo 1 sobreexpresan genes asociados con estadios inmaduros o precursores de Schwann. En base a estos resultados preliminares, proponemos que las células de Schwann desdiferenciadas pueden inducir la formación de estos tumores.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Khalil, R., Le Grand, F., Pallafacchina, G., Valable, S., Authier, F.-J., Rudnicki, M.A., Gherardi, R.K., Germain, S., Chretien, F., Sotiropoulos, A., et al. (2009). Autocrine and paracrine angiopoietin 1/Tie-2 signaling promotes muscle satellite cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 5, 298–309.
- Abraira, V.E., and Ginty, D.D. (2013). The Sensory Neurons of Touch. *Neuron* 79, 618–639.
- Adameyko, I., and Lallemand, F. (2010). Glial versus melanocyte cell fate choice: Schwann cell precursors as a cellular origin of melanocytes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 3037–3055.
- Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J.B., Pereira, J.A., Topilko, P., Müller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., et al. (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* 139, 366–379.
- Adameyko, I., Lallemand, F., Furlan, A., Zinin, N., Aranda, S., Kitambi, S.S., Blanchart, A., Favaro, R., Nicolis, S., Lübke, M., et al. (2012). Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. *Dev. Camb. Engl.* 139, 397–410.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Blood Vessels and Endothelial Cells*.
- Amoh, Y., and Hoffman, R.M. (2017). Hair follicle-associated-pluripotent (HAP) stem cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 1–7.
- Amoh, Y., Li, L., Yang, M., Moossa, A.R., Katsuoka, K., Penman, S., and Hoffman, R.M. (2004). Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13291–13295.
- Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K., Penman, S., and Hoffman, R.M. (2005a). Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5530–5534.
- Amoh, Y., Li, L., Campillo, R., Kawahara, K., Katsuoka, K., Penman, S., and Hoffman, R.M. (2005b). Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17734–17738.
- Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K., and Hoffman, R.M. (2008). Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 1865–1869.
- Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K., and Hoffman, R.M. (2009a). Multipotent nestin-expressing hair follicle stem cells. *J. Dermatol.* 36, 1–9.
- Amoh, Y., Kanoh, M., Niiyama, S., Kawahara, K., Sato, Y., Katsuoka, K., and Hoffman, R.M. (2009b). Human and mouse hair follicles contain both multipotent and monopotent stem cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 176–177.
- Amoh, Y., Kanoh, M., Niiyama, S., Hamada, Y., Kawahara, K., Sato, Y., Hoffman, R.M., and Katsuoka, K. (2009c). Human hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells promote regeneration of peripheral-nerve injury: an advantageous alternative to ES and iPS cells. *J. Cell. Biochem.* 107, 1016–1020.
- Amoh, Y., Hamada, Y., Aki, R., Kawahara, K., Hoffman, R.M., and Katsuoka, K. (2010). Direct transplantation of uncultured hair-follicle pluripotent stem (hfPS) cells promotes the recovery of peripheral nerve injury. *J. Cell. Biochem.* 110, 272–277.
- Amoh, Y., Mii, S., Aki, R., Hamada, Y., Kawahara, K., Hoffman, R.M., and Katsuoka, K. (2012). Multipotent nestin-expressing stem cells capable of forming neurons are located in the upper, middle and lower part of the vibrissa hair follicle. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 3513–3517.
- Armulik, A., Genové, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev. Cell* 21, 193–215.
- Arnold, K., Sarkar, A., Yram, M.A., Polo, J.M., Bronson, R., Sengupta, S., Seandel, M., Geijsen, N., and Hochedlinger, K. (2011a). Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell* 9, 317–329.

Bibliografía

Arnold, K., Sarkar, A., Yram, M.A., Polo, J.M., Bronson, R., Sengupta, S., Seandel, M., Geijsen, N., and Hochedlinger, K. (2011b). Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell* 9, 317–329.

Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S.A., and Gronthos, S. (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 1787–1795.

Arthur-Farraj, P., Wanek, K., Hantke, J., Davis, C.M., Jayakar, A., Parkinson, D.B., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2011). Mouse schwann cells need both NRG1 and cyclic AMP to myelinate. *Glia* 59, 720–733.

Arthur-Farraj, P.J., Latouche, M., Wilton, D.K., Quintes, S., Chabrol, E., Banerjee, A., Woodhoo, A., Jenkins, B., Rahman, M., Turmaine, M., et al. (2012). c-Jun Reprograms Schwann Cells of Injured Nerves to Generate a Repair Cell Essential for Regeneration. *Neuron* 75, 633–647.

Ashrafi, M., Baguneid, M., and Bayat, A. (2016). The Role of Neuromediators and Innervation in Cutaneous Wound Healing. *Acta Derm. Venereol.* 96, 587–594.

Atit, R., Sgaier, S.K., Mohamed, O.A., Taketo, M.M., Dufort, D., Joyner, A.L., Niswander, L., and Conlon, R.A. (2006). Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev. Biol.* 296, 164–176.

Atit, R.P., Crowe, M.J., Greenhalgh, D.G., Wenstrup, R.J., and Ratner, N. (1999a). The Nf1 tumor suppressor regulates mouse skin wound healing, fibroblast proliferation, and collagen deposited by fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 112, 835–842.

Atit, R.P., Crowe, M.J., Greenhalgh, D.G., Wenstrup, R.J., and Ratner, N. (1999b). The Nf1 Tumor Suppressor Regulates Mouse Skin Wound Healing, Fibroblast Proliferation, and Collagen Deposited by Fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 112, 835–842.

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17, 126–140.

Aybar, M.J., Glavic, A., and Mayor, R. (2002). Extracellular signals, cell interactions and transcription factors involved in the induction of the neural crest cells. *Biol. Res.* 35, 267–275.

Baggiolini, A., Varum, S., Mateos, J.M., Bettosini, D., John, N., Bonalli, M., Ziegler, U., Dimou, L., Clevers, H., Furrer, R., et al. (2015). Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo. *Cell Stem Cell* 16, 314–322.

Bajard, L., Relaix, F., Lagha, M., Rocancourt, D., Daubas, P., and Buckingham, M.E. (2006). A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes Dev.* 20, 2450–2464.

Balakrishnan, A., Stykel, M.G., Touahri, Y., Stratton, J.A., Biernaskie, J., and Schuurmans, C. (2016). Temporal Analysis of Gene Expression in the Murine Schwann Cell Lineage and the Acutely Injured Postnatal Nerve. *PLoS One* 11, e0153256.

Bani-Yaghoob, M., Tremblay, R.G., Lei, J.X., Zhang, D., Zurakowski, B., Sandhu, J.K., Smith, B., Ribocco-Lutkiewicz, M., Kennedy, J., Walker, P.R., et al. (2006). Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev. Biol.* 295, 52–66.

Bardot, E.S., Valdes, V.J., Zhang, J., Perdigoto, C.N., Nicolis, S., Hearn, S.A., Silva, J.M., and Ezhkova, E. (2013). Polycomb subunits Ezh1 and Ezh2 regulate the Merkel cell differentiation program in skin stem cells. *EMBO J.* 32, 1990–2000.

Barembaum, M., and Bronner-Fraser, M. (2005). Early steps in neural crest specification. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 642–646.

Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 19–33.

- Barrette, B., Calvo, E., Vallières, N., and Lacroix, S. (2010). Transcriptional profiling of the injured sciatic nerve of mice carrying the Wld(S) mutant gene: identification of genes involved in neuroprotection, neuroinflammation, and nerve regeneration. *Brain. Behav. Immun.* 24, 1254–1267.
- Barrionuevo, F., Naumann, A., Bagheri-Fam, S., Speth, V., Taketo, M.M., Scherer, G., and Neubüser, A. (2008). Sox9 is required for invagination of the otic placode in mice. *Dev. Biol.* 317, 213–224.
- Beauchamp, J.R., Heslop, L., Yu, D.S.W., Tajbakhsh, S., Kelly, R.G., Wernig, A., Buckingham, M.E., Partridge, T.A., and Zammit, P.S. (2000). Expression of Cd34 and Myf5 Defines the Majority of Quiescent Adult Skeletal Muscle Satellite Cells. *J. Cell Biol.* 151, 1221–1234.
- Belicchi, M., Pisati, F., Lopa, R., Porretti, L., Fortunato, F., Sironi, M., Scalamogna, M., Parati, E.A., Bresolin, N., and Torrente, Y. (2004). Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 77, 475–486.
- Berry, D.C., Stenesen, D., Zeve, D., and Graff, J.M. (2013). The developmental origins of adipose tissue. *Dev. Camb. Engl.* 140, 3939–3949.
- Biernaskie, J., and Miller, F.D. (2010). White matter repair: skin-derived precursors as a source of myelinating cells. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* 37 Suppl 2, S34–41.
- Biernaskie, J., Sparling, J.S., Liu, J., Shannon, C.P., Plemel, J.R., Xie, Y., Miller, F.D., and Tetzlaff, W. (2007). Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 9545–9559.
- Biernaskie, J., Paris, M., Morozova, O., Fagan, B.M., Marra, M., Pevny, L., and Miller, F.D. (2009). SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 610–623.
- Biernaskie, J.A., McKenzie, I.A., Toma, J.G., and Miller, F.D. (2006). Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nat. Protoc.* 1, 2803–2812.
- Billingham, R.E., and Russell, P.S. (1956). Studies on wound healing, with special reference to the phenomenon of contracture in experimental wounds in rabbits' skin. *Ann. Surg.* 144, 961–981.
- Billon, N., Iannarelli, P., Monteiro, M.C., Glavieux-Pardanaud, C., Richardson, W.D., Kessar, N., Dani, C., and Dupin, E. (2007). The generation of adipocytes by the neural crest. *Dev. Camb. Engl.* 134, 2283–2292.
- Birch, R., Birch, R., Birch, R., and Birch, R. (2013). The Peripheral Nervous System: Anatomy and Function. In *Peripheral Nerve Injuries: A Clinical Guide*, (Springer, London), pp. 1–67.
- Birchmeier, C. (2009). ErbB receptors and the development of the nervous system. *Exp. Cell Res.* 315, 611–618.
- Birchmeier, C., and Brohmann, H. (2000). Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 725–730.
- Birchmeier, C., and Nave, K.-A. (2008). Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia* 56, 1491–1497.
- Biressi, S., Bjornson, C.R.R., Carlign, P.M.M., Nishijo, K., Keller, C., and Rando, T.A. (2013). Myf5 expression during fetal myogenesis defines the developmental progenitors of adult satellite cells. *Dev. Biol.* 379, 195–207.
- Bixby, S., Kruger, G.M., Mosher, J.T., Joseph, N.M., and Morrison, S.J. (2002). Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron* 35, 643–656.
- Blanpain, C., and Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 207–217.
- Bonfanti, P., Barrandon, Y., and Cossu, G. (2012). “Hearts and bones”: the ups and downs of “plasticity” in stem cell biology. *EMBO Mol. Med.* 4, 353–361.

Bibliografía

- Bonnemaison, E., Roze-Abert, B., Lorette, G., Sirinelli, D., Boscq, M., Mazjoub, S., De Courtivron, B., Bonnard, C., Despert, F., Toutain, A., et al. (2006). [Neurofibromatosis type 1 complications in the pediatric age: follow-up of a hundred cases]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* 13, 1009–1014.
- Bosse, F., Hasenpusch-Theil, K., Küry, P., and Müller, H.W. (2006). Gene expression profiling reveals that peripheral nerve regeneration is a consequence of both novel injury-dependent and reactivated developmental processes. *J. Neurochem.* 96, 1441–1457.
- Botchkarev, V.A., and Kishimoto, J. (2003). Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* 8, 46–55.
- Botchkarev, V.A., Eichmüller, S., Johansson, O., and Paus, R. (1997). Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin. *J. Comp. Neurol.* 386, 379–395.
- Boulais, N., and Misery, L. (2007). Merkel cells. *J. Am. Acad. Dermatol.* 57, 147–165.
- Boumahdi, S., Driessens, G., Lapouge, G., Rorive, S., Nassar, D., Le Mercier, M., Delatte, B., Caauwe, A., Lenglez, S., Nkusi, E., et al. (2014). SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* 511, 246–250.
- Bowles, J., Schepers, G., and Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* 227, 239–255.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., and Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2, 151–159.
- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., and Arnold, H.H. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* 8, 701–709.
- Braverman, I.M. (1989). Ultrastructure and organization of the cutaneous microvasculature in normal and pathologic states. *J. Invest. Dermatol.* 93, 2S-9S.
- Braverman, I.M. (1997). The cutaneous microcirculation: ultrastructure and microanatomical organization. *Microcirc. N. Y. N* 1994 4, 329–340.
- Braverman, I.M. (2000). The Cutaneous Microcirculation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 3–9.
- Britsch, S., Goerich, D.E., Riethmacher, D., Peirano, R.I., Rossner, M., Nave, K.A., Birchmeier, C., and Wegner, M. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 15, 66–78.
- Brockes, J.P., and Kumar, A. (2008). Comparative aspects of animal regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 525–549.
- Brohmann, H., Jagla, K., and Birchmeier, C. (2000). The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Dev. Camb. Engl.* 127, 437–445.
- Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. (1989). Developmental potential of avian trunk neural crest cells in situ. *Neuron* 3, 755–766.
- Bronner-Fraser, M., and Fraser, S.E. (1988a). Application of new technologies to studies of neural crest migration and differentiation. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* 4, 23–39.
- Bronner-Fraser, M., and Fraser, S.E. (1988b). Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* 335, 161–164.
- Brosius Lutz, A., and Barres, B.A. (2014). Contrasting the glial response to axon injury in the central and peripheral nervous systems. *Dev. Cell* 28, 7–17.

- Buckingham, M., and Rigby, P.W.J. (2014). Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. *Dev. Cell* 28, 225–238.
- Burns, A.J., and Douarin, N.M. (1998). The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Dev. Camb. Engl.* 125, 4335–4347.
- Burns, A.J., and Le Douarin, N.M. (2001). Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat. Rec.* 262, 16–28.
- Burns, A.J., Champeval, D., and Le Douarin, N.M. (2000). Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Dev. Biol.* 219, 30–43.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B.G., and Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat. Neurosci.* 6, 1162–1168.
- Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 328–340.
- Carbonnelle-Puscian, A., Vidal, V., Laurendeau, I., Valeyrie-Allanore, L., Vidaud, D., Bièche, I., Leroy, K., Lantieri, L., Wolkenstein, P., Schedl, A., et al. (2011). SOX9 expression increases with malignant potential in tumors from patients with neurofibromatosis 1 and is not correlated to desert hedgehog. *Hum. Pathol.* 42, 434–443.
- Carrasco-Garcia, E., Moreno-Cugnon, L., Garcia, I., Borrás, C., Revuelta, M., Izeta, A., Lopez-Lluch, G., de Pancorbo, M.M., Vergara, I., Vina, J., et al. (2018). SOX2 expression diminishes with ageing in several tissues in mice and humans. *Mech. Ageing Dev.*
- Carroll, S.L. (2012). Molecular mechanisms promoting the pathogenesis of Schwann cell neoplasms. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 321–348.
- Carroll, S.L., and Ratner, N. (2008). How does the Schwann cell lineage form tumors in NF1? *Glia* 56, 1590–1605.
- Carvajal, J.J., Cox, D., Summerbell, D., and Rigby, P.W. (2001). A BAC transgenic analysis of the *Mrf4/Myf5* locus reveals interdigitated elements that control activation and maintenance of gene expression during muscle development. *Dev. Camb. Engl.* 128, 1857–1868.
- Carvajal, J.J., Keith, A., and Rigby, P.W.J. (2008). Global transcriptional regulation of the locus encoding the skeletal muscle determination genes *Mrf4* and *Myf5*. *Genes Dev.* 22, 265–276.
- Casella, G.T.B., Bunge, R.P., and Wood, P.M. (1996). Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia* 17, 327–338.
- Cattin, A.-L., Burden, J.J., Van Emmenis, L., Mackenzie, F.E., Hoving, J.J.A., Garcia Calavia, N., Guo, Y., McLaughlin, M., Rosenberg, L.H., Quereda, V., et al. (2015). Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell* 162, 1127–1139.
- Cavallaro, M., Mariani, J., Lancini, C., Latorre, E., Caccia, R., Gullo, F., Valotta, M., DeBiasi, S., Spinardi, L., Ronchi, A., et al. (2008a). Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic *Sox2* mutants. *Dev. Camb. Engl.* 135, 541–557.
- Cavallaro, M., Mariani, J., Lancini, C., Latorre, E., Caccia, R., Gullo, F., Valotta, M., DeBiasi, S., Spinardi, L., Ronchi, A., et al. (2008b). Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic *Sox2* mutants. *Dev. Camb. Engl.* 135, 541–557.
- Chen, Y., Shi, L., Zhang, L., Li, R., Liang, J., Yu, W., Sun, L., Yang, X., Wang, Y., Zhang, Y., et al. (2008). The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J. Biol. Chem.* 283, 17969–17978.

Bibliografía

- Chen, Z., Pradhan, S., Liu, C., and Le, L.Q. (2012). Skin-derived precursors as a source of progenitors for cutaneous nerve regeneration. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 2261–2270.
- Chen, Z., Liu, C., Patel, A.J., Liao, C.-P., Wang, Y., and Le, L.Q. (2014). Cells of origin in the embryonic nerve roots for NF1-associated plexiform neurofibroma. *Cancer Cell* 26, 695–706.
- Chen, Z.-L., Yu, W.-M., and Strickland, S. (2007). Peripheral regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 209–233.
- Cheung, M., and Briscoe, J. (2003). Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Dev. Camb. Engl.* 130, 5681–5693.
- Chi, W., Wu, E., and Morgan, B.A. (2015). Earlier-born secondary hair follicles exhibit phenotypic plasticity. *Exp. Dermatol.* 24, 265–268.
- Christ, B., and Brand-Saberi, B. (2004). Limb muscle development. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 905–914.
- Christ, B., and Ordahl, C.P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anat. Embryol. (Berl.)* 191, 381–396.
- Christ, B., and Scaal, M. (2008). Formation and Differentiation of Avian Somite Derivatives. In *Somitogenesis*, (Springer, New York, NY), pp. 1–41.
- Christ, B., Jacob, M., and Jacob, H.J. (1983). On the origin and development of the ventrolateral abdominal muscles in the avian embryo. An experimental and ultrastructural study. *Anat. Embryol. (Berl.)* 166, 87–101.
- Christ, B., Huang, R., and Scaal, M. (2007). Amniote somite derivatives. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 2382–2396.
- Chuong, C.M., Nikoloff, B.J., Elias, P.M., Goldsmith, L.A., Macher, E., Maderson, P.A., Sundberg, J.P., Tagami, H., Plonka, P.M., Thestrup-Pederson, K., et al. (2002). What is the “true” function of skin? *Exp. Dermatol.* 11, 159–187.
- Cichowski, K., and Jacks, T. (2001). NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 104, 593–604.
- Cimadamore, F., Fishwick, K., Giusto, E., Gnedeva, K., Cattarossi, G., Miller, A., Pluchino, S., Brill, L.M., Bronner-Fraser, M., and Terskikh, A.V. (2011). Human ESC-derived neural crest model reveals a key role for SOX2 in sensory neurogenesis. *Cell Stem Cell* 8, 538–551.
- Cimadamore, F., Shah, M., Amador-Arjona, A., Navarro-Peran, E., Chen, C., Huang, C.-T., and Terskikh, A.V. (2012). SOX2 modulates levels of MITF in normal human melanocytes, and melanoma lines in vitro. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, 533–536.
- Clavel, C., Grisanti, L., Zemla, R., Rezza, A., Barros, R., Sennett, R., Mazloom, A.R., Chung, C.-Y., Cai, X., Cai, C.-L., et al. (2012). Sox2 in the dermal papilla niche controls hair growth by fine-tuning BMP signaling in differentiating hair shaft progenitors. *Dev. Cell* 23, 981–994.
- Clements, M.P., Byrne, E., Camarillo Guerrero, L.F., Cattin, A.-L., Zakka, L., Ashraf, A., Burden, J.J., Khadayate, S., Lloyd, A.C., Marguerat, S., et al. (2017). The Wound Microenvironment Reprograms Schwann Cells to Invasive Mesenchymal-like Cells to Drive Peripheral Nerve Regeneration. *Neuron* 96, 98-114.e7.
- Clewes, O., Narynyk, A., Gillinder, K.R., Loughney, A.D., Murdoch, A.P., and Sieber-Blum, M. (2011). Human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC)—characterization and directed differentiation into osteocytes and melanocytes. *Stem Cell Rev.* 7, 799–814.
- Clow, C., and Jasmin, B.J. (2010). Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration. *Mol. Biol. Cell* 21, 2182–2190.
- Colman, S.D., Williams, C.A., and Wallace, M.R. (1995). Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene. *Nat. Genet.* 11, 90–92.

- Cossu, G., Tajbakhsh, S., and Buckingham, M. (1996). How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet.* *TIG 12*, 218–223.
- Coulpier, F., Le Crom, S., Maro, G.S., Manent, J., Giovannini, M., Maciorowski, Z., Fischer, A., Gessler, M., Charnay, P., and Topilko, P. (2009). Novel features of boundary cap cells revealed by the analysis of newly identified molecular markers. *Glia* *57*, 1450–1457.
- Couly, G.F., Coltey, P.M., and Le Douarin, N.M. (1992). The developmental fate of the cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Dev. Camb. Engl.* *114*, 1–15.
- Cowell, R.M., Blake, K.R., Inoue, T., and Russell, J.W. (2008). Regulation of PGC-1 α and PGC-1 β -responsive genes with forskolin-induced Schwann cell differentiation. *Neurosci. Lett.* *439*, 269–274.
- Crist, C.G., Montarras, D., and Buckingham, M. (2012). Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell* *11*, 118–126.
- Dabdoub, A., Puligilla, C., Jones, J.M., Fritsch, B., Cheah, K.S.E., Pevny, L.H., and Kelley, M.W. (2008). Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 18396–18401.
- Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K., and McMahon, A.P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr. Biol.* *8*, 1323-S2.
- D'Antonio, M., Droggiti, A., Feltri, M.L., Roes, J., Wrabetz, L., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2006). TGF β type II receptor signaling controls Schwann cell death and proliferation in developing nerves. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 8417–8427.
- Dasgupta, B., Yi, Y., Chen, D.Y., Weber, J.D., and Gutmann, D.H. (2005). Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer Res.* *65*, 2755–2760.
- Daston, M.M., and Ratner, N. (1992). Neurofibromin, a predominantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expressed during development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *195*, 216–226.
- Daston, M.M., Scrabble, H., Nordlund, M., Sturbaum, A.K., Nissen, L.M., and Ratner, N. (1992). The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron* *8*, 415–428.
- Daubas, P., Tajbakhsh, S., Hadchouel, J., Primig, M., and Buckingham, M. (2000). Myf5 is a novel early axonal marker in the mouse brain and is subjected to post-transcriptional regulation in neurons. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 319–331.
- Daubas, P., Crist, C.G., Bajard, L., Relaix, F., Pecnard, E., Rocancourt, D., and Buckingham, M. (2009). The regulatory mechanisms that underlie inappropriate transcription of the myogenic determination gene Myf5 in the central nervous system. *Dev. Biol.* *327*, 71–82.
- Dequéant, M.-L., and Pourquié, O. (2008). Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 370–382.
- Dequéant, M.-L., Glynn, E., Gaudenz, K., Wahl, M., Chen, J., Mushegian, A., and Pourquié, O. (2006). A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. *Science* *314*, 1595–1598.
- Dhouailly, D., Olivera-Martinez, I., Fliniaux, I., Missier, S., Viallet, J.P., and Thélu, J. (2004). Skin field formation: morphogenetic events. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 85–91.
- Diamond, M.E., von Heimendahl, M., Knutsen, P.M., Kleinfeld, D., and Ahissar, E. (2008). “Where” and “what” in the whisker sensorimotor system. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 601–612.
- Doddrell, R.D.S., Dun, X.-P., Moate, R.M., Jessen, K.R., Mirsky, R., and Parkinson, D.B. (2012). Regulation of Schwann cell differentiation and proliferation by the Pax-3 transcription factor. *Glia* *60*, 1269–1278.

Bibliografía

Dong, Z., Brennan, A., Liu, N., Yarden, Y., Lefkowitz, G., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (1995). Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* 15, 585–596.

Dore-Duffy, P. (2008). Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 14, 1581–1593.

Dore-Duffy, P., Katychev, A., Wang, X., and Van Buren, E. (2006). CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 613–624.

Doron-Mandel, E., Fainzilber, M., and Terenzio, M. (2015). Growth control mechanisms in neuronal regeneration. *FEBS Lett.* 589, 1669–1677.

Douarin, N.L., and Kalcheim, C. (1999). *The Neural Crest* (Cambridge University Press).

Driskell, R., Jahoda, C.A.B., Chuong, C.-M., Watt, F., and Horsley, V. (2014). Defining dermal adipose tissue. *Exp. Dermatol.* 23, 629–631.

Driskell, R.R., Giangreco, A., Jensen, K.B., Mulder, K.W., and Watt, F.M. (2009). Sox2-positive dermal papilla cells specify hair follicle type in mammalian epidermis. *Dev. Camb. Engl.* 136, 2815–2823.

Driskell, R.R., Clavel, C., Rendl, M., and Watt, F.M. (2011). Hair follicle dermal papilla cells at a glance. *J. Cell Sci.* 124, 1179–1182.

Driskell, R.R., Lichtenberger, B.M., Hoste, E., Kretzschmar, K., Simons, B.D., Charalambous, M., Ferron, S.R., Haurault, Y., Pavlovic, G., Ferguson-Smith, A.C., et al. (2013). Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* 504, 277–281.

Duband, J.-L. (2010). Diversity in the molecular and cellular strategies of epithelium-to-mesenchyme transitions: Insights from the neural crest. *Cell Adhes. Migr.* 4, 458–482.

Duncan, T., Lowe, A., Sidhu, K., Sachdev, P., Lewis, T., Lin, R.C.Y., Sytnyk, V., and Valenzuela, M. (2017). Replicable Expansion and Differentiation of Neural Precursors from Adult Canine Skin. *Stem Cell Rep.* 9, 557–570.

Duong, J., Mii, S., Uchugonova, A., Liu, F., Moossa, A.R., and Hoffman, R.M. (2012). Real-time confocal imaging of trafficking of nestin-expressing multipotent stem cells in mouse whiskers in long-term 3-D histoculture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 48, 301–305.

Duong, T.A., Bastuji-Garin, S., Valeyrie-Allanore, L., Sbidian, E., Ferkal, S., and Wolkenstein, P. (2011). Evolving pattern with age of cutaneous signs in neurofibromatosis type 1: a cross-sectional study of 728 patients. *Dermatol. Basel Switz.* 222, 269–273.

Dupin, E., and Le Douarin, N.M. (2003). Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene* 22, 3016–3023.

Dupin, E., Creuzet, S., and Le Douarin, N. (2006). The contribution of the neural crest to the vertebrate body. *Adv. Exp. Med. Biol.* 589, 96–119.

Dupin, E., Calloni, G., Real, C., Gonçalves-Trentin, A., and Le Douarin, N.M. (2007). Neural crest progenitors and stem cells. *C. R. Biol.* 330, 521–529.

Dyachuk, V., Furlan, A., Shahidi, M.K., Giovenco, M., Kaukua, N., Konstantinidou, C., Pachnis, V., Memic, F., Marklund, U., Müller, T., et al. (2014). Parasympathetic neurons originate from nerve-associated peripheral glial progenitors. *Science* 345, 82–87.

Dyce, P.W., Zhu, H., Craig, J., and Li, J. (2004). Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 651–658.

Eguizabal, C., Montserrat, N., Veiga, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2013). Dedifferentiation, transdifferentiation, and reprogramming: future directions in regenerative medicine. *Semin. Reprod. Med.* 31, 82–94.

- El-Helou, V., Beguin, P.C., Assimakopoulos, J., Clement, R., Gosselin, H., Brugada, R., Aumont, A., Biernaskie, J., Villeneuve, L., Leung, T.K., et al. (2008). The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *45*, 694–702.
- Ellis, P., Fagan, B.M., Magness, S.T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M., and Pevny, L. (2004). SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev. Neurosci.* *26*, 148–165.
- Ernfors, P. (2010a). Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp. Cell Res.* *316*, 1397–1407.
- Ernfors, P. (2010b). Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp. Cell Res.* *316*, 1397–1407.
- Espinosa-Medina, I., Outin, E., Picard, C.A., Chettouh, Z., Dymecki, S., Consalez, G.G., Coppola, E., and Brunet, J.-F. (2014). Neurodevelopment. Parasympathetic ganglia derive from Schwann cell precursors. *Science* *345*, 87–90.
- Etchevers, H.C., Vincent, C., Le Douarin, N.M., and Couly, G.F. (2001). The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 1059–1068.
- Etzaniz, U., Pérez-San Vicente, A., Gago-López, N., García-Dominguez, M., Iribar, H., Aduriz, A., Pérez-López, V., Burgoa, I., Irizar, H., Muñoz-Culla, M., et al. (2014). Neural-competent cells of adult human dermis belong to the Schwann lineage. *Stem Cell Rep.* *3*, 774–788.
- Evans, D.G.R., Baser, M.E., McGaughan, J., Sharif, S., Howard, E., and Moran, A. (2002). Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J. Med. Genet.* *39*, 311–314.
- Fantes, J., Ragge, N.K., Lynch, S.-A., McGill, N.I., Collin, J.R.O., Howard-Peebles, P.N., Hayward, C., Vivian, A.J., Williamson, K., van Heyningen, V., et al. (2003). Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat. Genet.* *33*, 461–463.
- Favaro, R., Valotta, M., Ferri, A.L.M., Latorre, E., Mariani, J., Giachino, C., Lancini, C., Tosetti, V., Ottolenghi, S., Taylor, V., et al. (2009). Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat. Neurosci.* *12*, 1248–1256.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *237*, 752–757.
- Ferguson, J.E., Kelley, R.W., and Patterson, C. (2005). Mechanisms of endothelial differentiation in embryonic vasculogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 2246–2254.
- Fernandes, K.J.L., McKenzie, I.A., Mill, P., Smith, K.M., Akhavan, M., Barnabé-Heider, F., Biernaskie, J., Junek, A., Kobayashi, N.R., Toma, J.G., et al. (2004). A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1082–1093.
- Fernandes, K.J.L., Kobayashi, N.R., Gallagher, C.J., Barnabé-Heider, F., Aumont, A., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2006). Analysis of the neurogenic potential of multipotent skin-derived precursors. *Exp. Neurol.* *201*, 32–48.
- Ferner, R.E. (2007a). Neurofibromatosis 1. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *15*, 131–138.
- Ferner, R.E. (2007b). Neurofibromatosis 1. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *15*, 131–138.
- Ferner, R.E., and Gutmann, D.H. (2002). International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer Res.* *62*, 1573–1577.
- Ferri, A.L.M., Cavallaro, M., Braida, D., Cristofano, A.D., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P.P., Sala, M., DeBiasi, S., et al. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* *131*, 3805–3819.

Bibliografía

- Festa, E., Fretz, J., Berry, R., Schmidt, B., Rodeheffer, M., Horowitz, M., and Horsley, V. (2011). Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell* 146, 761–771.
- Finzsch, M., Schreiner, S., Kichko, T., Reeh, P., Tamm, E.R., Bösl, M.R., Meijer, D., and Wegner, M. (2010). Sox10 is required for Schwann cell identity and progression beyond the immature Schwann cell stage. *J. Cell Biol.* 189, 701–712.
- Fisher, T.R. (1976). Surgical disorders of the peripheral nerves, 2nd ed. *Injury* 8, 77–78.
- Fliniaux, I., Viallet, J.P., and Dhouailly, D. (2004). Signaling dynamics of feather tract formation from the chick somatopleure. *Dev. Camb. Engl.* 131, 3955–3966.
- Fontana, X., Hristova, M., Da Costa, C., Patodia, S., Thei, L., Makwana, M., Spencer-Dene, B., Latouche, M., Mirsky, R., Jessen, K.R., et al. (2012). c-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling. *J. Cell Biol.* 198, 127–141.
- Forni, M.F., Trombetta-Lima, M., and Sogayar, M.C. (2012). Stem cells in embryonic skin development. *Biol. Res.* 45, 215–222.
- Francetic, T., and Li, Q. (2011). Skeletal myogenesis and Myf5 activation. *Transcription* 2, 109–114.
- Friedman, J.M. (1999). Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *Am. J. Med. Genet.* 89, 1–6.
- Friedrich, R.E., Holstein, A.-F., Middendorff, R., and Davidoff, M.S. (2012). Vascular wall cells contribute to tumorigenesis in cutaneous neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. A comparative histological, ultrastructural and immunohistochemical study. *Anticancer Res.* 32, 2139–2158.
- Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature* 445, 834–842.
- Fujiwara, H., Ferreira, M., Donati, G., Marciano, D.K., Linton, J.M., Sato, Y., Hartner, A., Sekiguchi, K., Reichardt, L.F., and Watt, F.M. (2011). The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell* 144, 577–589.
- Fujiwara, S., Hoshikawa, S., Ueno, T., Hirata, M., Saito, T., Ikeda, T., Kawaguchi, H., Nakamura, K., Tanaka, S., and Ogata, T. (2014). SOX10 transactivates S100B to suppress Schwann cell proliferation and to promote myelination. *PLoS One* 9, e115400.
- Gago, N., Pérez-López, V., Sanz-Jaka, J.P., Cormenzana, P., Eizaguirre, I., Bernad, A., and Izeta, A. (2009). Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 1164–1172.
- Gao, J., Zhang, J.-Y., Li, Y.-H., and Ren, F. (2015). Decreased expression of SOX9 indicates a better prognosis and inhibits the growth of glioma cells by inducing cell cycle arrest. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 10130–10138.
- García-Castro, M.I., Marcelle, C., and Bronner-Fraser, M. (2002). Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* 297, 848–851.
- García-Linares, C., Fernández-Rodríguez, J., Terribas, E., Mercadé, J., Pros, E., Benito, L., Benavente, Y., Capellà, G., Ravella, A., Blanco, I., et al. (2011). Dissecting loss of heterozygosity (LOH) in neurofibromatosis type 1-associated neurofibromas: Importance of copy neutral LOH. *Hum. Mutat.* 32, 78–90.
- García-Parra, P., Cavaliere, F., Maroto, M., Bilbao, L., Obieta, I., López de Munain, A., Álava, J.I., and Izeta, A. (2012). Modeling neural differentiation on micropatterned substrates coated with neural matrix components. *Front. Cell. Neurosci.* 6.
- García-Parra, P., Maroto, M., Cavaliere, F., Naldaiz-Gastesi, N., Álava, J.I., García, A.G., López de Munain, A., and Izeta, A. (2013). A neural extracellular matrix-based method for in vitro hippocampal neuron culture and dopaminergic differentiation of neural stem cells. *BMC Neurosci.* 14, 48.
- Garratt, A.N., Voiculescu, O., Topilko, P., Charnay, P., and Birchmeier, C. (2000). A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the schwann cell precursor pool. *J. Cell Biol.* 148, 1035–1046.

- Gawriluk, T.R., Simkin, J., Thompson, K.L., Biswas, S.K., Clare-Salzler, Z., Kimani, J.M., Kiama, S.G., Smith, J.J., Ezenwa, V.O., and Seifert, A.W. (2016). Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals. *Nat. Commun.* 7, 11164.
- Gericota, B., Anderson, J.S., Mitchell, G., Borjesson, D.L., Sturges, B.K., Nolta, J.A., and Sieber-Blum, M. (2014). Canine epidermal neural crest stem cells: characterization and potential as therapy candidate for a large animal model of spinal cord injury. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 334–345.
- Gilbert, S.F. (2000). *Regeneration*.
- Gingras, M., Champigny, M.-F., and Berthod, F. (2007). Differentiation of human adult skin-derived neuronal precursors into mature neurons. *J. Cell. Physiol.* 210, 498–506.
- Golding, J.P., and Cohen, J. (1997). Border Controls at the Mammalian Spinal Cord: Late-Surviving Neural Crest Boundary Cap Cells at Dorsal Root Entry Sites May Regulate Sensory Afferent Ingrowth and Entry Zone Morphogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 9, 381–396.
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551.
- Gomez-Sanchez, J.A., Carty, L., Iruarrizaga-Lejarreta, M., Palomo-Irigoyen, M., Varela-Rey, M., Griffith, M., Hantke, J., Macias-Camara, N., Azkargorta, M., Aurrekoetxea, I., et al. (2015). Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. *J. Cell Biol.* 210, 153–168.
- Gomez-Sanchez, J.A., Pilch, K.S., Lans, M. van der, Fazal, S.V., Benito, C., Wagstaff, L.J., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2017). After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination. *J. Neurosci.* 37, 9086–9099.
- Gorio, A., Torrente, Y., Madaschi, L., Di Stefano, A.B., Pisati, F., Marchesi, C., Belicchi, M., Di Giulio, A.M., and Bresolin, N. (2004). Fate of autologous dermal stem cells transplanted into the spinal cord after traumatic injury (TSCI). *Neuroscience* 125, 179–189.
- Graham, A., Begbie, J., and McGonnell, I. (2004). Significance of the cranial neural crest. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 229, 5–13.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., and Pevny, L. (2003). SOX2 Functions to Maintain Neural Progenitor Identity. *Neuron* 39, 749–765.
- Greenwood, J.E. (2010). Function of the panniculus carnosus – a hypothesis. *Vet. Rec.* 167, 760–760.
- Gresset, A., Couplier, F., Gerschenfeld, G., Jourdon, A., Matesic, G., Richard, L., Vallat, J.-M., Charnay, P., and Topilko, P. (2015). Boundary Caps Give Rise to Neurogenic Stem Cells and Terminal Glia in the Skin. *Stem Cell Rep.* 5, 278–290.
- Grisanti, L., Clavel, C., Cai, X., Rezza, A., Tsai, S.-Y., Sennett, R., Mumau, M., Cai, C.-L., and Rendl, M. (2013). Tbx18 targets dermal condensates for labeling, isolation, and gene ablation during embryonic hair follicle formation. *J. Invest. Dermatol.* 133, 344–353.
- Grochmal, J., Dhaliwal, S., Stys, P.K., van Minnen, J., and Midha, R. (2014). Skin-derived precursor schwann cell myelination capacity in focal tibial demyelination. *Muscle Nerve* 50, 262–272.
- Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P.G., and Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 81, 531–535.
- Gros, J., Scaal, M., and Marcelle, C. (2004). A two-step mechanism for myotome formation in chick. *Dev. Cell* 6, 875–882.
- Guha, A., Lau, N., Huvar, I., Gutmann, D., Provias, J., Pawson, T., and Boss, G. (1996). Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors. *Oncogene* 12, 507–513.

Bibliografía

- Gustafsson, M.K., Pan, H., Pinney, D.F., Liu, Y., Lewandowski, A., Epstein, D.J., and Emerson, C.P. (2002). Myf5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. *Genes Dev.* *16*, 114–126.
- Gutmann, D.H., Wood, D.L., and Collins, F.S. (1991). Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 9658–9662.
- Hadchouel, J., Carvajal, J.J., Daubas, P., Bajard, L., Chang, T., Rocancourt, D., Cox, D., Summerbell, D., Tajbakhsh, S., Rigby, P.W.J., et al. (2003). Analysis of a key regulatory region upstream of the Myf5 gene reveals multiple phases of myogenesis, orchestrated at each site by a combination of elements dispersed throughout the locus. *Development* *130*, 3415–3426.
- Haeberle, H., and Lumpkin, E.A. (2008). Merkel Cells in Somatosensation. *Chemosens. Percept.* *1*, 110–118.
- Hagedorn, L., Suter, U., and Sommer, L. (1999). P0 and PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF-beta family factors. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 3781–3794.
- Hagey, D.W., and Muhr, J. (2014). Sox2 acts in a dose-dependent fashion to regulate proliferation of cortical progenitors. *Cell Rep.* *9*, 1908–1920.
- Hagstrom, S.A., Pauer, G.J.T., Reid, J., Simpson, E., Crowe, S., Maumenee, I.H., and Traboulsi, E.I. (2005). SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. *Am. J. Med. Genet. A.* *138A*, 95–98.
- Hall, B.K. (2000). The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol. Dev.* *2*, 3–5.
- Han, M., Yang, X., Jangwoo, L., Allan, C.H., and Muneoka, K. (2008). Development and Regeneration of the Neonatal Digit Tip in Mice. *Dev. Biol.* *315*, 125–135.
- Hauser, S., Widera, D., Qunneis, F., Müller, J., Zander, C., Greiner, J., Strauss, C., Lüningschrör, P., Heimann, P., Schwarze, H., et al. (2012). Isolation of novel multipotent neural crest-derived stem cells from adult human inferior turbinate. *Stem Cells Dev.* *21*, 742–756.
- Hendrix, S., Picker, B., Liezmann, C., and Peters, E.M.J. (2008). Skin and hair follicle innervation in experimental models: a guide for the exact and reproducible evaluation of neuronal plasticity. *Exp. Dermatol.* *17*, 214–227.
- Higashida, T., Jitsuki, S., Kubo, A., Mitsushima, D., Kamiya, Y., and Kanno, H. (2010). Skin-derived precursors differentiating into dopaminergic neuronal cells in the brains of Parkinson disease model rats. *J. Neurosurg.* *113*, 648–655.
- Hirata, K., and Kawabuchi, M. (2002). Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration. *Microsc. Res. Tech.* *57*, 541–547.
- Hisato Kondoh y Robin Lovell-Badge (2015). Sox2.
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* *209*, 1167–1181.
- Hoffman, R.M. (2007). The potential of nestin-expressing hair follicle stem cells in regenerative medicine. *Expert Opin. Biol. Ther.* *7*, 289–291.
- Hoffman, R.M. (2016). Introduction to Hair-Follicle-Associated Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1453*, 1–5.
- Holtkamp, N., Reuss, D.E., Atallah, I., Kuban, R.-J., Hartmann, C., Mautner, V.-F., Frahm, S., Friedrich, R.E., Algermissen, B., Pham, V.-A., et al. (2004). Subclassification of nerve sheath tumors by gene expression profiling. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *14*, 258–264.
- Houzelstein, D., Chéraud, Y., Auda-Boucher, G., Fontaine-Pérus, J., and Robert, B. (2000). The expression of the homeobox gene Msx1 reveals two populations of dermal progenitor cells originating from the somites. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 2155–2164.

- Hu, Y.F., Gourab, K., Wells, C., Clewes, O., Schmit, B.D., and Sieber-Blum, M. (2010). Epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC)--mediated recovery of sensory function in a mouse model of spinal cord injury. *Stem Cell Rev.* 6, 186–198.
- Huggenberger, R., and Detmar, M. (2011). The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* 15, 24–32.
- Hung, H.A., Sun, G., Keles, S., and Svaren, J. (2015). Dynamic regulation of Schwann cell enhancers after peripheral nerve injury. *J. Biol. Chem.* 290, 6937–6950.
- Hunt, D.P., Sajic, M., Phillips, H., Henderson, D., Compston, A., Smith, K., and Chandran, S. (2010). Origins of Gliogenic Stem Cell Populations Within Adult Skin and Bone Marrow. *Stem Cells Dev.* 19, 1055–1065.
- Hunt, D.P.J., Jahoda, C., and Chandran, S. (2009). Multipotent skin-derived precursors: from biology to clinical translation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 522–530.
- Hutchinson, P.E., and Thompson, J.R. (1997). The cross-sectional size and shape of human terminal scalp hair. *Br. J. Dermatol.* 136, 159–165.
- Hutson, M.R., and Kirby, M.L. (2003). Neural crest and cardiovascular development: a 20-year perspective. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 69, 2–13.
- Hutton, S.R., and Pevny, L.H. (2011a). SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon. *Dev. Biol.* 352, 40–47.
- Hutton, S.R., and Pevny, L.H. (2011b). SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon. *Dev. Biol.* 352, 40–47.
- IGGO, A. (1984). Cutaneous Receptors and their Sensory Functions. *J. Hand Surg.* 9, 7–10.
- Ikeya, M., and Takada, S. (1998). Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. *Dev. Camb. Engl.* 125, 4969–4976.
- Imanishi, N., Kishi, K., Chang, H., Nakajima, H., and Aiso, S. (2008). Three-dimensional venous anatomy of the dermis observed using stereography. *J. Anat.* 212, 669–673.
- Ishii, Y., Rex, M., Scotting, P.J., and Yasugi, S. (1998). Region-specific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 213, 464–475.
- Ito, M., Liu, Y., Yang, Z., Nguyen, J., Liang, F., Morris, R.J., and Cotsarelis, G. (2005). Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat. Med.* 11, 1351–1354.
- Ito, Y., Hamazaki, T.S., Ohnuma, K., Tamaki, K., Asashima, M., and Okochi, H. (2007). Isolation of Murine Hair-Inducing Cells Using the Cell Surface Marker Prominin-1/CD133. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1052–1060.
- Izumi, K., Hirao, Y., Hopp, L., and Oyasu, R. (1981). In vitro induction of ornithine decarboxylase in urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Res.* 41, 405–409.
- Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567–582.
- Janebodin, K., Horst, O.V., Ieronimakis, N., Balasundaram, G., Reesukumal, K., Pratumvinit, B., and Reyes, M. (2011). Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS One* 6, e27526.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2002). Signals that determine Schwann cell identity. *J. Anat.* 200, 367–376.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 671–682.

Bibliografía

- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2008a). Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia* 56, 1552–1565.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2008b). Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia* 56, 1552–1565.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., and Lloyd, A.C. (2015a). Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020487.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., and Arthur-Farraj, P. (2015b). The Role of Cell Plasticity in Tissue Repair: Adaptive Cellular Reprogramming. *Dev. Cell* 34, 613–620.
- Jinno, H., Morozova, O., Jones, K.L., Biernaskie, J.A., Paris, M., Hosokawa, R., Rudnicki, M.A., Chai, Y., Rossi, F., Marra, M.A., et al. (2010). Convergent genesis of an adult neural crest-like dermal stem cell from distinct developmental origins. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 2027–2040.
- Joannides, A., Gaughwin, P., Schwiening, C., Majed, H., Sterling, J., Compston, A., and Chandran, S. (2004). Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *Lancet Lond. Engl.* 364, 172–178.
- Joannides, A.J., Fiore-Hériché, C., Battersby, A.A., Athauda-Arachchi, P., Bouhon, I.A., Williams, L., Westmore, K., Kemp, P.J., Compston, A., Allen, N.D., et al. (2007). A Scaleable and Defined System for Generating Neural Stem Cells from Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 25, 731–737.
- Johannessen, C.M., Reczek, E.E., James, M.F., Brems, H., Legius, E., and Cichowski, K. (2005). The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8573–8578.
- John I. Hubbard, H. deF W., and Henry deF Webster, J.I.H. (1974). *The Peripheral Nervous System* (Springer US).
- Johnston, A.P.W., Naska, S., Jones, K., Jinno, H., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2013). Sox2-mediated regulation of adult neural crest precursors and skin repair. *Stem Cell Rep.* 1, 38–45.
- Johnston, A.P.W., Yuzwa, S.A., Carr, M.J., Mahmud, N., Storer, M.A., Krause, M.P., Jones, K., Paul, S., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2016). Dedifferentiated Schwann Cell Precursors Secreting Paracrine Factors Are Required for Regeneration of the Mammalian Digit Tip. *Cell Stem Cell*.
- Jopling, C., Boue, S., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 79–89.
- Joseph, N.M., Mukoyama, Y., Mosher, J.T., Jaegle, M., Crone, S.A., Dormand, E.-L., Lee, K.-F., Meijer, D., Anderson, D.J., and Morrison, S.J. (2004a). Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* 131, 5599–5612.
- Joseph, N.M., Mukoyama, Y.-S., Mosher, J.T., Jaegle, M., Crone, S.A., Dormand, E.-L., Lee, K.-F., Meijer, D., Anderson, D.J., and Morrison, S.J. (2004b). Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Dev. Camb. Engl.* 131, 5599–5612.
- Joseph, N.M., Mosher, J.T., Buchstaller, J., Snider, P., McKeever, P.E., Lim, M., Conway, S.J., Parada, L.F., Zhu, Y., and Morrison, S.J. (2008). The loss of Nf1 transiently promotes self-renewal but not tumorigenesis by neural crest stem cells. *Cancer Cell* 13, 129–140.
- Jouhilahti, E.-M., Peltonen, S., Callens, T., Jokinen, E., Heape, A.M., Messiaen, L., and Peltonen, J. (2011). The Development of Cutaneous Neurofibromas. *Am. J. Pathol.* 178, 500–505.
- Kahane, N., Cinnamon, Y., and Kalcheim, C. (2002). The roles of cell migration and myofiber intercalation in patterning formation of the postmitotic myotome. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2675–2687.

- Kaiser, S., Schirmacher, P., Philipp, A., Protschka, M., Moll, I., Nicol, K., and Blessing, M. (1998). Induction of bone morphogenetic protein-6 in skin wounds. Delayed reepithelialization and scar formation in BMP-6 overexpressing transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* *111*, 1145–1152.
- Kang, H.K., Min, S.-K., Jung, S.Y., Jung, K., Jang, D.H., Kim, O.B., Chun, G.-S., Lee, Z.H., and Min, B.-M. (2011). The potential of mouse skin-derived precursors to differentiate into mesenchymal and neural lineages and their application to osteogenic induction in vivo. *Int. J. Mol. Med.* *28*, 1001–1011.
- Karamchandani, J.R., Nielsen, T.O., van de Rijn, M., and West, R.B. (2012). Sox10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* *20*, 445–450.
- Karvonen, S.L., Kallioinen, M., Ylä-Outinen, H., Pöyhönen, M., Oikarinen, A., and Peltonen, J. (2000). Occult neurofibroma and increased S100 protein in the skin of patients with neurofibromatosis type 1: new insight to the etiopathomechanism of neurofibromas. *Arch. Dermatol.* *136*, 1207–1209.
- Kaucka, M., Ivashkin, E., Gyllborg, D., Zikmund, T., Tesarova, M., Kaiser, J., Xie, M., Petersen, J., Pachnis, V., Nicolis, S.K., et al. (2016). Analysis of neural crest-derived clones reveals novel aspects of facial development. *Sci. Adv.* *2*, e1600060.
- Kaukua, N., Shahidi, M.K., Konstantinidou, C., Dyachuk, V., Kaucka, M., Furlan, A., An, Z., Wang, L., Hultman, I., Åhrlund-Richter, L., et al. (2014). Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature* *513*, 551–554.
- Kaul, A., Toonen, J.A., Cimino, P.J., Gianino, S.M., and Gutmann, D.H. (2015). Akt- or MEK-mediated mTOR inhibition suppresses Nf1 optic glioma growth. *Neuro-Oncol.* *17*, 843–853.
- Kempfle, J.S., Turban, J.L., and Edge, A.S.B. (2016). Sox2 in the differentiation of cochlear progenitor cells. *Sci. Rep.* *6*, 23293.
- Keymeulen, A.V., Mascre, G., Youseff, K.K., Harel, I., Michaux, C., Geest, N.D., Szpalski, C., Achouri, Y., Bloch, W., Hassan, B.A., et al. (2009). Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J. Cell Biol.* *187*, 91–100.
- Khuong, H.T., Kumar, R., Senjaya, F., Grochmal, J., Ivanovic, A., Shakhbazov, A., Forden, J., Webb, A., Biernaskie, J., and Midha, R. (2014). Skin derived precursor Schwann cells improve behavioral recovery for acute and delayed nerve repair. *Exp. Neurol.* *254*, 168–179.
- Kiefer, J.C., and Hauschka, S.D. (2001). Myf-5 Is Transiently Expressed in Nonmuscle Mesoderm and Exhibits Dynamic Regional Changes within the Presegmented Mesoderm and Somites I–IV. *Dev. Biol.* *232*, 77–90.
- Kiernan, A.E., Pelling, A.L., Leung, K.K.H., Tang, A.S.P., Bell, D.M., Tease, C., Lovell-Badge, R., Steel, K.P., and Cheah, K.S.E. (2005). Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* *434*, 1031–1035.
- Kikuchi, M., Hayashi, R., Kanakubo, S., Ogasawara, A., Yamato, M., Osumi, N., and Nishida, K. (2011). Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *16*, 273–281.
- Kim, H.A., Mindos, T., and Parkinson, D.B. (2013). Plastic fantastic: Schwann cells and repair of the peripheral nervous system. *Stem Cells Transl. Med.* *2*, 553–557.
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., and Orkin, S.H. (2008). An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Cell* *132*, 1049–1061.
- Kirby, M.L. (1987). Cardiac morphogenesis--recent research advances. *Pediatr. Res.* *21*, 219–224.
- Kluwe, L., Friedrich, R.E., and Mautner, V.F. (1999a). Allelic loss of the NF1 gene in NF1-associated plexiform neurofibromas. *Cancer Genet. Cytogenet.* *113*, 65–69.
- Kluwe, L., Friedrich, R., and Mautner, V.F. (1999b). Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. *Genes. Chromosomes Cancer* *24*, 283–285.

Bibliografía

- Kopan, R., Nye, J.S., and Weintraub, H. (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Dev. Camb. Engl.* 120, 2385–2396.
- Kopp, J.L., Ormsbee, B.D., Desler, M., and Rizzino, A. (2008). Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 903–911.
- Korf, B.R. (1999). Plexiform neurofibromas. *Am. J. Med. Genet.* 89, 31–37.
- Koseki, H., Wallin, J., Wilting, J., Mizutani, Y., Kispert, A., Ebensperger, C., Herrmann, B.G., Christ, B., and Balling, R. (1993). A role for Pax-1 as a mediator of notochordal signals during the dorsoventral specification of vertebrae. *Dev. Camb. Engl.* 119, 649–660.
- Koster, M.I., and Roop, D.R. (2007). Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 93–113.
- Krafts, K.P. (2010). Tissue repair. *Organogenesis* 6, 225–233.
- Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H.H., and Tanaka, E.M. (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460, 60–65.
- Krause, K., and Foitzik, K. (2006). Biology of the hair follicle: the basics. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 25, 2–10.
- Krause, M.P., Dworski, S., Feinberg, K., Jones, K., Johnston, A.P.W., Paul, S., Paris, M., Peles, E., Bagli, D., Forrest, C.R., et al. (2014). Direct genesis of functional rodent and human schwann cells from skin mesenchymal precursors. *Stem Cell Rep.* 3, 85–100.
- Kretschmar, K., and Watt, F.M. (2012). Lineage tracing. *Cell* 148, 33–45.
- Kruger, G.M., Mosher, J.T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T., and Morrison, S.J. (2002). Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 35, 657–669.
- Kubo, A., Yoshida, T., Kobayashi, N., Yokoyama, T., Mimura, T., Nishiguchi, T., Higashida, T., Yamamoto, I., and Kanno, H. (2009). Efficient generation of dopamine neuron-like cells from skin-derived precursors with a synthetic peptide derived from von Hippel-Lindau protein. *Stem Cells Dev.* 18, 1523–1532.
- Kumar, A., and Brookes, J.P. (2012). Nerve dependence in tissue, organ, and appendage regeneration. *Trends Neurosci.* 35, 691–699.
- Kumar, A., Godwin, J.W., Gates, P.B., Garza-Garcia, A.A., and Brookes, J.P. (2007). Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* 318, 772–777.
- Kumar, R., Sinha, S., Hagner, A., Stykel, M., Raharjo, E., Singh, K.K., Midha, R., and Biernaskie, J. (2016). Adult skin-derived precursor Schwann cells exhibit superior myelination and regeneration supportive properties compared to chronically denervated nerve-derived Schwann cells. *Exp. Neurol.* 278, 127–142.
- LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Dev. Camb. Engl.* 125, 2403–2414.
- Labosky, P.A., and Kaestner, K.H. (1998). The winged helix transcription factor Hfh2 is expressed in neural crest and spinal cord during mouse development. *Mech. Dev.* 76, 185–190.
- Laga, A.C., Lai, C.-Y., Zhan, Q., Huang, S.J., Velazquez, E.F., Yang, Q., Hsu, M.-Y., and Murphy, G.F. (2010). Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: relevance to melanocyte and merkel cell biology. *Am. J. Pathol.* 176, 903–913.
- Lakkis, M.M., and Tennekoon, G.I. (2000). Neurofibromatosis type 1. I. General overview. *J. Neurosci. Res.* 62, 755–763.

- Lako, M., Armstrong, L., Cairns, P.M., Harris, S., Hole, N., and Jahoda, C.A.B. (2002). Hair follicle dermal cells repopulate the mouse haematopoietic system. *J. Cell Sci.* 115, 3967–3974.
- Langerhans, P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med.* 44, 325–337.
- Langhofer, M., Hopkinson, S.B., and Jones, J.C. (1993). The matrix secreted by 804G cells contains laminin-related components that participate in hemidesmosome assembly in vitro. *J. Cell Sci.* 105, 753–764.
- Langworthy, O.R. (1925). A morphological study of the panniculus carnosus and its genetical relationship to the pectoral musculature in rodents. *Am. J. Anat.* 35, 283–302.
- Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessaris, N., Richardson, W., Potocnik, A., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. (2011). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J. Clin. Invest.* 121, 3412–3424.
- Lavoie, J.-F., Biernaskie, J.A., Chen, Y., Bagli, D., Alman, B., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2009). Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem Cells Dev.* 18, 893–906.
- Laycock-van Spyk, S., Thomas, N., Cooper, D.N., and Upadhyaya, M. (2011). Neurofibromatosis type 1-associated tumours: their somatic mutational spectrum and pathogenesis. *Hum. Genomics* 5, 623–690.
- Le, L.Q., and Parada, L.F. (2007). Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene* 26, 4609–4616.
- Le, L.Q., Shipman, T., Burns, D.K., and Parada, L.F. (2009). Cell of origin and microenvironment contribution for NF1-associated dermal neurofibromas. *Cell Stem Cell* 4, 453–463.
- Le, L.Q., Liu, C., Shipman, T., Chen, Z., Suter, U., and Parada, L.F. (2011). Susceptible stages in Schwann cells for NF1-associated plexiform neurofibroma development. *Cancer Res.* 71, 4686–4695.
- Le, N., Nagarajan, R., Wang, J.Y.T., Araki, T., Schmidt, R.E., and Milbrandt, J. (2005). Analysis of congenital hypomyelinating *Egr2*^{Lo/Lo} nerves identifies *Sox2* as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2596–2601.
- Le Douarin, N. (1973). A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. *Dev. Biol.* 30, 217–222.
- Le Douarin, N.M. (1980). The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimaeras. *Nature* 286, 663–669.
- Le Douarin, N.M., Creuzet, S., Couly, G., and Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Dev. Camb. Engl.* 131, 4637–4650.
- Le Lièvre, C.S., and Le Douarin, N.M. (1975a). Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 34, 125–154.
- Le Lièvre, C.S., and Le Douarin, N.M. (1975b). Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 34, 125–154.
- Lechner, S.G., and Lewin, G.R. (2013a). Hairy sensation. *Physiol. Bethesda Md* 28, 142–150.
- Lechner, S.G., and Lewin, G.R. (2013b). Hairy Sensation. *Physiology* 28, 142–150.
- LeClair, E.E., Bonfiglio, L., and Tuan, R.S. (1999). Expression of the paired-box genes *Pax-1* and *Pax-9* in limb skeleton development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 214, 101–115.
- Legius, E., Marchuk, D.A., Collins, F.S., and Glover, T.W. (1993). Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis. *Nat. Genet.* 3, 122–126.
- Lehoczky, J.A., Robert, B., and Tabin, C.J. (2011). Mouse digit tip regeneration is mediated by fate-restricted progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20609–20614.

Bibliografía

- Leone, D.P., Genoud, S. téphane, Atanasoski, S., Grausenburger, R., Berger, P., Metzger, D., Macklin, W.B., Chambon, P., and Suter, U. (2003). Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 22, 430–440.
- Lermen, D., Gorjup, E., Dyce, P.W., von Briesen, H., and Müller, P. (2010). Neuro-muscular differentiation of adult porcine skin derived stem cell-like cells. *PLoS One* 5, e8968.
- Lesko, M.H., Driskell, R.R., Kretzschmar, K., Goldie, S.J., and Watt, F.M. (2013). Sox2 modulates the function of two distinct cell lineages in mouse skin. *Dev. Biol.* 382, 15–26.
- Lévy, P., Vidaud, D., Leroy, K., Laurendeau, I., Wechsler, J., Bolasco, G., Parfait, B., Wolkenstein, P., Vidaud, M., and Bièche, I. (2004). Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR. *Mol. Cancer* 3, 20.
- Li, L., and Ginty, D.D. (2014). The structure and organization of lanceolate mechanosensory complexes at mouse hair follicles. *eLife* 3, e01901.
- Li, H.-Y., Say, E.H.M., and Zhou, X.-F. (2007). Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 2053–2065.
- Li, L., Mignone, J., Yang, M., Matic, M., Penman, S., Enikolopov, G., and Hoffman, R.M. (2003). Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9958–9961.
- Li, L., Rutlin, M., Abaira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., et al. (2011). The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147, 1615–1627.
- Li, R., Sliwkowski, M.X., Lo, J., and Mather, J.P. (1996). Establishment of Schwann cell lines from normal adult and embryonic rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci. Methods* 67, 57–69.
- Li, Y., Bollag, G., Clark, R., Stevens, J., Conroy, L., Fults, D., Ward, K., Friedman, E., Samowitz, W., and Robertson, M. (1992). Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors. *Cell* 69, 275–281.
- Linher, K., Dyce, P., and Li, J. (2009). Primordial germ cell-like cells differentiated in vitro from skin-derived stem cells. *PLoS One* 4, e8263.
- Liu, F., Uchugonova, A., Kimura, H., Zhang, C., Zhao, M., Zhang, L., Koenig, K., Duong, J., Aki, R., Saito, N., et al. (2011). The bulge area is the major hair follicle source of nestin-expressing pluripotent stem cells which can repair the spinal cord compared to the dermal papilla. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 830–839.
- Liu, S., Zhang, H., and Duan, E. (2013). Epidermal Development in Mammals: Key Regulators, Signals from Beneath, and Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10869–10895.
- Liu, Z., Jin, Y.-Q., Chen, L., Wang, Y., Yang, X., Cheng, J., Wu, W., Qi, Z., and Shen, Z. (2015). Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLoS One* 10, e0123278.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lu, C., and Fuchs, E. (2014). Sweat Gland Progenitors in Development, Homeostasis, and Wound Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4.
- Lyons, D.A., Pogoda, H.-M., Voas, M.G., Woods, I.G., Diamond, B., Nix, R., Arana, N., Jacobs, J., and Talbot, W.S. (2005). *erbb3* and *erbb2* are essential for schwann cell migration and myelination in zebrafish. *Curr. Biol. CB* 15, 513–524.
- Maertens, O., Brems, H., Vandesompele, J., De Raedt, T., Heyns, I., Rosenbaum, T., De Schepper, S., De Paepe, A., Mortier, G., Janssens, S., et al. (2006). Comprehensive NF1 screening on cultured Schwann cells from neurofibromas. *Hum. Mutat.* 27, 1030–1040.
- Maklad, A., Conway, M., Hodges, C., and Hansen, L.A. (2010). Development of innervation to maxillary whiskers in mice. *Anat. Rec. Hoboken NJ* 293, 1553–1567.

- Maksimovic, S., Nakatani, M., Baba, Y., Nelson, A.M., Marshall, K.L., Wellnitz, S.A., Firozi, P., Woo, S.-H., Ranade, S., Patapoutian, A., et al. (2014). Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature* 509, 617–621.
- Malissen, B., Tamoutounour, S., and Henri, S. (2014). The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 417.
- Malki, S., Bibeau, F., Notarnicola, C., Roques, S., Berta, P., Poulat, F., and Boizet-Bonhoure, B. (2007). Expression and biological role of the prostaglandin D synthase/SOX9 pathway in human ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 255, 182–193.
- Marchant, L., Linker, C., Ruiz, P., Guerrero, N., and Mayor, R. (1998). The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Dev. Biol.* 198, 319–329.
- Maricich, S.M., Wellnitz, S.A., Nelson, A.M., Lesniak, D.R., Gerling, G.J., Lumpkin, E.A., and Zoghbi, H.Y. (2009). Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science* 324, 1580–1582.
- Maro, G.S., Vermeren, M., Voiculescu, O., Melton, L., Cohen, J., Charnay, P., and Topilko, P. (2004). Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat. Neurosci.* 7, 930–938.
- Martin, J.R., and Webster, H.D. (1973). Mitotic Schwann cells in developing nerve: their changes in shape, fine structure, and axon relationships. *Dev. Biol.* 32, 417–431.
- Martínez, M., Sorzano, C.O.S., Pascual-Montano, A., and Carazo, J.M. (2017). Gene signature associated with benign neurofibroma transformation to malignant peripheral nerve sheath tumors. *PLOS ONE* 12, e0178316.
- Martini, R., Fischer, S., López-Vales, R., and David, S. (2008). Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia* 56, 1566–1577.
- Matheny, R.W., Riddle-Kottke, M.A., Leandry, L.A., Lynch, C.M., Abdalla, M.N., Geddis, A.V., Piper, D.R., and Zhao, J.J. (2015). Role of phosphoinositide 3-OH kinase p110 β in skeletal myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 35, 1182–1196.
- Matheu, A., Collado, M., Wise, C., Manterola, L., Cekaite, L., Tye, A.J., Canamero, M., Bujanda, L., Schedl, A., Cheah, K.S.E., et al. (2012). Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer Res.* 72, 1301–1315.
- Matsuoka, T., Ahlberg, P.E., Kessar, N., Iannarelli, P., Dennehy, U., Richardson, W.D., McMahon, A.P., and Koentges, G. (2005). Neural crest origins of the neck and shoulder. *Nature* 436, 347–355.
- Mauger, A. (1972). [The role of somitic mesoderm in the development of dorsal plumage in chick embryos. II. Regionalization of the plumage-forming mesoderm]. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 28, 343–366.
- May, Z., Kumar, R., Führmann, T., Tam, R., Vulic, K., Forero, J., Lucas-Osma, A.M., Fenrich, K., Assinck, P., Lee, M.J., et al. (2017). Adult skin-derived precursor Schwann cell grafts form growths in the injured spinal cord of Fischer rats. *Biomed. Mater. Bristol Engl.*
- Mayes, D.A., Rizvi, T.A., Cancelas, J.A., Kolasinski, N.T., Ciruolo, G.M., Stemmer-Rachamimov, A.O., and Ratner, N. (2011). Perinatal or Adult Nf1 Inactivation Using Tamoxifen-Inducible PtpCre Each Cause Neurofibroma Formation. *Cancer Res.* 71, 4675–4685.
- McKenzie, I.A., Biernaskie, J., Toma, J.G., Midha, R., and Miller, F.D. (2006). Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 6651–6660.
- Meier, C., Parmantier, E., Brennan, A., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (1999). Developing Schwann Cells Acquire the Ability to Survive without Axons by Establishing an Autocrine Circuit Involving Insulin-Like Growth Factor, Neurotrophin-3, and Platelet-Derived Growth Factor-BB. *J. Neurosci.* 19, 3847–3859.
- Merrell, A.J., and Stanger, B.Z. (2016). Adult cell plasticity *in vivo*: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, nrm.2016.24.

Bibliografía

Mignone, J.L., Roig-Lopez, J.L., Fedtsova, N., Schones, D.E., Manganas, L.N., Maletic-Savatic, M., Keyes, W.M., Mills, A.A., Gleiberman, A., Zhang, M.Q., et al. (2007). Neural potential of a stem cell population in the hair follicle. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 2161–2170.

Mii, S., Duong, J., Tome, Y., Uchugonova, A., Liu, F., Amoh, Y., Saito, N., Katsuoka, K., and Hoffman, R.M. (2013). The role of hair follicle nestin-expressing stem cells during whisker sensory-nerve growth in long-term 3D culture. *J. Cell. Biochem.* 114, 1674–1684.

Milet, C., and Monsoro-Burq, A.H. (2012). Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Dev. Biol.* 366, 22–33.

Miller, S.J., Rangwala, F., Williams, J., Ackerman, P., Kong, S., Jegga, A.G., Kaiser, S., Aronow, B.J., Frahm, S., Kluwe, L., et al. (2006). Large-Scale Molecular Comparison of Human Schwann Cells to Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Cell Lines and Tissues. *Cancer Res.* 66, 2584–2591.

Miller, S.J., Jessen, W.J., Mehta, T., Hardiman, A., Sites, E., Kaiser, S., Jegga, A.G., Li, H., Upadhyaya, M., Giovannini, M., et al. (2009). Integrative genomic analyses of neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and survival gene. *EMBO Mol. Med.* 1, 236–248.

Mirsky, R., Jessen, K.R., Brennan, A., Parkinson, D., Dong, Z., Meier, C., Parmantier, E., and Lawson, D. (2002). Schwann cells as regulators of nerve development. *J. Physiol. Paris* 96, 17–24.

Mirsky, R., Woodhoo, A., Parkinson, D.B., Arthur-Farraj, P., Bhaskaran, A., and Jessen, K.R. (2008). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* 13, 122–135.

Misery, L. (2014). Inervación cutánea. *EMC - Dermatol.* 48, 1–6.

Miyamura, Y., Coelho, S.G., Wolber, R., Miller, S.A., Wakamatsu, K., Zmudzka, B.Z., Ito, S., Smuda, C., Passeron, T., Choi, W., et al. (2007). Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res.* 20, 2–13.

Mollaaghababa, R., and Pavan, W.J. (2003). The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene* 22, 3024–3034.

Monaghan, J.R., and Maden, M. (2013). Cellular plasticity during vertebrate appendage regeneration. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 367, 53–74.

Monaghan, J.R., Epp, L.G., Putta, S., Page, R.B., Walker, J.A., Beachy, C.K., Zhu, W., Pao, G.M., Verma, I.M., Hunter, T., et al. (2009). Microarray and cDNA sequence analysis of transcription during nerve-dependent limb regeneration. *BMC Biol.* 7, 1.

Monsoro-Burq, A.-H., Fletcher, R.B., and Harland, R.M. (2003). Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals. *Dev. Camb. Engl.* 130, 3111–3124.

Morgan, L., Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1991). The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: progression from an early phenotype (04+) to a myelin phenotype (P0+, GFAP-, N-CAM-, NGF-receptor-) depends on growth inhibition. *J. Cell Biol.* 112, 457–467.

Morrison, K.M., Miesegaes, G.R., Lumpkin, E.A., and Maricich, S.M. (2009). Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Dev. Biol.* 336, 76–83.

Morrison, S.J., White, P.M., Zock, C., and Anderson, D.J. (1999). Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96, 737–749.

Munger, B.L., and Ide, C. (1988). The structure and function of cutaneous sensory receptors. *Arch. Histol. Cytol.* 51, 1–34.

Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., et al. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537–544.

- Murtaugh, L.C., Chyung, J.H., and Lassar, A.B. (1999). Sonic hedgehog promotes somitic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. *Genes Dev.* *13*, 225–237.
- Nagoshi, N., Shibata, S., Kubota, Y., Nakamura, M., Nagai, Y., Satoh, E., Morikawa, S., Okada, Y., Mabuchi, Y., Katoh, H., et al. (2008). Ontogeny and Multipotency of Neural Crest-Derived Stem Cells in Mouse Bone Marrow, Dorsal Root Ganglia, and Whisker Pad. *Cell Stem Cell* *2*, 392–403.
- Naldaiz-Gastesi, N., Goicoechea, M., Alonso-Martín, S., Aiastui, A., López-Mayorga, M., García-Belda, P., Lacalle, J., San José, C., Araúzo-Bravo, M.J., Trouilh, L., et al. (2016). Identification and Characterization of the Dermal Panniculus Carnosus Muscle Stem Cells. *Stem Cell Rep.* *7*, 411–424.
- Napoli, I., Noon, L.A., Ribeiro, S., Kerai, A.P., Parrinello, S., Rosenberg, L.H., Collins, M.J., Harrisingh, M.C., White, I.J., Woodhoo, A., et al. (2012). A central role for the ERK-signaling pathway in controlling Schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration in vivo. *Neuron* *73*, 729–742.
- Narytnyk, A., Verdon, B., Loughney, A., Sweeney, M., Clewes, O., Taggart, M.J., and Sieber-Blum, M. (2014). Differentiation of human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC) into virtually homogenous populations of dopaminergic neurons. *Stem Cell Rev.* *10*, 316–326.
- Nishimura, E.K. (2011). Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* *24*, 401–410.
- Nishimura, E.K., Jordan, S.A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I.J., Barrandon, Y., Miyachi, Y., and Nishikawa, S.-I. (2002). Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* *416*, 854–860.
- Nitzan, E., Pfaltzgraff, E.R., Labosky, P.A., and Kalcheim, C. (2013). Neural crest and Schwann cell progenitor-derived melanocytes are two spatially segregated populations similarly regulated by Foxd3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 12709–12714.
- Noden, D.M., Marcucio, R., Borycki, A.G., and Emerson, C.P. (1999). Differentiation of avian craniofacial muscles: I. Patterns of early regulatory gene expression and myosin heavy chain synthesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *216*, 96–112.
- Odelin, G., Faure, E., Couplier, F., Di Bonito, M., Bajolle, F., Studer, M., Avierinos, J.-F., Charnay, P., Topilko, P., and Zaffran, S. (2017). Krox20 defines a subpopulation of cardiac neural crest cells contributing to arterial valves and bicuspid aortic valve. *Dev. Camb. Engl.*
- Ohtola, J., Myers, J., Akhtar-Zaidi, B., Zuzindlak, D., Sandesara, P., Yeh, K., Mackem, S., and Atit, R. (2008). beta-Catenin has sequential roles in the survival and specification of ventral dermis. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 2321–2329.
- Ohyama, M. (2007). Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J. Dermatol. Sci.* *46*, 81–89.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* *448*, 313–317.
- Okubo, T., Pevny, L.H., and Hogan, B.L.M. (2006). Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes Dev.* *20*, 2654–2659.
- Olivera-Martinez, I., Thélu, J., Teillet, M.A., and Dhouailly, D. (2001). Dorsal dermis development depends on a signal from the dorsal neural tube, which can be substituted by Wnt-1. *Mech. Dev.* *100*, 233–244.
- Olivera-Martinez, I., Viallet, J.P., Michon, F., Pearton, D.J., and Dhouailly, D. (2004a). The different steps of skin formation in vertebrates. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 107–115.
- Olivera-Martinez, I., Thélu, J., and Dhouailly, D. (2004b). Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 93–101.

Bibliografía

- Onimaru, K., Shoguchi, E., Kuratani, S., and Tanaka, M. (2011). Development and evolution of the lateral plate mesoderm: comparative analysis of amphioxus and lamprey with implications for the acquisition of paired fins. *Dev. Biol.* 359, 124–136.
- Ordahl, C.P., and Le Douarin, N.M. (1992). Two myogenic lineages within the developing somite. *Dev. Camb. Engl.* 114, 339–353.
- Ordahl, C.P., Berdoudo, E., Venters, S.J., and Denetclaw, W.F. (2001). The dermomyotome dorsomedial lip drives growth and morphogenesis of both the primary myotome and dermomyotome epithelium. *Dev. Camb. Engl.* 128, 1731–1744.
- Ott, M.O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H., and Buckingham, M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* 111, 1097–1107.
- Packer, R.J., Gutmann, D.H., Rubenstein, A., Viskochil, D., Zimmerman, R.A., Vezina, G., Small, J., and Korf, B. (2002). Plexiform neurofibromas in NF1: toward biologic-based therapy. *Neurology* 58, 1461–1470.
- Paratore, C., Goerich, D.E., Suter, U., Wegner, M., and Sommer, L. (2001). Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Dev. Camb. Engl.* 128, 3949–3961.
- Parfejevs, V., Debbache, J., Shakhova, O., Schaefer, S.M., Glausch, M., Wegner, M., Suter, U., Riekstina, U., Werner, S., and Sommer, L. (2018a). Injury-activated glial cells promote wound healing of the adult skin in mice. *Nat. Commun.* 9, 236.
- Parfejevs, V., Debbache, J., Shakhova, O., Schaefer, S.M., Glausch, M., Wegner, M., Suter, U., Riekstina, U., Werner, S., and Sommer, L. (2018b). Injury-activated glial cells promote wound healing of the adult skin in mice. *Nat. Commun.* 9, 236.
- Park, D., Xiang, A.P., Mao, F.F., Zhang, L., Di, C.-G., Liu, X.-M., Shao, Y., Ma, B.-F., Lee, J.-H., Ha, K.-S., et al. (2010). Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 2162–2171.
- Parkinson, D.B., Bhaskaran, A., Arthur-Farraj, P., Noon, L.A., Woodhoo, A., Lloyd, A.C., Feltri, M.L., Wrabetz, L., Behrens, A., Mirsky, R., et al. (2008). c-Jun is a negative regulator of myelination. *J. Cell Biol.* 181, 625–637.
- Parrinello, S., and Lloyd, A.C. (2009). Neurofibroma development in NF1--insights into tumour initiation. *Trends Cell Biol.* 19, 395–403.
- Parrinello, S., Napoli, I., Ribeiro, S., Wingfield Digby, P., Fedorova, M., Parkinson, D.B., Doddrell, R.D.S., Nakayama, M., Adams, R.H., and Lloyd, A.C. (2010). EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell* 143, 145–155.
- Paus, R., and Cotsarelis, G. (1999). The biology of hair follicles. *N. Engl. J. Med.* 341, 491–497.
- Paus, R., Müller-Röver, S., Van Der Veen, C., Maurer, M., Eichmüller, S., Ling, G., Hofmann, U., Foitzik, K., Mecklenburg, L., and Handjiski, B. (1999). A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 113, 523–532.
- Pavletic, M.M. (2011). *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery* (John Wiley & Sons).
- Pekmezci, M., Reuss, D.E., Hirbe, A.C., Dahiya, S., Gutmann, D.H., Deimling, A. von, Horvai, A.E., and Perry, A. (2015). Morphologic and immunohistochemical features of malignant peripheral nerve sheath tumors and cellular schwannomas. *Mod. Pathol.* 28, 187.
- Peters, E.M.J., Botchkarev, V.A., Müller-Röver, S., Moll, I., Rice, F.L., and Paus, R. (2002). Developmental timing of hair follicle and dorsal skin innervation in mice. *J. Comp. Neurol.* 448, 28–52.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

- Pietri, T., Eder, O., Blanche, M., Thiery, J.P., and Dufour, S. (2003). The human tissue plasminogen activator-Cre mouse: a new tool for targeting specifically neural crest cells and their derivatives in vivo. *Dev. Biol.* 259, 176–187.
- Poblet, E., Jiménez-Acosta, F., Hardman, J.A., Escario, E., and Paus, R. (2016). Is the eccrine gland an integral, functionally important component of the human scalp pilosebaceous unit? *Exp. Dermatol.* 25, 149–150.
- Pomeranz, H.D., Rothman, T.P., and Gershon, M.D. (1991). Colonization of the post-umbilical bowel by cells derived from the sacral neural crest: direct tracing of cell migration using an intercalating probe and a replication-deficient retrovirus. *Dev. Camb. Engl.* 111, 647–655.
- Pourquié, O. (2011). Vertebrate segmentation: from cyclic gene networks to scoliosis. *Cell* 145, 650–663.
- Pownall, M.E., Gustafsson, M.K., and Emerson, C.P. (2002). Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 747–783.
- Prada, C.E., Jousma, E., Rizvi, T.A., Wu, J., Dunn, R.S., Mayes, D.A., Cancelas, J.A., Dombi, E., Kim, M.-O., West, B.L., et al. (2013). Neurofibroma-associated macrophages play roles in tumor growth and response to pharmacological inhibition. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 159–168.
- Prasad, M.S., Sauka-Spengler, T., and LaBonne, C. (2012). Induction of the neural crest state: control of stem cell attributes by gene regulatory, post-transcriptional and epigenetic interactions. *Dev. Biol.* 366, 10–21.
- Prost-Squarcioni, C. (2006). [Histology of skin and hair follicle]. *Med. Sci. MS* 22, 131–137.
- Puligilla, C., and Kelley, M.W. (2017). Dual role for Sox2 in specification of sensory competence and regulation of Atoh1 function. *Dev. Neurobiol.* 77, 3–13.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., and Williams, S.M. (2001). Mechanoreceptors Specialized to Receive Tactile Information.
- Que, J., Okubo, T., Goldenring, J.R., Nam, K.-T., Kurotani, R., Morrisey, E.E., Taranova, O., Pevny, L.H., and Hogan, B.L.M. (2007). Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Dev. Camb. Engl.* 134, 2521–2531.
- .Radomska, K.J., and Topilko, P. (2017). Boundary cap cells in development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 47, 209–215.
- Radomska, K.J., and Topilko, P. (2017). Boundary cap cells in development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 47, 209–215.
- Raff, M. (2003). Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 1–22.
- Rahmani, W., Abbasi, S., Hagner, A., Raharjo, E., Kumar, R., Hotta, A., Magness, S., Metzger, D., and Biernaskie, J. (2014). Hair follicle dermal stem cells regenerate the dermal sheath, repopulate the dermal papilla, and modulate hair type. *Dev. Cell* 31, 543–558.
- Rahmatullah, M., Schroering, A., Rothblum, K., Stahl, R.C., Urban, B., and Carey, D.J. (1998). Synergistic regulation of Schwann cell proliferation by heregulin and forskolin. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6245–6252.
- Rasmussen, S.A., Overman, J., Thomson, S.A., Colman, S.D., Abernathy, C.R., Trimpert, R.E., Moose, R., Viridi, G., Roux, K., Bauer, M., et al. (2000). Chromosome 17 loss-of-heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1. *Genes. Chromosomes Cancer* 28, 425–431.
- Ratner, N., and Miller, S.J. (2015). A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat. Rev. Cancer* 15, 290–301.
- Real, C., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N.M., and Dupin, E. (2006). Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential. *Dev. Biol.* 300, 656–669.

Bibliografía

- Reina, M.A., López, A., Villanueva, M.C., de Andrés, J.A., and León, G.I. (2000). [Morphology of peripheral nerves, their sheaths, and their vascularization]. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.* 47, 464–475.
- Reinisch, C.M., and Tschachler, E. (2005). The touch dome in human skin is supplied by different types of nerve fibers. *Ann. Neurol.* 58, 88–95.
- Reinisch, C.M., and Tschachler, E. (2012). The dimensions and characteristics of the subepidermal nerve plexus in human skin--terminal Schwann cells constitute a substantial cell population within the superficial dermis. *J. Dermatol. Sci.* 65, 162–169.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Ribeiro, S., Napoli, I., White, I.J., Parrinello, S., Flanagan, A.M., Suter, U., Parada, L.F., and Lloyd, A.C. (2013). Injury signals cooperate with Nf1 loss to relieve the tumor-suppressive environment of adult peripheral nerve. *Cell Rep.* 5, 126–136.
- Riccardi, V.M. (1982). Neurofibromatosis: clinical heterogeneity. *Curr. Probl. Cancer* 7, 1–34.
- Riccardi, V.M. (1993). Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History and Pathogenesis. *Plast. Reconstr. Surg.* 91, 561.
- Riccardi, V.M. (2000). Of mass and men: neurofibromas and histogenesis. *Arch. Dermatol.* 136, 1257–1258.
- Riccardi VM, V.M.R. (1992). Phenotype, Natural History, and Pathogenesis (Baltimore: The Johns Hopkins University Press).
- Rinkevich, Y. (2015). Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential.
- Rinkevich, B., Shlemberg, Z., and Fishelson, L. (1995). Whole-body protochordate regeneration from totipotent blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7695–7699.
- Rinkevich, Y., Douek, J., Haber, O., Rinkevich, B., and Reshef, R. (2007). Urochordate whole body regeneration inaugurates a diverse innate immune signaling profile. *Dev. Biol.* 312, 131–146.
- Rinkevich, Y., Lindau, P., Ueno, H., Longaker, M.T., and Weissman, I.L. (2011). Germ and lineage restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip. *Nature* 476.
- Rios, A.C., Serralbo, O., Salgado, D., and Marcelle, C. (2011). Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. *Nature* 473, 532–535.
- Rittié, L. (2016). Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *J. Cell Commun. Signal.* 10, 103–120.
- Roberts, S.L., Dun, X., Doddrell, R.D.S., Mindos, T., Drake, L.K., Onaitis, M.W., Florio, F., Quattrini, A., D'Antonio, M., and Parkinson, D.B. (2017). Sox2 expression in Schwann cells inhibits myelination in vivo and induces influx of macrophages to the nerve. *Development* dev.150656.
- Rodríguez-Niedenführ, M., Dathe, V., Jacob, H.J., Pröls, F., and Christ, B. (2003). Spatial and temporal pattern of Wnt-6 expression during chick development. *Anat. Embryol. (Berl.)* 206, 447–451.
- Roth, T.M., Petty, E.M., and Barald, K.F. (2008). The role of steroid hormones in the NF1 phenotype: focus on pregnancy. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A, 1624–1633.
- Ruetze, M., Knauer, T., Gallinat, S., Wenck, H., Achterberg, V., Maerz, A., Deppert, W., and Knott, A. (2013). A novel niche for skin derived precursors in non-follicular skin. *J. Dermatol. Sci.* 69, 132–139.
- Rutkowski, J.L., Wu, K., Gutmann, D.H., Boyer, P.J., and Legius, E. (2000). Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1059–1066.

- Rutlin, M., Ho, C.-Y., Abraira, V.E., Cassidy, C., Bai, L., Woodbury, C.J., and Ginty, D.D. (2014). The cellular and molecular basis of direction selectivity of A δ -LTMRs. *Cell* 159, 1640–1651.
- Saha, S., Aranda, E., Hayakawa, Y., Bhanja, P., Atay, S., Brodin, N.P., Li, J., Asfaha, S., Liu, L., Taylor, Y., et al. (2016). Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nat. Commun.* 7.
- Sakaue, M., and Sieber-Blum, M. (2015). Human epidermal neural crest stem cells as a source of Schwann cells. *Dev. Camb. Engl.* 142, 3188–3197.
- Salz, L., and Driskell, R.R. (2017). The Sox2: GFP \pm knock-in mouse model does not faithfully recapitulate Sox2 expression in skin. *Exp. Dermatol.* 26, 1146–1148.
- Salzer, J.L. (2008). Switching myelination on and off. *J. Cell Biol.* 181, 575–577.
- Sambasivan, R., Kuratani, S., and Tajbakhsh, S. (2011). An eye on the head: the development and evolution of craniofacial muscles. *Dev. Camb. Engl.* 138, 2401–2415.
- Santagati, F., and Rijli, F.M. (2003). Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 806–818.
- Sarkar, A., and Hochedlinger, K. (2013). The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* 12, 15–30.
- Sato, K., Kang, W.H., Saga, K., and Sato, K.T. (1989). Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *J. Am. Acad. Dermatol.* 20, 537–563.
- Sato, T., Rocancourt, D., Marques, L., Thorsteinsdóttir, S., and Buckingham, M. (2010). A Pax3/Dmrt2/Myf5 regulatory cascade functions at the onset of myogenesis. *PLoS Genet.* 6, e1000897.
- Satoh, A., Makanae, A., Nishimoto, Y., and Mitogawa, K. (2016). FGF and BMP derived from dorsal root ganglia regulate blastema induction in limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Dev. Biol.* 417, 114–125.
- Sawada, S., Florell, S., Purandare, S.M., Ota, M., Stephens, K., and Viskochil, D. (1996). Identification of NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofibroma. *Nat. Genet.* 14, 110–112.
- Sbarbati, A., Accorsi, D., Benati, D., Marchetti, L., Orsini, G., Rigotti, G., and Panettiere, P. (2010). Subcutaneous adipose tissue classification. *Eur. J. Histochem. EJH* 54, e48.
- Scaal, M., and Christ, B. (2004). Formation and differentiation of the avian dermomyotome. *Anat. Embryol. (Berl.)* 208, 411–424.
- Scaal, M., and Wiegrefe, C. (2006). Somite compartments in anamniotes. *Anat. Embryol. (Berl.)* 211 Suppl 1, 9–19.
- Scaal, M., Bonafede, A., Dathe, V., Sachs, M., Cann, G., Christ, B., and Brand-Saber, B. (1999). SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development. *Dev. Camb. Engl.* 126, 4885–4893.
- Schepers, G.E., Bullejos, M., Hosking, B.M., and Koopman, P. (2000). Cloning and characterisation of the Sry-related transcription factor gene Sox8. *Nucleic Acids Res.* 28, 1473–1480.
- Schepers, G.E., Teasdale, R.D., and Koopman, P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev. Cell* 3, 167–170.
- Schlake, T. (2007). Determination of hair structure and shape. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 267–273.
- Schmidt, B.A., and Horsley, V. (2013). Intra-dermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Dev. Camb. Engl.* 140, 1517–1527.
- Schmidt-Ullrich, R., and Paus, R. (2005). Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *BioEssays* 27, 247–261.

Bibliografía

Schneider, M.R., and Paus, R. (2010). Sebocytes, multifaceted epithelial cells: Lipid production and holocrine secretion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 181–185.

Schneider, M.R., Schmidt-Ullrich, R., and Paus, R. (2009). The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr. Biol. CB* 19, R132-142.

Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 295.

Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961–967.

Seifert, A.W., and Muneoka, K. (2018). The blastema and epimorphic regeneration in mammals. *Dev. Biol.* 433, 190–199.

Serbedzija, G.N., Bronner-Fraser, M., and Fraser, S.E. (1994). Developmental potential of trunk neural crest cells in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* 120, 1709–1718.

Serra, E., Puig, S., Otero, D., Gaona, A., Kruyer, H., Ars, E., Estivill, X., and Lázaro, C. (1997). Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 512–519.

Serra, E., Rosenbaum, T., Winner, U., Aledo, R., Ars, E., Estivill, X., Lenard, H.G., and Lázaro, C. (2000). Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations. *Hum. Mol. Genet.* 9, 3055–3064.

Serra, E., Ars, E., Ravella, A., Sánchez, A., Puig, S., Rosenbaum, T., Estivill, X., and Lázaro, C. (2001). Somatic NF1 mutational spectrum in benign neurofibromas: mRNA splice defects are common among point mutations. *Hum. Genet.* 108, 416–429.

Shah, N.M., Marchionni, M.A., Isaacs, I., Stroobant, P., and Anderson, D.J. (1994). Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell* 77, 349–360.

Sherman, L.S., Atit, R., Rosenbaum, T., Cox, A.D., and Ratner, N. (2000). Single Cell Ras-GTP Analysis Reveals Altered Ras Activity in a Subpopulation of Neurofibroma Schwann Cells but Not Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 275, 30740–30745.

Shi, G., Sohn, K.-C., Li, Z., Choi, D.-K., Park, Y.M., Kim, J.-H., Fan, Y.-M., Nam, Y.H., Kim, S., Im, M., et al. (2013). Expression and functional role of Sox9 in human epidermal keratinocytes. *PLoS One* 8, e54355.

Shimizu, E., Shinohara, T., Mori, N., Yokota, J., Tani, K., Izumi, K., Obashi, A., and Ogura, T. (1993). Loss of heterozygosity on chromosome arm 17p in small cell lung carcinomas, but not in neurofibromas, in a patient with von Recklinghausen neurofibromatosis. *Cancer* 71, 725–728.

Shin, J.-Y., Méndez-López, I., Hong, M., Wang, Y., Tanji, K., Wu, W., Shugol, L., Krauss, R.S., Dauer, W.T., and Worman, H.J. (2017). Lamina-associated polypeptide 1 is dispensable for embryonic myogenesis but required for postnatal skeletal muscle growth. *Hum. Mol. Genet.* 26, 65–78.

Sieber-Blum, M. (2010). Epidermal neural crest stem cells and their use in mouse models of spinal cord injury. *Brain Res. Bull.* 83, 189–193.

Sieber-Blum, M. (2014). Human epidermal neural crest stem cells as candidates for cell-based therapies, disease modeling, and drug discovery. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 102, 221–226.

Sieber-Blum, M., and Hu, Y. (2008). Epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSC) and pluripotency. *Stem Cell Rev.* 4, 256–260.

Sieber-Blum, M., Grim, M., Hu, Y.F., and Szeder, V. (2004). Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 231, 258–269.

Sieber-Blum, M., Schnell, L., Grim, M., Hu, Y.F., Schneider, R., and Schwab, M.E. (2006). Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 67–81.

- Siegle, J.M., Basin, A., Sastre-Perona, A., Yonekubo, Y., Brown, J., Sennett, R., Rendl, M., Tsigos, A., Carucci, J.A., and Schober, M. (2014). SOX2 is a cancer-specific regulator of tumour initiating potential in cutaneous squamous cell carcinoma. *Nat. Commun.* 5, 4511.
- Sieiro, D., Rios, A.C., Hirst, C.E., and Marcelle, C. (2016). Cytoplasmic NOTCH and membrane-derived β -catenin link cell fate choice to epithelial-mesenchymal transition during myogenesis. *ELife* 5.
- Simon, C., Lickert, H., Götz, M., and Dimou, L. (2012). Sox10-iCreERT2: A mouse line to inducibly trace the neural crest and oligodendrocyte lineage. *Genesis* 50, 506–515.
- Singer, M. (1952). The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity. *Q. Rev. Biol.* 27, 169–200.
- Skuse, G.R., Kosciulek, B.A., and Rowley, P.T. (1989). Molecular genetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis: loss of heterozygosity for chromosome 17. *Genes. Chromosomes Cancer* 1, 36–41.
- Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, P.M., Schallreuter, K.U., Paus, R., and Tobin, D.J. (2005). Hair Follicle Pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* 124, 13–21.
- Snider, P., Olaopa, M., Firulli, A.B., and Conway, S.J. (2007). Cardiovascular development and the colonizing cardiac neural crest lineage. *ScientificWorldJournal* 7, 1090–1113.
- Snowden, J.M., Kennedy, D.F., and Cliff, W.J. (1982). Wound contraction. The effects of scab formation and the nature of the wound bed. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 60, 73–82.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 21, 70–71.
- Sorrell, J.M., and Caplan, A.I. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* 117, 667–675.
- Sorrell, J.M., Baber, M. a., and Caplan, A. i. (2004). Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. *J. Cell. Physiol.* 200, 134–145.
- Sorrell, J.M., Baber, M.A., and Caplan, A.I. (2006). Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. *Cell Tissue Res.* 327, 499–510.
- Sorrell, J.M., Baber, M.A., and Caplan, A.I. (2008). Human dermal fibroblast subpopulations; differential interactions with vascular endothelial cells in coculture: Nonsoluble factors in the extracellular matrix influence interactions. *Wound Repair Regen.* 16, 300–309.
- Southard-Smith, E.M., Kos, L., and Pavan, W.J. (1998). Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat. Genet.* 18, 60–64.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., et al. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219–1227.
- Sparling, J.S., Bretzner, F., Biernaskie, J., Assinck, P., Jiang, Y., Arisato, H., Plunet, W.T., Borisoff, J., Liu, J., Miller, F.D., et al. (2015). Schwann cells generated from neonatal skin-derived precursors or neonatal peripheral nerve improve functional recovery after acute transplantation into the partially injured cervical spinal cord of the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 6714–6730.
- Sriram, G., Bigliardi, P.L., and Bigliardi-Qi, M. (2015). Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 94, 483–512.
- Steinbach, S.K., El-Mounayri, O., DaCosta, R.S., Frontini, M.J., Nong, Z., Maeda, A., Pickering, J.G., Miller, F.D., and Husain, M. (2011). Directed differentiation of skin-derived precursors into functional vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2938–2948.
- Stemple, D.L., and Anderson, D.J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71, 973–985.

Bibliografía

- Stenn, K.S., and Paus, R. (2001). Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev.* 81, 449–494.
- Stewart, H.J., Morgan, L., Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1993). Changes in DNA synthesis rate in the Schwann cell lineage in vivo are correlated with the precursor--Schwann cell transition and myelination. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1136–1144.
- Stine, Z.E., Huynh, J.L., Loftus, S.K., Gorkin, D.U., Salmasi, A.H., Novak, T., Purves, T., Miller, R.A., Antonellis, A., Gearhart, J.P., et al. (2009). Oligodendroglial and Pan-neural Crest Expression of Cre Recombinase Directed by Sox10 Enhancer. *Genes. N. Y. N* 2000 47, 765–770.
- Stockdale, F.E., Nikovits, W., and Christ, B. (2000). Molecular and cellular biology of avian somite development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 219, 304–321.
- Stratton, J.A., Kumar, R., Sinha, S., Shah, P., Stykel, M., Shapira, Y., Midha, R., and Biernaskie, J. (2017). Purification and Characterization of Schwann Cells from Adult Human Skin and Nerve. *ENeuro* 4.
- Summerbell, D., Ashby, P.R., Coutelle, O., Cox, D., Yee, S., and Rigby, P.W. (2000). The expression of Myf5 in the developing mouse embryo is controlled by discrete and dispersed enhancers specific for particular populations of skeletal muscle precursors. *Dev. Camb. Engl.* 127, 3745–3757.
- Summerbell, D., Halai, C., and Rigby, P.W.J. (2002). Expression of the myogenic regulatory factor Mrf4 precedes or is contemporaneous with that of Myf5 in the somitic bud. *Mech. Dev.* 117, 331–335.
- Tajbakhsh, S., and Buckingham, M.E. (1994). Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 747–751.
- Tajbakhsh, S., and Buckingham, M.E. (1995). Lineage restriction of the myogenic conversion factor myf-5 in the brain. *Dev. Camb. Engl.* 121, 4077–4083.
- Tajbakhsh, S., Vivarelli, E., Cusella-De Angelis, G., Rocancourt, D., Buckingham, M., and Cossu, G. (1994). A population of myogenic cells derived from the mouse neural tube. *Neuron* 13, 813–821.
- Tajbakhsh, S., Bober, E., Babinet, C., Pournin, S., Arnold, H., and Buckingham, M. (1996). Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 206, 291–300.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, M., and Osumi, N. (2005). Identification of a novel type II classical cadherin: rat cadherin19 is expressed in the cranial ganglia and Schwann cell precursors during development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 232, 200–208.
- Tallquist, M.D., Weismann, K.E., Hellstrom, M., and Soriano, P. (2000). Early myotome specification regulates PDGFA expression and axial skeleton development. *Development* 127, 5059–5070.
- Taranova, O.V., Magness, S.T., Fagan, B.M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S.R., and Pevny, L.H. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev.* 20, 1187–1202.
- Taylor, G., Lehrer, M.S., Jensen, P.J., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (2000). Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102, 451–461.
- Teboul, L., Hadchouel, J., Daubas, P., Summerbell, D., Buckingham, M., and Rigby, P.W.J. (2002). The early epaxial enhancer is essential for the initial expression of the skeletal muscle determination gene Myf5 but not for subsequent, multiple phases of somitic myogenesis. *Development* 129, 4571–4580.
- Thody, A.J., and Shuster, S. (1989). Control and function of sebaceous glands. *Physiol. Rev.* 69, 383–416.
- Thomas, A.J., and Erickson, C.A. (2008). The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21, 598–610.

- Timmons, J.A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T.B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D.L., Gimeno, R.E., Wahlestedt, C., Baar, K., et al. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4401–4406.
- Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* *3*, 778–784.
- Toma, J.G., McKenzie, I.A., Bagli, D., and Miller, F.D. (2005). Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells Dayt. Ohio* *23*, 727–737.
- Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., et al. (2005). Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J. Cell Biol.* *170*, 1135–1146.
- Tran, T.H., Shi, X., Zaia, J., and Ai, X. (2012). Heparan sulfate 6-O-endosulfatases (Sulfs) coordinate the Wnt signaling pathways to regulate myoblast fusion during skeletal muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* *287*, 32651–32664.
- Trovó-Marqui, A.B., and Tajara, E.H. (2006). Neurofibromin: a general outlook. *Clin. Genet.* *70*, 1–13.
- Tschachler, E., Reinisch, C.M., Mayer, C., Paiha, K., Lassmann, H., and Weninger, W. (2004). Sheet preparations expose the dermal nerve plexus of human skin and render the dermal nerve end organ accessible to extensive analysis. *J. Invest. Dermatol.* *122*, 177–182.
- Tucker, T., and Friedman, J.M. (2002). Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the “two-hit” hypothesis. *Clin. Genet.* *62*, 345–357.
- Tucker, T., Riccardi, V.M., Brown, C., Fee, J., Sutcliffe, M., Vielkind, J., Wechsler, J., Wolkenstein, P., and Friedman, J.M. (2011). S100B and neurofibromin immunostaining and X-inactivation patterns of laser-microdissected cells indicate a multicellular origin of some NF1-associated neurofibromas. *J. Neurosci. Res.* *89*, 1451–1460.
- Tumbar, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W.E., Rendl, M., and Fuchs, E. (2004). Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* *303*, 359–363.
- Uchugonova, A., Duong, J., Zhang, N., König, K., and Hoffman, R.M. (2011). The bulge area is the origin of nestin-expressing pluripotent stem cells of the hair follicle. *J. Cell. Biochem.* *112*, 2046–2050.
- Uesaka, T., Nagashimada, M., and Enomoto, H. (2015). Neuronal Differentiation in Schwann Cell Lineage Underlies Postnatal Neurogenesis in the Enteric Nervous System. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *35*, 9879–9888.
- Upadhyaya, M. (2011). Genetic basis of tumorigenesis in NF1 malignant peripheral nerve sheath tumors. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *16*, 937–951.
- Upadhyaya, M., Han, S., Consoli, C., Majounie, E., Horan, M., Thomas, N.S., Potts, C., Griffiths, S., Ruggieri, M., von Deimling, A., et al. (2004). Characterization of the somatic mutational spectrum of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in neurofibromatosis patients with benign and malignant tumors. *Hum. Mutat.* *23*, 134–146.
- Valenzuela, M.J., Dean, S.K., Sachdev, P., Tuch, B.E., and Sidhu, K.S. (2008). Neural precursors from canine skin: a new direction for testing autologous cell replacement in the brain. *Stem Cells Dev.* *17*, 1087–1094.
- Van Keymeulen, A., Mascré, G., Youseff, K.K., Harel, I., Michaux, C., De Geest, N., Szpalski, C., Achouri, Y., Bloch, W., Hassan, B.A., et al. (2009). Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J. Cell Biol.* *187*, 91–100.
- Vargas, M.E., and Barres, B.A. (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu. Rev. Neurosci.* *30*, 153–179.
- Vasyutina, E., and Birchmeier, C. (2006). The development of migrating muscle precursor cells. *Anat. Embryol. (Berl.)* *211 Suppl 1*, 37–41.

Bibliografía

- Vetrugno, R., Liguori, R., Cortelli, P., and Montagna, P. (2003). Sympathetic skin response: basic mechanisms and clinical applications. *Clin. Auton. Res. Off. J. Clin. Auton. Res. Soc.* 13, 256–270.
- Vidal, P., and Dickson, M.G. (1993). Regeneration of the distal phalanx. A case report. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 18, 230–233.
- Vidal, V.P.I., Chaboissier, M.-C., Lützkendorf, S., Cotsarelis, G., Mill, P., Hui, C.-C., Ortonne, N., Ortonne, J.-P., and Schedl, A. (2005). Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. *Curr. Biol. CB* 15, 1340–1351.
- Volponi, A.A., Pang, Y., and Sharpe, P.T. (2010). Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.* 20, 715–722.
- W C Lobitz, Jr, and Dobson, and R.L. (1961). Dermatology: The Eccrine Sweat Glands. *Annu. Rev. Med.* 12, 289–298.
- Wagner, J., Schmidt, C., Nikowits, W., and Christ, B. (2000). Compartmentalization of the somite and myogenesis in chick embryos are influenced by wnt expression. *Dev. Biol.* 228, 86–94.
- Walsh, S., Biernaskie, J., Kemp, S.W.P., and Midha, R. (2009). Supplementation of acellular nerve grafts with skin derived precursor cells promotes peripheral nerve regeneration. *Neuroscience* 164, 1097–1107.
- Walsh, S.K., Gordon, T., Addas, B.M.J., Kemp, S.W.P., and Midha, R. (2010). Skin-derived precursor cells enhance peripheral nerve regeneration following chronic denervation. *Exp. Neurol.* 223, 221–228.
- Wang, X., Chan, A.K.K., Sham, M.H., Burns, A.J., and Chan, W.Y. (2011). Analysis of the sacral neural crest cell contribution to the hindgut enteric nervous system in the mouse embryo. *Gastroenterology* 141, 992-1002.e1-6.
- Wanner, I.B., Mahoney, J., Jessen, K.R., Wood, P.M., Bates, M., and Bunge, M.B. (2006a). Invariant mantling of growth cones by Schwann cell precursors characterize growing peripheral nerve fronts. *Glia* 54, 424–438.
- Wanner, I.B., Guerra, N.K., Mahoney, J., Kumar, A., Wood, P.M., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2006b). Role of N-cadherin in Schwann cell precursors of growing nerves. *Glia* 54, 439–459.
- Watt, F.M. (2001). Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 410–417.
- Watt, F.M., and Hogan, B.L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287, 1427–1430.
- Webster, H.D., Martin, R., and O'Connell, M.F. (1973). The relationships between interphase Schwann cells and axons before myelination: a quantitative electron microscopic study. *Dev. Biol.* 32, 401–416.
- Wegner, M. (2011). SOX after SOX: SOXession regulates neurogenesis. *Genes Dev.* 25, 2423–2428.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318–324.
- Widera, D., Zander, C., Heidbreder, M., Kasperek, Y., Noll, T., Seitz, O., Saldamli, B., Sudhoff, H., Sader, R., Kaltschmidt, C., et al. (2009). Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 1899–1910.
- Winkelmann, R.K. (1986). Sensory Receptors of the Skin. In *Spinal Afferent Processing*, (Springer, Boston, MA), pp. 19–57.
- Witzel, C., Rohde, C., and Brushart, T.M. (2005). Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J. Comp. Neurol.* 485, 183–190.
- Wojciechowicz, K., Gledhill, K., Ambler, C.A., Manning, C.B., and Jahoda, C.A.B. (2013). Development of the mouse dermal adipose layer occurs independently of subcutaneous adipose tissue and is marked by restricted early expression of FABP4. *PLoS One* 8, e59811.

- Wong, C.E., Paratore, C., Dours-Zimmermann, M.T., Rochat, A., Pietri, T., Suter, U., Zimmermann, D.R., Dufour, S., Thiery, J.P., Meijer, D., et al. (2006). Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J. Cell Biol.* *175*, 1005–1015.
- Woodhoo, A., and Sommer, L. (2008a). Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia* *56*, 1481–1490.
- Woodhoo, A., and Sommer, L. (2008b). Development of the Schwann cell lineage: From the neural crest to the myelinated nerve. *Glia* *56*, 1481–1490.
- Woodhoo, A., Alonso, M.B.D., Droggiti, A., Turmaine, M., D'Antonio, M., Parkinson, D.B., Wilton, D.K., Al-Shawi, R., Simons, P., Shen, J., et al. (2009). Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat. Neurosci.* *12*, 839–847.
- Wu, J., Williams, J.P., Rizvi, T.A., Kordich, J.J., Witte, D., Meijer, D., Stemmer-Rachamimov, A.O., Cancelas, J.A., and Ratner, N. (2008). Plexiform and dermal neurofibromas and pigmentation are caused by Nf1 loss in desert hedgehog-expressing cells. *Cancer Cell* *13*, 105–116.
- Xiao, J., Li, Q., Qu, P., Zhang, Z., Pan, S., Wang, Y., and Zhang, Y. (2016). Isolation of Bovine Skin-Derived Precursor Cells and Their Developmental Potential After Nuclear Transfer. *Cell. Reprogramming* *18*, 411–418.
- Xiao, Y., Woo, W.-M., Nagao, K., Li, W., Terunuma, A., Mukoyama, Y.-S., Oro, A.E., Vogel, J.C., and Brownell, I. (2013). Perivascular hair follicle stem cells associate with a venule annulus. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 2324–2331.
- Xu, G.F., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., and White, R. (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* *62*, 599–608.
- Yamamoto, T. (1966). The fine structure of the palisade-type sensory endings in relation to hair follicles. *J. Electron Microsc.* (Tokyo) *15*, 158–166.
- Yamazaki, A., Hamada, Y., Arakawa, N., Yashiro, M., Mii, S., Aki, R., Kawahara, K., Hoffman, R.M., and Amoh, Y. (2016a). Early-age-dependent selective decrease of differentiation potential of hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells to beating cardiac-muscle cells. *Cell Cycle Georget. Tex* *15*, 2619–2625.
- Yamazaki, A., Yashiro, M., Mii, S., Aki, R., Hamada, Y., Arakawa, N., Kawahara, K., Hoffman, R.M., and Amoh, Y. (2016b). Isoproterenol directs hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells to differentiate in vitro to cardiac muscle cells which can be induced to form beating heart-muscle tissue sheets. *Cell Cycle* *15*, 760–765.
- Yang, F.-C., Ingram, D.A., Chen, S., Hingtgen, C.M., Ratner, N., Monk, K.R., Clegg, T., White, H., Mead, L., Wenning, M.J., et al. (2003). Neurofibromin-deficient Schwann cells secrete a potent migratory stimulus for Nf1^{+/-} mast cells. *J. Clin. Invest.* *112*, 1851–1861.
- Yang, F.-C., Ingram, D.A., Chen, S., Zhu, Y., Yuan, J., Li, X., Yang, X., Knowles, S., Horn, W., Li, Y., et al. (2008). Nf1-dependent tumors require a microenvironment containing Nf1^{+/-} and c-kit-dependent bone marrow. *Cell* *135*, 437–448.
- Yashiro, M., Mii, S., Aki, R., Hamada, Y., Arakawa, N., Kawahara, K., Hoffman, R.M., and Amoh, Y. (2015). From hair to heart: nestin-expressing hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells differentiate to beating cardiac muscle cells. *Cell Cycle* *14*, 2362–2366.
- Yoshida, S., Shimmura, S., Nagoshi, N., Fukuda, K., Matsuzaki, Y., Okano, H., and Tsubota, K. (2006). Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells Dayt. Ohio* *24*, 2714–2722.
- Yoshida, T., Vivatbutsiri, P., Morriss-Kay, G., Saga, Y., and Iseki, S. (2008). Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mech. Dev.* *125*, 797–808.
- Zammit, P.S., Carvajal, J.J., Golding, J.P., Morgan, J.E., Summerbell, D., Zolnerciks, J., Partridge, T.A., Rigby, P.W.J., and Beauchamp, J.R. (2004). Myf5 expression in satellite cells and spindles in adult muscle is controlled by separate genetic elements. *Dev. Biol.* *273*, 454–465.

Bibliografía

- Zavan, B., Michelotto, L., Lancerotto, L., Della Puppa, A., D'Avella, D., Abatangelo, G., Vindigni, V., and Cortivo, R. (2010). Neural potential of a stem cell population in the adipose and cutaneous tissues. *Neurol. Res.* *32*, 47–54.
- Zenteno, J.C., Gascon-Guzman, G., and Tovilla-Canales, J.L. (2005). Bilateral anophthalmia and brain malformations caused by a 20-bp deletion in the SOX2 gene. *Clin. Genet.* *68*, 564–566.
- Zhao, M., Isom, S.C., Lin, H., Hao, Y., Zhang, Y., Zhao, J., Whyte, J.J., Dobbs, K.B., and Prather, R.S. (2009). Tracing the stemness of porcine skin-derived progenitors (pSKP) back to specific marker gene expression. *Cloning Stem Cells* *11*, 111–122.
- Zhao, M.-T., Whitworth, K.M., Zhang, X., Zhao, J., Miao, Y.-L., Zhang, Y., and Prather, R.S. (2010a). Deciphering the mesodermal potency of porcine skin-derived progenitors (SKP) by microarray analysis. *Cell. Reprogramming* *12*, 161–173.
- Zhao, M.-T., Whitworth, K.M., Lin, H., Zhang, X., Isom, S.C., Dobbs, K.B., Bauer, B., Zhang, Y., and Prather, R.S. (2010b). Porcine skin-derived progenitor (SKP) spheres and neurospheres: Distinct “stemness” identified by microarray analysis. *Cell. Reprogramming* *12*, 329–345.
- Zhao, M.-T., Yang, X., Lee, K., Mao, J., Teson, J.M., Whitworth, K.M., Samuel, M.S., Spate, L.D., Murphy, C.N., and Prather, R.S. (2012). The in vivo developmental potential of porcine skin-derived progenitors and neural stem cells. *Stem Cells Dev.* *21*, 2682–2688.
- Zheng, H., Chang, L., Patel, N., Yang, J., Lowe, L., Burns, D.K., and Zhu, Y. (2008). Induction of abnormal proliferation by nonmyelinating schwann cells triggers neurofibroma formation. *Cancer Cell* *13*, 117–128.
- Zhu, Y., and Parada, L.F. (2001). Neurofibromin, a tumor suppressor in the nervous system. *Exp. Cell Res.* *264*, 19–28.
- Zhu, Y., Ghosh, P., Charnay, P., Burns, D.K., and Parada, L.F. (2002). Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* *296*, 920–922.
- Zimmerman, A., Bai, L., and Ginty, D.D. (2014). The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science* *346*, 950–954.

ANEXO

ANEXO I: Análisis de expresión génica en el GeneChip™ Mouse Genome 430 2.0 Array de Affimetrix. En relación a la Figura 1.34.

Tabla A1. Genes sobreexpresados en las fracciones Doble+/Sox2+ vs Doble-/Myf5+ (144 genes)					
110059G02Rik	1435144 _a t	1439872 _a t	1440371 _a t	1444499 _a t	1444749 _a t
1457077 _a t	1457373 _a t	1457741 _a t	1458287 _a t	2210408K08Rik	2310046A06Rik
4930506M07Rik	6330563C09Rik	Acap1	Adamts1	Afap1l2	Akap6
Apod	Arhgap20	Arhgef9	Arnt2	Asgr1	Aspa
Atf3	Atp8a1	B3galt2	Bik	C1qtnf3	Cadm1
Cadm4	Car6	Cd200	Cd24a	Cdh10	Ceacam1
Celsr2	Cnksr2	Cntf	Crabp2	Csmd1	Ctsc
Cubn	Cyfp2	Cyp2j6	Cyp2j9	Dhh	Dmd
Dtna	Efhd1	Egfl8	Epb4.1l4b	Epha5	Erbp3
Ezr	Fabp7	Fam89a	Fgf5	Fign	Foxd3
Fyb	Gatm	Gfra1	Ggct	Gjc3	Gm10672
Gpr56	Gzmb	Hcn1	Hdac9	Insc	Itga1
Itga7	Itgb8	Kcna1	Kcna2	cna6	Kcnj12
Klhl30	L1cam	Lgi4	Limch1	Lphn3	Lrtm1
Mal	Mbp	Megf9	Mertk	Mgl1	Mmp15
Mmp17	Moxd1	Mpz	Nabl	Ngfr	Nkain2
Nrcam	Ntm	Padi2	Pax3	cdh17	Pcdh20
Pdgfa	Pkp2	lekfb1	Plip	Plp1	Plxnb3
Pou3f1	Ppp1r14c	Rdh5	Reln	S100b	Sema3e
Sema4f	Shisa2	Shroom2	Slitrk6	Snca	Sntb1
Sorbs1	Sox10	Sox2	Sox2ot	Sox6	Spata13
St6gal1	Svip	Synm	Syt4	Tcfap2a	Tcfap2b
Tmem88b	Tnik	Tspan15	Tspan2	Ttc9	Ttyh1
Tubb4	Uchl1	Ucn2	Ugt8a	Vwa1	Zfp536

Tabla A2. Genes infraexpresados en las fracciones Doble+/Sox2+ vs Doble-/Myf5+ (70 genes)					
1458943 _a t	4833403l15Rik	Al256396	AW551984	Adcy7	Aff2
Ar	Aspn	C1qtnf7	C1s	Calcl	Cd38
Colec10	Cp	Cyp2f2	Dkk2	Ebf1	Efemp1
Egfr	En1	Enah	Epha3	Fgfr4	Fst
Gda	Grem2	H19	Hmcn1	Hoxc8	Ifi203
Ifi204	Ifi205	ligp1	Il18	Kera	Lmo2
Lox	Lpl	Meis2	Meox2	Mmp9	Mndal
Ms4a4d	Nhsl2	Osmr	Pdgfd	Pitx2	Prr16
Prrx1	Ptgfr	Ptgir	Ptgs2	Rgs7bp	Robo1
Sfrp2	Slc14a1	Sox11	St6galnac5	Steap1	Steap2
Steap4	Tbx18	Tfpi2	Thbs1	Tmigd1	Trim30a
Tslp	Vcam1	Wnt5a	Zic1		

ANEXO II: Artículos publicados en relación al trabajo realizado en esta Tesis Doctoral.

2017 Haizea Iribar; Virginia Pérez-López, Usue Etxaniz, Araika Gutiérrez-Rivera, Ander Izeta. **Schwann Cells in the ventral dermis do not derive from Myf5-expressing precursors.** *Stem Cell Reports* (Factor de impacto 7,338). Volumen 9, pp.1477–1487.

2016 Haizea Iribar, Ane Jaka, Nerea Ormaechea, Anna Tuneu, Ander Izeta, Araika Gutiérrez-Rivera. **Does Schwann cell dedifferentiation originate dermal neurofibromas?** *Experimental Dermatology* (Factor de impacto 2,532). Volumen 25, pp.901–903.

2012 Araika Gutiérrez-Rivera, Haizea Iribar, Anna Tuneu y Ander Izeta. **Skin-derived precursor cells as an in vitro modeling tool for the study of type 1 neurofibromatosis.** *Stem Cells Internacional* (Factor de impacto 3,540). ID 646725.

Schwann Cells in the Ventral Dermis Do Not Derive from Myf5-Expressing Precursors

Haizea Iribar,¹ Virginia Pérez-López,¹ Usue Etxaniz,¹ Araika Gutiérrez-Rivera,^{1,*} and Ander Izeta^{1,2,*}

¹Tissue Engineering Laboratory, Bioengineering Area, Instituto Biodonostia, San Sebastian 20014, Spain

²Department of Biomedical Engineering, School of Engineering, Tecnun-University of Navarra, San Sebastian 20009, Spain

*Correspondence: araika.gutierrez@biodonostia.org (A.G.-R.), ander.izeta@biodonostia.org (A.I.)

<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.09.010>

SUMMARY

The embryonic origin of lineage precursors of the trunk dermis is somewhat controversial. Precursor cells traced by *Myf5* and *Twist2* (*Dermo1*) promoter activation (i.e., cells of presumed dermomyotomal lineage) have been reported to generate Schwann cells. On the other hand, abundant data demonstrate that dermal Schwann cells derive from the neural crest. This is relevant because dermal precursors give rise to neural lineages, and multilineage differentiation potential qualifies them as adult stem cells. However, it is currently unclear whether neural lineages arise from dedifferentiated Schwann cells instead of mesodermally derived dermal precursor cells. To clarify these discrepancies, we traced SOX2⁺ adult dermal precursor cells by two independent *Myf5* lineage tracing strains. We demonstrate that dermal Schwann cells do not belong to the *Myf5*⁺ cell lineage, indicating that previous tracing data reflected aberrant *cre* recombinase expression and that bona fide *Myf5*⁺ dermal precursors cannot transdifferentiate to neural lineages in physiological conditions.

INTRODUCTION

The developmental origin of adult stem cells affects their differentiation potential. Thus, a proper understanding of cell lineage specification may be considered as a prerequisite for safe and efficacious use in the clinic. Adult skin-derived precursors might represent a useful tool for novel cell-based therapies (Agabalyan et al., 2017; Hunt et al., 2009), and their use in the potential treatment of neurodegenerative disease has long been pursued (Joannides et al., 2004). However, the developmental origins and relationships of the diverse adult stem cell pools in the dermis are poorly understood (Dupin and Sommer, 2012). The classical view is that craniofacial dermis originates in the neural crest. In accordance, the dermal precursors in this region are neural crest-derived and thus traced by the *Wnt1-cre* construct (Fernandes et al., 2004). In the trunk dermis, dorsal precursors present a somitic origin while ventrolateral precursors derive from the lateral plate mesoderm (Christ et al., 2007; Millar, 2005; Olivera-Martinez et al., 2004). Consistent with embryonic development, adult dorsal but not ventral trunk precursors are traced by the *Myf5-cre^{Sor}* construct (Jinno et al., 2010). The fact that dorsal mesoderm-derived (*Dermo1-cre⁺*) precursors efficiently give rise to functional Schwann cells, both *in vitro* and in cell transplants (Krause et al., 2014), is puzzling for a number of reasons. First, Schwann cells originate in the neural crest (Jessen et al., 2015) and there is no known evidence of physiological mesenchymal-to-Schwann cell transitions in development. Second, dorsal precursors with the capacity to generate neural crest derivatives seem to represent terminal Schwann cells and melanocytes resident in the mouse skin, both cell types being neural crest-derived

(Gresset et al., 2015). Third, the endogenous dorsal precursors implicated in the dermal response to wounding are also neural crest-derived (Johnston et al., 2013; Krause et al., 2014). Finally, SOX2⁺ dermal precursor cells of human foreskin belong to the Schwann and perivascular lineages (Etxaniz et al., 2014), which again seem consistent with a neural crest origin.

It is currently unknown whether the dermal precursors that operate in development are identical to those relevant in adult dermal homeostasis and in the dermal response to injury (Agabalyan et al., 2016). To shed light on the relationship between embryonic and adult precursors and to facilitate translation to the clinic of adult human dermal precursor cells, in this work we aimed to identify the origin of adult ventral precursors by lineage tracing experiments in the mouse dermis. We demonstrate that the tracing by *Myf5-cre^{Sor}* mice does not actually represent the existence of a mesodermally derived cell population that generates Schwann cells (Jinno et al., 2010; Krause et al., 2014), thus suggesting that the neural progeny of dermal stem cell cultures derives from widespread neural crest precursors, most possibly the Schwann cells ensheathing peripheral nerves.

RESULTS

A SOX2⁺ Cell Population Traced by *Myf5-cre^{Sor}* Expression Retains Neural Competence in Ventral Trunk Dermis

To trace the lineage of precursor cells in the dorsal and ventral dermis, we chose the same transgenic mouse line that had been previously used to express *cre* recombinase under the control of the *Myf5* promoter (*Myf5-cre^{Sor}*)

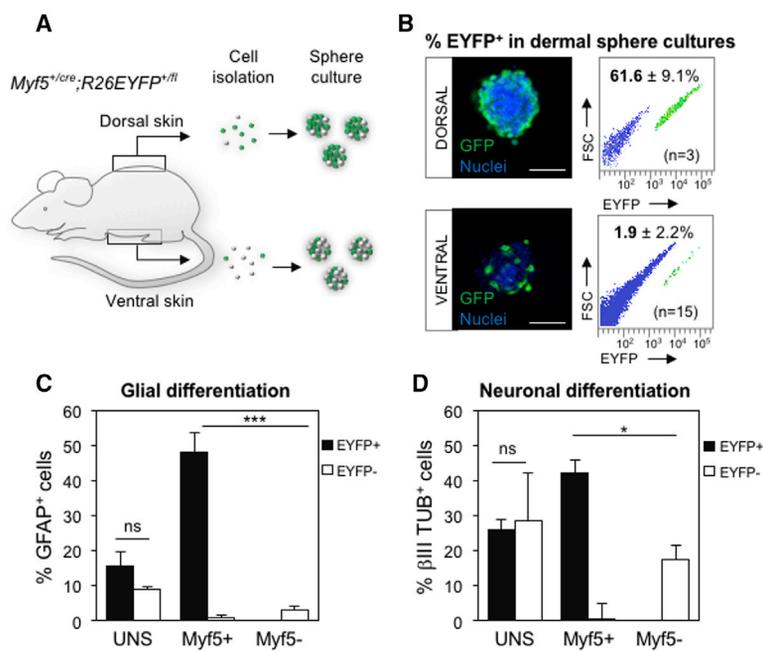


Figure 1. A *Myf5*⁺ Neural-Competent Cell Population in Mouse Ventral Dermis

(A) Scheme of the isolation and culture of dermal precursors from *Myf5*^{+/cre};*R26EYFP*^{+/fl} mouse skin.

(B) Characterization of primary dermal spheres by immunofluorescence (IF) and flow cytometry. Left panels (IF): EYFP expression was detected with anti-GFP antibody (green) and cell nuclei were counter-stained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars, 50 μm. Right panels (flow cytometry): *Myf5*⁺ cell percentages (mean ± SD) were determined by EYFP expression in sphere cultures (n, number of independent biological replicates).

(C and D) *In vitro* neural differentiation of unsorted (UNS), *Myf5*⁺, and *Myf5*⁻ cell fractions isolated by FACS from *Myf5*^{cre/+};*R26EYFP* ventral dermal spheres. Quantification of the neural progeny as percentage of GFAP⁺ cells (C) and βIII TUBULIN⁺ cells (D) in UNS, *Myf5*⁺, and *Myf5*⁻ cell fractions in relation to the total number of cells are shown. Bars represent means ± SEM. Statistical significance values (determined by two-tailed unpaired t test) were: in (C), p = 0.1975 (not significant; ns) for the comparison of EYFP⁺ versus EYFP⁻ in UNS condition and ***p = 0.0004 for the comparison of EYFP⁺ (*Myf5*⁺) versus EYFP⁻ (*Myf5*⁻) fractions; in (D), p = 0.771 (ns) for the comparison of EYFP⁺ versus EYFP⁻ populations in the UNS fraction and *p = 0.01 for the comparison of EYFP⁺ (*Myf5*⁺) versus EYFP⁻ (*Myf5*⁻) fractions. See also Figures S1 and S2.

versus EYFP⁻ in UNS condition and ***p = 0.0004 for the comparison of EYFP⁺ (*Myf5*⁺) versus EYFP⁻ (*Myf5*⁻) fractions; in (D), p = 0.771 (ns) for the comparison of EYFP⁺ versus EYFP⁻ populations in the UNS fraction and *p = 0.01 for the comparison of EYFP⁺ (*Myf5*⁺) versus EYFP⁻ (*Myf5*⁻) fractions. See also Figures S1 and S2.

(Jinno et al., 2010), and crossed it with *R26EYFP*^{+/fl} reporter mice (Figure 1). Dorsal and ventral dermis-derived precursors from *Myf5*^{cre/+};*R26EYFP* double transgenic mice were isolated and expanded in sphere culture (Figure 1A). Consistent with previous reports, a majority (61.6% ± 9.1%, n = 3) of sphere cells from back skin were traced by *Myf5*-cre^{Sor} expression (EYFP⁺ cells), as assessed by immunofluorescence and flow cytometry (Figure 1B). In the ventral dermis, we noticed the existence of a small and previously overlooked *Myf5*⁺ cell population (1.9% ± 2.2%, n = 15) that was difficult to reconcile with a lateral plate mesoderm origin of precursor cells in this region (Ohtola et al., 2008). Besides a morphology consistent with neural-competent, dedifferentiated Schwann cells (lower panel of Figure 1B; see also Figure S1 and Etzaniz et al., 2014), the *Myf5*⁺ cells expressed neural precursor cell marker NESTIN (Figure S1). To determine whether the *Myf5*⁺ cells from ventral skin presented *in vitro* neural differentiation capacities, we isolated cell fractions from *Myf5*^{cre/+};*R26EYFP* mice by fluorescence-activated cell sorting (FACS) through EYFP expression, put them into differentiation media, and quantified their neural progeny by immunofluorescence with anti-GFAP and anti-βIII TUBULIN antibodies (Figures 1C and 1D). In both cases, the *Myf5*⁺ cells showed a significant increase in neural differentiation capacity when compared with the *Myf5*⁻ fraction, which was more evident for the glial-specific antibody GFAP (15.5-fold versus 2.5-fold increase in βIII TUBULIN⁺ cells; Figures 1C and

1D). Furthermore, the differentiated cultures of the *Myf5*⁺ fraction presented a characteristic bipolar glial morphology that was corroborated by co-staining with markers p75NTR, GFAP, βIII TUBULIN, and S100β (Figures S1A–S1P). Interestingly, *Myf5*⁺ cells expressed SOX2, a transcription factor associated with dermal stem cells (Figures S1Q–S1T). These data suggested that a SOX2⁺ neural precursor cell population (unexpectedly traced by *Myf5* expression) retained neural competence in mouse ventral dermis.

To further characterize *in vitro* differentiated cells, we determined the expression of key markers of the Schwann cell lineage (Etzaniz et al., 2014) by real-time qRT-PCR (Figure S2). We selected the genes *Ngfr* (coding for p75NTR), *Cdh19* (CADHERIN 19), *Egr1* (KROX24), *Gap43* (GAP43), *Ncam1* (CD56), *S100b* (S100β), and *Egr2* (KROX20) to discriminate between the different stages of Schwann cell lineage determination (Figures S2A and S2B). Analysis of mRNA expression for these genes demonstrated that markers specific of Schwann cell precursors (SCP), such as *Cdh19*, as well as genes shared by SCPs and immature Schwann cells (such as *Egr1* and *Gap43*) were upregulated in differentiated *Myf5*⁺ cells, indicating that significant numbers of cells remained in precursor state in culture. The more differentiated cells seem to belong to the non-myelinating Schwann lineage as shown by the expression patterns of *Ngfr*, *Gap43*, *Ncam1*, *S100b*, and *Egr2* (Figure S2C). In all, these data suggested that *Myf5*-cre^{Sor} cells might belong to the Schwann lineage and give rise to Schwann cells *in vitro*.

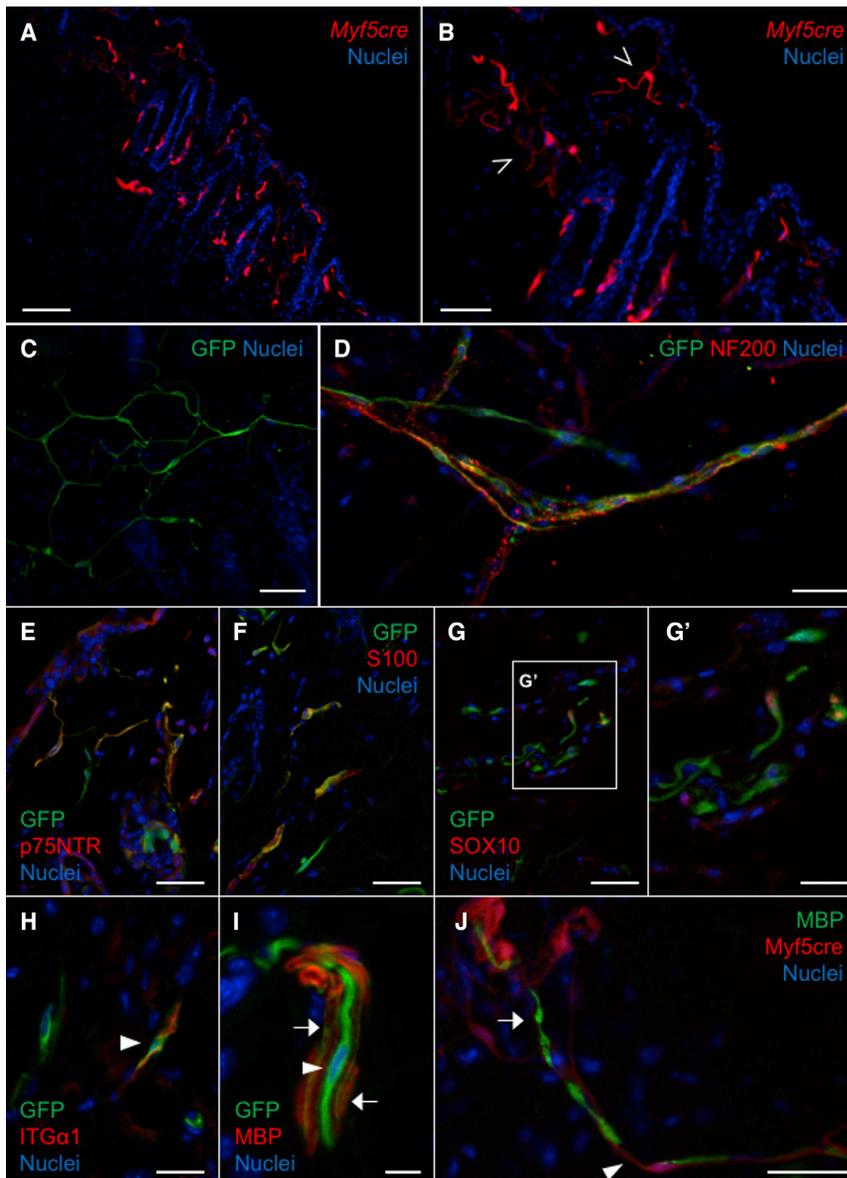


Figure 2. *In Situ* Localization of *Myf5*⁺ Cells in Mouse Ventral Dermis

(A and B) Ventral skin sections of *Myf5*^{cre/+};*R26*^{TdTomato} were directly visualized under the microscope and showed a nerve fiber-like pattern of *Myf5* expression (TdTomato, red) across the entire dermal papillary layer. Open arrowheads in (B) point to Schwann cells (SC) of the subepidermal plexus.

(C and D) Whole-mount preparations of *Myf5*^{cre/+};*R26*^{EYFP} ventral dermis were stained with anti-GFP (to detect EYFP, green) and imaged in (C) at the subepidermal plexus level and in (D) in thin subepidermal nerves running along NF200⁺ (red) peripheral axons.

(E–G') *Myf5*⁺ cells (GFP, green) forming the subepidermal nerve plexus stained positive to p75NTR (E; red), S100 (F; red), and SOX10 (G and G'; red) glial markers.

(H–J) A subset of *Myf5*⁺ cells (GFP, green) expressed the non-myelinating SC marker INTEGRIN α 1 (H; red; arrowhead), while other *Myf5*⁺ cells co-localized with myelin basic protein. (I) Some *Myf5*⁺ cells (GFP, green) co-localized with myelin basic protein (MBP, red), and thus constitute myelinating SCs (arrows). A subset of *Myf5*⁺ cells lacked co-localization with MBP, and thus constitute non-myelinating SCs (arrowhead). (J) An example of non-myelinating *Myf5*⁺ cells traced by TdTomato reporter (red, arrowhead). MBP staining is shown in green (arrow).

All sections were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars represent 50 μ m in (A), (C), and (D), 25 μ m in (B), 20 μ m in (E), (F), (G), and (J), and 10 μ m in (G'), (H), and (I).

In Situ Localization of Ventral *Myf5*-*cre*^{Sor+} Cells Corroborates Their Schwann Cell Identity

To investigate the identity and localization of *Myf5*⁺ cells in the dermis, we first analyzed ventral skin sections of adult *Myf5*^{cre/+};*R26*^{TdTomato} mice. *Myf5*-*cre*^{Sor+} cells presented a regular fiber-like pattern (Figures 2A and 2B) reminiscent of Schwann cells of the superficial cutaneous nerve network (Gresset et al., 2015). In fact, a distinct subset of *Myf5*⁺ cells in subepidermal location showed a unique morphology, with long processes expanding from the cell body (Figure 2B, open arrowheads). This is characteristic of terminal Schwann cells (teloglia) that ensheath nociceptive nerve endings at the dermo-epidermal inter-

face (Gresset et al., 2015). To better understand the spatial distribution of *Myf5*⁺ cells, we performed whole-mount ventral dermis analyses (Fujiwara et al., 2011; Tschachler et al., 2004) of the *Myf5*^{cre/+};*R26*^{EYFP} strain. *Myf5*⁺ cells (detected with anti-GFP) formed a subepidermal network (Figure 2C) of elongated bipolar cells that were associated with NF200⁺ peripheral nerves (Figure 2D). The *Myf5*⁺ cells also co-localized with glial markers p75NTR, S100 β , and SOX10 (Figures 2E–2G'), and presented phenotypes consistent with both myelinating and non-myelinating Schwann cells. Non-myelinating Schwann cells were INTEGRIN α 1⁺ (Figure 2H, arrowhead) and myelin basic protein negative (MBP⁻) (Figure 2I, arrowhead; Figure 2J).

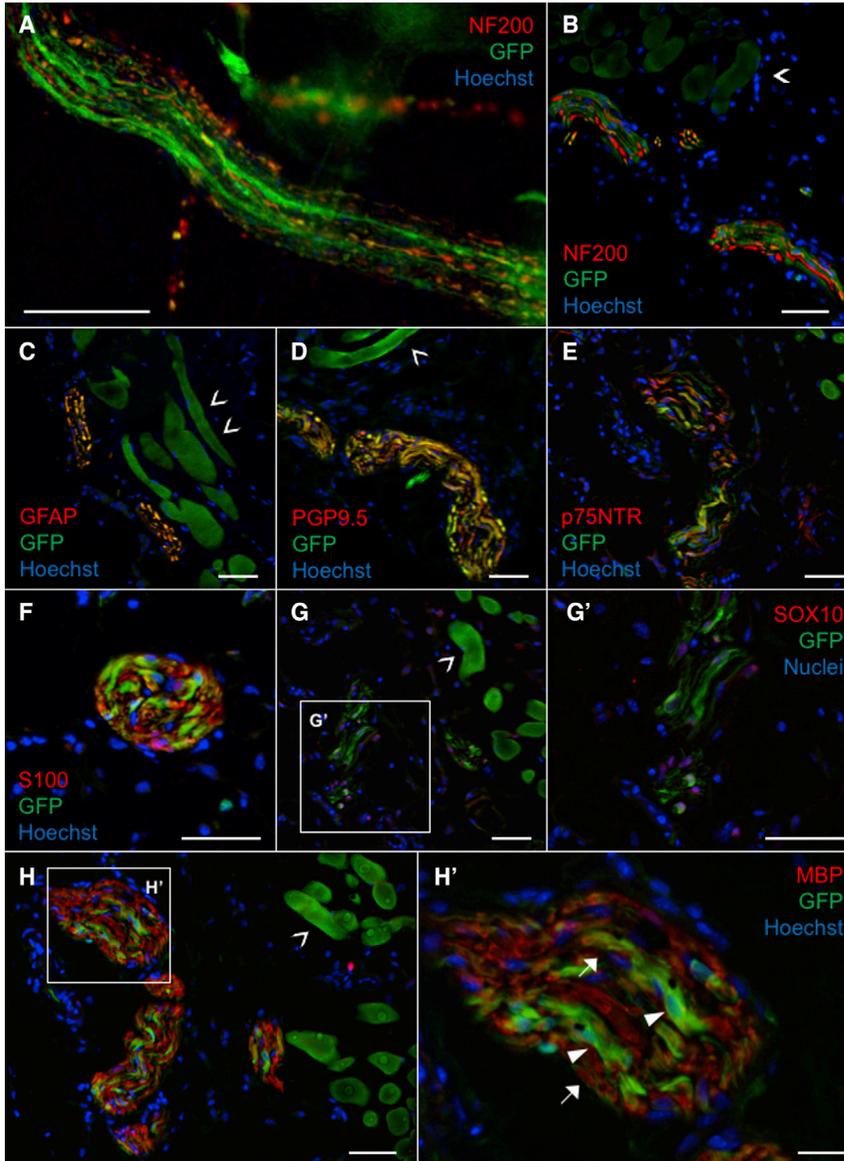


Figure 3. *Myf5* Is Expressed by Cells Ensheathing Thick Nerve Bundles at the Level of the Dermal *panniculus carnosus* Muscle

(A and B) Immunostaining of *Myf5^{cre/+}; R26^{EYFP}* mice dermal whole-mount (A) and ventral skin sections (B) showing thick NF200⁺ (red) nerve bundles ensheathed by *Myf5⁺* Schwann cells (GFP, green).

(B–H) *Panniculus carnosus* muscle was traced by this construct (GFP, green; open arrowheads), as well as thick nerve bundles that co-stained with GFAP (C; red), PGP9.5 (D; red), p75NTR (E; red), S100 (F, red), and SOX10 (G and G'; red). Analysis of MBP (H and H'; red) revealed some co-localization of *Myf5⁺* cells (GFP, green), indicative of myelinating (MBP⁺) Schwann cells (arrows). Non-myelinating Schwann cells (arrowheads) were also clearly detected.

All sections were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars represent 50 μ m in (A), 25 μ m in (B) to (H), and 20 μ m in (H').

MBP⁺ myelinating Schwann cells were also detected, although GFP expression was greatly diminished (Figure 2I, arrows).

At the deep dermis, thicker NF200⁺ and PGP9.5⁺ nerve bundles (Figures 3A, 3B, and 3D) were ensheathed by *Myf5⁺* cells that co-localized with glial markers GFAP, p75NTR, S100 β , and SOX10 (Figures 3C–3G'). These nerves form the subcutaneous plexus at the level of the dermal *panniculus carnosus* muscle (Naldaiz-Gastesi et al., 2016), which was also traced by *Myf5-cre^{Sor}* (open arrowheads in Figures 3B–3D, 3G, and 3H). Again, both myelinating (Figure 3H', arrows) and non-myelinating (Figure 3H', arrowheads) Schwann cells were detected as assessed by co-localization with MBP.

In the hair follicles, glial cells forming the mechanosensory lanceolate complex (Li and Ginty, 2014) were also *Myf5-cre^{Sor+}* (Figure 4A). Hair-follicle-associated *Myf5⁺* cells were p75NTR⁺, S100 β ⁺, and NESTIN⁺ (Figures 4B–4E), as described for the lanceolate complex glial cells (Johnston et al., 2013). In addition, *Myf5⁺* cells were occasionally detected in three other locations (Figures S3–S5): (1) perivascular *Myf5⁺* cells (Figure S3) were consistent with a pericyte identity, as they displayed a characteristic morphology (Figures S3C and S3D; arrows) and co-expressed pericytic markers α -smooth muscle actin (α SMA) and platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β); (2) dermal nerve cells ensheathing axons in SOX2⁺ touch domes (Reinisch and Tschachler, 2005) were also *Myf5⁺* (Figure S4); and

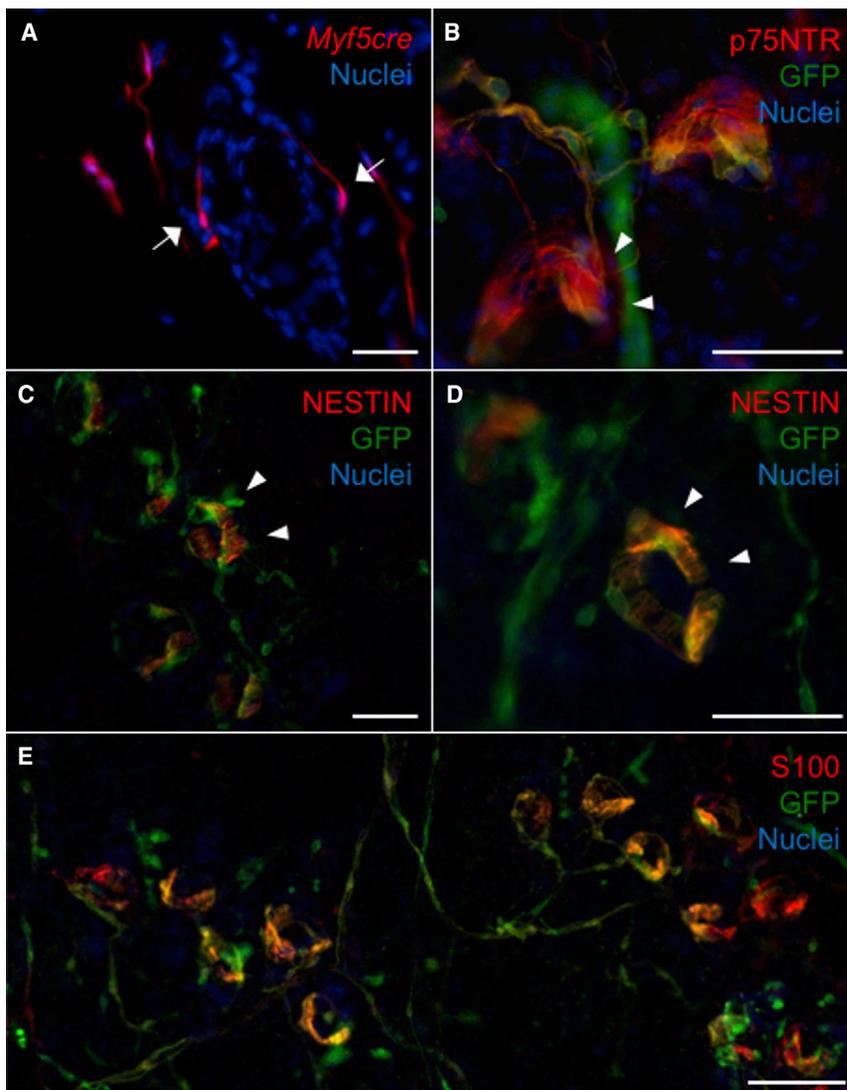


Figure 4. Schwann Cells Forming the Lanceolate Complexes of Hair Follicles Are Traced by $Myf5^{cre/+};R26^{EGFP}$

(A) $Myf5$ expression (TdTomato, red) in sections of $Myf5^{cre/+};R26^{TdTomato}$ was observed in lanceolate Schwann cells (SCs) surrounding hair follicles (arrows).

(B–E) Terminal SCs (GFP, green) analyzed in dermal whole-mount preparations of $Myf5^{cre/+};R26^{EGFP}$ presented finger-shaped processes (arrowheads in B–D) and co-stained to p75NTR (B; red), NESTIN (C and D; red), and S100 (E; red).

All sections were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars represent 25 μm in (A) to (D) and 50 μm in (E). See also Figures S3–S5.

(3) hair-follicle melanocytes were adjacent to the dermal papilla (Figure S5).

In all, these results demonstrated that the small (but reproducible) population of ventral $Myf5^+$ cells are mainly composed of Schwann cells, and also includes rare cells of possible mesenchymal origin such as pericytes, an identity associated with dermal stem cell subsets in human skin (Etxaniz et al., 2014; Feisst et al., 2014; Ruetze et al., 2013; Yamanishi et al., 2012), as well as hair-follicle-associated melanocytes.

Sox2 Expression Levels Correlate with Neural Competence of Mouse Ventral Precursors

The neural competence of dermal precursor cells isolated from human foreskin (and mouse dorsal skin) is regulated by the expression levels of SOX2 (Etxaniz et al., 2014).

To test whether this is also the case for mouse ventral dermis, we separated dermal sphere cells from $Sox2^{+/EGFP}$ mice by FACS according to their EGFP expression levels into SOX2-high, -medium, -low, and -negative populations (Figure 5). The endogenous $Sox2$ mRNA levels correlated with EGFP, as determined by qRT-PCR (Figure 5B). *In vitro* differentiation of freshly isolated cell populations and immunofluorescence analyses with anti-GFAP, anti- β III TUBULIN, and anti-GFP antibodies (surrogate for SOX2; Figures 5D–5G) demonstrated that neural competence was restricted to SOX2^{medium} and SOX2^{high} cell fractions, and correlated with the $Sox2$ mRNA levels of each fraction. Morphology of the SOX2⁺ cells in the differentiated cultures was consistent with a neural identity (Figures 5E and 5G–5I). This was corroborated by co-expression in differentiated cells of markers PGP9.5,

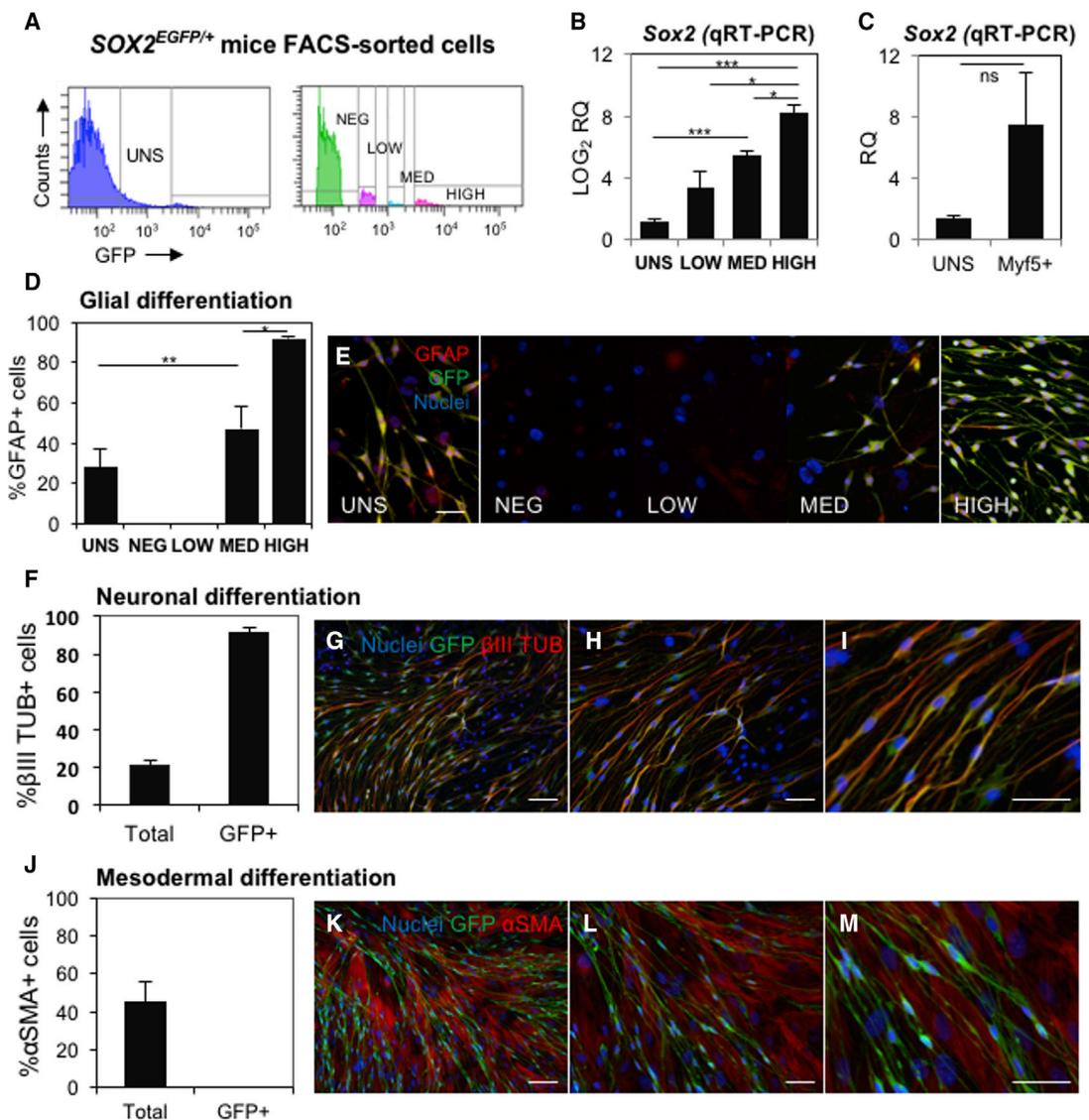


Figure 5. Neural Competence of Ventral Precursors Correlates with Sox2 Expression Levels

(A) Ventral dermis-derived sphere cultures from *Sox2^{EGFP/+}* mice were sorted by FACS into SOX2-negative (NEG), -low (LOW), -medium (MED), and -high (HIGH) subpopulations according to their EGFP levels.

(B) *Sox2* mRNA levels of separated cell fractions measured by qRT-PCR. Log₂ relative quantification (LOG₂ RQ) is shown in comparison with the NEG fraction. Mean values and SEM are represented (n = 3). Statistical significance (two-tailed unpaired t test): ***p = 0.0003 for comparison of HIGH versus UNS, *p = 0.0113 for HIGH versus LOW, *p = 0.0113 for HIGH versus MED, and ***p = 0.0003 for UNS versus MED. No statistical significance (ns) was found in all other comparisons.

(C) *Sox2* mRNA levels measured in the UNS and *Myf5*⁺ cell fractions measured by qRT-PCR. The mean RQ value is represented for each fraction in comparison with the *Myf5*⁻ cell fraction. Error bars indicate SEM (n = 4). Statistical analysis value (two-tailed unpaired t test) was not significant (p = 0.0654).

(D) *In vitro* glial differentiation of UNS, NEG, LOW, MED, and HIGH populations isolated from *Sox2^{EGFP/+}* dermal cultures. Quantification of the percentage of GFAP⁺ cells in relation to the total number of cells. Error bars indicate SEM (n = 3). Statistical significance (two-tailed unpaired t test) values were **p = 0.0021 for comparison of UNS versus HIGH fraction and *p = 0.0149 for HIGH versus MED. No statistical significance was found in any other comparisons.

(E) Representative images of *in vitro* differentiated cultures of the UNS, NEG, LOW, MED, and HIGH cell fractions, stained with anti-GFP (*Sox2^{EGFP}*, green) and anti-GFAP (red).

(F) *In vitro* neuronal differentiation of unsorted *Sox2^{EGFP/+}* dermal cultures. Quantification of the percentage of βIII TUBULIN⁺ cells in relation to the total number of cells and GFP⁺ cells are shown. Error bars indicate SEM (n = 3).

(legend continued on next page)



TH, p75NTR, and NESTIN (Figure S6). In contrast, SOX2⁺ cells showed no mesodermal differentiation capacities, as assessed by co-expression of α SMA marker (Figures 5J–5M). Finally, to analyze whether the increased neural competence of *Myf5*⁺ cells also correlated with *Sox2* expression, spheres from *Myf5*^{cre/+};R26^{EYFP} mice were sorted into *Myf5*⁺ and *Myf5*⁻ fractions and the *Sox2* mRNA levels were measured by qRT-PCR (Figure 5C). *Sox2* mRNA expression was 6.9-fold higher in the *Myf5*⁺ fraction (although non-significant). Overall, these results indicate that the neural competence of ventral dermal precursors might be regulated by SOX2 expression levels, as previously demonstrated for dorsal precursors (Etxaniz et al., 2014).

Myf5⁺ Cells in the Ventral Dermis Partially Overlap with Resident SOX2⁺ Cells

To define the relationship between SOX2⁺ and *Myf5*⁺ cells in the ventral dermis, we analyzed skin biopsies of *Sox2*^{+/EGFP} mice in dermal whole-mount preparations. At the subepidermal level, SOX2⁺ cells (stained with anti-GFP) were associated with the cutaneous peripheral nerve plexus, where they ensheathed NF200⁺ axons and co-stained with glial marker S100 β (Figures 6A–6C). In hair follicles, SOX2 expression was localized in the lanceolate complexes (arrows in Figure 6D; Figures 6D–6F). Each receptor was individually innervated by a subset of peripheral axons that sprouted out from a dense network of NF200⁺ dermal nerves (Figure 6E). Lanceolate ending SOX2⁺ cells co-stained with NESTIN and S100 β (Figures 6G–6H'). Additionally, SOX2⁺ cells were occasionally detected at the dermal papilla/dermal cup of some hair follicles (arrowheads; Figures 6D and 6G). SOX2⁺ pericytes were not detected. Since both SOX2⁺ and *Myf5*⁺ cells of ventral dermis overlap in similar dermal compartments, and to ascertain whether these markers were present in the same cells, we crossed *Myf5*^{cre/+};R26^{TdTomato} mice with *Sox2*^{+/EGFP}. The analysis of whole-mount samples from the ventral dermis of *Myf5*^{cre/+};R26^{TdTomato}; *Sox2*^{+/EGFP} triple transgenic mice confirmed that lanceolate ending *Myf5*⁺ cells (seen as TdTomato⁺ cells in these experiments) co-expressed SOX2 (arrows in Figures 6I and 6J). Both markers were also co-expressed by Schwann cells of the cutaneous plexus, although this was more difficult to visualize due to the apparently lower SOX2 expression levels (data not shown).

Schwann Cells in the Ventral Dermis Are Not Traced by a More Restricted *Myf5* Lineage Strain

Tracing of Schwann cells by *Myf5* expression would in principle be unexpected. Of note, a cause for concern with the *Myf5*^{tm3(cre)Sor} mouse model is that transgene expression is constitutive, and widespread when crossed with R26YFP (Eppig et al., 2015 and data not shown). To clarify whether tracing by the *Myf5-cre*^{Sor} transgene was truly indicative of *Myf5*⁺ cell lineage or was otherwise aberrant, we used a second *cre*-expressing strain (*B195AP-cre*) that traces a more restricted subset (17.6% in the dorsal dermis) of bona fide *Myf5*⁺ cells (Naldaiz-Gastesi et al., 2016). In the ventral dermis, 0.7% of sphere cells were B195AP⁺ (EYFP⁺), as assessed by flow cytometry (Figure 7A). *In vitro* glial differentiation of B195AP-positive and -negative cell fractions showed that only the cells negative for *Myf5* expression were able to generate GFAP⁺ cells. Furthermore, B195AP⁺ cells gave rise to MYH2⁺ myotubes *in vitro* (Figures 7B and 7C), which is consistent with tracing of *panniculus carnosus*-derived muscle satellite stem cells by this strain (Figures 7D and 7E; see also Naldaiz-Gastesi et al., 2016). Interestingly, SOX2 expression co-localized with B195AP⁻ cells (Figures 7F and 7F'). Finally, no co-localization of B195AP⁺ cells was observed *in situ* with nerves and Schwann cells, as detected by absence of co-expression or vicinity with cells expressing markers PGP9.5, p75NTR, S100 β , and NF200 (Figures 7G–7J). These results suggest that ventral dermal Schwann cells traced by the *Myf5-cre*^{Sor} transgene do not belong to the *Myf5*⁺ cell lineage, and are most likely explained by aberrant *cre* recombinase expression in the *Myf5-cre*^{Sor} mice.

DISCUSSION

In the last few years, dermal stem/precursor cells and different subsets of fibroblasts have been isolated and variously named by independent research groups. Clearly, the field is in need of harmonization and clarification. This is due in part to the developmental regionalization of the dermis and to the variety of ill-described dermal stem cell niches, but also to the lack of markers that uniquely distinguish stem cells.

In this article, we demonstrate that the neural-competent cells in ventral dermis are Schwann cells aberrantly traced by the *Myf5-cre*^{Sor} construct. This is certainly true for ventral dermis and seems probable for dorsal dermis

(G–I) Representative images of differentiated cultures, stained with anti-GFP (*Sox2*^{EGFP}, green) and anti- β III TUBULIN (β III, red).

(J) *In vitro* mesodermal differentiation of unsorted *Sox2*^{EGFP/+} dermal cultures. Quantification of the percentage of α SMA⁺ cells in relation to the total number of cells and GFP⁺ cells are shown. Error bars indicate SEM (n = 3).

(K–M) Representative images of differentiated cultures, stained with anti-GFP (*Sox2*^{EGFP}, green) and anti- α SMA (red). Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (blue) in all panels.

Scale bars represent 25 μ m in (E), (H), (I), (L), and (M), and 50 μ m in (G) and (K). See also Figure S6.

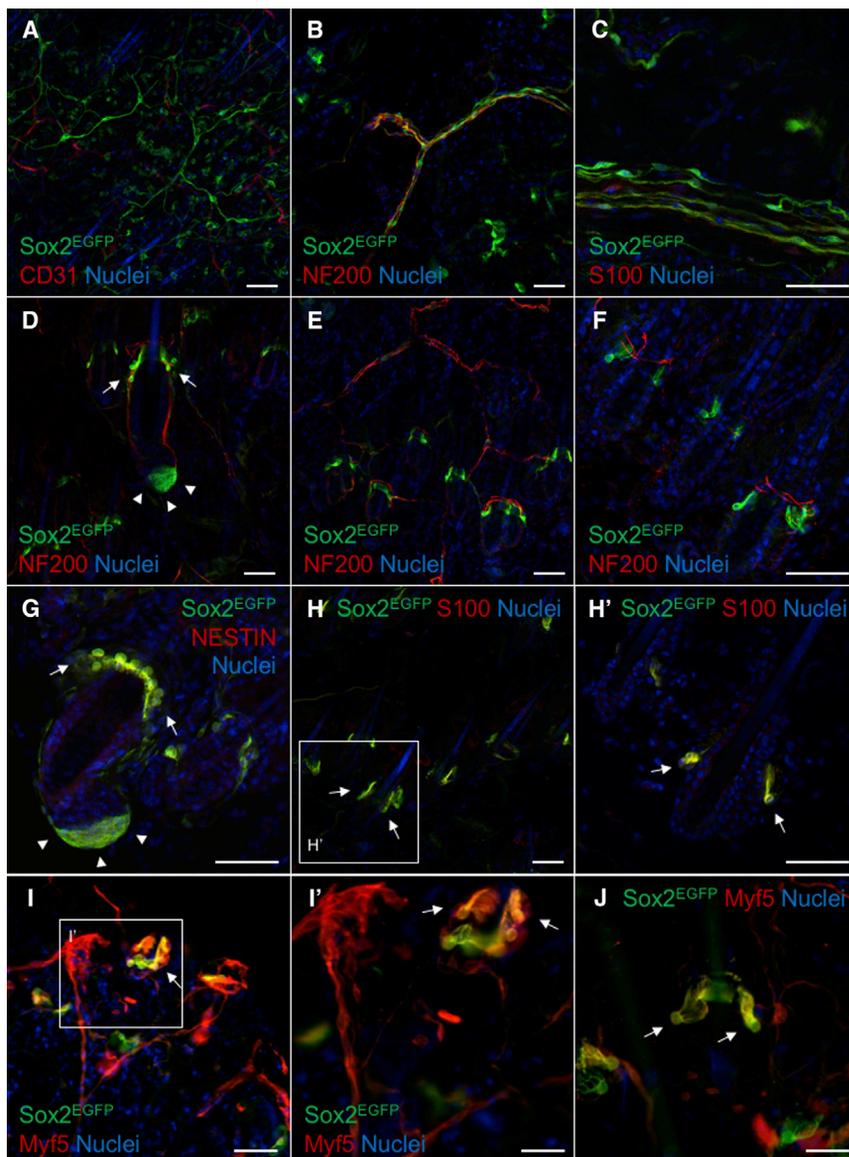


Figure 6. *In Situ* Localization of Sox2^{EGFP+} Cells in Mouse Ventral Dermis

(A–C) Immunostaining of ventral dermal whole-mount preparations from Sox2^{EGFP/+} mice. Sox2^{EGFP} is expressed in peripheral nerve endings innervating the skin. (A) SOX2⁺ cells (Sox2^{EGFP}; green) detected in the subepidermal nerve plexus, which does not co-localize with CD31⁺ blood vessels (red); and (B) ensheathing NF200⁺ nerve fibers (red). (C) Deeper in the dermis, Sox2^{EGFP} cells (green) forming thick nerve bundles co-expressed glial marker S100 (red).

(D) In hair follicles (HFs) Sox2 expression (Sox2^{EGFP}, green) is detected in the lanceolate complexes (arrows) and in a subset of HF dermal papillae (arrowheads).

(E and F) SOX2⁺ cells (Sox2^{EGFP}, green) located in the bulge region of HFs innervated by NF200⁺ nerve endings (red).

(G–H') Lanceolate complex cells expressed NESTIN (G; red) and S100 (H and H'; red) (arrows). Dermal papilla/dermal cup cells are marked with arrowheads in (G).

(I–J) Dermal whole-mount preparations of Myf5^{cre/+};R26^{TdTomato};Sox2^{+/EGFP} showing co-expression of Myf5 (TdTomato, red) and Sox2^{EGFP} (green) in lanceolate complexes (arrows).

All sections were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars represent 50 μm in (A) to (I) and 25 μm in (I') and (J).

as well, although most dorsal dermal cells are traced by Myf5 expression, and this fact complicates the matter of discriminating among multiple components of the cell fractions. Tracing by Myf5 expression by a second strain (*B195AP-cre*) showed that Schwann cells do not originate in a bona fide Myf5⁺ cell lineage. Thus the tracing by Myf5-cre^{Sor} mice (Jinno et al., 2010) does not actually represent the existence of a Myf5⁺ cell population that generates Schwann cells. A similar picture may emerge from *Dermo1* (*Twist2*)⁺ cell fate analyses (Krause et al., 2014), since the tracing construct used by these authors also presents widespread expression (including neural tissue), similar to Myf5-cre^{Sor} mice (Eppig et al., 2015).

Adult dermal stem cells of diverse niches are all considered to be SOX2⁺ (a marker that, once more, is not

specific for dermal stem cells [Agabalyan et al., 2016]). In mouse dorsal skin, the diverse SOX2⁺ cell niches are well characterized (Biernaskie et al., 2009; Clavel et al., 2012; Driskell et al., 2009; Lesko et al., 2013) but the expression levels of this transcription factor are cell-context dependent and highly dynamic. Besides, Schwann cell dedifferentiation in response to wounding accounts for the majority of SOX2⁺ cells populating the wound bed (Johnston et al., 2013). In this context, we showed here that cell populations aberrantly traced by the Myf5-cre^{Sor} construct seem to be coincident with those previously described as SOX2⁺ by diverse groups. In our hands, *in situ* SOX2⁺ compartments matched between ventral and dorsal skin of Sox2^{+/EGFP} mice (data not shown).

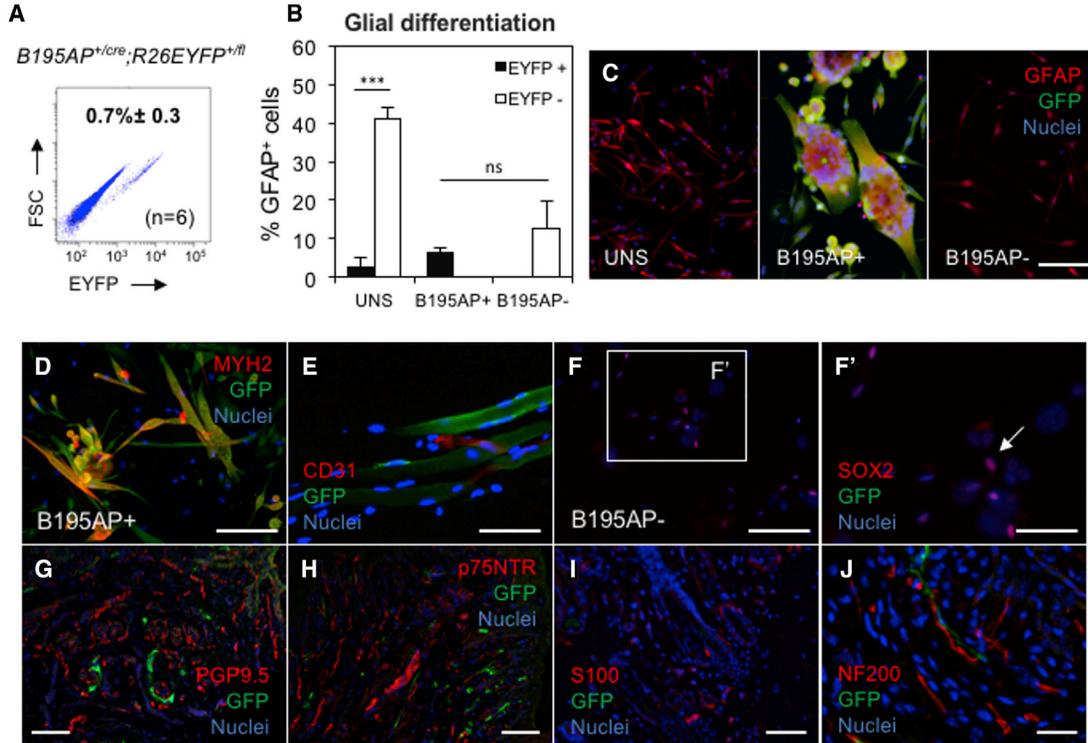


Figure 7. Neural-Competent Cells of Mouse Ventral Dermis Do Not Belong to the *Myf5*⁺ Lineage

(A) *B195AP*⁺ cell percentages (mean ± SD) were determined by flow cytometry (EYFP expression) in dermal sphere cultures from *B195AP*^{cre/+}; *R26*^{EYFP} mouse ventral skin (n, number of biological replicates).

(B) *In vitro* glial differentiation of unsorted (UNS) and FACS-sorted *B195AP*⁺ and *B195AP*⁻ cell fractions from *B195AP*^{cre/+}; *R26*^{EYFP} ventral dermal spheres. Quantification of the neural progeny as percent GFAP⁺ cells in UNS, *B195AP*⁺, and *B195AP*⁻ cell fractions is shown in relation to the total number of cells. Bars represent means ± SEM. Statistical significance values (determined by two-tailed unpaired t test) were ***p = 0.0006 for comparison of EYFP⁺ versus EYFP⁻ in UNS condition and p = 0.4596 (not significant; ns) for EYFP⁺ (*B195AP*⁺) versus EYFP⁻ (*B195AP*⁻) fractions.

(C–F) Representative immunofluorescence (IF) images of *in vitro* differentiated UNS, *B195AP*⁺, and *B195AP*⁻ cell fractions (C) stained with anti-GFP (*B195AP*, green) and anti-GFAP antibody (red). *B195AP*⁺ cells (GFP, green) co-expressed the myogenic marker MYH2 (D; red). SOX2 was detected only in the *B195AP*⁻ fraction (F and F'; red nuclei; arrow). (E) In ventral skin sections of *B195AP*^{cre/+}; *R26*^{EYFP}, muscle satellite cells were traced by *B195AP*^{cre} (GFP, green).

(G–J) *B195AP* (GFP, green) did not co-localize or ensheath nerves stained with PGP9.5 (G; red), p75NTR (H; red), S100 (I, red), and NF200 (J, red).

All IFs were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars represent 25 μm in (E) and (F') and 50 μm in all other panels.

In conclusion, aberrantly traced *Myf5*-*cre*^{Sor+} Schwann cells generate neural lineages (mostly Schwann cells) upon *in vitro* differentiation in a SOX2-level-dependent manner. This report sheds light on the identification of adult ventral trunk neural precursor cells and demonstrates that they correspond to dedifferentiated peripheral glia, which derive from the neural crest (Gresset et al., 2015).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Mice (8- to 12-weeks-old) were used in accordance with the relevant Spanish and European guidelines after approval by the Biodonostia Animal Care Committee. Transgenic lines (described in

Table S1) were purchased from JaxMice with the exception of *Sox2*^{+/EGFP} mice, which were donated by Dr. K. Hochedlinger (Harvard University) and *B195AP*-*cre* mice, a gift of Dr. J.J. Carvajal (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo).

Cell Isolation, Culture, and Differentiation

Animals were euthanized by CO₂ inhalation and the dorsal and ventral skin carefully dissected. Dermal cells were processed and put in suspension culture as described by Etzaniz et al. (2014). Dermal sphere cells were separated by FACS (as detailed below), plated onto 12-mm coverslips coated with extracellular matrix (ECM) secreted from 804G cells, growth in adherence, and differentiated in Schwann medium for an additional 7–12 days as described previously (Gago et al., 2009). For neuronal differentiation, dermal spheres were disaggregated and directly plated onto



a specially designed coating on glass coverslips (Garcia-Parra et al., 2014) in Neurobasal medium supplemented with 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1% P/S (Sigma-Aldrich), 2% B27 Supplement (Gibco), 1% N2 Supplement (Gibco), 1% fetal bovine serum (ATCC), 50 ng/mL nerve growth factor β (Sigma-Aldrich), and 50 ng/mL brain-derived neurotrophic factor (Peprotech). For mesodermal differentiation, dermal spheres were disaggregated and directly plated into 12-mm diameter 804G ECM-coated coverslips in the presence of DMEM supplemented with 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1% P/S (Sigma-Aldrich), 20% fetal bovine serum (Lonza), and 10 ng/mL transforming growth factor β III (Gibco). Cells were maintained in differentiation media for 10–14 days.

Cell Sorting

Dermal spheres at day 7 of proliferation were dissociated to a single-cell suspension with 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich), resuspended in sorting buffer, and analyzed in a FACSAria III (Becton Dickinson) with TOPRO exclusion of viable populations. Cell fractions from *Myf5^{Cre/+};R26EYFP* mice were sorted as EYFP-positive and -negative, and *SOX2^{+/-EGFP}* samples were separated according to their SOX2 expression levels. Cells were collected for expansion as described by Etxaniz et al. (2014).

RNA Extraction and Real-Time qPCR

Total RNA was extracted from sorted cells using an miRNeasy micro kit with the automatic QIAcube workstation (Qiagen). Reverse transcription was performed using RNA to cDNA High Capacity Kit (Applied Biosystems). The cDNA of selected genes (SOX2 expression analysis) was specifically amplified (14 cycles) using a PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems). TaqMan probe and SYBR green-based gene expression analyses were performed using 96- and 384-well plates on 7900HT (Applied Biosystems) and Light Cycler 96 (Roche) real-time PCR systems, respectively. Relative quantification analyses were carried out by using the RQ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) method (Livak and Schmittgen, 2001). The significance threshold was set at a fold change of 2. TaqMan probes and SYBR green primer sequences are listed in Tables S2 and S3, respectively.

Immunofluorescence on Coverslips, Frozen Skin Sections, and Dermal Whole Mounts

Dermal sphere cultures and *in vitro* differentiated cells were fixed, permeabilized, stained, and imaged as described by Etxaniz et al. (2014). Tissue samples were embedded in Tissue-Tek (OCT compound, Sakura) and 5 μ m-thick cryostat sections were cut. The staining was performed as described by Jinno et al. (2010). Antibodies used are detailed in Table S4. Dermal whole-mount immunofluorescence has been described elsewhere (Fujiwara et al., 2011; Tschachler et al., 2004).

Image Acquisition

Images were acquired on an LSM510 META confocal microscope (Zeiss) using the ZEN 2008 sp2 software package (v. 4.2), in addition to an Eclipse 80i fluorescence microscope (Nikon) using NIS elements-AR software packages (v.3.2).

Statistical Analyses

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism software v5.01. For multiple group comparisons, a two-tailed unpaired t test was performed. The number of biological replicates (n) for each experiment and average \pm SEM are indicated when applicable, and statistical significance is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures and four tables and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.09.010>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.I. performed most of the experimental work. V.P.-L. helped in cell culturing, mouse genotyping, and histological characterization. U.E. performed some of the initial cell culture and differentiation experiments. A.G.-R. was responsible for mouse colony handling and co-directed experimental work. A.I. directed and financed the project. H.I. and A.I. wrote the manuscript, which was approved by all authors prior to submission.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to K. Hochedlinger and J.J. Carvajal for kindly providing mouse strains and to A. Aduriz, A. Pavón, and M.P. López-Mato for their expert help with confocal and FACS analyses. This work was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (RTC-2015-3750-1) and the Instituto de Salud Carlos III (PI13/02172, PI16/01430), co-funded by the European Union (ERDF/ESF, “Investing in your future”). H.I. received a studentship from the Department of Education, University and Research of the Basque Government (PRE2013-1-1068).

Received: November 11, 2016

Revised: September 12, 2017

Accepted: September 13, 2017

Published: October 12, 2017

REFERENCES

- Agabalyan, N.A., Hagner, A., Rahmani, W., and Biernaskie, J. (2016). SOX2 in the skin. In *Sox2—Biology and Role in Development and Disease*, H. Kondoh and R. Lovell-Badge, eds. (Academic Press), pp. 281–300.
- Agabalyan, N.A., Rosin, N.L., Rahmani, W., and Biernaskie, J. (2017). Hair follicle dermal stem cells and skin-derived precursor cells: exciting tools for endogenous and exogenous therapies. *Exp. Dermatol.* 26, 505–509.
- Biernaskie, J., Paris, M., Morozova, O., Fagan, B.M., Marra, M., Pevny, L., and Miller, F.D. (2009). SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 610–623.
- Christ, B., Huang, R., and Scaal, M. (2007). Amniote somite derivatives. *Dev. Dyn.* 236, 2382–2396.



- Clavel, C., Grisanti, L., Zemla, R., Rezza, A., Barros, R., Sennett, R., Mazloom, A.R., Chung, C.-Y., Cai, X., Cai, C.-L., et al. (2012). Sox2 in the dermal papilla niche controls hair growth by fine-tuning BMP signaling in differentiating hair shaft progenitors. *Dev. Cell* 23, 981–994.
- Driskell, R.R., Giangreco, A., Jensen, K.B., Mulder, K.W., and Watt, F.M. (2009). Sox2-positive dermal papilla cells specify hair follicle type in mammalian epidermis. *Development* 136, 2815–2823.
- Dupin, E., and Sommer, L. (2012). Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev. Biol.* 366, 83–95.
- Eppig, J.T., Blake, J.A., Bult, C.J., Kadin, J.A., and Richardson, J.E. (2015). The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic Acids Res.* 43, D726–D736.
- Etzaniz, U., Pérez-San Vicente, A., Gago-López, N., García-Domínguez, M., Iribar, H., Aduriz, A., Pérez-López, V., Burgoa, I., Irizar, H., Muñoz-Culla, M., et al. (2014). Neural-competent cells of adult human dermis belong to the Schwann lineage. *Stem Cell Reports* 3, 774–788.
- Feisst, V., Brooks, A.E., Chen, C.J., and Dunbar, P.R. (2014). Characterization of mesenchymal progenitor cell populations directly derived from human dermis. *Stem Cells Dev.* 23, 631–642.
- Fernandes, K.J.L., McKenzie, I.A., Mill, P., Smith, K.M., Akhavan, M., Barnabé-Heider, F., Biernaskie, J., Junek, A., Kobayashi, N.R., Toma, J.G., et al. (2004). A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat. Cell Biol.* 6, 1082–1093.
- Fujiwara, H., Ferreira, M., Donati, G., Marciano, D.K., Linton, J.M., Sato, Y., Hartner, A., Sekiguchi, K., Reichardt, L.F., and Watt, F.M. (2011). The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell* 144, 577–589.
- Gago, N., Pérez-López, V., Sanz-Jaka, J.P., Cormenzana, P., Eizaguirre, I., Bernad, A., and Izeta, A. (2009). Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells* 27, 1164–1172.
- García-Parra, P., Naldaiz-Gastesi, N., Maroto, M., Padin, J.F., Goicoechea, M., Aiausti, A., Fernández-Morales, J.C., García-Belda, P., Lacalle, J., Alava, J.I., et al. (2014). Murine muscle engineered from dermal precursors: an in vitro model for skeletal muscle generation, degeneration, and fatty infiltration. *Tissue Eng. Part C Methods* 20, 28–41.
- Gresset, A., Couplier, F., Gerschenfeld, G., Jourdon, A., Matesic, G., Richard, L., Vallat, J.-M., Charnay, P., and Topilko, P. (2015). Boundary caps give rise to neurogenic stem cells and terminal glia in the skin. *Stem Cell Reports* 5, 278–290.
- Hunt, D.P., Jahoda, C., and Chandran, S. (2009). Multipotent skin-derived precursors: from biology to clinical translation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 522–530.
- Jessen, K.n.R., Mirsky, R., and Lloyd, A.C. (2015). Schwann cells: development and role in nerve repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020487.
- Jinno, H., Morozova, O., Jones, K.L., Biernaskie, J.A., Paris, M., Hosokawa, R., Rudnicki, M.A., Chai, Y., Rossi, F., Marra, M.A., et al. (2010). Convergent genesis of an adult neural crest-like dermal stem cell from distinct developmental origins. *Stem Cells* 28, 2027–2040.
- Joannides, A., Gaughwin, P., Schwiening, C., Majed, H., Sterling, J., Compston, A., and Chandran, S. (2004). Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *Lancet* 364, 172–178.
- Johnston, A.P.W., Naska, S., Jones, K., Jinno, H., Kaplan, D.R., and Miller, E.D. (2013). Sox2-mediated regulation of adult neural crest precursors and skin repair. *Stem Cell Reports* 1, 38–45.
- Krause, M.P., Dworski, S., Feinberg, K., Jones, K., Johnston, A.P.W., Paul, S., Paris, M., Peles, E., Bagli, D., Forrest, C.R., et al. (2014). Direct genesis of functional rodent and human schwann cells from skin mesenchymal precursors. *Stem Cell Reports* 3, 85–100.
- Lesko, M.H., Driskell, R.R., Kretzschmar, K., Goldie, S.J., and Watt, F.M. (2013). Sox2 modulates the function of two distinct cell lineages in mouse skin. *Dev. Biol.* 382, 15–26.
- Li, L., and Ginty, D.D. (2014). The structure and organization of lanceolate mechanosensory complexes at mouse hair follicles. *Elife* 3, e01901.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Millar, S.E. (2005). An ideal society? Neighbors of diverse origins interact to create and maintain complex mini-organs in the skin. *PLoS Biol.* 3, e372.
- Naldaiz-Gastesi, N., Goicoechea, M., Alonso-Martín, S., Aiausti, A., López-Mayorga, M., García-Belda, P., Lacalle, J., San José, C., Araúzo-Bravo, M.J., Trouilh, L., et al. (2016). Identification and characterization of the dermal panniculus carnosus muscle stem cells. *Stem Cell Reports* 7, 411–424.
- Ohtola, J., Myers, J., Akhtar-Zaidi, B., Zuzindlak, D., Sandesara, P., Yeh, K., Mackem, S., and Atit, R. (2008). beta-Catenin has sequential roles in the survival and specification of ventral dermis. *Development* 135, 2321–2329.
- Olivera-Martinez, I., Viallet, J.P., Michon, F., Pearton, D.J., and Dhouailly, D. (2004). The different steps of skin formation in vertebrates. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 107–115.
- Reinisch, C.M., and Tschachler, E. (2005). The touch dome in human skin is supplied by different types of nerve fibers. *Ann. Neurol.* 58, 88–95.
- Ruetze, M., Knauer, T., Gallinat, S., Wenck, H., Achterberg, V., Maerz, A., Depfert, W., and Knott, A. (2013). A novel niche for skin derived precursors in non-follicular skin. *J. Dermatol. Sci.* 69, 132–139.
- Tschachler, E., Reinisch, C.M., Mayer, C., Paiha, K., Lassmann, H., and Weninger, W. (2004). Sheet preparations expose the dermal nerve plexus of human skin and render the dermal nerve end organ accessible to extensive analysis. *J. Invest. Dermatol.* 122, 177–182.
- Yamanishi, H., Fujiwara, S., and Soma, T. (2012). Perivascular localization of dermal stem cells in human scalp. *Exp. Dermatol.* 21, 78–80.

Does Schwann cell dedifferentiation originate dermal neurofibromas?

Abstract

Dermal neurofibromas are characteristic of neurofibromatosis type one (NF1), and their developmental origin still unsolved. Although NF1 loss is required for neurofibroma initiation, some features of these benign tumors resemble a skin injury state and cutaneous trauma or other insults might support tumor development. Since adult terminal Schwann cells ensheathing nerve endings are able to dedifferentiate into a progenitor-like state in response to nerve crushing, we hypothesized that dedifferentiation of NF1^{-/-} Schwann cells could be at the origin of human dermal neurofibromas. In support of this, here we show that CDH19 (a marker specific of Schwann cell precursors) and Schwann cell dedifferentiation marker SOX2 are significantly upregulated in NF1 tumors. We posit that onset of nerve regeneration might have a role in dermal neurofibroma initiation via dedifferentiation of NF1^{-/-} Schwann cells.

1 | BACKGROUND

Neurofibromas are benign peripheral nerve sheath tumors known to contain a subpopulation of NF1^{-/-} Schwann cells (SCs) and a variety of NF1^{+/-} (haploinsufficient) cell types.⁵¹ Dermal neurofibromas (dNF) occur in virtually all adults with neurofibromatosis type 1 (NF1) and unlike plexiform neurofibromas, present a restricted growth and no malignant transformation potential. This phenotype may reflect the developmentally late occurrence of the NF1 second-hit mutation.¹ In fact, it has been suggested that adult multipotent stem/progenitor cells could originate dNFs.²⁻⁴ Nevertheless, dedifferentiation of a terminal SC that has suffered a second-hit mutation remains an enticing possibility.⁵

2 | PREMISES

1. NF1^{-/-} SCs originate dNFs (reviewed by ref. 4).⁵²⁻⁵⁶
2. Trauma to the skin and cutaneous nerves induces nerve regeneration and hypertrophy, activating the nearby progenitors to transform into a dNF.³ Neurofibromas resemble an injured state in their complex mixture of cells and in that SCs are dedifferentiated and mostly dissociated from axons. In NF1-deficient mice, myelinating SCs (mSCs) give rise to neurofibromas distal to the wound site, suggesting that adult mSCs can be the cell of origin for neurofibromas⁵ and highlighting the importance of tissue injury. Local trauma can also be a factor in the

development of dNFs in NF1 patients.⁵⁷ Neurofibromas have been described as unrepaired wounds.^{5,6}

3. Although loss of Nf1 is required for neurofibroma development, it is not sufficient and tumor microenvironment plays a key role in this process. Poorly regulated wound healing has been described in NF1 haploinsufficient tissues,⁵⁸ again highlighting a possible relationship between wounding and tumor initiation.

3 | HYPOTHESIS

In the skin, terminal SCs ensheath peripheral nerve endings.⁵⁹ These SCs are able to dedifferentiate into a progenitor-like state in response to trauma or other insults.⁶⁻⁸ Furthermore, recent data from our group suggest terminal SCs may behave as bona fide dermal stem cells.⁹ Based on all of these premises, we hypothesize that dedifferentiation of SCs could originate human dNFs.

4 | EVIDENCE SUPPORTING THIS HYPOTHESIS

We analysed the differentiation stage of dNFs of 8 patients diagnosed with NF1 (Data S1), looking at the expression levels of genes characteristic of the different dermal stem cell stages by qRT-PCR of isolated tumor tissue (Fig. 1a,b).⁹ We found that SC markers SOX10 and S100B were upregulated in 100% and 75% of tumors, respectively (Fig. 1c). Interestingly, NGFR, NCAM1 and SOX2, all of them dermal stem cell markers were present in tumors although in variable numbers (Fig. 1d). In contrast, MCAM and SOX9 which mark more differentiated stages were mostly non-expressed in tumors (Fig. 1e). CDH19, a marker of Schwann cell precursors and adult dermal stem cells, was upregulated in 100% (8/8) of the cases (Fig. 1f). Levels of neurofibromin (NF1) were unaltered (75%) or slightly upregulated (25%; data not shown).

To confirm CDH19 expression at the protein level, we analysed dNF and unaffected skin sections of NF1 patients as well as healthy donor skin by immunofluorescence. We confirmed upregulation of CDH19 in dNFs as compared to controls (Fig. S1). The difference was especially clear in the lower dermis, where most lesional NGFR⁺, S100β⁺, and SOX10⁺ cells are present (Figs S2-S4). We also observed that S100β⁺/NGFR⁺ early stage microneurofibromas were present in "unaffected" NF1 patient skin and that, interestingly, CDH19 was also

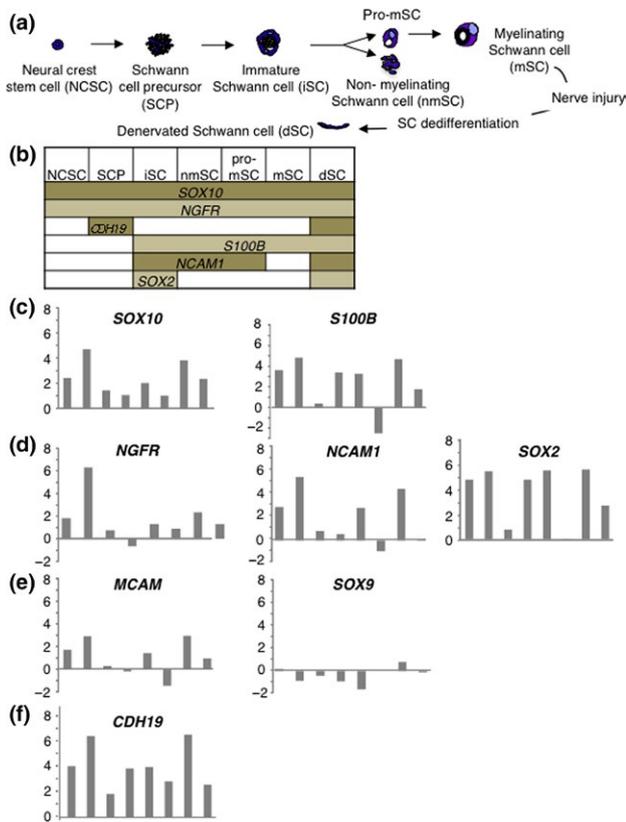


FIGURE 1 Differentiation stages of dermal neurofibromas by qRT-PCR. (a) Schematic representation of Schwann cell lineage development. Description of the embryonic developmental cell lineage from neural crest stem cell (NCSC) to Schwann cell (SC) subtypes, also including an injury-induced, partial dedifferentiation state in the adult (denervated Schwann cell, dSC).⁹ SCP, Schwann cell precursor. iSC, Immature Schwann cell. pro-mSC, Pro-myelinating Schwann cell. mSC, Myelinating Schwann cell. nmSC, non-myelinating Schwann cell. (b) Expression of genes characteristic of each of the stages (as shown in panel a) is indicated by colour-filled boxes. Most markers are expressed in several stages of Schwann cell development or after injury-induced dedifferentiation.⁹ (c–f) Expression of genes characteristic of each of the stages in dermal neurofibromas by qRT-PCR. Each bar represents relative quantification (\log_2 fold change) of genes characteristic of the dermal stem cell stages, normalized to GAPDH

upregulated in those areas (Fig. S5). Finally, we pursued characterization of CDH19 expression by immunofluorescence in dermal spheres isolated from control foreskin and dNFs. As expected, CDH19⁺ cells were detected in both normal and dNF-derived spheres (Fig. S6).

5 | HOW TO TEST THIS HYPOTHESIS

- To test that human NF1^{-/-} dedifferentiated SCs originate dNFs, a xenograft model should be tested in which:
 - Human NF1^{+/-} dermal spheres isolated from unaffected areas of NF1 patient skin may be used to isolate NGFR⁺ NCAM1⁺ (which are CDH19⁺ dedifferentiated SCs) and NGFR⁻ NCAM1⁻ cell fractions (which are non-Schwann, non-perivascular cells).⁹
 - NF1 may be silenced in these cell fractions and then NF1^{+/-} and NF1^{-/-} cells of each fraction transplanted to immunocom-

promised, pregnant NF1^{+/-} female mice to test for dNF development.^{3,510} We predict that only NF1^{-/-} NGFR⁺ NCAM1⁺ cells would form neurofibromas.

- To further demonstrate that SC dedifferentiation, which is mediated by SOX2 expression levels, plays a role, we propose to treat NGFR⁺ NCAM1⁺ cells with pLKO.shSox2⁹ which should abolish neurofibroma formation.
- To discriminate between the possibility of resident dermal precursor or dedifferentiated SCs being responsible for dNFs, we propose to cross two transgenic lines. One in which SOX2⁺ dermal stem cells may be ablated by DTA expression under Sox2-CreERT. The other line would be CMV-CreERT; NF1^{flox/-}.³ In the crossed animals, subcutaneous tamoxifen injections would promote ablation of resident dermal stem cells and deletion of NF1 in dermal SCs. In these animals, we predict that dedifferentiation of SCs would produce dNFs even in the absence of resident dermal stem cells.

6 | RELEVANCE AND PERSPECTIVES

Our preliminary results are consistent with dermal regeneration via SC dedifferentiation playing a role in dNF initiation. Further work is needed in order to confirm these preliminary results in a higher number of patients and to elucidate the molecular mechanisms behind the SC dedifferentiation process, to further illuminate our understanding of human dNF development.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants of Ministerio de Economía y Competitividad (ISCIII-PI10/02871) and Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad of the Basque Government (SAIO10-PE10BF01), Spain, to AI.

AUTHOR CONTRIBUTION

HI, AJ, NO and AGR performed the research. AGR, AI and AT designed the study. HI, NO, AJ and AT contributed to essential reagents or tools. HI, AJ, NO and AGR contributed to data acquisition. AGR and AI analysed the data. AGR and AI wrote the manuscript.

ETHICS APPROVAL

This research was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Donostia on 23 of March of 2011 (certificate no. 3/11).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have declared no conflicting interests.

Keywords

CDH19, dermal neurofibroma, dermal stem cell, neurofibromatosis type one, Schwann cell

Haizea Iribar¹
 Ane Jaka²
 Nerea Ormaechea²
 Anna Tuneu²
 Ander Izeta¹
 Araika Gutiérrez-Rivera¹

¹Tissue Engineering Laboratory, Department of Bioengineering, Instituto Biodonostia, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spain

²Department of Dermatology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spain

Correspondence

Araika Gutiérrez-Rivera,

Tissue Engineering Laboratory, Department of Bioengineering, Instituto Biodonostia, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spain.

Email: araika.gutierrez@biodonostia.org

REFERENCES

1. Le LQ, Liu C, Shipman T, et al. *Cancer Res.* 2011;71:4686–4695.
2. Jouhilahti E-M, Peltonen S, Callens T, et al. *Am J Pathol.* 2011;178:500–505.
3. Le LQ, Shipman T, Burns DK, et al. *Cell Stem Cell.* 2009;4:453–463.
4. Gutiérrez-Rivera A, Iribar H, Tuneu A, et al. *Stem Cells Int.* 2012;2012:646725.

5. Ribeiro S, Napoli I, White IJ, et al. *Cell Rep.* 2013;5:126–136.
6. Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, et al. *Cell.* 2010;143:145–155.
7. Dupin E, Sommer L. *Dev Biol.* 2012;366:83–95.
8. Johnston APW, Naska S, Jones K, et al. *Stem Cell Reports.* 2013;1:38–45.
9. Etxaniz U, Pérez-San Vicente A, Gago-López N, et al. *Stem Cell Reports.* 2014;3:774–788.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

Data S1 Supplementary methods and Materials

Data S2 Supplementary References

Figure S1 Expression of CDH19 in dNFs

Figure S2 Expression of NGFR in dNFs

Figure S3 Expression of S100b in dNFs

Figure S4 Co-expression of CDH19 and SOX10 in dNFs

Figure S5 Expression of CDH19, S100b and NGFR in early stage micro-neurofibromas of “unaffected” NF1 patient skin

Figure S6 Expression of CDH19 in control skin-derived and dNF-derived dermal sphere cultures

DOI: 10.1111/exd.13066

Accepted: 10 May 2016

LETTERS TO THE EDITOR

Establishment of a new three-dimensional human epidermal model reconstructed from plucked hair follicle-derived keratinocytes

1 | BACKGROUND

For decades, many in vitro three-dimensional (3D) skin models have been established and widely used in lieu of animals for skin research. Models that mimic human skin in as many physiological aspects as possible are suitable for academic and industrial research. Such models have been increasingly required because of worldwide expansions of bans and limitations on animal experimentation. Several models of reconstructed human epidermis (RHE) are currently available.¹ These models have been used for various studies, such as metabolic studies of pharmaceutical products (s1–s3), determination of absorption properties (s4–s6), assessment of cutaneous corrosivity (s7–s9) and epidermal responses to irritants and sensitizers (s10–s12). However, the major drawback of these models is that they are derived from unknown donors, hampering studies on differences among individuals. Limat et al.^{2,3} first reported a hair follicle-derived keratinocyte RHE model as a less invasive treatment for chronic leg ulcers, and it was recently used to evaluate sunscreens.⁴ They

used keratinocytes derived from plucked hair follicles with feeder cells in addition to foetal calf serum or autologous serum for primary and 3D cultures. A safer and simpler RHE model is needed.

2 | QUESTIONS ADDRESSED

We established a RHE model from plucked hair follicle-derived keratinocytes using safer (without serum), simpler (without fibroblasts) and less invasive (without biopsy) techniques and compared this model with the skin-derived RHE model.

3 | EXPERIMENTAL DESIGN

Primary keratinocytes derived from plucked hair follicles containing the outer root sheath (ORS) or skin (for controls) were cultured with serum-free medium. To reconstruct 3D epidermis, harvested keratinocytes

Review Article

Skin-Derived Precursor Cells as an In Vitro Modelling Tool for the Study of Type 1 Neurofibromatosis

Araika Gutiérrez-Rivera,¹ Haizea Iribar,¹ Anna Tuneu,² and Ander Izeta¹

¹Tissue Engineering Lab, Bioengineering Area, Instituto Biodonostia, Hospital Universitario Donostia, 20014 San Sebastián, Spain

²Department of Dermatology, Hospital Universitario Donostia, 20014 San Sebastián, Spain

Correspondence should be addressed to Ander Izeta, ander.izetapermisan@osakidetza.net

Received 14 November 2011; Accepted 18 January 2012

Academic Editor: Mary Familiar

Copyright © 2012 Araika Gutiérrez-Rivera et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The most characteristic feature of neurofibromatosis type 1 (NF1) is the development of neurofibromas. It has been suggested that these tumors are caused by somatic inactivation of the wild-type *NF1* allele, but the cell that originally suffers this mutation remains controversial. Several lines of evidence support the clonal origin of these tumors, and it has been recently suggested that skin-derived precursor cells (SKPs) could be the cell of origin of dermal neurofibromas. Nullizygous (*NF1*^{-/-}) SKPs do give rise to neurofibromas when transplanted to heterozygous mice. Moreover, a nullizygous population of cells that is S100 β negative is present in human neurofibromas, and *NF1*^{+/-} multipotent progenitor cells are seemingly recruited to the tumor. This evidence supports the neurofibroma stem cell hypothesis and a putative involvement of SKPs in the aetiopathogenesis of the disease, suggesting that SKPs could become a valuable tool for the in vitro study of NF1.

1. Introduction

The tumor predisposition disorder von Recklinghausen's neurofibromatosis type I (NF1) is one of the most common genetic disorders of the nervous system, affecting 1 in 3500 individuals worldwide [1–4]. The disease is caused by mutation in the *NF1* gene (located on chromosome 17q11.2) that encodes the tumor suppressor protein neurofibromin, a GTPase-activating protein (GAP) [5, 6].

Neurofibromas are complex tumors that contain proliferating Schwann-like cells and other local supporting elements of the nerve fibers, as perineurial-like cells, fibroblasts, endothelial cells, pericytes, and vascular smooth muscle cells, as well as infiltration of mast cells [7]. Although several reports have studied which cell originates this tumor, the present data are somewhat contradictory. In this paper we will address the issue of the cell of origin for dermal neurofibromas to explore if the available data support the cancer stem cell hypothesis. We will discuss recent findings in the light of possible involvement of the so-called skin-derived precursor cells in the aetiopathogenesis of this complex disease.

2. Skin-Derived Precursors (SKPs)

Skin-derived precursors (SKPs) are a population of neural crest-derived multipotent precursor cells present in both human and mouse dermis. They can be identified in vitro as nonadherent cells isolated from the dermis that proliferate and self-renew in response to growth factors FGF-2 and EGF. Under specific differentiation conditions, they give rise to progeny of the neuronal, glial, and mesodermal lineages [8–14].

SKPs thus derive from the dermis and apparently are distinct from mesenchymal stem cells and from central nervous system neural stem cells [8, 13], although they express genes characteristic of embryonic neural crest cells, such as *Slug*, *Snail*, *Twist*, *Pax3*, and *Sox9* [8].

In vitro, SKPs can be differentiated into mesodermal lineages such as SMA+ smooth muscle cells and adipocytes, as well as into neural crest-derived tissues such as neurons and Schwann cells [8, 13]. In particular, SKPs give rise to cells with neuronal morphology that express the pan-neuronal markers β III tubulin and neurofilament-M and proteins characteristic of peripheral neurons such as p75NTR,

peripherin, NCAM, tyrosine hydroxylase, and dopamine β -hydroxylase. SKPs can also be differentiated into bipolar cells coexpressing glial fibrillary acidic protein GFAP, CNPase, S100 β , and p75NTR, typical markers of cells with a differentiated Schwann phenotype, as well as MBP and P0 peripheral myelin protein [8, 13].

When transplanted in ovo into the chick neural crest migratory stream, SKPs mostly migrated into peripheral neural crest targets such as spinal nerve, dorsal root ganglia, and skin and expressed S100 β [8]. In vivo, it has recently been reported that SKPs derive from Sox2+ follicle-associated dermal precursors and show characteristics of dermal stem cells. In this respect, they contribute to dermal maintenance, wound healing, and hair follicle morphogenesis [15].

3. Type 1 Neurofibromatosis (NF1)

The primary clinical feature of NF1 is the development of benign peripheral nerve sheath tumors, termed neurofibromas [16]. In a small percentage of NF1 patients, a particular type of neurofibromas (plexiform, see below) progress to malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs). NF1 patients are also predisposed to astrocytic brain tumors, pheochromocytoma, and juvenile myelomonocytic leukaemia [2, 17]. Noncancerous symptoms of the disease may include intellectual deficits, bone deformations, benign lesions of the iris (Lisch nodules), axillary freckling, and hyperpigmentation defects of the skin known as café-au-lait macules. Because many of the cardinal features of the disease affect neural crest-derived tissues, NF1 is considered as a neurocristopathy [16, 18–20].

NF1 is a dominantly inherited genetic disease. Half of the NF1 patients have inherited their *NF1* mutation and the other half are caused by a de novo *NF1* mutation, suggesting that the *NF1* locus may represent a mutational hotspot in the human genome [3, 4, 16, 21]. Neurofibromin, the *NF1* gene product, has a Ras GTPase activating (RasGAP) activity and negatively regulates Ras signaling [22, 23]. Neurofibromin functions as a tumor suppressor protein expressed in many cells although it is more abundant in cells from the nervous system such as neurons, Schwann cells, astrocytes, and oligodendrocytes as well as in leukocytes [6, 24, 25]. Loss or reduced neurofibromin expression leads to an increased Ras activity and it has been associated with increased mammalian target of rapamycin (mTOR) activity in astrocytes and Schwann cells [26, 27]. Moreover, neurofibromin plays a key role in the generation of cyclic AMP (cAMP) in both neurons and astrocytes [28, 29]. Loss of heterozygosity (LOH) in the inherited wild-type allele has been detected in some tumor types in NF1 patients, although it has been demonstrated that heterozygosity for *NF1* is a key element for the development of many NF1 symptoms, including neurofibroma formation [30]. An additional complexity of the disease is its variable phenotypic expression, suggesting that modifier genes and epigenetic phenomena may play an important role in disease manifestations [2].

4. Neurofibroma Subtypes and Cellular Components

The most common and complex feature of NF1 is the development of benign peripheral nerve sheath tumors or neurofibromas. Neurofibromas were classified by WHO into five subtypes [31]: localized cutaneous, localized intraneural, plexiform, diffuse cutaneous, and soft tissue diffuse neurofibromas (elefantiasis neuromatosa).

Cutaneous neurofibromas reside exclusively in the skin and occur in virtually all individuals with NF1. They initially appear at puberty and increase in number with age and during pregnancy, suggesting a hormonal component in disease development [32–35]. These benign tumors, ranging from 0.1 to several cm in diameter, grow as discrete lesions in the dermis. Patients sometimes develop thousands of these tumors. Depending on their location, they can be painful and disfiguring for the patient and thus affect their quality of life. In contrast, plexiform neurofibromas develop internally along the plexus of major peripheral nerves and become quite large, sometimes involving an entire limb or body region [36]. They occur in about 30% of the individuals and are thought to be congenital. While these tumors are also benign, they are debilitating and may progress to malignancy [37, 38]. The cellular make-up of these lesions is generally similar to that of dermal lesions.

In a physiological situation, a single peripheral nerve shaft is associated with myelinating or nonmyelinating Schwann cells. Several nerve fibers and associated Schwann cells are clustered into a nerve fascicle, each fascicle being surrounded by concentric layers of perineurial cells. Fibroblasts, endothelial cells, and occasional mast cells are also present in a normal nerve fascicle (Figure 1) [7, 16, 37, 38]. Neurofibromas contain all of the cell types found in normal peripheral nerve but in inappropriate numbers. Moreover, Schwann cells are found dissociated from nerves and the perineurium is often disrupted. Large amounts of intercellular collagen and ground substance are also typically present in neurofibromas [16].

5. How Many Mutagenic Events Are Needed for Neurofibromas to Arise?

The penetrance of NF1 is 100% by age 20, although the degree of severity is highly variable, even among family members that present the same mutation [1, 39].

Two types of congenital NF1 mutations have been found to influence neurofibroma number [40–42]. However, these two types of mutations affect only a small percentage of NF1 patients, and, moreover, patients bearing the same germline mutation can exhibit a very different number of dermal neurofibromas [43, 44], indicating that other mechanisms are implicated in neurofibroma formation.

Somatic mutations in the *NF1* gene have been found in tumors associated with NF1, leading to functional loss of both alleles of the gene [45–47]. For example, loss of heterozygosity (LOH) in chromaffin cells initiates pheochromocytomas, and LOH in melanocytes produces pigmented

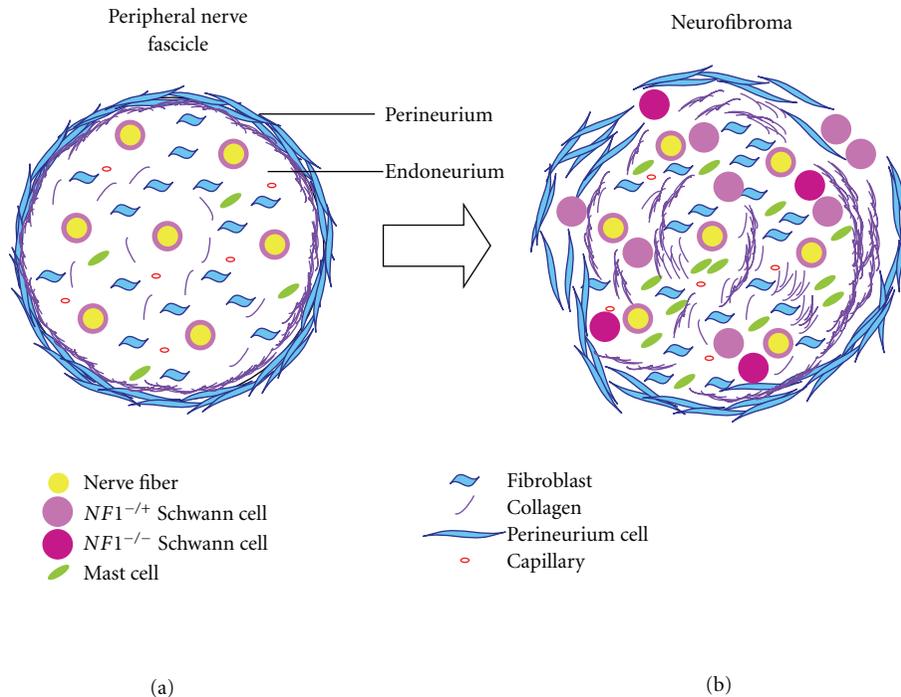


FIGURE 1: Cellular organization of a normal nerve shaft and a neurofibroma. (a) Nerve shafts are made up of axons and associated Schwann cells. Endoneurium is connective tissue composed by collagen, fibroblasts, mast cells, capillaries and extracellular matrix. Collagen fibers are tighter and more compact near the perineurium. The perineurium is composed by flattened fibroblasts, collagen and elastic fibres. (b) In a neurofibroma, the cells are the same as in a normal nerve shaft, but increased in number. There are more Schwann cells and they can be dissociated from axons. Two kinds of Schwann cells can be detected: $NF1^{+/-}$ and $NF1^{-/-}$. Fibroblasts and mast cells are also increased in number but they are all heterozygous ($NF1^{+/-}$). The collagen deposits are also increased and perineurium is usually disrupted.

lesions such as café-au-lait macules and Lisch nodules. LOH in myeloid cells induces myelomonocytic leukaemia, and LOH in glial cells permits astrocytoma formation [48–53].

It has also been suggested that neurofibromas are caused by somatic inactivation of the wild-type *NF1* allele, leading to complete functional abrogation of the gene [45, 54, 55]. LOH in Schwann progenitor cells permits plexiform neurofibroma formation [30, 56], and it has been suggested that LOH in skin-derived precursors leads to cutaneous neurofibroma formation [34]. Using both *NF1* intragenic polymorphisms and markers from flanking and more distal regions of chromosome 17, Colman et al. demonstrated loss of heterozygosity (LOH) of the *NF1* gene in eight neurofibromas from 22 patients and Serra et al. found LOH in 15 out of 60 dermal neurofibromas [55, 57]. Moreover, Sawada et al. identified a somatic deletion of the *NF1* gene in a dermal neurofibroma with a defined germline mutation [54]. LOH has also been detected in plexiform neurofibromas [58–60].

One possible explanation for the lack of allele loss detection in some tumors is that a more subtle somatic *NF1* mutation occurred (point mutation, small deletion, insertion, or modification through epigenetic mechanisms). These changes do not produce loss of closely linked polymorphic marker loci [61]. Alternatively, LOH may stay undetected because the presence of normal stromal or inflammatory tissue within the tumors increases sample background. Nevertheless, mechanisms that do not involve inactivation of the

normal allele cannot be excluded. In dermal neurofibromas, local trauma can be a factor in the development of the tumors [62] and it has been suggested that dermal neurofibromas could be hyperplastic instead of neoplastic lesions, due to a poorly regulated wound healing in *NF1* haploinsufficient tissues [63–65]. However most experts agree that these lesions are true neoplasms and are not hyperplastic.

6. Which Neurofibroma Cells Harbor Somatic *NF1* Mutations?

Being a complex genetic disease with tumors of multicellular composition, the question arises which cell type within the tumor presents the secondary somatic mutations that characterize the pathological presentation of the dermal neurofibromas. Although $NF1^{-/-}$ fibroblasts exhibit greater proliferation capacity than their normal and heterozygous counterparts [63, 66], they are not normally found in tumors since only Schwann cells carry a double inactivation of the *NF1* gene [59, 61, 67–69].

Two different populations of S100 β + cells (presumably terminally differentiated Schwann cells) have been demonstrated within in vitro cultures obtained from dermal neurofibromas, indicating that both *NF1* Schwann cell subtypes (+/-) and (-/-) coexist in these tumors [61, 68]. This fact may be explained through two alternative possibilities: (i) the

second hit mutation occurred as a secondary event within a neurofibroma that had already developed polyclonally, and thus only a subpopulation of S100 β + cells is (-/-), or (ii) the tumors arose through a two-hit mechanism within a stem/progenitor cell that gave rise to most tumor cells, but the proliferating neoplastic clone stimulated the proliferation of infiltrating nonneoplastic cells such as heterozygous Schwann cells, mast cells, and fibroblasts.

The influence of a heterozygous environment in plexiform neurofibroma development supports the latter theory. In a conditional plexiform neurofibroma mice model (*NF1*^{fllox/-}; Krox20cre), haploinsufficient stromal and mast cells (*NF1*^{+/-}) are necessary and limiting for neurofibroma development [30, 70]. Accordingly, *NF1*^{-/-} Schwann cell-derived secreted stem cell factor (SCF) causes a hyperactive recruitment of *NF1*^{+/-} mast cells [71]. Furthermore, *NF1* mast cells secreted 2.5-fold higher TGF β than wt mast cells, leading to a heightened fibroblast proliferation, migration, and collagen production [72]. In all, these data reinforce the idea that heterozygous fibroblast and mast cells may play a key role in the neurofibroma pathogenesis [70].

7. Does Neurofibroma Originate from Stem/Progenitor Cells?

Cancer is a heterogeneous disease and tumors present a significant morphological, phenotypic, genetic, kinetic, and functional diversity. Several lines of evidence suggest that this heterogeneity could be due to a hierarchical organization of tumors that resembles normal tissue development. However another possible explanation is that tumor cells are biologically equivalent and that heterogeneity derives from extrinsic or intrinsic influences that result in stochastic responses [73]. Strong evidence points to the importance of stem cells in the initiation and long-term maintenance of several cancers, as malignant germ cell cancers [74, 75], leukemias [76, 77], nervous system [78], breast [79] and colon cancers [80–83]. In these cancer types, several markers have been identified to distinguish the so called “cancer stem cells” that may form tumors when serially transplanted into immunocompromised NOD/SCID mice as compared to nontumorigenic cancer cells that do not present self-renewal capacities. Nevertheless, it is worth noting that in some cancers, most tumor cells fulfill this tumorigenic potential [84–86] and that the NOD/scid mouse transplantation assay sometimes might underestimate the frequency of human cancer cells with tumorigenic potential [85, 86].

The two-hit tumor suppressor hypothesis for NF1 predicts that all cells carry a constitutional mutation and a particular cell acquires a second mutation to initiate tumor formation [87]. Based on the two-hit model of tumorigenesis, tumor cells in neurofibromas should be of clonal origin. Nevertheless, while both alleles are inactivated in NF1-associated malignancies, the clonal nature of the neurofibromas is controversial (see below) [58, 67, 88–91].

Interestingly, there is strong evidence that an adult multipotent stem/progenitor cell could be the cell of origin for cutaneous neurofibromas. It has been demonstrated that

plexiform neurofibromas originate from embryonic neural crest-derived progenitors [30, 56, 92–96] and mice that develop plexiform tumors with 100% frequency fail to develop dermal tumors. Moreover, plexiform neurofibromas are congenital while cutaneous neurofibromas arise in puberty. The facts that dermal neurofibromas arise in the adulthood and locate in the dermis suggest the idea that dermal adult progenitor cells could be the source of these tumors [34]. Furthermore, the close relationship observed between the development of cutaneous neurofibromas and hair follicle proximity suggests that adult progenitor cells residing in the hair follicle may be the origin of these tumors. There is evidence that the neurofibromas arise in the hair follicle vicinity and even small neurofibromas can be detected histologically in close contact with the hair follicle, in otherwise apparently healthy skin areas [97, 98]. Mechanical trauma has also been suggested to play a role in the pathogenesis of neurofibromas, that is, some neurofibromas appear to arise as a dysplastic response to crush trauma [99].

Several populations of stem/progenitor cells have been described to reside in the hair follicle or surrounding areas [81, 100–114], some of them being potential candidates for an involvement in NF1 pathogenesis. Recently, it has been speculated that recruitment of Nestin+ multipotent *NF1*^{+/-} precursor cells is associated with cutaneous neurofibroma development [97]. Histologically, nestin-positive small blood vessels and spindle-shaped tumor cells can be detected in the neurofibromas. In accordance with this hypothesis, S100 β -/*NF1*- cells are detected in high proportion (16–31%) in neurofibromas. This fact could indicate the presence of multipotent stem cells that have suffered a second-hit mutation, although a dedifferentiation from S100 β +/*NF1*- Schwann cells, also present in the tumor, can not be excluded [91].

Finally, there is strong evidence that SKPs could be the cell of origin for dermal neurofibromas [34]. Cre-mediated recombination of *NF1*^{lox/-} SKPs induced in vitro loss of the wt allele in these cells. When transplanted into the same *NF1*^{lox/-} mice that originated these cells, *NF1*^{-/-} SKPs (but not control *NF1*^{lox/-} cells) then initiated dermal neurofibromas. However, tumor formation was only efficient in female recipients that were pregnant at the time of implantation, highlighting the hormone sensitivity observed in NF1 patients and the importance of the microenvironment during neurofibroma formation. Furthermore, deletion of *NF1* in the skin of CMV-CreERT2 *NF1*^{lox/-} mice after topical application of tamoxifen led to local dermal neurofibroma formation, supporting the notion that the cell of origin for these tumors resides within the skin at close range of topical tamoxifen application [34, 115].

8. SKPs as a Tool for In Vitro Modelling of NF1 Features

Several lines of evidence now point to a stem cell origin of dermal neurofibromas. On the one hand, a number of studies have assessed the clonal origin of neurofibromas, based on

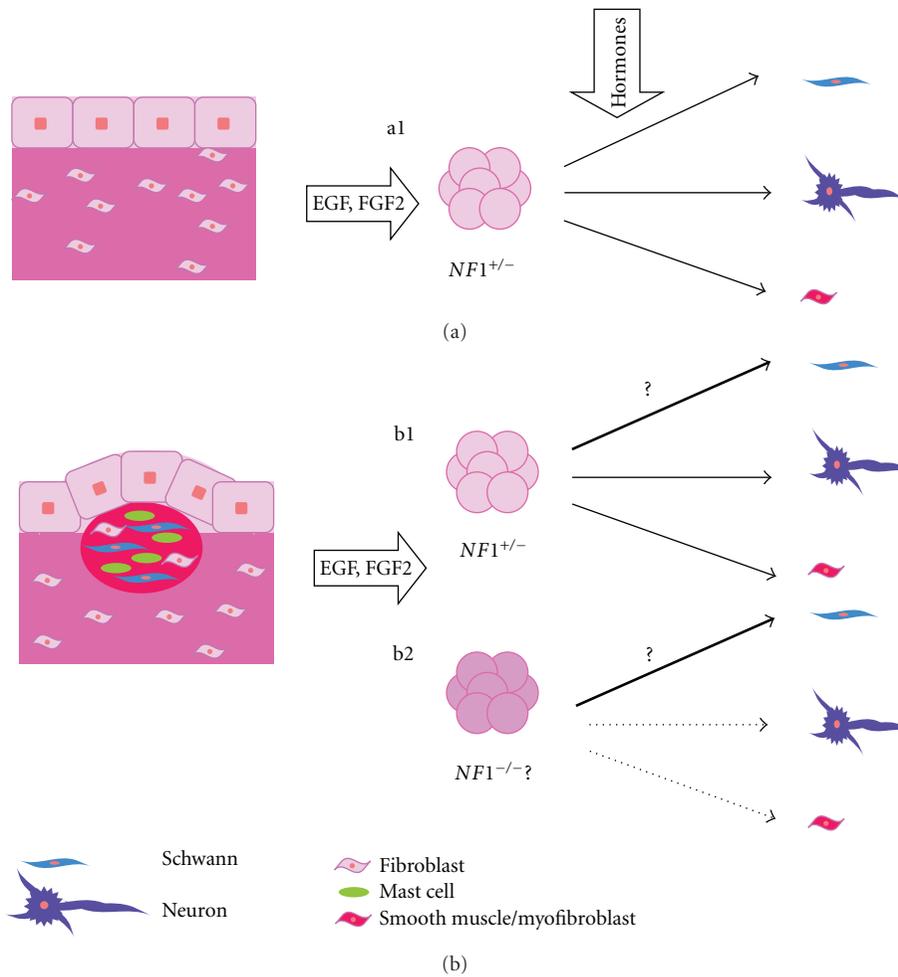


FIGURE 2: Isolation of SKPs from healthy skin and a neurofibroma of an NF1 patient. (a) Dermal multipotent stem cells form spheres in vitro, in response to EGF and FGF. In NF1 patients, SKPs from healthy skin should give rise to $NF1^{+/+}$ SKPs in vitro (a1). SKPs can differentiate into glial, neuronal, and mesodermal lineages. If SKPs are isolated from NF1 patient neurofibromas, $NF1^{+/-}$ SKPs (b1) are expected to form in vitro, under standard culture conditions. If $NF1^{-/-}$ (b2) SKPs may be isolated has to be determined. If SKPs are the cell of origin of neurofibromas, they might present a predisposition to differentiate into the glial lineage.

X chromosome inactivation (XCI) clonality assay. In our view, the results are still controversial since (i) clonal cell origin may not formally be proven through XCI analyses and (ii) studies have generally been performed with low patient numbers. For instance, Skuse et al. studied eight dermal neurofibromas and concluded that all of them were of clonal origin [90]. Tucker et al. also found evidence for clonality in some of the six neurofibromas studied [91], suggesting that although other mechanisms could be at stake, at least in some neurofibromas a unique stem cell may have suffered a second-hit mutation, giving rise to a nullizygous Schwann cell progeny. On the other hand, only one kind of somatic mutation has been found in every neurofibroma analyzed and different neurofibromas of the same patient present different somatic mutations [61, 68], reinforcing the neurofibroma stem cell hypothesis. Moreover, multipotent stem cells (termed neurofibroma-derived precursor cells or NFPs) have been isolated from dermal neurofibromas. These

precursors express Nestin and show a multipotent differentiation potential, giving rise to Schwann cells, neurons, epithelial cells, and adipocytes [97]. However NFPs do not contain the somatic $NF1$ mutation and thus their relationship with NF1 pathogenesis is currently unclear. Similarly, characterization of cells present in neurofibromas by S100 β , a marker for the Schwann lineage, has demonstrated that a nullizygous population ($NF1^{-/-}$) that is negative for S100 β expression is present in neurofibromas. Although it cannot be discarded that they could be dedifferentiated Schwann cells, it is also possible that they could be progenitor cells that have suffered the somatic mutation and that generate the Schwann cells present in the tumor. In any case, cell characterization by a single marker is less than optimal and too many interpretations of these results are possible as to extract any meaningful conclusion.

Recently, an elegant study showed that $NF1^{+/-}$ SKPs could form neurofibromas in a conditional mouse model,

although a key role for tumor environment was also found [34]. To date there is no data on involvement of SKPs in human neurofibroma development, although *NF1*^{+/-} multipotent progenitor cells are supposedly recruited to form dermal neurofibromas [97]. If SKPs were the cells of origin of dermal neurofibromas, *NF1*^{-/-} SKPs should be present within NF1 patient neurofibromas, although *NF1*^{+/-} SKPs should also be detected. If these putative *NF1*^{-/-} SKPs would present a predisposition to differentiate preferentially into the Schwann cell lineage should also be explored (Figure 2).

9. Conclusions

In summary, current evidence supports the notion that, at least in murine models, skin-derived precursor cells (SKPs) might be a cell of origin for dermal neurofibromas. It is also conceivable that human SKPs might be the cell of origin of neurofibromas, although formal proof for this is lacking. Isolation of SKPs from human neurofibromas could demonstrate if these dermal multipotent stem cells bear the somatic mutation and whether or not this mutation confers a predisposition to these precursor cells to differentiate into the Schwann cell lineage. Furthermore, isolation of SKPs from healthy skin of NF1 patients could demonstrate if there are SKPs with the somatic mutation, even in areas where the neurofibroma is histologically undetectable. In conclusion, SKPs may become a useful tool for the in vitro study of the neurofibromatosis type 1 syndrome.

Acknowledgments

This work was financed by grants provided by MICINN-Instituto de Salud Carlos III (Proyecto Inv. Salud, PI10/02871) and Gobierno Vasco (Dpto. de Industria, SAIO10-PE10BF01). A. Izeta was supported by the "Programa I3SNS" (CES09/015) from Instituto de Salud Carlos III and by Osakidetza-Servicio Vasco de Salud (Spain).

References

- [1] J. M. Friedman, "Epidemiology of neurofibromatosis type 1," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 89, no. 1, pp. 1–6, 1999.
- [2] V. M. Riccardi, *Neurofibromatosis: phenotype, Natural history, and Pathogenesis*, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md, USA, 2nd edition, 1992.
- [3] J. Szudek, P. Birch, V. M. Riccardi, D. G. Evans, and J. M. Friedman, "Associations of clinical features in neurofibromatosis 1 (NF1)," *Genetic Epidemiology*, vol. 19, no. 4, pp. 429–439, 2000.
- [4] A. B. Trovó-Marqui and E. H. Tajara, "Neurofibromin: a general outlook," *Clinical Genetics*, vol. 70, no. 1, pp. 1–13, 2006.
- [5] J. E. DeClue, B. D. Cohen, and D. R. Lowy, "Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 22, pp. 9914–9918, 1991.
- [6] D. H. Gutmann, D. L. Wood, and F. S. Collins, "Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 21, pp. 9658–9662, 1991.
- [7] M. Kimura, Y. Kamata, K. Matsumoto, and H. Takaya, "Electron microscopical study on the tumor of Von Recklinghausen's neurofibromatosis," *Acta Pathologica Japonica*, vol. 24, no. 1, pp. 79–91, 1974.
- [8] K. J. L. Fernandes, I. A. McKenzie, P. Mill et al., "A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells," *Nature Cell Biology*, vol. 6, no. 11, pp. 1082–1093, 2004.
- [9] K. J. L. Fernandes, J. G. Toma, and F. D. Miller, "Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential," *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 363, no. 1489, pp. 185–198, 2008.
- [10] N. Gago, V. Pérez-López, J. P. Sanz-Jaka et al., "Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells," *Stem Cells*, vol. 27, no. 5, pp. 1164–1172, 2009.
- [11] D. P. J. Hunt, C. Jahoda, and S. Chandran, "Multipotent skin-derived precursors: from biology to clinical translation," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 20, no. 5, pp. 522–530, 2009.
- [12] I. A. McKenzie, J. Biernaskie, J. G. Toma, R. Midha, and F. D. Miller, "Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system," *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 24, pp. 6651–6660, 2006.
- [13] J. G. Toma, M. Akhavan, K. J. L. Fernandes et al., "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin," *Nature Cell Biology*, vol. 3, no. 9, pp. 778–784, 2001.
- [14] J. G. Toma, I. A. McKenzie, D. Bagli, and F. D. Miller, "Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin," *Stem Cells*, vol. 23, no. 6, pp. 727–737, 2005.
- [15] J. Biernaskie, M. Paris, O. Morozova et al., "SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells," *Cell Stem Cell*, vol. 5, no. 6, pp. 610–623, 2009.
- [16] K. Cichowski and T. Jacks, "NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP," *Cell*, vol. 104, no. 4, pp. 593–604, 2001.
- [17] J. L. Bader, "Neurofibromatosis and cancer," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 486, pp. 57–65, 1986.
- [18] L. Q. Le and L. F. Parada, "Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs," *Oncogene*, vol. 26, no. 32, pp. 4609–4616, 2007.
- [19] B. A. Ward and D. H. Gutmann, "Neurofibromatosis 1: from lab bench to clinic," *Pediatric Neurology*, vol. 32, no. 4, pp. 221–228, 2005.
- [20] Y. Zhu and L. F. Parada, "Neurofibromin, a tumor suppressor in the nervous system," *Experimental Cell Research*, vol. 264, no. 1, pp. 19–28, 2001.
- [21] S. M. H. Hughes, *The Neurofibromatoses: A Pathogenic and Clinical Overview*, Chapman & Hall, London, UK, 1994.
- [22] R. Ballester, D. Marchuk, M. Boguski et al., "The *NF1* locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins," *Cell*, vol. 63, no. 4, pp. 851–859, 1990.
- [23] G. Xu, P. O'Connell, D. Viskochil et al., "The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP," *Cell*, vol. 62, no. 3, pp. 599–608, 1990.
- [24] M. M. Daston and N. Ratner, "Neurofibromin, a predominantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expressed during development," *Developmental Dynamics*, vol. 195, no. 3, pp. 216–226, 1993.

- [25] M. M. Daston, H. Scrabble, M. Nordlund, A. K. Sturbaum, L. M. Nissen, and N. Ratner, "The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes," *Neuron*, vol. 8, no. 3, pp. 415–428, 1992.
- [26] B. Dasgupta, Y. Yi, D. Y. Chen, J. D. Weber, and D. H. Gutmann, "Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors," *Cancer Research*, vol. 65, no. 7, pp. 2755–2760, 2005.
- [27] C. M. Johannessen, E. E. Reczek, M. F. James, H. Brems, E. Legius, and K. Cichowski, "The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 24, pp. 8573–8578, 2005.
- [28] B. Dasgupta, L. L. Dugan, and D. H. Gutmann, "The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes," *Journal of Neuroscience*, vol. 23, no. 26, pp. 8949–8954, 2003.
- [29] J. Tong, F. Hannan, Y. Zhu, A. Bernards, and Y. Zhong, "Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity," *Nature Neuroscience*, vol. 5, no. 2, pp. 95–96, 2002.
- [30] Y. Zhu, P. Ghosh, P. Charnay, D. K. Burns, and L. F. Parada, "Neurofibromas in NF1: schwann cell origin and role of tumor environment," *Science*, vol. 296, no. 5569, pp. 920–922, 2002.
- [31] B. W. Scheithauer, J. M. Woodruff, and C. R. Antonescu, "Perineurioma," in *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, D. N. Louis et al., Ed., pp. 158–159, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, 2007.
- [32] R. E. Ferner, "Neurofibromatosis 1," *European Journal of Human Genetics*, vol. 15, no. 2, pp. 131–138, 2007.
- [33] M. M. Lakkis and G. I. Tennekoon, "Neurofibromatosis type 1 I. General overview," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 62, no. 6, pp. 755–763, 2000.
- [34] L. Q. Le, T. Shipman, D. K. Burns, and L. F. Parada, "Cell of origin and microenvironment contribution for NF1-associated dermal neurofibromas," *Cell Stem Cell*, vol. 4, no. 5, pp. 453–463, 2009.
- [35] T. M. Roth, E. M. Petty, and K. F. Barald, "The role of steroid hormones in the NF1 phenotype: focus on pregnancy," *American Journal of Medical Genetics, Part A*, vol. 146, no. 12, pp. 1624–1633, 2008.
- [36] B. R. Korf, "Plexiform neurofibromas," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 89, no. 1, pp. 31–37, 1999.
- [37] P. Lévy, D. Vidaud, K. Leroy et al., "Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR," *Molecular Cancer*, vol. 3, article 20, 2004.
- [38] J. M. Woodruff, "Pathology of tumors of the peripheral nerve sheath in type 1 neurofibromatosis," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 89, no. 1, pp. 23–30, 1999.
- [39] V. M. Riccardi and R. A. Lewis, "Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants," *American Journal of Human Genetics*, vol. 42, no. 2, pp. 284–289, 1988.
- [40] L. M. Kayes, W. Burke, V. M. Riccardi et al., "Deletions spanning the neurofibromatosis I gene: identification and phenotype of five patients," *American Journal of Human Genetics*, vol. 54, no. 3, pp. 424–436, 1994.
- [41] M. Upadhyaya, S. M. Huson, M. Davies et al., "An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the *NF1* gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation," *American Journal of Human Genetics*, vol. 80, no. 1, pp. 140–151, 2007.
- [42] B. L. Wu, M. A. Austin, G. H. Schneider, R. G. Boles, and B. R. Korf, "Deletion of the entire *NF1* gene detected by fish: four deletion patients associated with severe manifestations," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 59, no. 4, pp. 528–535, 1995.
- [43] E. Ars, E. Serra, J. García et al., "Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1," *Human Molecular Genetics*, vol. 9, no. 2, pp. 237–247, 2000.
- [44] J. C. Carey, J. M. Laub, and B. D. Hall, "Penetrance and variability in neurofibromatosis: a genetic study of 60 families," *Birth Defects*, vol. 15, no. 5, pp. 271–281, 1979.
- [45] T. De Raedt, O. Maertens, M. Chmara et al., "Somatic loss of wild type *NF1* allele in neurofibromas: comparison of *NF1* microdeletion and non-microdeletion patients," *Genes Chromosomes and Cancer*, vol. 45, no. 10, pp. 893–904, 2006.
- [46] E. Legius, D. A. Marchuk, F. S. Collins, and T. W. Glover, "Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis," *Nature Genetics*, vol. 3, no. 2, pp. 122–126, 1993.
- [47] Y. Li, G. Bollag, R. Clark et al., "Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors," *Cell*, vol. 69, no. 2, pp. 275–281, 1992.
- [48] M. L. Bajenaru, M. R. Hernandez, A. Perry et al., "Optic nerve glioma in mice requires astrocyte *NF1* gene inactivation and *NF1* brain heterozygosity," *Cancer Research*, vol. 63, no. 24, pp. 8573–8577, 2003.
- [49] S. De Schepper, O. Maertens, T. Callens, J. M. Naeyaert, J. Lambert, and L. Messiaen, "Somatic mutation analysis in NF1 café au lait spots reveals two *NF1* hits in the melanocytes," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 128, no. 4, pp. 1050–1053, 2008.
- [50] D. A. Largaespada, C. I. Brannan, N. A. Jenkins, and N. G. Copeland, "*NF1* deficiency causes Ras-mediated granulocyte/macrophage colony stimulating factor hypersensitivity and chronic myeloid leukaemia," *Nature Genetics*, vol. 12, no. 2, pp. 137–143, 1996.
- [51] F. Li, A. M. Munchhof, H. A. White et al., "Neurofibromin is a novel regulator of RAS-induced signals in primary vascular smooth muscle cells," *Human Molecular Genetics*, vol. 15, no. 11, pp. 1921–1930, 2006.
- [52] A. M. Munchhof, F. Li, H. A. White et al., "Neurofibroma-associated growth factors activate a distinct signaling network to alter the function of neurofibromin-deficient endothelial cells," *Human Molecular Genetics*, vol. 15, no. 11, pp. 1858–1869, 2006.
- [53] Y. Zhu, T. Harada, L. Liu et al., "Inactivation of NF1 in CNS causes increased glial progenitor proliferation and optic glioma formation," *Development*, vol. 132, no. 24, pp. 5577–5588, 2005.
- [54] S. Sawada, S. Florell, S. M. Purandare, M. Ota, K. Stephens, and D. Viskochil, "Identification of *NF1* mutations in both alleles of a dermal neurofibroma," *Nature Genetics*, vol. 14, no. 1, pp. 110–112, 1996.
- [55] E. Serra, S. Puig, D. Otero et al., "Confirmation of a double-hit model for the *NF1* gene in benign neurofibromas,"

- American Journal of Human Genetics*, vol. 61, no. 3, pp. 512–519, 1997.
- [56] L. Q. Le, C. Liu, T. Shipman, Z. Chen, U. Suter, and L. F. Parada, “Susceptible stages in Schwann cells for NF1-associated plexiform neurofibroma development,” *Cancer Research*, vol. 71, no. 13, pp. 4686–4695, 2011.
- [57] S. D. Colman, C. A. Williams, and M. R. Wallace, “Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the *NF1* gene,” *Nature Genetics*, vol. 11, no. 1, pp. 90–92, 1995.
- [58] K. Däschner, G. Assum, I. Eisenbarth et al., “Clonal origin of tumor cells in a plexiform neurofibroma with LOH in NF1 intron 38 and in dermal neurofibromas without LOH of the NF1 gene,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 234, no. 2, pp. 346–350, 1997.
- [59] L. Kluwe, R. E. Friedrich, and V. F. Mautner, “Allelic loss of the *NF1* gene in NF1-associated plexiform neurofibromas,” *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 113, no. 1, pp. 65–69, 1999.
- [60] S. A. Rasmussen, J. Overman, S. A. M. Thomson et al., “Chromosome 17 loss-of-heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1,” *Genes Chromosomes and Cancer*, vol. 28, no. 4, pp. 425–431, 2000.
- [61] O. Maertens, H. Brems, J. Vandesompele et al., “Comprehensive *NF1* screening on cultured Schwann cells from neurofibromas,” *Human Mutation*, vol. 27, no. 10, pp. 1030–1040, 2006.
- [62] V. M. Riccardi, “Of mass and men: neurofibromas and histogenesis,” *Archives of Dermatology*, vol. 136, no. 10, pp. 1257–1258, 2000.
- [63] R. P. Atit, M. J. Crowe, D. G. Greenhalgh, R. J. Wenstrup, and N. Ratner, “The *Nf1* tumor suppressor regulates mouse skin wound healing, fibroblast proliferation, and collagen deposited by fibroblasts,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 112, no. 6, pp. 835–842, 1999.
- [64] T. Tucker and J. M. Friedman, “Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the “two-hit” hypothesis,” *Clinical Genetics*, vol. 62, no. 5, pp. 345–357, 2002.
- [65] H. Ylä-Outinen, V. Aaltonen, A. S. Björkstrand et al., “Upregulation of tumor suppressor protein neurofibromin in normal human wound healing and *in vitro* evidence for platelet derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) elicited increase in neurofibromin mRNA steady-state levels in dermal fibroblasts,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 110, no. 3, pp. 232–237, 1998.
- [66] T. Rosenbaum, Y. L. Boissy, K. Kombrinck et al., “Neurofibromin-deficient fibroblasts fail to form perineurium *in vitro*,” *Development*, vol. 121, no. 11, pp. 3583–3592, 1995.
- [67] J. L. Rutkowski, K. Wu, D. H. Gutmann, P. J. Boyer, and E. Legius, “Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1,” *Human Molecular Genetics*, vol. 9, no. 7, pp. 1059–1066, 2000.
- [68] E. Serra, T. Rosenbaum, U. Winner et al., “Schwann cells harbor the somatic *NF1* mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations,” *Human Molecular Genetics*, vol. 9, no. 20, pp. 3055–3064, 2000.
- [69] L. S. Sherman, R. Atit, T. Rosenbaum, A. D. Cox, and N. Ratner, “Single cell Ras-GTP analysis reveals altered Ras activity in a subpopulation of neurofibroma Schwann cells but not fibroblasts,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 39, pp. 30740–30745, 2000.
- [70] F. C. Yang, D. A. Ingram, S. Chen et al., “*Nf1*-dependent tumors require a microenvironment containing *NF1*^{+/-} and c-kit-dependent bone marrow,” *Cell*, vol. 135, no. 3, pp. 437–448, 2008.
- [71] F. C. Yang, D. A. Ingram, S. Chen et al., “Neurofibromin-deficient Schwann cells secrete a potent migratory stimulus for *NF1*^{+/-} mast cells,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 12, pp. 1851–1861, 2003.
- [72] F. C. Yang, S. Chen, T. Clegg et al., “*NF1*^{+/-} mast cells induce neurofibroma like phenotypes through secreted TGF- β signaling,” *Human Molecular Genetics*, vol. 15, no. 16, pp. 2421–2437, 2006.
- [73] J. E. Dick, “Stem cell concepts renew cancer research,” *Blood*, vol. 112, no. 13, pp. 4793–4807, 2008.
- [74] K. Illmensee and B. Mintz, “Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, no. 2, pp. 549–553, 1976.
- [75] L. J. Kleinsmith and G. B. Pierce Jr., “Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells,” *Cancer Research*, vol. 24, pp. 1544–1551, 1964.
- [76] D. Bonnet and J. E. Dick, “Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell,” *Nature Medicine*, vol. 3, no. 7, pp. 730–737, 1997.
- [77] T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor et al., “A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice,” *Nature*, vol. 367, no. 6464, pp. 645–648, 1994.
- [78] S. K. Singh, I. D. Clarke, T. Hide, and P. B. Dirks, “Cancer stem cells in nervous system tumors,” *Oncogene*, vol. 23, no. 43, pp. 7267–7273, 2004.
- [79] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke, “Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 7, pp. 3983–3988, 2003.
- [80] P. Dalerba and M. F. Clarke, “Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory,” *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 3, pp. 241–242, 2007.
- [81] V. Horsley, D. O’Carroll, R. Tooze et al., “A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice,” *Cell*, vol. 126, no. 3, pp. 597–609, 2006.
- [82] C. A. O’Brien, A. Pollett, S. Gallinger, and J. E. Dick, “A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice,” *Nature*, vol. 445, no. 7123, pp. 106–110, 2007.
- [83] L. Ricci-Vitiani, D. G. Lombardi, E. Pilozzi et al., “Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells,” *Nature*, vol. 445, no. 7123, pp. 111–115, 2007.
- [84] P. N. Kelly, A. Dakic, J. M. Adams, S. L. Nutt, and A. Strasser, “Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells,” *Science*, vol. 317, no. 5836, p. 337, 2007.
- [85] E. Quintana, M. Shackleton, M. S. Sabel, D. R. Fullen, T. M. Johnson, and S. J. Morrison, “Efficient tumour formation by single human melanoma cells,” *Nature*, vol. 456, no. 7222, pp. 593–598, 2008.
- [86] M. Shackleton, E. Quintana, E. R. Fearon, and S. J. Morrison, “Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution,” *Cell*, vol. 138, no. 5, pp. 822–829, 2009.
- [87] A. G. Knudson Jr., “Overview: genes that predispose to cancer,” *Mutation Research*, vol. 247, no. 2, pp. 185–190, 1991.

- [88] I. Eisenbarth, K. Beyer, W. Krone, and G. Assum, "Toward a survey of somatic mutation of the *NF1* gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1," *American Journal of Human Genetics*, vol. 66, no. 2, pp. 393–401, 2000.
- [89] P. J. Fialkow, R. W. Sagebiel, S. M. Gartler, and D. L. Rimoïn, "Multiple cell origin of hereditary neurofibromas," *The New England Journal of Medicine*, vol. 284, no. 6, pp. 298–300, 1971.
- [90] G. R. Skuse, B. A. Kosciölek, and P. T. Rowley, "The neurofibroma in von Recklinghausen neurofibromatosis has a unicellular origin," *American Journal of Human Genetics*, vol. 49, no. 3, pp. 600–607, 1991.
- [91] T. Tucker, V. M. Riccardi, C. Brown et al., "S100B and neurofibromin immunostaining and X-inactivation patterns of laser-microdissected cells indicate a multicellular origin of some NF1-associated neurofibromas," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 89, no. 9, pp. 1451–1460, 2011.
- [92] K. Cichowski, T. S. Shih, E. Schmitt et al., "Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1," *Science*, vol. 286, no. 5447, pp. 2172–2176, 1999.
- [93] N. M. Joseph, J. T. Mosher, J. Buchstaller et al., "Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1," *Cancer Cell*, vol. 13, no. 2, pp. 129–140, 2008.
- [94] K. S. Vogel, L. J. Klesse, S. Velasco-Miguel, K. Meyers, E. J. Rushing, and L. F. Parada, "Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1," *Science*, vol. 286, no. 5447, pp. 2176–2179, 1999.
- [95] J. Wu, J. P. Williams, T. A. Rizvi et al., "Plexiform and dermal neurofibromas and pigmentation are caused by *Nf1* loss in desert hedgehog-expressing cells," *Cancer Cell*, vol. 13, no. 2, pp. 105–116, 2008.
- [96] H. Zheng, L. Chang, N. Patel et al., "Induction of abnormal proliferation by nonmyelinating schwann cells triggers neurofibroma formation," *Cancer Cell*, vol. 13, no. 2, pp. 117–128, 2008.
- [97] E.-M. Jouhilahti, S. Peltonen, T. Callens et al., "The development of cutaneous neurofibromas," *American Journal of Pathology*, vol. 178, no. 2, pp. 500–505, 2011.
- [98] S. L. Karvonen, M. Kallioinen, H. Ylä-Outinen, M. Pöyhönen, A. Oikarinen, and J. Peltonen, "Occult neurofibroma and increased S100 protein in the skin of patients with neurofibromatosis type 1: new insight to the etiopathomechanism of neurofibromas," *Archives of Dermatology*, vol. 136, no. 10, pp. 1207–1209, 2000.
- [99] V. M. Riccardi, "Neurofibromatosis type 1 is a disorder of dysplasia: the importance of distinguishing features, consequences, and complications," *Birth Defects Research Part A*, vol. 88, no. 1, pp. 9–14, 2010.
- [100] C. Blanpain, W. E. Lowry, A. Geoghegan, L. Polak, and E. Fuchs, "Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche," *Cell*, vol. 118, no. 5, pp. 635–648, 2004.
- [101] S. Claudinot, M. Nicolas, H. Oshima, A. Rochat, and Y. Barraud, "Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 41, pp. 14677–14682, 2005.
- [102] G. Cotsarelis, T. T. Sun, and R. M. Lavker, "Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis," *Cell*, vol. 61, no. 7, pp. 1329–1337, 1990.
- [103] A. Gutiérrez-Rivera, A. Pavón-Rodríguez, P. Cormenzana, J. P. Sanz-Jaka, and A. Izeta, "A protocol for enrichment of CD34+ stromal cell fraction through human skin disaggregation and magnetic separation," *Journal of Dermatological Science*, vol. 59, no. 1, pp. 60–62, 2010.
- [104] A. Gutiérrez-Rivera, A. Pavón-Rodríguez, F. Jiménez-Acosta et al., "Functional characterization of highly adherent CD34+ keratinocytes isolated from human skin," *Experimental Dermatology*, vol. 19, no. 7, pp. 685–688, 2010.
- [105] A. Haegebarth and H. Clevers, "Wnt signaling, *Lgr5*, and stem cells in the intestine and skin," *American Journal of Pathology*, vol. 174, no. 3, pp. 715–721, 2009.
- [106] V. Jaks, N. Barker, M. Kasper et al., "*Lgr5* marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells," *Nature Genetics*, vol. 40, no. 11, pp. 1291–1299, 2008.
- [107] V. Jaks, M. Kasper, and R. Toftgård, "The hair follicle—a stem cell zoo," *Experimental Cell Research*, vol. 316, no. 8, pp. 1422–1428, 2010.
- [108] Y. Liu, S. Lyle, Z. Yang, and G. Cotsarelis, "Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 121, no. 5, pp. 963–968, 2003.
- [109] R. J. Morris, Y. Liu, L. Marles et al., "Capturing and profiling adult hair follicle stem cells," *Nature Biotechnology*, vol. 22, no. 4, pp. 411–417, 2004.
- [110] R. J. Morris and C. S. Potten, "Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells *in vitro*," *Cell Proliferation*, vol. 27, no. 5, pp. 279–289, 1994.
- [111] M. Ohyama, A. Terunuma, C. L. Tock et al., "Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 1, pp. 249–260, 2006.
- [112] H. Oshima, A. Rochat, C. Kedzia, K. Kobayashi, and Y. Barraud, "Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells," *Cell*, vol. 104, no. 2, pp. 233–245, 2001.
- [113] C. S. Trempus, R. J. Morris, C. D. Bortner et al., "Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 120, no. 4, pp. 501–511, 2003.
- [114] T. Tumber, G. Guasch, V. Greco et al., "Defining the epithelial stem cell niche in skin," *Science*, vol. 303, no. 5656, pp. 359–363, 2004.
- [115] Z. S. Morris and A. I. McClatchey, "The neurofibroma cell of origin: SKPs expand the playing field," *Cell Stem Cell*, vol. 4, no. 5, pp. 371–372, 2009.