

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

# Disfunción de las células precursoras dérmicas asociada al envejecimiento cutáneo: SOX2 como regulador del destino del linaje celular

Laura Yndriago Acha

2020

(c) 2020 Laura Yndriago Acha





Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

**biodonostia**

osasun ikerketa institutua  
instituto de investigación sanitaria

# Disfunción de las células precursoras dérmicas asociada al envejecimiento cutáneo: SOX2 como regulador del destino del linaje celular

**Laura Yndriago Acha**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor  
por la Universidad del País Vasco – Euskal Herriko Unibertsitatea

Departamento de Biología Celular e Histología

Facultad de Medicina y Enfermería

Bajo la dirección del Doctor

**Ander Izeta Permisán**

Donostia – San Sebastián, abril de 2020



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 del Departamento de Educación, Política Lingüística y Cultura del Gobierno Vasco - Eusko Jaurlaritza, y a las ayudas para la investigación recibidas del Instituto de Salud Carlos III, de la Diputación Foral de Gipuzkoa, del Gobierno Vasco, del Gobierno Español y de la Unión Europea.



*A mis ángeles en el cielo y en la tierra.*





## Agradecimientos

---

En las subidas y bajadas implícitas en la realización de una Tesis Doctoral, el camino se ha hecho ameno por las personas con quienes he compartido el día a día, las que se han convertido en mi familia, las que han reído y llorado mis tristezas y alegrías, y las que han sido un punto de apoyo indispensable.

Como todas estas historias, empiezan por quien te abre la primera puerta, quien confía en tus capacidades y te anima a ir a por más. Gracias Ander, porque más allá de haber sido un director de tesis, tu calidez humana lo ha facilitado todo. Sin quererlo, tu pasión por la ciencia y esa vena científica innata nos contagia de la curiosidad necesaria para ser investigadores. No tengo palabras de agradecimiento suficientes para ti. Agradezco también al IIS Biodonostia por ser el espacio de catálisis para que todo ocurra.

He podido vivir la transformación del laboratorio de Ingeniería Tisular y agradezco a todas y a cada una de las personas que lo formaron y lo forman, porque todas han sido parte de este recorrido. A Araika Gutiérrez, por guiar y facilitar mis primeros pasos con la mejor disposición, aun cuando tenías tus propias batallas. A Haizea Iribar, por tu paciencia, por tus ganas de ayudar, por tu encanto, tu rigurosidad y crítica científica, tu ética y tu profesionalidad; has sido mentora, amiga, compañera y colega. Para ti tampoco hay gracias suficientes. A Virgi, por el apoyo técnico y personal, por tu compañía en las horas de procesamientos y por hacer todos los cortes que te cayeron encima con este proyecto. A Nanda, porque me trajiste a mi país, me devolviste mis palabras, mis sabores y siempre me inyectas positivismo, nunca pensé que estaríamos tan cerca después de la universidad y no puedo estar más feliz por ello. A Sandruski que llegaste con esa fuerza y ese ímpetu tan tuyo en el momento idóneo para darme las fuerzas y el apoyo que necesitaba para emocionarme de nuevo con el *bench*, ya hemos llegado al río nena, pero éste desemboca en el mar. A Héctor que en todo momento estás dispuesto a ayudarme, incluso cuando te calculé un poco mal la edad. A Leire, por echar una mano con esos procesamientos que de

otra forma hubiesen sido interminables. A Ainhoa y Paula, que han refrescado de energía al labo.

A los estudiantes de prácticas cuyo trabajo ha estado enmarcado dentro de este proyecto: Ignacio Prieto, Paula Castro, Amaia Garmendia, Ceren Sudem y Sarah Rey; todos hicieron aportes destacables en este trabajo.

Al grupo de Oncología Celular, empezando por Ander Matheu por las críticas constructivas que has aportado al proyecto que sin duda nos ayudan a mejorar. A Leire Moreno, porque las extracciones en el animalario hubiesen sido muy aburridas sin compartir los pormenores de nuestra vida mientras clasificábamos órganos. A Miren Revuelta tienes una calidad humana y una determinación inigualables. A Jaione por tu positividad constante, a Mikel por la alegría (aunque todavía te faltarán unos centímetros), a Juncal, Ander, María A y Maddalen que de una u otra forma me han sacado sonrisas estos años. No menos importante gracias a Estefanía, que eres un pilar, una hormiguita que trabaja sin cesar para ti y para todos.

Al grupo de Oncología Molecular, empezando por María Arestín que me has enseñado que todo se puede decir con respeto y una sonrisa, a Carla por tu ayuda con el citómetro y cómo no las risas con tus historias, a Esther que fuiste mi compi y confidente de batallas. Al italianini Giovanni, que aunque (casi siempre) nuestros puntos de vista son distintos esa puede ser la base de grandes amistades. A Maitena, porque los chocolates eran un pago muy barato por tu ayuda con los macros, gracias!

Mi agradecimiento más especial y hondo se merecen las Caffarel Girls, empezando por María que inconscientemente te convertiste en mi modelo a seguir, me demuestras día tras día que la bondad es indispensable para lograr cualquier objetivo; de sobra están las gracias por tu ayuda académica que ha sido infinita. A Andrea, gracias por tu trabajo y tu tiempo invertido en los westerns, juntas aprendemos que de las cosas negativas también salen resultados. A Angela, mi fofinha, eres de los mayores tesoros que me dejan estos años en BD, me has dado apoyo y abrazos, hemos compartido lágrimas, sonrisas, sorpresas, confidencias, experimentos, divagaciones de fibros y de macrófagos, tras estas

puertas seguirás siendo una de mis grandes amigas. Y a Joana, por tu interés en la ciencia por abrir a nosotras tus sentimientos y enseñarnos lo que significa la empatía.

Gracias a nuestros colaboradores: empezando por Marcos Araúzo y Daniela Gerovska por los análisis de datos que han derivado de este proyecto; a Adam Strange y Anna Maeva del UCL Eastman Institute, por los análisis de luz polarizada y microscopía de fuerza atómica. A la plataforma de Histología de Biodonostia, en especial a Ana Aiausti y Claudia, por su aporte en el procesamiento de muestras histológicas. A la plataforma de Genómica: Ana Gorostidi y Carmen, por la constante disposición siempre con una sonrisa. A Irantzu Llarena del servicio de microscopía confocal del CIC Biomagune, por su ayuda con el microscopio y sus sugerencias para el procesamiento de las imágenes.

Finalmente, agradezco a mi familia por ayudarme y apoyarme en todo momento para emprender este camino. A mi Mamá y Tutú, donde todo empezó y a mi Papá por su lucha para seguir aquí. A Iker, por la constante comprensión, por animarme a perseguir mis metas, por hacerme ver la simplicidad cuando se me pierde, por tus esfuerzos en convencerme de que podemos hacer todo, absolutamente todo lo que queramos en la vida. Al aita, por el apoyo incondicional y por querer siempre salvaguardar nuestro porvenir. A Mary Jose, a los abuelos y a los tíos por no hacerme sentirme desamparada y convertirse en mi actual familia.

Doy las gracias por ser tan afortunada.

## ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDO	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix



## **INDICE DE CONTENIDO**

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
GENERALES	3
GENES Y PROTEÍNAS	5
<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
Estructura de la piel	13
La epidermis	14
La dermis	15
Los fibroblastos	16
La matriz dérmica extracelular	20
Tejido graso dérmico	23
El folículo piloso	27
El ciclo del pelo	29
Glándulas sebáceas y sudoríparas	31
Sistema nervioso cutáneo	32
Las células de Schwann	35
Sistema vascular cutáneo	38
SOX2 en la piel	39
Generalidades	39
SOX2 en el desarrollo embrionario de la piel	40
SOX2 en la piel adulta	42
SOX2 como regulador de las células madre adultas	43
Generalidades de las células madre	43
Plasticidad celular y mecanismos regenerativos	45
	iii

Células madre dérmicas adultas	47
El envejecimiento	52
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>59</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>63</b>
Animales	65
Genotipado y sacrificio	66
Inducción de fase anágena por depilación	66
Disección de la piel	66
Preservación del tejido	67
Métodos de cultivo de líneas celulares	68
Métodos de cultivos primarios	69
Aislamiento de células precursoras dérmicas de ratón	69
Disgregación de dermoesferas en suspensión	71
Cuantificación del tamaño de las dermoesferas	71
Siembra de dermoesferas para IF	71
Diferenciación neural de células precursoras dérmicas	72
Diferenciación adiposa de células precursoras dérmicas	72
Análisis de la población EGFP+ por citometría de flujo	73
Métodos de análisis de expresión génica	74
Aislamiento de RNA de piel ventral	74
Aislamiento de RNA de células en cultivo	74
Cuantificación de la cantidad y la calidad del RNA	75
Digestión de DNA contaminante en extractos de RNA	75
Retrotranscripción (RT) de RNA a cDNA	76
Evaluación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR)	76
Cuantificación de la expresión génica relativa	79
Métodos histológicos de evaluación del tejido dérmico	80

Tinción de Hematoxilina-Eosina (HE)	80
Tinción con rojo sirio (PSR, Picrosirius Red)	80
Tinción con Verhoeff-Van Gieson (VVG)	81
Inmunohistoquímica (IHQ)	82
Métodos de inmunofluorescencia (IF)	84
IF en tejido completo	84
IF en cortes congelados	84
IF en células a partir de cultivos primarios	85
Métodos de adquisición de imagen	86
Análisis estadísticos	87
Análisis de imagen	87
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>89</b>
4.1 Caracterización funcional in vitro de las células dérmicas precursoras con el envejecimiento	91
4.2 Caracterización de la localización, número y funcionalidad in vitro de las células precursoras dérmicas Sox2+ con el envejecimiento	99
4.3 La alteración de la homeostasis dérmica durante el envejecimiento se acentúa con la heterocigosis de Sox2	118
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>129</b>
5.1 Con la edad hay alteraciones en la inervación y microvasculatura cutánea, sin afectar la localización de las células precursoras dérmicas	133
5.2 Con el envejecimiento hay una reducción del número de células precursoras dérmicas y una posible alteración de la plasticidad celular in vitro mediada por Sox2	134
5.3 Alteraciones en las rutas de senescencia en las células precursoras dérmicas con el envejecimiento	136
5.4 Con la edad, los cambios proliferativos conllevan al desequilibrio entre las poblaciones celulares con diferentes niveles de Sox2, afectando su potencialidad y funcionalidad	139



5.5 En el modelo Sox2 <sup>EGFP</sup> hay un desequilibrio en el compromiso de linaje que conlleva a alteraciones dérmicas estructurales	142
5.6 Consideraciones finales	145
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>147</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>151</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>179</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Distribución de distintas proteínas, proteoglicanos y GAG en la dermis	23
Tabla 1.2 Perfil de marcadores de células de Schwann en la piel humana	36
Tabla 1.3 Cambios en la piel con el envejecimiento cronológico	53
Tabla 3.1 Modelos animales	65
Tabla 3.2 Protocolo para la digestión específica de DNA	75
Tabla 3.3 Protocolo de reacción y condiciones para la retrotranscripción de RNA	76
Tabla 3.4 Protocolo qPCR para tecnología <i>TaqMan</i>	77
Tabla 3.5 Descripción de sondas TaqMan empleadas	77
Tabla 3.6 Protocolo qPCR para tecnología SYBR Green	78
Tabla 3.7 Descripción de cebadores empleados con <i>SYBR Green</i>	79
Tabla 3.8 Protocolo de tinción de fibras de colágeno con PSR	81
Tabla 3.9 Protocolo de tinción de fibras elásticas con VVG	82
Tabla 3.10 Protocolo de IHQ para la detección de POSTN en dWAT	83
Tabla 3.11 Descripción de anticuerpos primarios y secundarios usados para IF	86



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Principales capas que componen la piel mamífera	13
Figura 1.2 Piel humana adulta de la región dorsal	15
Figura 1.3 Organización y composición de las fibras de colágeno y fibras elásticas dentro de la dermis	22
Figura 1.4 Estructura de la piel de ratón y la piel humana	24
Figura 1.5 Relación del linaje fibroblástico reticular y adiposo en la dermis de ratón	25
Figura 1.6 Acoplamiento entre el ciclo del pelo y el grosor del dWAT	26
Figura 1.7 Estructura del folículo piloso	29
Figura 1.8 Esquema del ciclo del pelo en el ratón	31
Figura 1.9 Dibujo esquemático de la organización de las fibras nerviosas aferentes y su recorrido hasta el sistema nervioso central	33
Figura 1.10 Dibujo esquemático simplificado de los plexos nerviosos en la piel	34
Figura 1.11 Dibujo esquemático de los receptores sensitivos en la piel glabra y folicular	35
Figura 1.12 Dibujo esquemático de células de SCH cutáneas especializadas	37
Figura 1.13 Expresión de <i>Sox2</i> durante el desarrollo embrionario y en tejidos adultos	40
Figura 1.14 Establecimiento de la placa germinal y el condensado dérmico en el embrión	41
Figura 1.15 Expresión de <i>Sox2</i> en piel murina adulta	43
Figura 1.16 Estrategias de auto-renovación y mantenimiento de las células madre adultas	45
Figura 1.17 Diagrama de Waddington aplicado a las células madre adultas	46
Figura 4.1 Con el envejecimiento se reducen los nichos de células madre en la piel del ratón C57	92
Figura 4.2 El envejecimiento altera el potencial esferogénico	94
Figura 4.3 Alteraciones proliferativas en dermoesferas de animales C57 envejecidos	95
Figura 4.4 Análisis de la expresión <i>in vitro</i> de marcadores de senescencia con el envejecimiento	96
Figura 4.5 Alteración en el potencial de diferenciación de las células precursoras dérmicas con la edad	98

Figura 4.6 Con el envejecimiento se mantiene la expresión de EGFP bajo el promotor de <i>Sox2</i>	100
Figura 4.7 La localización de las células <i>Sox2<sup>EGFP</sup></i> + no cambia con el envejecimiento	101
Figura 4.8 La coexpresión de EGFP con marcadores de célula madre neural y células gliales se mantiene con el envejecimiento	103
Figura 4.9 La piel envejecida en fase anágena mantiene la coexpresión de EGFP y marcadores gliales	105
Figura 4.10 La capacidad esferogénica está afectada con el envejecimiento y con la heterocigosis de <i>Sox2</i>	107
Figura 4.11 La población celular <i>Sox2<sup>EGFP</sup></i> + disminuye con el envejecimiento.	110
Figura 4.12 Caracterización <i>in vitro</i> de las poblaciones celulares con intensidad alta y media de <i>Sox2<sup>EGFP</sup></i>	111
Figura 4.13 Caracterización <i>in vitro</i> de los cambios en la proliferación de las células <i>Sox2<sup>EGFP</sup></i> con la edad	114
Figura 4.14 Cambios en la capacidad de diferenciación <i>in vitro</i> de las células dérmicas <i>Sox2<sup>EGFP</sup></i> con el envejecimiento.	116
Figura 4.15 Caracterización de los cambios asociados a la edad en la piel wt y <i>Sox2<sup>EGFP</sup></i>	119
Figura 4.16 Expresión de marcadores adipogénicos en piel de ratones wt y <i>Sox2<sup>EGFP</sup></i>	121
Figura 4.17 Alteración de las fibras elásticas (FE) en la piel del ratón <i>Sox2<sup>EGFP</sup></i>	122
Figura 4.18 La arquitectura de las fibras de colágeno está alterada en la piel <i>Sox2<sup>EGFP</sup></i>	123
Figura 4.19 La cantidad de CCN2 dérmico cambia con la edad y está alterada en la piel <i>Sox2<sup>EGFP</sup></i>	125
Figura 4.20 Con la edad y la heterocigosis de <i>Sox2</i> , POSTN se acumula de forma específica en distintos nichos dérmicos	126
Figura 4.21 La ruta de señalización mediada por Osm/Osmr podría estar alterada frente al envejecimiento y heterocigosis de <i>Sox2</i>	127
Figura 5.1 Relación entre los componentes que mantienen la homeostasis de la piel	145

## ABREVIATURAS

---



## GENERALES

APM	Músculo erector del pelo ( <i>Arrector Pili Muscle</i> )
BM	Membrana basal
BSA	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
cDNA	hebra complementaria de ADN ( <i>complementary Desoxyribonucleic Acid</i> )
CNS	Sistema nervioso central ( <i>Central Nervous System</i> )
CTS	Vaina de tejido conectivo ( <i>Connective Tissue Sheath</i> )
DC	Condensado dérmico ( <i>Dermal Condensate</i> )
DP	Papila dérmica ( <i>Dermal Papilla</i> )
DS	Vaina dérmica ( <i>Dermal Sheath</i> )
DS-Fb	Fibroblastos asociados a la DS
dWAT	Tejido adiposo blanco dérmico ( <i>dermal White Adipose Tissue</i> )
ECM	Matriz extracelular ( <i>ExtraCellular Matrix</i> )
Fb-p	Fibroblastos papilares
Fb-r	Fibroblastos reticulares
FBS	Suero fetal bovino
FDP-Fb	Fibroblastos de la papila dérmica folicular ( <i>Follicular Dermal Papilla fibroblasts</i> )
FE	Fibras elásticas
HAP	Células madre pluripotentes asociadas al folículo piloso ( <i>Hair-follicle-Associated Pluripotent stem cells</i> )
HF	Folículo piloso ( <i>Hair Follicle</i> )
hfDSC	Células madre dérmicas asociadas a la DP y CTS del folículo piloso ( <i>Hair follicle-Dermal Stem Cells</i> )
HFSC	Células madre del <i>bulge</i> del folículo piloso ( <i>Hair Follicle Stem Cells</i> )
HF-TAC	Células transitorias del folículo piloso ( <i>Hair Follicle Transit-Amplifying Cells</i> )
HP	Placa germinal ( <i>Hair Placode</i> )
HS	Fibra capilar ( <i>Hair Shaft</i> )
HTMR	Mecanorreceptor de alto umbral ( <i>High-Threshold MechanoReceptor</i> )



IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
iPS	Células madre pluripotentes inducidas ( <i>induced Pluripotent Stem Cells</i> )
IRS	Vaina interna de la raíz ( <i>Inner Root Sheath</i> )
LINC	<i>Linkers of nucleoskeleton and cytoskeleton</i>
LTMR	Mecanorreceptor de bajo umbral ( <i>Low-Threshold MechanoReceptor</i> )
m-SCH	Célula de Schwann mielinizante
ORS	Vaina externa de la raíz ( <i>Outer Root Sheath</i> ).
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PC	músculo <i>Panniculus Carnosus</i>
PFA	Paraformaldehído
PNS	Sistema nervioso periférico ( <i>Peripheral Nervous System</i> )
PSR	Tinción con rojo sirio ( <i>Picrosirius Red</i> )
qPCR	Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa ( <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
RNAsa	Ribonucleasa ( <i>Ribonuclease</i> )
r-SCH	Célula de Schwann no mielinizante o célula de Remak
SAASP	Proteínas secretadas asociadas al envejecimiento de la piel ( <i>Skin Aging-Associated Secretory Proteins</i> )
SASP	Fenotipo secretado asociado a la senescencia ( <i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i> )
SC	Célula madre ( <i>Stem Cell</i> )
SCH	Célula de Schwann
SCP	Célula de Schwann precursora ( <i>Schwann Cell Precursor</i> )
SG	Glándula sebácea ( <i>Sebaceous Gland</i> )
SKPs	Células precursoras derivadas de la piel ( <i>Skin Derived Precursors</i> )
sWAT	Tejido adiposo blanco subcutáneo ( <i>subcutaneous White Adipose Tissue</i> )
WT	Genotipo <i>Wyl/d type</i>

## GENES Y PROTEÍNAS

Adipoq	Adiponectin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CCN2 (CTGF)	Cellular Communication Network Factor 2
CDH2	N-cadherin
Cdkn1a (p21)	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
Cdkn1b (p27)	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
Cdkn2a (p16)	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
Cdkn2b (p15)	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B
Cebpa	CCAAT Enhancer Binding Protein- $\alpha$
COLXAX	collagen type X alpha X
DCN	Decorin
Dlk1	Delta like non-canonical notch ligand-1
Dpp4 (CD26)	Dipeptidyl peptidase-4
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
Egr2 (Krox20)	Early Growth Response-2
Fabp4	Fatty Acid Binding Protein-4
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAG	Glycosaminoglycan
IL-6	Interleukin 6
K	Keratin
KGF	Keratinocyte Growth Factor
L1CAM (CD171)	Neural cell adhesion molecule L1
MAGP	Microfibril-Associated Glycoprotein
MBP	Myelin Basic Protein
MCAM (CD146)	Melanoma cell adhesion molecule
Mitf	Melanocyte inducing transcription factor
MMP	Metalloproteinase
MYC	v-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

NCAM (CD56)	Neural cell adhesion molecule
NES	Nestin
NG2	Neural/glial antigen-2
OSM	Oncostatin M
OSMR	Oncostatin M receptor
p53	Tumor protein p53
P75NTR (NGFR)	P75 Neurotrophin receptor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFRa/b	PDGF receptor alpha/beta
PECAM-1 (CD31)	Platelet endothelial cell adhesion molecule
Plp1	Proteolipid protein-1
POSTN	Periostin
Ppar $\gamma$	Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$
S100	S100 Calcium Binding Protein A1
SHH	Sonic HedgeHog
Sox2/10	Sex determining region Y-box 2/10
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
VCAN (CSPG2)	Versican
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin

## RESUMEN

---



Durante el envejecimiento se produce una disminución funcional progresiva de los tejidos, a la cual subyace la pérdida del potencial regenerativo por alteraciones en el funcionamiento de las células madre/precursoras residentes del tejido. En la piel, una población de células precursoras dérmicas es trazada por la expresión de *Sox2*, conocido por su función en el mantenimiento de las células madre. En este tejido, los niveles de *Sox2* modulan la transición entre diferentes estadios celulares gliales y perivasculares con capacidad multipotente. En este trabajo hipotetizamos que la disminución funcional dérmica que ocurre en el envejecimiento es consecuencia de alteraciones en las poblaciones de células precursoras *Sox2*<sup>+</sup>. Utilizando los modelos animales C57BL/6J y *Sox2*<sup>EGFP</sup> envejecidos cronológicamente, hemos encontrado alteraciones en los nichos dérmicos nervioso y vascular, en conjunto con una disminución *in vitro* en la capacidad proliferativa, en el potencial de diferenciación, y un aumento de la senescencia celular. Más aún, la cantidad total de células precursoras *Sox2*<sup>+</sup> disminuye con la edad, pero esta pérdida es acusada en la fracción celular con altos niveles de expresión de *Sox2*, mientras que aquella con bajos niveles de expresión parece estar menos afectada por el envejecimiento. Estos cambios, producto de alteraciones proliferativas selectivas, afectan al potencial de diferenciación hacia los linajes neural y mesodérmico. De hecho, en el animal heterocigoto *Sox2*<sup>EGFP</sup> hay un mayor compromiso adiposo, incluso desde edades jóvenes, que es concomitante con una disminución de la celularidad, resultando en alteraciones tempranas de la estructura de la matriz extracelular dérmica. Los resultados de este trabajo proponen la importancia de *Sox2* en el mantenimiento de la homeostasis dérmica durante el envejecimiento, a través de la regulación de diversas poblaciones celulares en la piel.



## 1. INTRODUCCIÓN

---





## ESTRUCTURA DE LA PIEL

La piel es la capa externa del organismo de los animales vertebrados y en el humano supone el 5% del peso corporal total (Sontheimer, 2014). Su principal función es permitir al animal vivir en un determinado ambiente e interactuar en él, para lo cual debe mantener la homeostasis del organismo. La adaptación de los animales vertebrados a diversos entornos ha hecho que la piel sea un órgano muy variable morfológicamente y con una amplia gama de estructuras especializadas, como: el pelo, las escamas, las uñas, las pezuñas, las espuelas, entre otras (Montagna, 1967; 1971). La piel evita la pérdida percutánea de fluidos, mantiene la temperatura corporal, percibe estímulos sensoriales del entorno y sirve como principal barrera protectora del organismo (Farage *et al.*, 2010). Para cumplir estas funciones, la piel está compuesta por diversas estructuras con gran heterogeneidad celular.

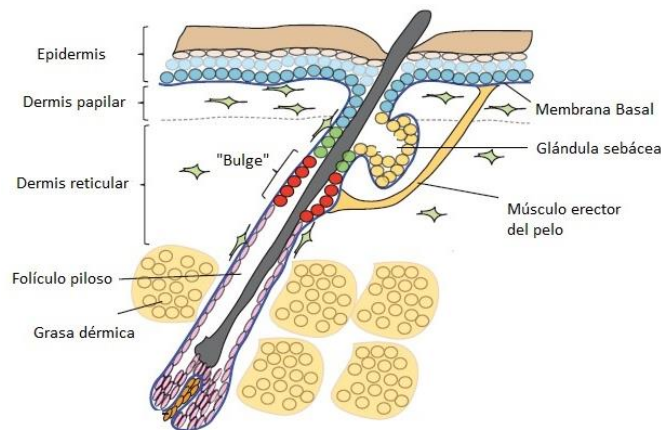


Figura 1.1 Principales capas que componen la piel mamífera [modificado de (Watt & Fujiwara, 2011)].

La piel está compuesta por tres capas: la epidermis, la dermis y el tejido graso dérmico; los anejos cutáneos, tales como el folículo piloso y las glándulas sudoríparas, se extienden desde la epidermis hasta las capas más profundas de la piel (Figura 1.1). La vascularización e inervación cutánea están presentes a lo largo de todas las capas, formando distintos plexos (Nolano *et al.*, 2013; Camargo & Gemperli, 2018).

En la introducción de este trabajo se utilizará la piel humana como referencia, por la abundante descripción morfológica existente y por su relevancia clínica. Sin embargo, esta investigación se ha realizado en ratones de laboratorio, por lo que cuando se considere relevante, la información se limitará a conceptos y mecanismos propios de esta especie.

## LA EPIDERMIS

La epidermis es la capa más externa de la piel, mediante estrategias químicas y estructurales, sirve de barrera protectora al organismo. Químicamente segrega péptidos microbianos, ácidos y enzimas hidrolíticas; a nivel celular tiene una organización estratificada y una matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*) de gran resistencia (Baroni *et al.*, 2012). Está compuesta principalmente por queratinocitos en diversos estadios de diferenciación. La constante proliferación de los queratinocitos basales mantiene la renovación del tejido epidérmico (Mackenzie, 1997; Ghazizadeh & Taichman, 2001; 2005). Al reprimir la proliferación, los queratinocitos se diferencian formando las capas espinosa y granulosa, en las cuales aún se mantiene la viabilidad celular. La diferenciación terminal da lugar a los corneocitos, que pierden viabilidad, carecen de núcleo y adquieren un fenotipo aplanado y escamoso (Blanpain & Fuchs, 2006; Baroni *et al.*, 2012). La epidermis se separa de la dermis por una membrana basal, rica en laminina-5. Sobre ésta los queratinocitos se adhieren a través de interacciones célula-matriz mediada por integrinas (Blanpain & Fuchs, 2006; Baroni *et al.*, 2012).

Otros tipos celulares residen también en la epidermis. Las células de Langerhans, derivadas de la médula ósea, son células dendríticas presentadoras de antígenos que median la respuesta inmune primaria, siendo especialmente relevantes en procesos alérgicos e infecciosos (Atmatzidis *et al.*, 2017). Las células de Merkel son células epidérmicas especializadas que se asocian directamente con terminales nerviosas, detectando estímulos táctiles concretos (Morrison *et al.*, 2009; Woo *et al.*, 2015). Los melanocitos originados en la cresta neural durante el desarrollo embrionario, se ubican en la membrana basal de la epidermis, donde producen melanina que es transferida a los queratinocitos y sirve como filtro natural de rayos ultravioleta (Uong & Zon, 2010).

## LA DERMIS

La dermis es una región sumamente heterogénea que alberga estructuras con orígenes embrionarios diversos, las cuales a su vez están formadas por numerosos tipos celulares especializados (Ross & Pawlina, 2016). Esto confiere a la dermis un alto nivel de complejidad y a la vez la convierte en un órgano idóneo para estudiar la interacción entre distintos tipos celulares. Por otro lado, la convergencia de varios sistemas dentro del mismo órgano permite a la piel cumplir las funciones básicas de soporte, protección, termorregulación y capacidad táctil (Brown & Krishnamurthy, 2019).

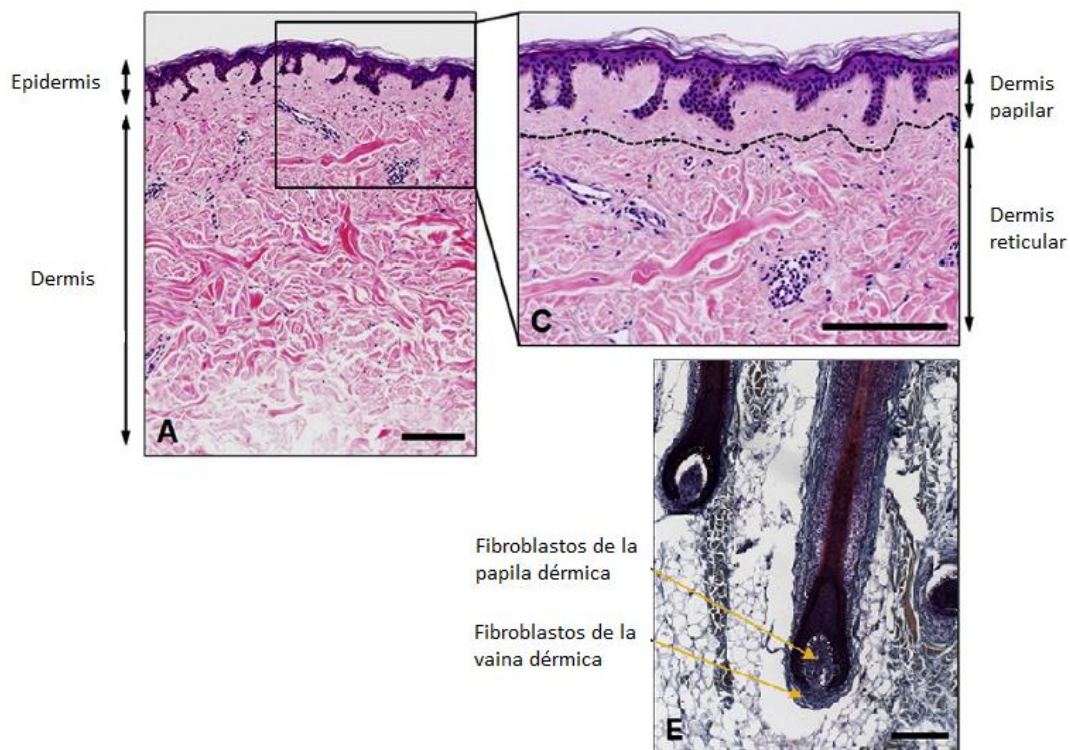


Figura 1.2 Piel humana adulta de la región dorsal. (A) Estructura general de la piel glabra con las crestas rete que forma la epidermis. (C) Diferencia morfológica entre la dermis papilar y reticular. (E) Folículo piloso. Escala 200  $\mu\text{m}$  [Modificado de (Sriram *et al.*, 2015)].

La dermis es la capa inmediatamente contigua a la epidermis (Figura 1.1, Figura 1.2, Figura 1.4), cuyo grosor varía entre especies y región corporal (Wei *et al.*, 2017). Por localización y composición de la ECM, la dermis se subdivide en papilar y reticular (Figura 1.2). La dermis papilar o superior, se ubica por debajo de la membrana basal epidérmica

formando crestas papilares (*dermal papillae*) cuya contraparte epidérmica se denomina crestas rete (*rete ridges*). En las crestas papilares se agrupan terminaciones nerviosas y conglomerados de capilares que nutren a la epidermis y sustentan la comunicación con la misma (Ham & Cormack, 1987). La dermis papilar se caracteriza por tener alta densidad celular, elevado contenido de proteoglicanos y fibras de colágeno finas y poco organizadas, cuyo contenido de colágeno tipo III es mayor que en la dermis profunda. El límite inferior de la dermis papilar está determinado por el plexo vascular subpapilar (*rete subpapillare*); desde éste hasta el plexo vascular profundo (*rete cutaneum*) se localiza la dermis reticular o profunda. Ésta tiene menor celularidad pero mayor organización de la ECM, la cual se compone por fibras de colágeno gruesas con mayor contenido de colágeno tipo I entrelazadas con fibras elásticas (FE) (Sorrell & Caplan, 2004; Rippa *et al.*, 2019).

La piel del ratón carece de las crestas rete y papilares, aunque pueden formarse estructuras similares durante el proceso de cicatrización cutánea (Sundberg *et al.*, 2012). Por otro lado, la distinción entre la dermis papilar y reticular es más difusa que en la piel humana, aunque mantiene las características básicas referentes a la ECM.

## LOS FIBROBLASTOS

La ECM es sintetizada principalmente por los fibroblastos. Los fibroblastos son células mesenquimales productoras de colágeno y FE que en conjunto forman la ECM de los tejidos conectivos, entre ellos la dermis; los fibroblastos son una población funcionalmente heterogénea, cuyo origen embrionario es específico según su localización, y con programas transcripcionales variables a lo largo de la vida del individuo (Driskell & Watt, 2015). La función de los fibroblastos no es exclusivamente estructural, también están involucrados en la homeostasis del tejido a través de la secreción de citoquinas y factores de crecimiento que ejercen señales sobre células no fibroblásticas.

La localización de los fibroblastos en la dermis determina su clasificación más amplia. Los fibroblastos papilares (Fb-p) se ubican en la región dérmica papilar y tienen una morfología alargada en forma de huso, mientras que los fibroblastos reticulares (Fb-r) se

asocian a la zona dérmica reticular y poseen una morfología estrellada. Comparativamente, los Fb-p poseen mayor capacidad de proliferación en cultivo, mientras que los Fb-r tienen mayor contractilidad (Harper & Grove, 1979; Sorrell *et al.*, 1996). La capacidad secretora de los fibroblastos en cada región difiere; así, los Fb-p en cultivo expresan altos niveles de colágeno tipo XVI y decorina (DCN), mientras que la expresión de versican (VCAN) es baja. Por su parte, los Fb-r tienen baja expresión de colágeno tipo XVI y DCN, pero alta secreción de VCAN. De manera común, ambos tipos de fibroblastos sintetizan colágeno tipo I y III en las mismas proporciones, así como también otros tipos de colágeno y tenascinas (Sorrell & Caplan, 2004; Sriram *et al.*, 2015).

La heterogeneidad funcional de los fibroblastos se refleja en numerosos procesos. Por su cercanía con la epidermis, los Fb-p interactúan con los queratinocitos de forma paracrina modulando su diferenciación y síntesis de la membrana basal (Smola *et al.*, 1998). Esta comunicación está mediada, al menos en parte, por la secreción de los factores KGF, (*keratinocyte growth factor*), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) e IL-6 (*interleukin-6*), cuyos receptores se encuentran en los queratinocitos (Sorrell *et al.*, 2004). La comunicación entre la epidermis y los fibroblastos es recíproca. Las señales de las rutas SHH (*Sonic Hedgehog*) y Wnt/ $\beta$ catenina provenientes de la epidermis, promueven la proliferación y deposición de ECM en la dermis papilar (Lichtenberger *et al.*, 2016); mientras que la actividad de los queratinocitos y su diferenciación *in vitro* está modulada por miRNAs contenidos en vesículas extracelulares segregadas por los fibroblastos (Terlecki-Zaniewicz *et al.*, 2019). La comunicación intercelular con la epidermis depende del tipo de fibroblasto. Los mio-fibroblastos aislados del lecho de heridas no modulan la diferenciación epidérmica, ni estimulan la secreción de la membrana basal en la misma medida que los Fb-p (Moulin *et al.*, 2000). Por otro lado, los Fb-p tienen un enriquecimiento transcripcional en rutas señaladoras de la respuesta inmune, desempeñando funciones de defensa contra las infecciones (Janson *et al.*, 2012).

Los Fb-r están mayormente involucrados en la producción de ECM, en homeostasis y en cicatrización. A pesar de su relativa distancia con la epidermis, los Fb-r responden a señales paracrinas provenientes de ella. La producción de TGF- $\beta$ 2 (*Transforming growth*

*factor  $\beta 2$* ) epidérmico, influye sobre la proliferación, deposición de ECM y diferenciación de los Fb-r (Lichtenberger *et al.*, 2016). Las propiedades celulares intrínsecas de linajes específicos de fibroblastos favorecen los procesos fibróticos, dando lugar al tejido cicatricial en la piel adulta (Rinkevich *et al.*, 2015). Así, los cultivos de Fb-r exhiben un fenotipo similar al que se encuentra en el tejido cicatricial hipertrófico, con una elevada producción de TGF- $\beta$ , CCN2 (*Cellular Communication Network Factor 2*) también conocido como CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*),  $\alpha$ -SMA (*Smooth Muscle Actin*), HSP47 (*Heat Shock Protein 47*) y VCAN (Wang *et al.*, 2008). Según el perfil de expresión génica de los Fb-r, también están involucrados en la motilidad celular, organización del citoesqueleto, capacidad de contracción mecánica y desarrollo neuronal (Janson *et al.*, 2012).

Aparte de los Fb-p y Fb-r clasificados en función de su morfología y localización, existen otras dos poblaciones de fibroblastos asociadas al folículo piloso (Figura 1.2, Figura 1.7): los fibroblastos de la papila dérmica (FDP-Fb, *follicular dermal papilla fibroblasts*), y los fibroblastos asociados a la vaina dérmica folicular (DS-Fb, *dermal sheath fibroblasts*). Los FDP-Fb están implicados en la regulación del tamaño del bulbo, de la longitud y grosor del pelo, y en la duración de la fase de crecimiento del mismo (anagen) (Sriram *et al.*, 2015). Por su parte, los DS-Fb rodean todo el folículo piloso formando la vaina de tejido conectivo, su función se ha asociado a la regeneración de la piel interfolicular, a la regeneración del folículo piloso y a la angiogénesis asociada al ciclo del pelo (Higgins *et al.*, 2017; Yoshida *et al.*, 2019). Aunque los fibroblastos tienen un origen mesodérmico, bien sea derivados de la placa lateral embrionaria o del dermomiótomo, diversos trazados de linaje en ratón sugieren que tanto los FDP-Fb como los DS-Fb tienen su origen en la cresta neural durante el desarrollo embrionario (Sriram *et al.*, 2015).

La amplia gama de funciones atribuidas a los fibroblastos plantea que deben existir diversas subpoblaciones, o bien que exhiben una gran plasticidad celular (Driskell & Watt, 2015). Durante el desarrollo embrionario, los fibroblastos expresan temporal y espacialmente marcadores que determinan su linaje y localización. En la dermis postnatal del ratón se han identificado al menos cuatro poblaciones de fibroblastos: i) células CD26+/Sca1- (*Dipeptidyl peptidase-4/Stem cells antigen-1*) que contribuyen a los Fb-p, la

papila dérmica y el APM; ii) células Dlk1+/Sca1- (*Delta like non-canonical notch ligand-1*) que dan lugar a Fb-r y contribuyen a todos los compartimientos mesenquimales; iii) células Dlk1+/Sca1+ y iv) Dlk1-/Sca1+ que contribuyen a la progenie adiposa en el tejido hipodérmico (Driskell *et al.*, 2013). Estos marcadores no son útiles para la identificación de fibroblastos en piel adulta. Durante el desarrollo embrionario el marcador CD26 define a los Fb-p, pero su expresión en edades adultas es menos restrictiva y se encuentra tanto en Fb-p como en Fb-r. No obstante, el 94% de células CD26+ aisladas de tejido adulto provienen de una población mesodérmica embrionaria trazada con el marcador En1 (*Engrailed-1*), y es responsable del potencial fibrótico característico de los fibroblastos (Rinkevich *et al.*, 2015).

Por otro lado, no se conoce si los marcadores que se han sugerido para separar las diferentes poblaciones fibroblásticas en el ratón, están o no conservados en la dermis humana. Diversos grupos se han centrado en caracterizar estas poblaciones y la firma transcriptómica que las define. Se ha planteado la existencia de al menos 2 poblaciones de fibroblastos que se distinguen por la expresión específica de los marcadores SFRP2 (*Secreted frizzled related protein-2*) y FMO1 (*Flavin containing monooxygenase-1*); la primera coexpresa CD26 y proteínas colagenosas, mientras que la segunda tiene menor expresión de COL1A1 y COL1A2, sugiriendo que su función principal no es la síntesis de ECM. Otras 5 subpoblaciones menores se caracterizan por la expresión de CRABP1 (*Cellular retinoic acid binding protein-1*), COL11A1, FMO2, PRG4 (*Proteoglycan 4*) y C2ORF40 (*Chromosome-2 open reading frame-40*); éstas posiblemente representan células de la papila dérmica del folículo piloso, células precursoras de tendones, músculo y tejido conectivo, y células precursoras de adipocitos (Tabib *et al.*, 2018). Por otra parte, Philippeos y colaboradores describieron al menos cuatro poblaciones de fibroblastos en la dermis humana, cuya función no está restringida por la localización espacial. Así, todos los fibroblastos dérmicos mostraron expresión de los marcadores CD90 (*Thy-1 cell surface antigen*), PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$  (PDGF *receptor*  $\alpha/\beta$ ), mientras que las subpoblaciones específicas fueron definidas por la expresión de: i) CD90+CD39+CD26- correspondientes a Fb-p que expresan distintos tipos de colágeno y cuya expresión de CD39 (*CD39 antigen*) se conserva entre humano y ratón; ii) CD90+CD36+ (*Thrombospondin receptor*) ubicados



en la dermis profunda e incluye a los adipocitos maduros; iii) células perivasculares CD90+CD39-RGS5+ (*Regulator of G protein signaling-5*); y iv) dos subpoblaciones de fibroblastos no descritas hasta el presente y que expresan los marcadores CD90+CD39+CD26+ y CD90+CD39-RGS5- (Philippeos *et al.*, 2018).

A pesar de los esfuerzos por establecer marcadores que permitan la identificación y el aislamiento de los fibroblastos dérmicos, las tecnologías de análisis de célula única (*single cell RNA-seq*) dejan en evidencia que la heterogeneidad fibroblástica no es sólo a nivel de localización, sino también de firma transcriptómica. En este sentido, las diversas poblaciones de fibroblastos que se han identificado recientemente, parecen ser mejor clasificables por funcionalidad que por localización. Además, la expresión de marcadores tradicionales entre las distintas poblaciones fibroblásticas identificadas demuestra i) la inespecificidad para identificar poblaciones celulares concretas y ii) la plasticidad de este tipo celular (Vorstandlechner *et al.*, 2020).

## LA MATRIZ DÉRMICA EXTRACELULAR

La ECM dérmica confiere a la piel soporte, rigidez, elasticidad y resistencia a la deformación. En el adulto está compuesta principalmente por colágeno, FE, proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAG) y agua. Diversos tipos de colágeno fibrilares y no fibrilares conforman la matriz dérmica, de los primeros, los más abundantes son el colágeno tipo I (80%), el colágeno tipo III (15%) y el colágeno tipo V (5%) (Haydont *et al.*, 2019a). La proporción de los distintos tipos de colágeno dentro de las fibras varía en función de la región. Las fibras papilares tienen mayor contenido de colágeno tipo III e histológicamente son finas y desorganizadas; por su parte, las fibras reticulares poseen mayor cantidad de colágeno tipo I, son más gruesas y organizadas (Figura 1.3 y Tabla 1.1). La biomecánica y superestructura de las fibras de colágeno está mediada por colágenos de menor abundancia, denominados FACIT (*fibril-associated collagens with interrupted triple helices*). Entre éstos se encuentran los de tipo XII, XVI y XIV; los dos primeros se expresan preferencialmente en la dermis papilar, mientras que el de tipo XIV está más localizado en la zona reticular [Tabla 1.1, (Haydont *et al.*, 2019a)]. Los FACIT se ubican en la superficie de

las fibras de colágeno regulando el proceso de formación de las mismas (fibrillogénesis), y mediante la unión con fibrilina-1 modulan el anclaje con la red de FE (Kassner *et al.*, 2003).

La formación y ensamblaje de las fibras de colágeno se lleva a cabo a través de la nucleación y de la regulación. Los colágenos "nucleadores", principalmente de tipo V y XI (papilar y reticular respectivamente), se ubican en el centro de las fibras e inician la incorporación de otros tipos de colágeno. La regulación del tamaño, arquitectura y ensamblaje de las fibras de colágeno está mediada por los proteoglicanos: perlecano, lumicano, DCN y tenascina X (Kadler *et al.*, 2008; Nauroy *et al.*, 2017). De forma importante, la vía de señalización TGF- $\beta$ /Smad promueve la síntesis de colágeno, fibronectina, DCN y VCAN, e inhibe la síntesis de metaloproteinasas (MMP) que degradan la ECM, funcionando como la principal vía regulatoria de la producción de ECM (Quan & Fisher, 2015).

Los proteoglicanos son macromoléculas compuestas por un núcleo proteico, al cual se une de forma covalente un GAG que pertenece al grupo de los carbohidratos complejos. Los proteoglicanos tienen gran variabilidad molecular por lo que son un grupo químico multifuncional, que además de regular la interacción de las fibras de colágeno con otros elementos de la ECM, también interactúan con factores de crecimiento y citoquinas facilitando su retención dentro de la ECM (Sorrell & Caplan, 2009). Los proteoglicanos y los GAG, en especial el ácido hialurónico, tienen un papel fundamental en la retención del agua dentro del tejido. El agua se une a esta variedad de moléculas generando la presión osmótica que mantiene la rigidez y la resistencia a la deformación que caracterizan a la piel (Haydout *et al.*, 2019a). El contenido de proteoglicanos y GAG dentro del tejido conectivo determina en gran parte las propiedades biomecánicas del mismo.

Las FE confieren elasticidad a la piel, esta propiedad implica deformación y resiliencia, es decir volver a su estado original después de ser deformada (Naylor *et al.*, 2011). Las FE forman una red organizada y altamente estructurada que concurre desde la unión dermo-epidérmica hasta la dermis profunda (Figura 1.3). Las fibras de oxitalán penetran en la unión dermo-epidérmica perpendicularmente y están compuestas por microfibrillas ricas en fibrilina; son las FE más delgadas y adquieren una morfología de varilla que depende de la interacción con iones de calcio y con glicoproteínas MAGP

(*microfibril-associated glycoprotein*). En la dermis papilar se encuentran las fibras de elastina, compuestas por fibrilina y elastina en proporciones iguales; también discurren perpendiculares a la epidermis y son ligeramente más gruesas que las fibras de oxitalán. Entre ambos tipos de FE se halla la proteína de transición emilina (*elastin microfibrillar interface protein*), la cual regula la acumulación de tropoelastina alrededor de las fibras. En la dermis reticular las fibras se componen esencialmente de elastina, son más gruesas y se orientan paralelamente con respecto a la epidermis (Cotta-Pereira *et al.*, 1976; Haydont *et al.*, 2019a).

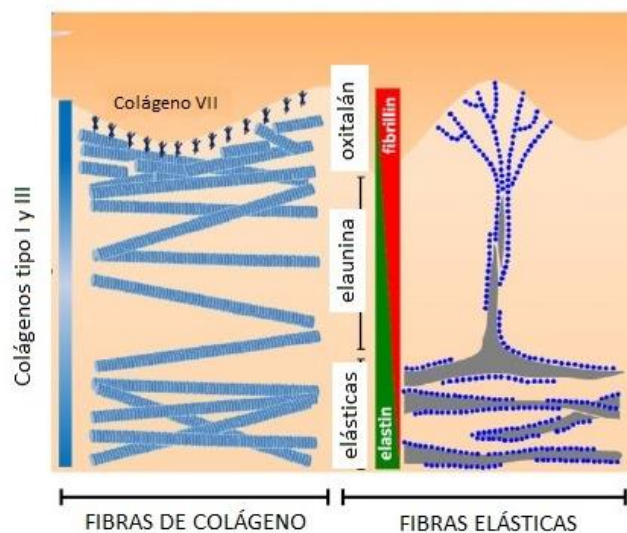


Figura 1.3 Organización y composición de las fibras de colágeno y fibras elásticas dentro de la dermis [modificado de (Naylor *et al.*, 2011)].

Las diferencias en la arquitectura y composición de la ECM dérmica proveen una amplia gama de nichos o microambientes que favorecen distintas señales para la células ubicadas en cada uno de ellos. Así, los procesos celulares de proliferación, diferenciación y migración, están altamente influenciados por las interacciones célula-ECM en nichos dérmicos específicos (Watt & Fujiwara, 2011; Gattazzo *et al.*, 2014). En particular, tanto el proceso de morfogénesis del folículo piloso como el ciclo del pelo, requiere un remodelado constante de la ECM para permitir la elongación del canal folicular (Mok *et al.*, 2019). En la Tabla 1.1 se resume la distribución de las proteínas más importantes de la ECM y otros componentes no-celulares en la dermis.

Tabla 1.1 Distribución de distintas proteínas, proteoglicanos y GAG en la dermis [adaptado de (Sriram *et al.*, 2015)].

	<b>DERMIS PAPILAR</b>	<b>DERMIS RETICULAR</b>
Colágeno tipo I/III	Bajo	Alto
Colágeno tipo IV	Positivo en la membrana basal	Negativo
Colágeno tipo VI	Positivo en la membrana basal y unión dermo-epidérmica	Positividad débil
Colágeno tipo XII	Positivo	Bajo-ausente
Colágeno tipo XIV	Bajo-ausente	Positivo
Colágeno tipo XVI	Positivo en la membrana basal y unión dermo-epidérmica	Negativo
$\alpha$ -SMA	Negativo	Vaina dérmica del folículo, APM, vasculatura
Tenascina-C	Positivo en la membrana basal y unión dermo-epidérmica	Negativo
Tenascina-X	Débilmente positivo en la membrana basal y unión dermo-epidérmica	Positivo
Versicano	Difuso, débilmente positivo, asociado a microfibrillas	Positivo a lo largo de las FE
Decorina	Positivo	Débilmente positivo
Perlecano	Positivo en la membrana basal	
Fibras elásticas	Finas, orientadas perpendiculares a la unión dermo-epidérmica	Gruesas, orientadas paralelamente a la unión dermo-epidérmica
Fibronectina	Positiva en unión dermo-epidérmica y vasos sanguíneos	Positiva asociada a vasculatura
Hialuronano	Positivo	Difuso

## TEJIDO GRASO DÉRMICO

El tejido graso se encuentra contiguo a la dermis reticular (Figura 1.4). En el ratón se distinguen dos tipos de tejido graso separados entre ellos por el músculo *panniculus carnosus* (PC). La capa adiposa ubicada entre la dermis reticular profunda y el PC se denomina tejido adiposo blanco dérmico (dWAT, *dermal White Adipose Tissue*), mientras que la capa grasa localizada por debajo del PC se denomina tejido adiposo blanco subcutáneo (sWAT, *subcutaneous White Adipose Tissue*) (Driskell *et al.*, 2014). El humano carece de PC, siendo éste un músculo vestigial conservado evolutivamente en localizaciones discretas (Naldaiz-Gastesi *et al.*, 2018). En el humano, el dWAT y el sWAT se

encuentran contiguos dificultando su identificación histológica; sin embargo, diversas observaciones clínicas aseveran que la *fascia superficialis* demarca ambos compartimientos adiposos (Zwick *et al.*, 2018).

La función del tejido adiposo se asocia a la homeostasis energética, a través del almacenamiento y liberación de ácidos grasos en respuesta a necesidades metabólicas, ingesta calórica y termorregulación. No obstante, se ha visto que el dWAT está involucrado en procesos tan diversos como: la regulación del ciclo del pelo, la remodelación de la ECM, la cicatrización, la segregación hormonal y la defensa inmune innata frente a infecciones (Guerrero-Juarez & Plikus, 2018; Zwick *et al.*, 2018).

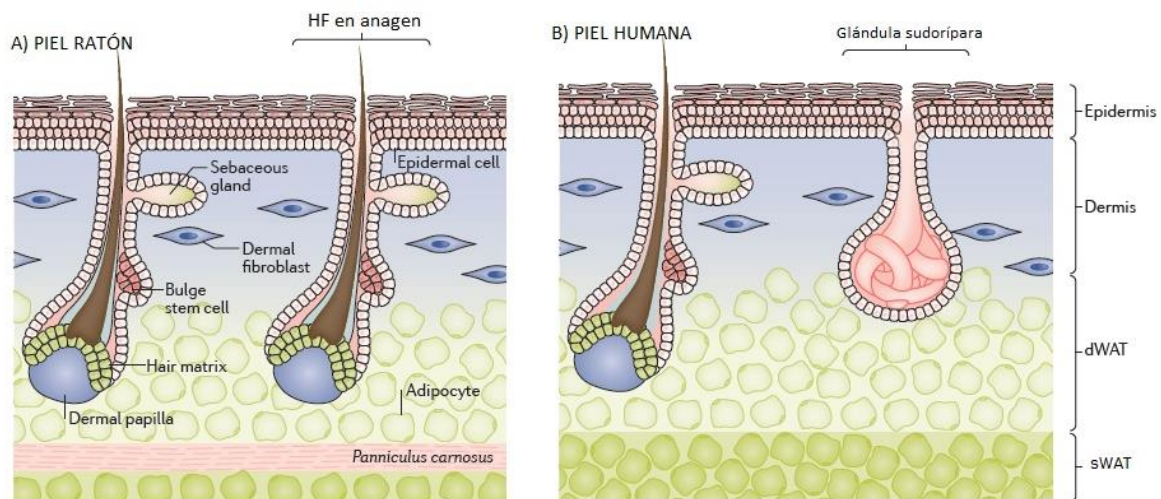


Figura 1.4 Estructura de la piel de ratón (A) y la piel humana (B). Las capas de la piel están conservadas, excepto por la presencia del músculo *Panniculus carnosus* en los roedores que no se encuentra en la piel humana. Los ratones también carecen de glándulas sudoríparas [modificado de (Guerrero-Juarez & Plikus, 2018)].

Los adipocitos que componen el dWAT o el sWAT son distintos con respecto a su metabolismo, morfología y origen embrionario (Driskell *et al.*, 2014). En respuesta a los ciclos de remodelado tisular acoplados al ciclo del pelo, el dWAT tiene una alta tasa de renovación celular, mientras que otros depósitos grasos como el sWAT o el vWAT (visceral WAT) tienen una renovación celular extremadamente limitada (Festa *et al.*, 2011; Rivera-Gonzalez *et al.*, 2016). De hecho, en trasplantes de piel embrionaria de ratón (E14) en el riñón, se demostró que la adipogénesis del dWAT ocurre independientemente del sWAT, e

incluso de folículos pilosos. Durante el desarrollo embrionario y en períodos adultos, los adipocitos del dWAT están localmente restringidos por encima del PC, y no existen reportes que describan su migración hacia otros compartimientos subcutáneos (sWAT) o sistémicos (p. ej.: WAT visceral, gonadal) (Wojciechowicz *et al.*, 2013).

El dWAT está formado por adipocitos maduros unilobulares que contienen pocas mitocondrias. Al menos en el ratón, los adipocitos del dWAT tienen un origen embrionario común con los Fb-r (Figura 1.5). En el período postnatal (P2) una célula progenitora [PDGFR $\alpha$ + (*platelet derived growth factor receptor- $\alpha$* ), Blimp1- (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) y Dlk1+] posee una restricción de linaje para formar Fb-r y adipocitos maduros (Driskell *et al.*, 2013). Aunque la expresión de *Pdgfra* y *Dlk1* se pierde en los adipocitos terminalmente diferenciados, éstos pueden distinguirse por la expresión de los genes *Cebpa* (*CCAAT Enhancer Binding Protein- $\alpha$* ), *Fabp4* (*Fatty Acid Binding Protein-4*), *Ppar $\gamma$*  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$* ) y *Adipoq* (*Adiponectin*), así como por la acumulación lipídica intracelular (Wojciechowicz *et al.*, 2013). La restricción de linaje de una subpoblación de fibroblastos dérmicos embrionarios hacia adipocitos, podría estar mediada por la expresión de *Fabp4* durante el desarrollo embrionario (E16), antes de que ocurra la deposición lipídica (Wojciechowicz *et al.*, 2013).

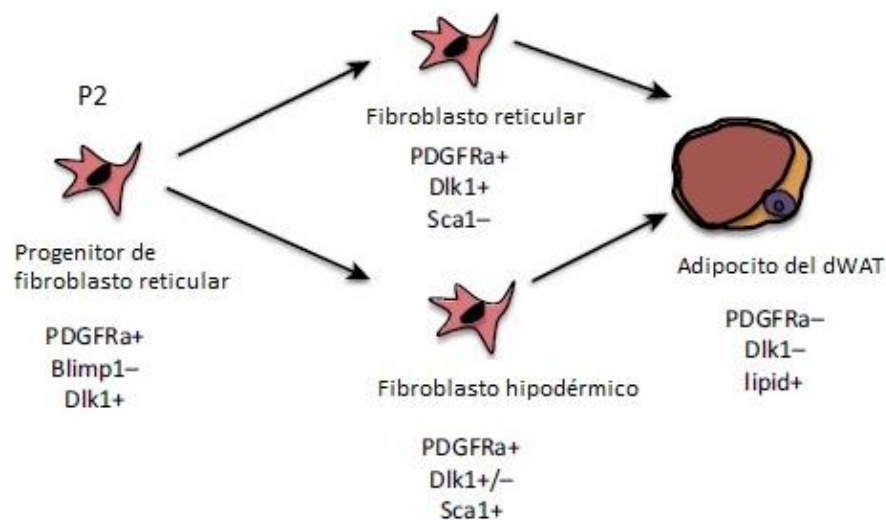


Figura 1.5 Relación del linaje fibroblástico reticular y adiposo en la dermis de ratón. Sólo se muestra el período postnatal (P2). Los marcadores indicados tienen expresión transitoria [modificado de (Driskell & Watt, 2015)].

El folículo piloso (HF, *hair follicle*) atraviesa la piel desde la epidermis hasta el dWAT (Figura 1.4), por lo que factores segregados en este último pueden influir en compartimientos inferiores del HF y viceversa. De hecho, las fluctuaciones en el grosor del dWAT están acopladas al ciclo del pelo. Cuando el HF entra en fase de crecimiento (Figura 1.6) hay una expansión pronunciada del dWAT; luego, el folículo se retrae por apoptosis de las células epiteliales (catagen) mientras que el dWAT empieza a retraerse; finalmente, cuando el HF está en quiescencia (telogen) el dWAT alcanza su punto más estrecho (Festa *et al.*, 2011; Donati *et al.*, 2014; Guerrero-Juarez & Plikus, 2018).

Los cambios en el volumen del dWAT pueden ser consecuencia de la hipertrofia (aumento de volumen) o la hiperplasia (aumento del número de células) de los adipocitos. El cambio de volumen o hipertrofia de los compartimientos adiposos ocurre a través de la lipogénesis y la lipólisis de los ácidos grasos; mientras que la hiperplasia implica la proliferación celular a partir de precursores adipogénicos (Festa *et al.*, 2011; Wojciechowicz *et al.*, 2013; Rivera-Gonzalez *et al.*, 2016; Foster *et al.*, 2018).

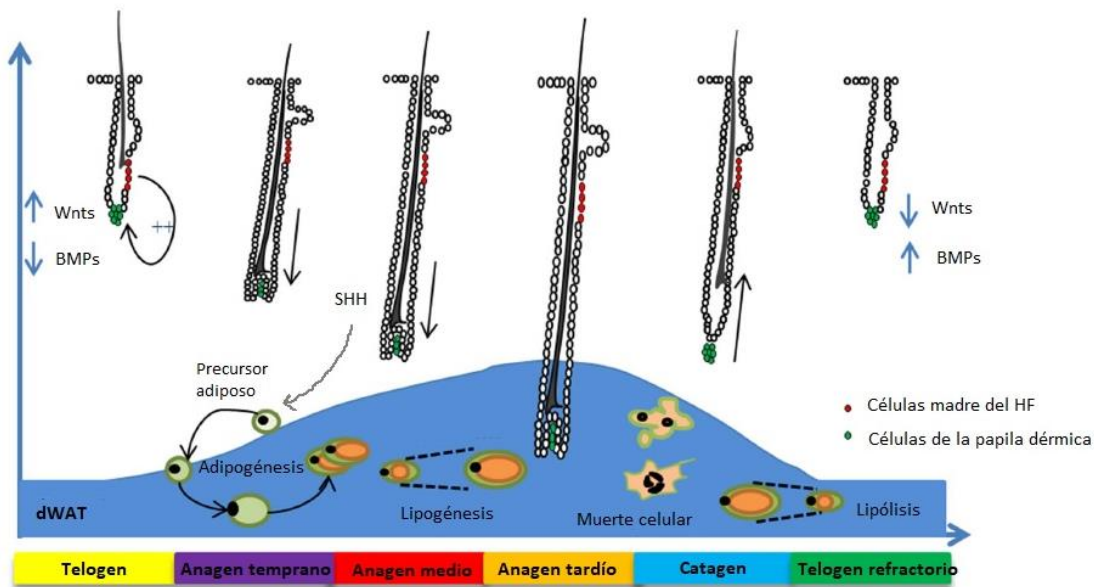


Figura 1.6 Acoplamiento entre el ciclo del pelo y el grosor del dWAT [modificado de (Foster *et al.*, 2018)].

A nivel sistémico, los depósitos grasos juegan un papel metabólico y endocrino importante mediante la liberación de hormonas y citoquinas (adipoquinas), pero el papel

del dWAT en este sentido no ha sido elucidado; no obstante, los adipocitos dérmicos segregan adiponectina y leptina que promueven la cicatrización y la revascularización en heridas cutáneas (Zwick *et al.*, 2018). También en respuesta a herida, se ha propuesto que los miofibroblastos se transdiferencian en adipocitos maduros mediante la sobreexpresión de *Zfp423*, gen clave para el compromiso hacia linajes adipogénicos, pero esto sólo sucede en presencia de HF (Plikus *et al.*, 2017).

El dWAT está directamente involucrado en la respuesta inmune innata. Frente a infecciones, el dWAT puede aumentar de tamaño sirviendo de barrera física para el ingreso de los microorganismos. También se ha visto que los adipocitos dérmicos pueden segregar péptidos antimicrobianos, como la catelicidina, que actúa directamente sobre las bacterias (Guerrero-Juarez & Plikus, 2018; Zwick *et al.*, 2018).

## EL FOLÍCULO PILOSO

El pelo es un rasgo característico de los animales mamíferos. Está involucrado en la protección física, el camuflaje, el aislamiento térmico, la percepción de estímulos y la dispersión del sudor. En el humano el pelo tiene un papel principalmente social y estético, recubre casi la totalidad del cuerpo, excepto palmas de manos y pies, así como zonas genitales discretas. La piel no pilosa es denominada piel glabra. En el cuerpo se encuentran dos tipos de pelo: i) el pelo terminal que es grueso, largo y pigmentado, y ii) el vello fino, corto y poco pigmentado (Marks & Miller, 2019).

En los ratones el pelo cumple un abanico más amplio de funciones, distinguiéndose al menos ocho tipos de pelo: las vibrisas, las pestañas, el pelo alrededor de las patas, la región genital, perianal, alrededor de los pezones y el pelaje que recubre la mayor parte del animal (Schneider *et al.*, 2009). A su vez el pelaje está formado por tres tipos de pelo: *guard*, *awl/auchenne* y *zigzag* (Schlake, 2007; Driskell *et al.*, 2009). Éstos son diferentes a nivel de desarrollo embrionario, morfología y propiedades mecánicas. Las fibras *guard* representan el ~1% del pelaje total, son las más largas y tienen dos filas de células en la médula. Las fibras *awl/auchenne* comprenden un ~20% del pelo, son más cortas y tienen 3-4 filas de células en la médula, los de tipo *auchenne* poseen además un doblez en la



fibra. Por último, las fibras *zigzag* son las más abundantes (~80%), tienen una fila de células en la médula y al menos dos dobleces a lo largo de la fibra capilar (Schlake, 2007). Cada tipo de pelo está inervado por una combinación específica de fibras nerviosas, desempeñando funciones mecano-sensitivas distintas (Li & Ginty, 2014).

El HF en conjunto con la glándula sebácea (SG, *sebaceous gland*) y el APM, forman la unidad pilosebácea. El HF está formado por células derivadas del ectodermo (queratinocitos), del mesodermo (fibroblastos de la DP y CTS/DS) y de la cresta neural (melanocitos), que están en constante comunicación a través de interacciones epitelio-mesenquimales, lo cual permite mantener procesos básicos como el ciclo de crecimiento del pelo, o la morfogénesis durante el período embrionario (Sennett *et al.*, 2015).

Anatómicamente, el HF es una invaginación de la epidermis con un canal a través del cual el pelo sale de la piel (Figura 1.7A). La región distal (más cercana a la epidermis), o infundíbulo, comprende desde la apertura epidérmica hasta la inserción de la SG. Por debajo de ésta se ubica el istmo, donde se une el APM; en su zona inferior están las células madre epiteliales y melanocíticas que sustentan la regeneración del folículo y de la unidad pigmentaria, esta región es conocida como "*bulge*" (Figura 1.7B). En la región proximal, se localizan la zona suprabulbar y el bulbo, que varían a lo largo del ciclo del pelo. La matriz del bulbo contiene queratinocitos proliferativos que migran desde el *bulge* para generar las células especializadas que componen las distintas capas de la vaina folicular interna (IRS), y de la fibra del pelo (Figura 1.7C-D). Esta última se compone de queratinocitos muertos intercalados entre capas de queratinas, confiriendo al pelo alta resistencia (Schneider *et al.*, 2009). Por fuera de la IRS, se encuentra la vaina folicular externa (ORS), cuyas células precursoras no provienen del *bulge* sino que están dispersas a lo largo de la ORS exhibiendo un crecimiento regional (Legue & Nicolas, 2005). La papila dérmica o papila folicular (DP) se ubica dentro del bulbo en la fase anágena del ciclo del pelo, o por debajo de él en la fase telógena. La DP está compuesta por fibroblastos empaquetados que ejercen señales inductivas para determinar la duración del ciclo, el tamaño y el tipo del pelo (Driskell *et al.*, 2009; Rahmani *et al.*, 2014). La DP está en contacto directo con la vaina de tejido conectivo (CTS), también llamada vaina dérmica (DS, *dermal sheath*), compuesta

por fibras de colágeno sueltas y células alargadas que rodean todo el folículo. La DP y la CTS/DS se separan físicamente de la ORS y de la matriz por una membrana hialina (*glassy membrane*) carente de células (Muller-Rover *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2009).

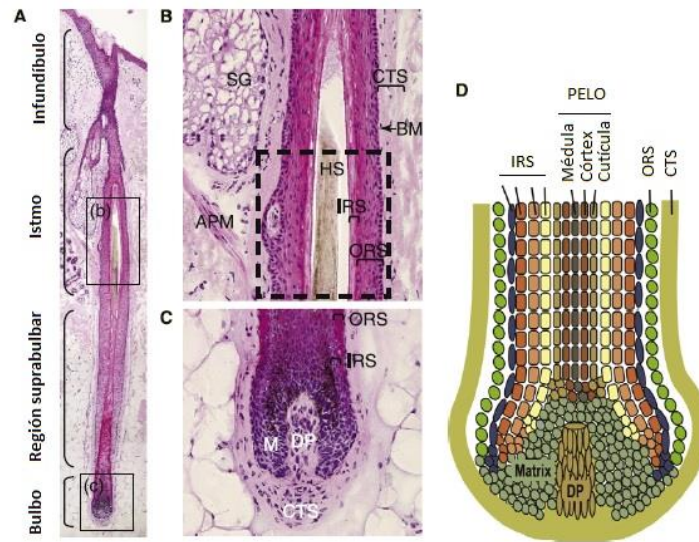


Figura 1.7 Estructura del folículo piloso. (A) Histología de un folículo humano en fase anágena. (B) Magnificación del istmo, en la zona de inserción del APM se ubica el *bulge*. (C) Magnificación del bulbo. (D) Dibujo esquemático de las capas celulares que conforman el bulbo. La IRS y ORS no están unidas entre sí para permitir el crecimiento del pelo. El pelo está recubierto por una cutícula que en los ratones, pero no en el humano, tiene zonas de aire que ayudan al aislamiento térmico. BM: membrana basal, SG: glándula sebácea, APM: músculo erector del pelo, CTS: vaina de tejido conectivo (*connective tissue sheath*), DP: papila dérmica, M: matriz, HS: pelo (*hair shaft*), IRS: vaina folicular interna (*inner root sheath*), ORS: vaina folicular externa (*outer root sheath*) [modificado de (Schneider *et al.*, 2009)].

## El ciclo del pelo

En períodos postnatales tempranos termina la morfogénesis del folículo dando paso al ciclo del pelo, durante el cual ocurren ciclos repetitivos de regresión (catagen), reposo (telogen) y crecimiento (anagen) de la porción variable del folículo, dando lugar a una fibra de pelo nueva (Figura 1.8). En los humanos cada fase del ciclo puede durar meses o años, mientras que en los ratones duran días o semanas. En ambas especies, durante el envejecimiento se alarga la fase de reposo, causando alteraciones en la densidad capilar. Por otro lado, después del nacimiento todos los HF están sincronizados para ciclar a la vez; en los humanos esta sincronización se pierde rápidamente y cada HF funciona como una

entidad autónoma que autorregula la entrada en la fase anágena, mientras que en el ratón, se forman parches de folículos que ciclan de manera coordinada (Schneider *et al.*, 2009).

En períodos postnatales tempranos del ratón empieza la fase catágena (Figura 1.8), en la cual los queratinocitos de la matriz, la IRS y la ORS entran en apoptosis, generando la regresión del folículo. Las células madre en el *bulge* se mantienen comunicadas con la DP mediante una columna de epitelio que se acorta hasta que el HF entra en la fase telógena, momento en el cual se alcanza la menor distancia entre la DP y el *bulge*. En la fase telógena no ocurren muchos cambios morfológicos, no obstante, a nivel génico hay una alta actividad transcripcional y un proceso energético muy controlado (Tasseff *et al.*, 2014; Geyfman *et al.*, 2015). La fase telógena comprende un periodo refractario, en el cual las células madre foliculares no responden a señales pro-anágenas; y un periodo competente, donde se vuelven altamente sensibles a factores inductivos de anagen. Este mecanismo podría estar mediado por cambios en la señalización de BMP y Wnt/ $\beta$ catenina acoplados al dWAT (Festa *et al.*, 2011; Donati *et al.*, 2014; Driskell *et al.*, 2014). Cuando se alcanza una concentración mínima de señales inductivas, empieza la fase anágena temprana, en la cual las células madre foliculares generan una subpoblación transitoria de células: las HF-TAC (*hair follicle transit-amplifying cells*). Éstas tienen una tasa de proliferación elevada que permite establecer la matriz del folículo y su elongación (Hsu *et al.*, 2014b). En estadios medio y tardío de anagen, ocurre la diferenciación de los diversos tipos celulares que contribuyen a las capas del folículo y a la vez se produce una nueva fibra de pelo. En roedores, el pelo puede permanecer en el canal folicular por varios ciclos, incluso cuando éste no está en crecimiento activo, permitiendo aumentar la densidad del pelaje (Higgins *et al.*, 2009).

La pigmentación del pelo es un proceso acoplado al ciclo del mismo. Diferentes subpoblaciones de melanocitos y sus precursores, se encuentran en la ORS y en la matriz. Sólo los melanocitos ubicados en la unidad pigmentaria (alrededor de la DP) son responsables de la pigmentación folicular. Los melanocitos generan gránulos de melanina (melanosomas) que son transferidos activamente a los queratinocitos de la corteza y de la médula en la fibra de pelo. Toda la actividad enzimática y molecular necesaria para la

melanogénesis folicular, ocurre únicamente en fase anágena (Slominski *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2009).

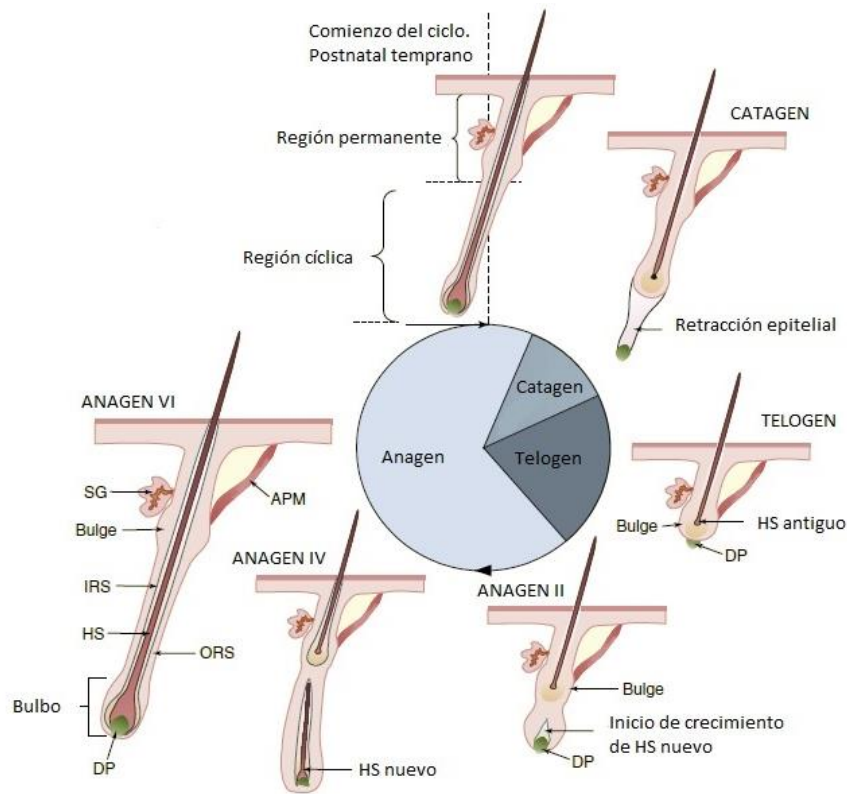


Figura 1.8 Esquema del ciclo del pelo en el ratón. El círculo central muestra la proporción de tiempo de cada fase durante el primer ciclo del pelo, con el envejecimiento se produce un alargamiento de la fase telógena. Es importante notar las modificaciones morfológicas que ocurren en la DP y el bulbo. A lo largo del ciclo varias fibras de pelo pueden ocupar el mismo canal folicular [modificado de (Schneider *et al.*, 2009)].

## GLÁNDULAS SEBÁCEAS Y SUDORÍPARAS

Las glándulas sebáceas (SG) son estructuras exocrinas, unidas al HF mediante un canal que se inserta en la zona del infundíbulo (Figura 1.7A-B), a través del cual se secreta el sebo. Éste es una sustancia lipídica de consistencia aceitosa y lubricante que previene la pérdida de agua, controlando la temperatura corporal. En algunos casos, las SG no se asocian a los HF y su conducto alcanza directamente la epidermis (Sundberg *et al.*, 2012).

Las glándulas sudoríparas son otro tipo de glándulas exocrinas que se clasifican en ecrinas y apocrinas. En el humano, las primeras tienen una función termorreguladora,

mediante la secreción de agua a la superficie de la piel. En los ratones, la termorregulación se lleva a cabo principalmente por el pelaje y el dWAT, siendo un rasgo característico la ausencia de glándulas sudoríparas en la piel del cuerpo. Sólo están presentes en la piel de las patas (Sundberg *et al.*, 2012). Mientras que las glándulas apocrinas, responsables del olor corporal, están completamente ausentes en esta especie (Sundberg *et al.*, 2012; Marks & Miller, 2019).

## SISTEMA NERVIOSO CUTÁNEO

La interacción con el medio ambiente tiene amplias implicaciones en el comportamiento animal. Por ejemplo, la percepción de estímulos nocivos, como temperaturas frías y calientes extremas, o la discriminación de objetos cortantes y punzantes, es indispensable para la supervivencia; mientras que la sensación táctil de estímulos placenteros, y el reconocimiento de objetos en base a formas y/o texturas, es clave para el desarrollo cognitivo. La piel alberga una estructura nerviosa altamente compleja y especializada que permite discriminar entre una gran diversidad de estímulos y ejecutar respuestas adecuadas (Laverdet *et al.*, 2015; Jenkins & Lumpkin, 2017; Marks & Miller, 2019).

La inervación cutánea pertenece al sistema nervioso periférico (PNS), e incluye fibras aferentes (sensitivas) y fibras autonómicas del sistema nervioso simpático que ejecutan respuestas involuntarias más sistémicas. Las fibras aferentes perciben los estímulos externos, transmitiéndolos al sistema nervioso central (CNS) para su interpretación. En la Figura 1.9 se muestra simplificada la ruta sensorial básica y la estructura de los nervios aferentes. Desde los ganglios de la raíz dorsal DRG (DRG, *dorsal root ganglia*) hasta el órgano sensorial, los axones discurren empaquetados en tejido conectivo y células de Schwann (SCH) formando en conjunto los nervios, cuyo calibre disminuye a fibras nerviosas más delgadas y finalmente terminales axonales que penetran en la epidermis (Dubin & Patapoutian, 2010; Ross & Pawlina, 2016; Jenkins & Lumpkin, 2017). Por su parte, la inervación autonómica es una minoría en comparación con la sensitiva; es principalmente simpática y su función es mantener las condiciones homeostáticas a través

de respuestas involuntarias, como la vasoconstricción para regular el flujo sanguíneo y por consiguiente la temperatura corporal; o la secreción de sudor por las glándulas sudoríparas (Gibbons & Freeman, 2012; Laverdet *et al.*, 2015).

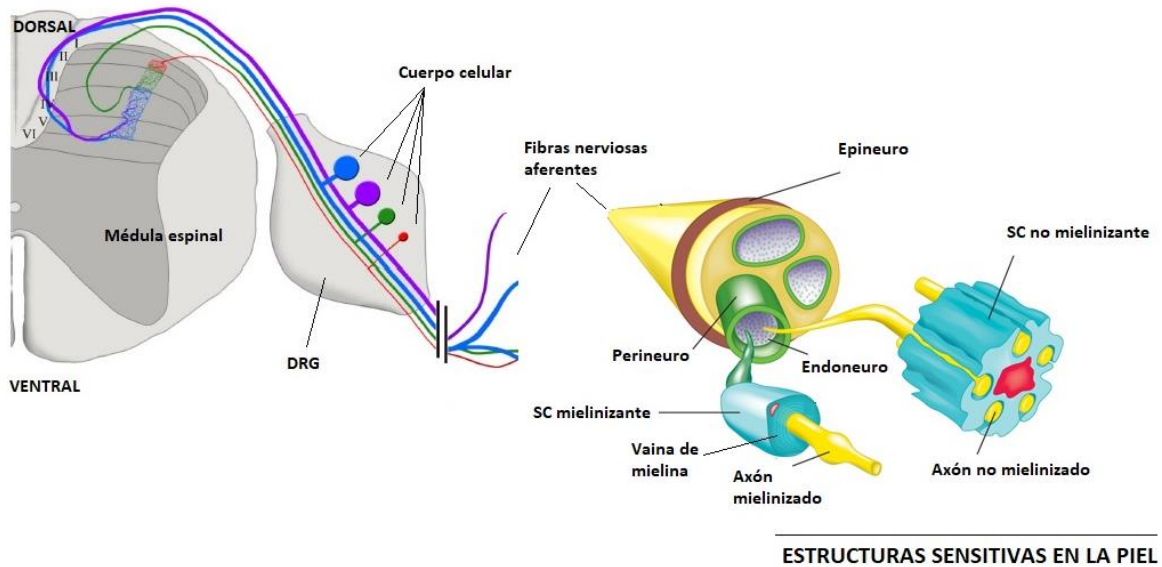


Figura 1.9 Dibujo esquemático de la organización de las fibras nerviosas aferentes y su recorrido hasta el sistema nervioso central. DRG: ganglio de la raíz dorsal, SC: célula de Schwann [modificado de (Li *et al.*, 2011; Sepúlveda Saavedra & Soto Domínguez, 2014)].

La anatomía de la inervación cutánea está conservada entre diversas especies, como el conejo, mono, humano y ratón (Weddell, 1945; Weddell & Miller, 1962; Montagna & Parakkal, 1974; Peters *et al.*, 2002). Las fibras nerviosas cutáneas están estratificadas en tres niveles o plexos que discurren paralelamente a la superficie de la piel (Figura 1.10). El primero, denominado plexo subcutáneo, se ubica justo por encima del PC con fibras nerviosas gruesas; por encima de éste e inmerso en la dermis se encuentra el plexo dérmico; el tercero se sitúa justo por debajo de la epidermis, por lo que se le conoce como plexo subepidérmico (Peters *et al.*, 2002). De los paquetes de nervios gruesos se derivan fibras más delgadas que conforman el plexo siguiente. Paralelamente a la superficie, cada plexo forma un entramado similar a una red, donde las fibras nerviosas están entrelazadas pero en ningún caso fusionadas, permitiendo que toda el área de la piel se encuentre inervada (Weddell, 1945; Weddell & Miller, 1962; Tschachler *et al.*, 2004).

Los terminales de las fibras nerviosas son similares a callejones sin salida, en donde puede haber 3 opciones: i) penetrar entre los queratinocitos y acabar en la epidermis, ii) inervar estructuras, como glándulas, vasos sanguíneos y HF, en éstos forman los complejos lanceolados compuestos por distintos tipos de fibras nerviosas dispuestas circular y longitudinalmente alrededor del HF; o iii) formar mecano-receptores cuya estructura está altamente especializada para la percepción de estímulos mecánicos. Una vez que la fibra alcanza uno de estos destinos, no se ramifica nuevamente para llegar a otro que se encuentre en un plano superior. Así mismo, las terminaciones de cada destino pueden provenir de diferentes tipos de fibras nerviosas (Weddell, 1945).

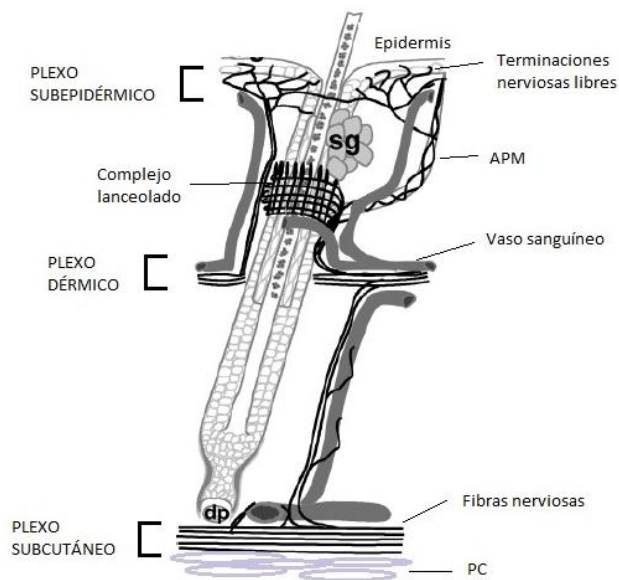


Figura 1.10 Dibujo esquemático simplificado de los plexos nerviosos en la piel. Hay 3 plexos que varían en profundidad con respecto a la epidermis: subepidérmico, dérmico y subcutáneo. De éstos se ramifican las terminaciones nerviosas libres, la inervación autonómica del APM, glándulas y vasos sanguíneos o la inervación sensorial del folículo formando los complejos lanceolados [modificado de (Peters *et al.*, 2002)].

La piel alberga fibras nerviosas de distintos tipos para percibir los estímulos mecánicos, térmicos y químicos (Figura 1.11). Las fibras nerviosas se componen de neuronas mecano-sensitivas que se clasifican según su umbral de activación alto o bajo (HTMR, *high-threshold mechanoreceptor*, LTMR, *low-threshold mechanoreceptor*) y adaptación al estímulo (SA, *slowly adapting*, IA, *intermediate adapting*, RA, *rapidly*

*adapting*) (Abraira & Ginty, 2013; Laverdet *et al.*, 2015; Jenkins & Lumpkin, 2017). Las neuronas sensoriales cutáneas también se clasifican en función del tamaño del cuerpo celular, el diámetro del axón, la presencia de vaina de mielina y la conducción del impulso eléctrico, dando lugar a las fibras A $\beta$ , A $\delta$  y C. Las neuronas que forman las fibras de tipo C son las más abundantes en la piel, tienen el diámetro axonal más pequeño y no están mielinizadas. La distribución y densidad de distintas fibras sensitivas varía con respecto a la función que desempeña la piel de cada región del cuerpo (Roudaut *et al.*, 2012; Abraira & Ginty, 2013; Laverdet *et al.*, 2015). Según la clasificación funcional de la percepción sensorial, se generaliza que las fibras A $\beta$  y algunos terminales A $\delta$  responden al tacto, mientras que las fibras A $\delta$  y C median las respuestas térmicas y nocivas. Algunas respuestas son solapantes y la posibilidad de captar estímulos diversos radica en la activación combinada de distintas fibras nerviosas [Figura 1.11 y (Roudaut *et al.*, 2012)].

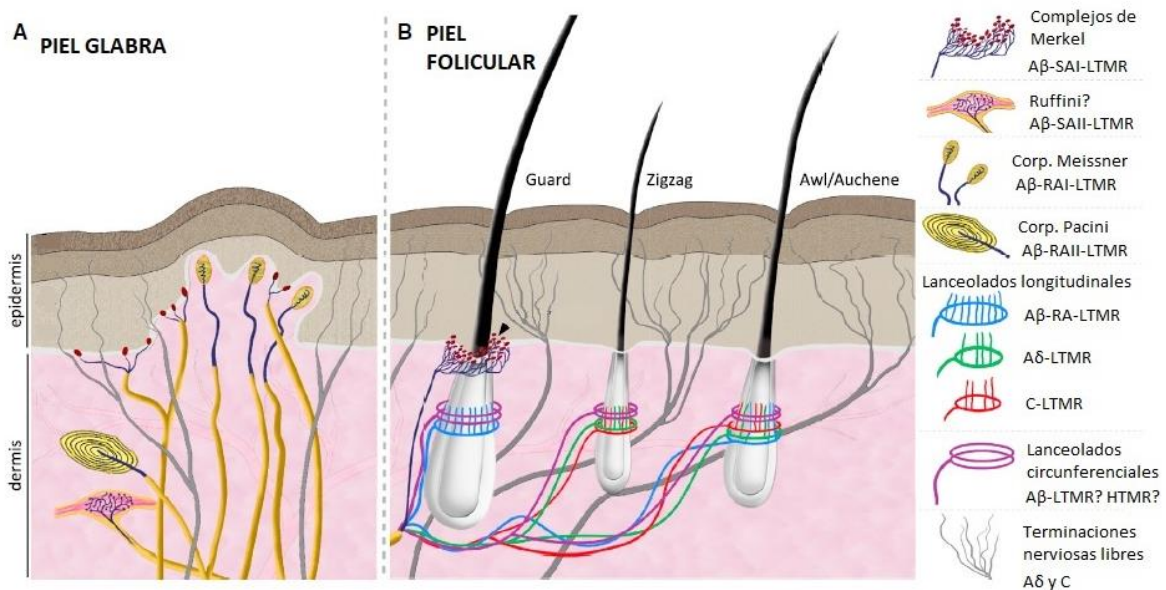


Figura 1.11 Dibujo esquemático de los receptores sensitivos en la piel (A) glabra y (B) folicular. Se muestran las fibras nerviosas asociadas a cada uno de ellos [modificado de (Abraira & Ginty, 2013)].

## Las células de Schwann

Las células de Schwann (SCH) son células gliales periféricas derivadas de la cresta neural embrionaria. Son un grupo heterogéneo de células, que se clasifican en



mielinizantes (m-SCH) y no mielinizantes (r-SCH, células de *Remak*). Su diferenciación sigue un programa transcripcional bien definido que comprende tipos celulares intermedios, como las SCH precursoras y las SCH inmaduras (Jessen & Mirsky, 2005; Kastriti & Adameyko, 2017). En el adulto tienen gran plasticidad, y su identidad depende en gran medida de estímulos provenientes del nicho en donde se encuentran y los axones a los cuales se asocian. Las m-SCH recubren principalmente los axones de gran calibre (A $\beta$ -A $\delta$ ) generando la vaina de mielina, mientras que las r-SCH se asocian a axones de menor diámetro (Harty & Monk, 2017). En la piel, las m-SCH se localizan mayormente en plexos nerviosos profundos, mientras que las r-SCH se asocian al plexo subepidérmico y a los complejos lanceolados. Al menos en humano, se distinguen principalmente por la expresión de MBP (*myelin basic protein*), y con respecto a los nervios periféricos las SCH cutáneas tienen un patrón proteico diferente [Tabla 1.2 y (Reinisch & Tschachler, 2012)].

Tabla 1.2 Perfil de marcadores de células de Schwann en la piel humana [modificado de (Reinisch & Tschachler, 2012)].

	SCH No-mielinizante		SCH mielinizante	
	Piel	PNS	Piel	PNS
NGFR/P75NTR ( <i>Nerve growth factor receptor</i> )	+	+	+	-
NCAM ( <i>Neural cell adhesion molecule</i> )	+	+	+	-
L1CAM ( <i>Neural cell adhesion molecule L1</i> )	+	+	+	-
CD146 ( <i>Melanoma cell adhesion molecule</i> )	+	+	+	-
S100 ( <i>S100 Calcium Binding Protein A1</i> )	+	+	+	+
Vimentina	+	+	+	+
MBP	-	-	+	+

Las r-SCH en la piel están altamente especializadas, participando en la percepción térmica y mecánica. Los corpúsculos de Ruffini, Meissner y Pacini (Figura 1.11) están formados por SCH estructuralmente adaptadas (Cauna & Ross, 1960; Halata, 1977). Se han descrito SCH especializadas, con prolongaciones que recubren los axones terminales del complejo lanceolado (Takahashi-Iwanaga, 2000; Li & Ginty, 2014). Las proyecciones citoplasmáticas de las SCH envuelven axones de distintos tipos de fibras nerviosas, sin

existir solapamiento entre las SCH que están contiguas (Figura 1.12A). Las SCH del complejo lanceolado sirven para anclar las terminaciones nerviosas a la estructura inervada, manteniendo su integridad (Figura 1.12B). La ausencia de las SCH terminales del HF provoca que las fibras nerviosas se retraigan; mientras que, cuando hay una denervación, las células de SCH permanecen localizadas en los folículos promoviendo que los axones re-inervan el pelo durante el proceso de regeneración (Li & Ginty, 2014; Zimmerman *et al.*, 2014).

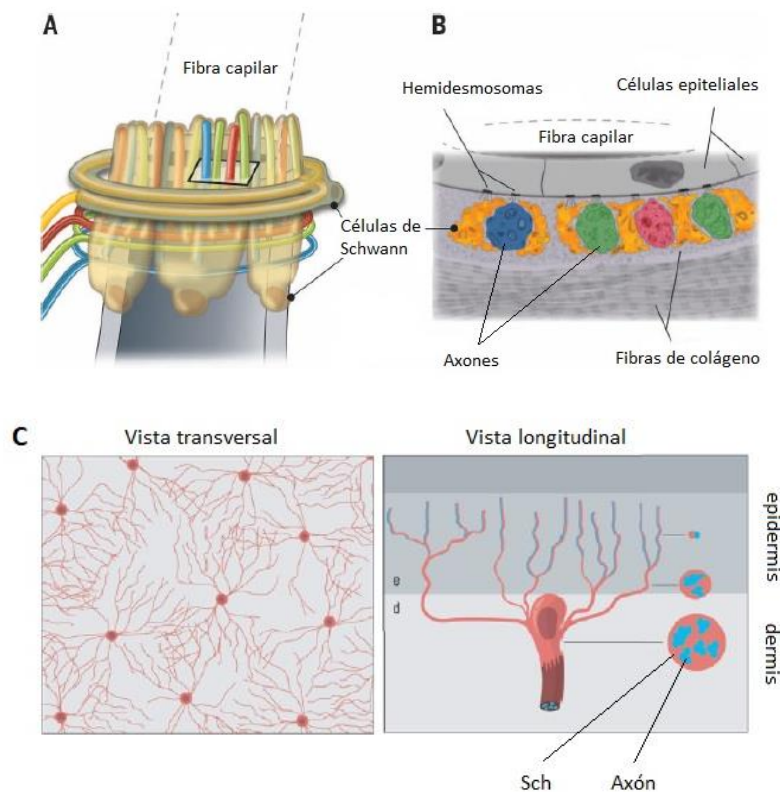


Figura 1.12 Dibujo esquemático de células de SCH cutáneas especializadas. (A) Cada SCH rodea con sus proyecciones varios tipos de fibras nerviosas longitudinal y circunferencialmente. (B) Los hemidesmosomas unen las SCH y las células epiteliales, mientras toda la estructura está embebida en fibras de colágeno. (C) SCH nociceptiva en la unión dermo-epidérmica envolviendo los axones [modificadas de (Zimmerman *et al.*, 2014; Abdo *et al.*, 2019)].

Las SCH nociceptivas, se localizan en la unión dermo-epidérmica, asociándose a fibras nerviosas nociceptivas. Forman un complejo glio-neural que penetra la epidermis, favoreciendo el establecimiento de una amplia red interconectada (Figura 1.12C). Responden principalmente a estímulos mecánicos y pueden generar una respuesta

electrofisiológica. Tienen alta expresión del canal transmembrana acuaporina-1 (AQP1), y al igual que otras SCH, expresan los marcadores PLP1 (*Proteolipid protein-1*), SOX10 (*sex determining region Y-box 10*), S100, y no expresan SOX2 (*Sex determining region Y-box 2*) (Abdo *et al.*, 2019).

## SISTEMA VASCULAR CUTÁNEO

El sistema vascular cutáneo provee irrigación sanguínea a las diferentes capas y estructuras de la piel, cumpliendo un papel fundamental en la termorregulación e intercambio metabólico. Similar a la inervación, la vascularización cutánea se organiza en 2 plexos horizontales: un plexo superior en la dermis papilar y un plexo en la dermis profunda. Cada plano horizontal se comunica entre sí por arteriolas que ascienden verticalmente a la superficie, y vénulas que descienden a las zonas profundas. En ésta, se encuentran vasos sanguíneos de gran calibre que disminuyen en diámetro hasta formar los capilares más próximos a la epidermis; de cada plexo se ramifican los vasos que irrigan el HF y las glándulas (Braverman, 2000; Imanishi *et al.*, 2008). En el ratón, se ha descrito un tercer plexo denominado HPuHG (*hair plexus under the hair germ*), cuya estructura y densidad es dependiente del ciclo del pelo (Li *et al.*, 2019). Así mismo, células de la CTS/DS en el HF humano, están involucradas en la angiogénesis que ocurre durante el ciclo del pelo (Yoshida *et al.*, 2019).

Desde el lumen hacia el exterior, las arteriolas están formadas por capas de células endoteliales, células de músculo liso, FE y una pared vascular recubriendo todo el conjunto. Sobre la superficie de los vasos sanguíneos reposan, entre otras, células perivasculares que contactan con las células endoteliales internas por interrupciones en la membrana. El calibre de los vasos sanguíneos determina el número de células que componen cada capa (Braverman, 2000; Imanishi *et al.*, 2008). En algunos casos, a los pericitos y a las células de músculo liso se les engloba como células murales (Vishvanath *et al.*, 2017). Sin embargo, los pericitos se diferencian de las células de músculo liso por ser más estrechas, tienen cuerpos celulares menos densos, menos miofilamentos y recubren vasos de calibres distintos (Braverman, 2000; Armulik *et al.*, 2011). Aunque por el momento no se han

descrito marcadores específicos de ambas poblaciones, las células murales se distinguen por la expresión de Pdgfr $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA y NG2 (*Neural/glial antigen-2*) (Vishvanath *et al.*, 2017). Por su parte, las células endoteliales se caracterizan por la expresión de vWF (*von Willebrand factor*), CD31 (*cluster of differentiation-31*) y CD34, aunque no exclusivamente (Armulik *et al.*, 2011; Morikawa & Ezaki, 2011; Goncharov *et al.*, 2017).

## SOX2 EN LA PIEL

### Generalidades

SOX2 (*sex determining region Y-box 2*) es un factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas SOX, caracterizadas por tener un dominio HMG (*high mobility group*) de unión al DNA que está altamente conservado entre especies. SOX2 se clasifica dentro del subgrupo SOXB1, siendo homólogo a los factores SOX1 y SOX3 del mismo grupo, por lo que en algunos casos pueden cumplir funciones solapantes (Sarkar & Hochedlinger, 2013). El gen *Sox2/SOX2*, se compone de un único exón cuya transcripción está regulada mediante *enhancers*, RNAs no codificantes y microRNAs; además, mediante la unión con otros factores de transcripción, se autorregula positivamente (Zhang & Cui, 2014). La estabilidad proteica está controlada por al menos seis tipos de modificaciones post-traduccionales. Los efectos de SOX2 son dosis-dependientes, por ello los mecanismos regulatorios en varios niveles son imprescindibles para controlar la concentración de la proteína (Taranova *et al.*, 2006; Metz & Rizzino, 2019).

*Sox2* se expresa desde el desarrollo en la masa interna celular del blastocisto y su ausencia genera letalidad embrionaria (Avilion *et al.*, 2003). Durante el desarrollo regula el compromiso hacia linajes celulares pertenecientes a las tres capas del embrión [Figura 1.13 y (Sarkar & Hochedlinger, 2013)]; mantiene la pluripotencia de células madre y su auto-renovación, a través de la proliferación y diferenciación celular, siendo indispensable para el desarrollo del CNS (Pevny & Nicolis, 2010; Novak *et al.*, 2019). Es uno de los cuatro factores clave para la reprogramación celular (Takahashi & Yamanaka, 2006). En el adulto, está involucrado en el mantenimiento de las células madre y en la homeostasis de distintos

tejidos (Arnold *et al.*, 2011), asociándose su defecto al proceso de envejecimiento (Vilas *et al.*, 2018; Carrasco-Garcia *et al.*, 2019).

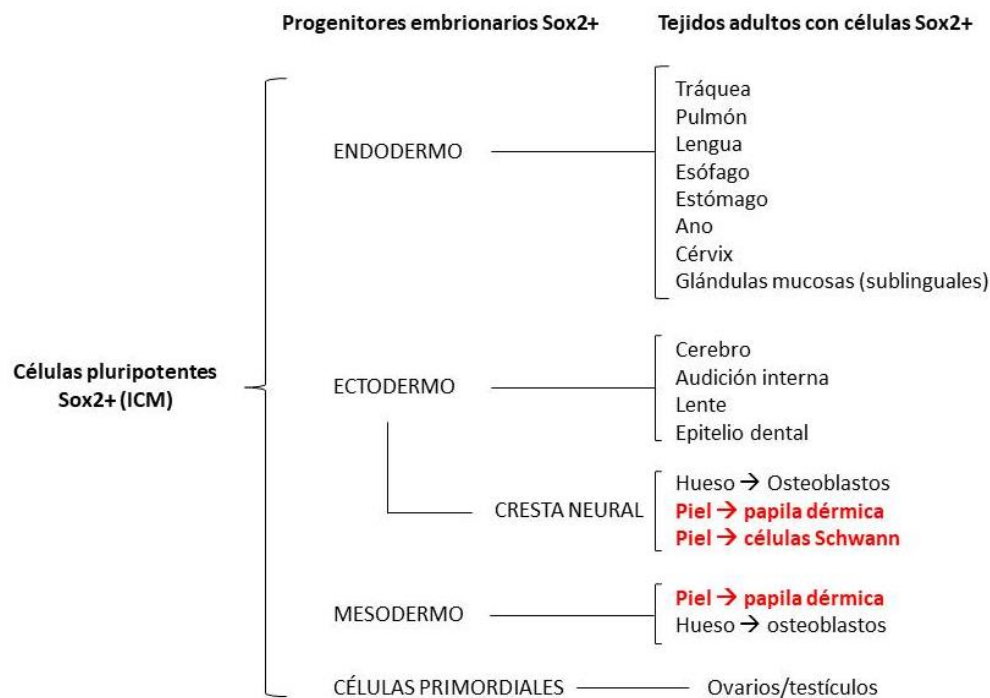


Figura 1.13 Expresión de *Sox2* durante el desarrollo embrionario y en tejidos adultos [modificado de (Sarkar & Hochedlinger, 2013)].

## SOX2 en el desarrollo embrionario de la piel

Los componentes celulares en la piel tienen orígenes embrionarios diferentes (Figura 1.13). Los queratinocitos, las células de Merkel y la mayoría de las células que componen los apéndices cutáneos, tienen un origen ectodérmico (Morrison *et al.*, 2009; Agabalyan *et al.*, 2016). De la cresta neural se derivan células del PNS, tanto gliales como neurales, los melanocitos y los fibroblastos dérmicos de la cabeza (Jinno *et al.*, 2010; Adameyko *et al.*, 2012; Iribar *et al.*, 2017; Kastriti & Adameyko, 2017); mientras que los fibroblastos del tejido conectivo dorsal y ventral derivan respectivamente del dermomiótomo y de la placa lateral, ambos provenientes del mesodermo (Jinno *et al.*, 2010; Driskell *et al.*, 2013; Rinkevich *et al.*, 2015). A su vez, de una subpoblación de fibroblastos embrionarios se especifican los adipocitos del dWAT, a través de la expresión de *Fabp4* (Wojciechowicz *et al.*, 2013).

En el ectodermo, la expresión de *Sox2* no determina el compromiso de linaje epidérmico, pero influye en la diferenciación de las células de Merkel. La delección desde estadios E9.5 de *Sox2* en células K14+ (modelo de ratón *K14CreSox2fl/fl*) resulta en un desarrollo epidérmico normal. No obstante, hay una reducción en el número de células de Merkel K8+ asociadas a los folículos *guard* (Lesko *et al.*, 2013). *Sox2* regula la especificación temprana del linaje neural que dará lugar al CNS (Takemoto *et al.*, 2011) y de los precursores del PNS (Wegner & Stolt, 2005; Pevny & Nicolis, 2010). De particular interés en la inervación cutánea, *SOX2* promueve la diferenciación de neuronas ganglionares sensitivas derivadas de progenitores de la cresta neural (Cimadamore *et al.*, 2011). Por otro lado, *Sox2* es un regulador negativo de la mielinización (Mercurio *et al.*, 2019). Durante el desarrollo de animales con bajos niveles de *EGR2* (*Early Growth Response-2*, también conocido como *Krox20*), *Sox2* promueve la proliferación de SCH precursoras (SCP, *Schwann cell precursors*), pero previene su diferenciación terminal (Le *et al.*, 2005). De hecho, en SCP de la cresta neural, *Sox2* especifica el compromiso hacia un linaje neural o melanocítico, cuya diferenciación terminal es determinada por los factores *Krox20* y *Mitf* (*Melanocyte inducing transcription factor*), respectivamente (Adameyko *et al.*, 2009; Adameyko *et al.*, 2012).

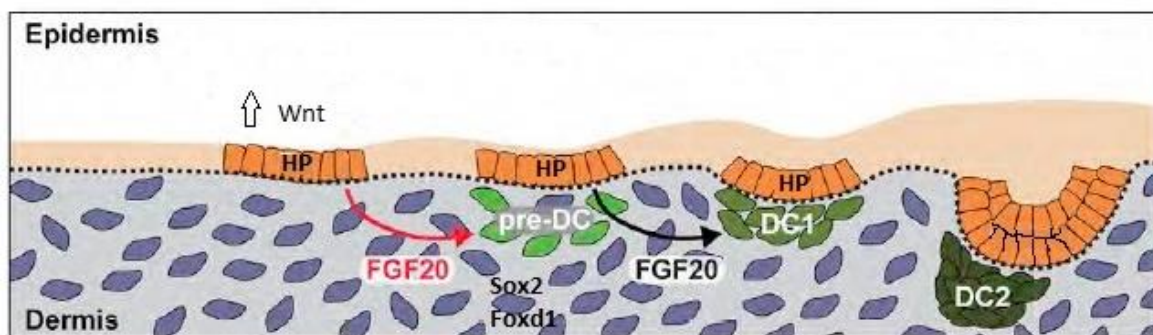


Figura 1.14 Establecimiento de la placa germinal y el condensado dérmico en el embrión. Mediante señales epitelio-mesenquimales se forma el DC cuyas células expresan *Sox2* y *FoxD1*. HP: placa germinal, DC: condensado dérmico [modificado de (Mok *et al.*, 2019)].

En el mesodermo, *Sox2* tiene un papel clave en la especificación de fibroblastos que dan lugar a la DP de los folículos. En la epidermis embrionaria se forman las placas germinales (HP, *hair placode*), que mediante la ruta canónica WNT y FGF20 instruyen a la

dermis contigua para establecer el condensado dérmico (DC, *dermal condensate*) [Figura 1.14 y (Mok *et al.*, 2019)]. El DC da origen a las células de la DP y CTS/DS (Grisanti *et al.*, 2013). Los fibroblastos que forman el DC expresan *Sox2* y *Foxd1* (*Forkhead box D1*) antes que cualquier otro factor de transcripción (Driskell *et al.*, 2009; Clavel *et al.*, 2012; Lesko *et al.*, 2013; Mok *et al.*, 2019). Durante el desarrollo embrionario, los DC que originan todos los tipos de folículos expresan *Sox2*, pero a partir de E18.5 y en períodos postnatales, su expresión está restringida a las DP de los folículos *guard* y *awl/auchenne* (Driskell *et al.*, 2009). Si bien la delección de *Sox2* en las DP (*Blimp1CreSox2<sup>fl/fl</sup>*) durante el desarrollo no influye en el establecimiento de la dermis, ni en la morfogénesis del pelo, es determinante para especificar el tipo de pelo (Driskell *et al.*, 2009; Lesko *et al.*, 2013).

## SOX2 en la piel adulta

Algunas subpoblaciones celulares expresan *Sox2* a lo largo de la vida del individuo, especialmente en tejidos adultos que durante el desarrollo embrionario requieren de *Sox2* para el compromiso de linaje [Figura 1.13 y (Sarkar & Hochedlinger, 2013)]. En la piel adulta de ratón (Figura 1.15), *Sox2* se expresa en las células de Merkel, en las SCH terminales de los complejos lanceolados, en células gliales asociadas a los nervios periféricos y en la DP de los folículos *guard* y *awl/auchenne* (Agabalyan *et al.*, 2016).

En la epidermis murina, la falta de SOX2 no altera la homeostasis del tejido adulto (Lesko *et al.*, 2013), y tampoco se ha reportado la expresión de *Sox2* en condiciones normales (Driskell *et al.*, 2009); pero se ha visto sobreexpresado en melanoma (Weina *et al.*, 2016), y en carcinoma de células escamosas de la piel, contribuyendo a la progresión tumoral (Boumahdi *et al.*, 2014). En humano, una subpoblación celular minoritaria epidérmica es SOX2+ y co-expresa MITF, relacionándola con el linaje melanocítico (Laga *et al.*, 2010). En las células madre epiteliales, la represión de *Sox2* por el complejo transcripcional POLYCOMB controla la diferenciación de las células de Merkel (Bardot *et al.*, 2013), pero su relevancia funcional no ha sido descrita más allá del remodelado asociado al ciclo del pelo (Marshall *et al.*, 2016).

Sin embargo, la delección de *Sox2* en DP murinas seleccionadas por la expresión de *Tbx18* (*Tbx18CreSox2<sup>fl/fl</sup>*), resulta en fibras capilares *guard* y *awl/auchene* más cortas. En este modelo animal, la proliferación y diferenciación de las HF-TAC y de las células de la matriz eran normales; pero la ausencia de *Sox2* en el folículo adulto, afectó la migración de las células de la matriz y con ello la elongación del pelo (Clavel *et al.*, 2012). En línea con el crecimiento del pelo, sólo las DP/DS de folículos en anagen contienen células trazadas con EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) bajo el promotor de *Sox2* [modelo de ratón *Sox2<sup>EGFP</sup>* (Ellis *et al.*, 2004; Biernaskie *et al.*, 2009)]. En el mismo modelo transgénico, algunas células *Sox2<sup>EGFP</sup>*+ se asocian al plexo nervioso subepidérmico, rodeando axones NF200+. Otras, son células terminales de los complejos lanceolados en todos los tipos de folículos, y co-expresan los marcadores de células precursoras de la cresta neural: Nestina y P75NTR. En ambos compartimientos nerviosos, las células *Sox2<sup>EGFP</sup>*+ expresan también el marcador glial S100 (Johnston *et al.*, 2013; Iribar *et al.*, 2017).

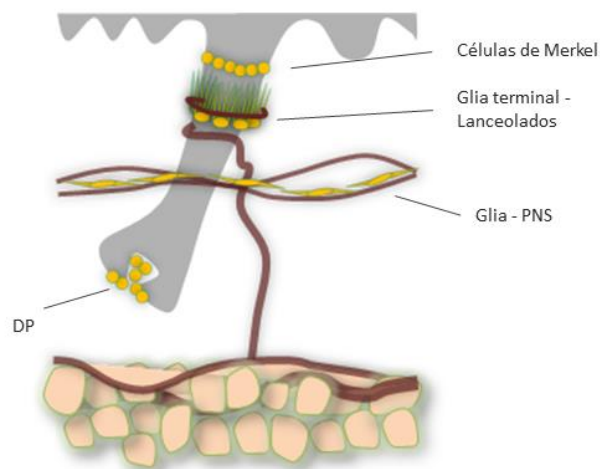


Figura 1.15 Expresión de *Sox2* en piel murina adulta. Las células con expresión de *Sox2* se indican en amarillo DP: papila dérmica, PNS: sistema nervioso periférico [modificado de (Iribar *et al.*, 2017)].

## SOX2 COMO REGULADOR DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS

### Generalidades de las células madre

Las células madre (*SC*, *stem cell*) tienen capacidad indefinida de auto-renovación y mediante la diferenciación dan lugar a células especializadas que pertenecen a distintos



linajes (Siminovitch *et al.*, 1963). En función de su potencial de diferenciación, las SC se clasifican en toti-, pluri-, multi- y uni-potentes. Las SC totipotentes dan lugar a los tejidos embrionarios y extraembrionarios, encontrándose esencialmente en el cigoto y en la mórula. La primera restricción de linaje celular ocurre durante la formación del blastocisto, donde las células del trofoblasto darán lugar a los tejidos extraembrionarios, mientras que la masa celular interna (IMC) dará lugar a las tres capas germinativas del embrión. Las células que componen la IMC son consideradas pluripotentes, porque pueden diferenciarse a todos los tipos celulares que formarán al individuo adulto. A medida que avanza el desarrollo embrionario las células se comprometen a linajes celulares cada vez más específicos, siendo multipotentes aquellas que se diferencian a linajes celulares derivados de la misma capa embrionaria, y unipotentes los precursores de un sólo tipo celular (Krafts, 2010; Chagastelles & Nardi, 2011).

En el individuo adulto, las SC se encuentran de forma ubicua en diversos tejidos, son multipotentes, retienen capacidad de auto-renovación y pueden presentar una parada reversible del ciclo celular (quiescencia). No obstante la quiescencia no es indispensable, si bien en diversos órganos las SC mantienen una proliferación que puede ser constante o cíclica (Simons & Clevers, 2011). Las SC tienen un papel fundamental en la capacidad regenerativa/reparadora de los tejidos y en consecuencia en la homeostasis a largo plazo, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Para ello, las SC mantienen un balance asimétrico entre proliferación y diferenciación que ocurre a nivel celular y/o poblacional (Figura 1.16). A nivel celular, después de la división una célula se diferencia mientras que la otra permanece indiferenciada; a nivel poblacional, se preserva el conjunto de SC dentro del tejido, mediante un balance entre proliferación y diferenciación. Así, una vez que ocurre la división de una célula toda la progenie puede diferenciarse, mantenerse como SC o ambas. Por otro lado, ambos mecanismos pueden estar regulados intrínsecamente mediante señales celulares internas, o de forma extrínseca a través del entorno (Simons & Clevers, 2011; Rezza *et al.*, 2014).

El entorno o nicho se define como una región anatómica concreta que regula la participación de las SC en la regeneración, mantenimiento y reparación del tejido

(Scadden, 2006). El nicho está conformado por las SC y su progenie, células mesenquimales cercanas, ECM y señales provenientes de los vasos sanguíneos, nervios y células del sistema inmune; todos los componentes pueden ejercer señales autocrinas y/o paracrinas que regulan la proliferación y diferenciación de las SC (Scadden, 2006; Rezza *et al.*, 2014). Así mismo, el nicho de SC puede estar rodeado por una membrana basal o por células epiteliales (Simons & Clevers, 2011). La disrupción funcional del nicho de SC está implicada en el envejecimiento, cáncer y procesos patológicos asociados con la degeneración tisular (Gattazzo *et al.*, 2014).

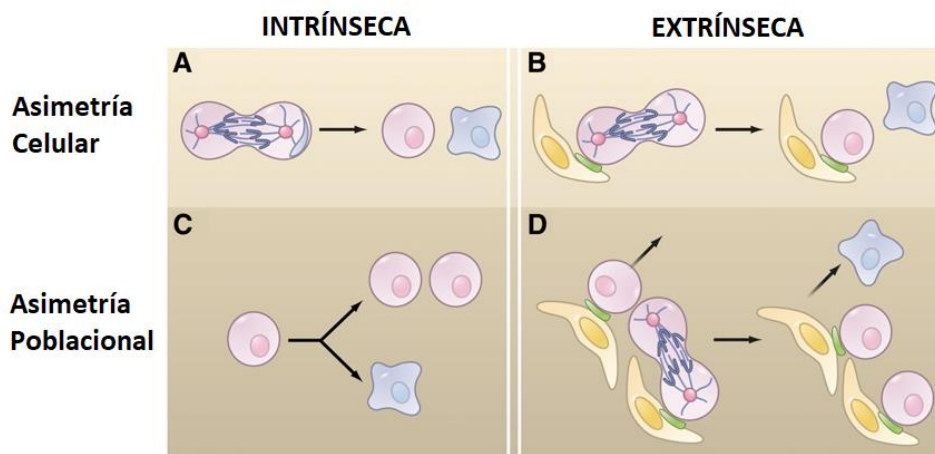


Figura 1.16 Estrategias de auto-renovación y mantenimiento de las células madre adultas. La capacidad de auto-renovarse puede estar vinculada a la división asimétrica celular o poblacional, mientras que el mecanismo de control puede ser intrínseco de la célula o extrínseco del entorno [modificado de (Simons & Clevers, 2011)].

## Plasticidad celular y mecanismos regenerativos

En 1957 Waddington propuso que el curso de diferenciación de las SC durante el desarrollo embrionario es semejante a colinas y valles, donde las células en el tope de la colina representan las SC, los valles representan a las células diferenciadas y el terreno incluye tanto la genética como el entorno (Figura 1.17A-i) (Waddington, 1957). Si bien la identidad celular está establecida durante la formación del embrión, en tejidos adultos ésta puede cambiar a lo largo de la vida del individuo. La capacidad de cambio o adaptación celular se denomina plasticidad, siendo indispensable para el mantenimiento homeostático y para la reparación frente al daño. El concepto de plasticidad implica un cambio dinámico

del entorno, equivalente al terreno propuesto originalmente por Waddington, cuya topología es moldeada por numerosos factores (Figura 1.17B). La naturaleza moldeable del entorno donde se alojan las células, plantea la posibilidad de estados celulares transitorios que en sí mismos constituyen la plasticidad tisular (Rajagopal & Stanger, 2016).

La reparación y regeneración de un tejido comienza con la activación de las SC, o con la puesta en marcha de mecanismos asociados a la plasticidad celular, principalmente: desdiferenciación y transdiferenciación (Figura 1.17A ii y iii, respectivamente). El primero ocurre cuando una célula terminalmente diferenciada revierte a un estadio precursor del mismo linaje, el cual prolifera y su progenie se diferencia a células maduras; mientras que la transdiferenciación implica el cambio de un linaje celular a otro que puede ocurrir directamente entre células terminalmente diferenciadas, o indirectamente revirtiendo a un estadio precursor perteneciente a otro linaje celular (Jopling *et al.*, 2011; Rajagopal & Stanger, 2016). En ambos casos el objetivo es sustituir las células que por cualquier razón se hayan perdido, preservando la funcionalidad del tejido.

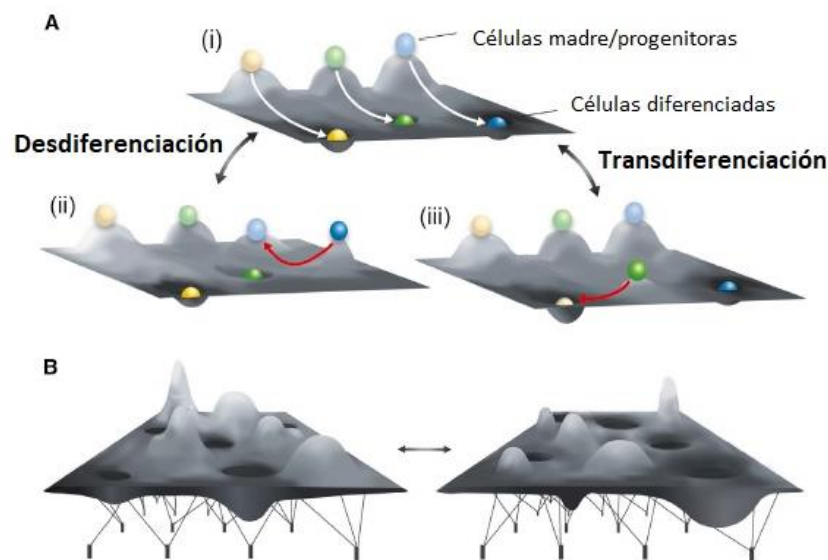


Figura 1.17 Diagrama de Waddington aplicado a las células madre adultas. (A) i) simplificación del estado de homeostasis basado en el diagrama original de Waddington referente al período embrionario; procesos de desdiferenciación (ii) y transdiferenciación (iii) en respuesta al remodelado del entorno. (B) Representación del cambio dinámico del tejido que favorece la plasticidad celular [modificado de (Rajagopal & Stanger, 2016)].

La reprogramación celular es un tercer proceso que implica plasticidad. Es un estado de inducción *in vitro* de células somáticas adultas terminalmente diferenciadas, hacia células con pluripotencialidad (iPS, *induced pluripotent stem cells*), que se logra mediante la sobreexpresión de factores clave, como: *Sox2*, *Oct4* (*Pou5f1*, *octamer binding protein-4*), *Nanog*, *Myc* y *Klf4* (*Krüppel like factor-4*) (Takahashi & Yamanaka, 2006). Considerando la importancia de este proceso en terapias regenerativas, diversos estudios se han centrado en lograr la reprogramación celular *in vivo* mediante la sobreexpresión de OSMK (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*) (Ocampo *et al.*, 2016). A diferencia de la des- y transdiferenciación, se pensaba que la reprogramación celular no ocurría espontáneamente en individuos adultos (Jopling *et al.*, 2011; Scudellari, 2016). Sin embargo, en los últimos años se han aportado evidencias experimentales que soportan la idea de que la reprogramación *in vivo* ocurre de forma paracrina en respuesta a factores segregados por células senescentes circundantes (SASP, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (Chiche *et al.*, 2017; Mosteiro *et al.*, 2018; Pesaresi *et al.*, 2018).

## Células madre dérmicas adultas

En la piel se han descrito distintos tipos de SC asociadas a variedad de nichos. En la epidermis interfolicular, la renovación celular depende en su totalidad del proceso de diferenciación y maduración de células progenitoras que expresan K5/K14 y que contactan con la membrana basal (Blanpain & Fuchs, 2006; Hsu *et al.*, 2014a). Así mismo, en la epidermis folicular la función de las SG depende de la diferenciación celular, a partir de precursores localizados en la base de la glándula (Niemann & Horsley, 2012); y las células madre en la región del *bulge* (Figura 1.7) son imprescindibles durante el ciclo del pelo para generar la subpoblación de HF-TAC que migrará a la matriz, y cuya diferenciación permite la elongación de la fibra capilar (Hsu *et al.*, 2014b). No obstante, hasta el momento no se ha descrito que la función de las SC epidérmicas esté regulada directamente por *Sox2*.

Las poblaciones de SC descritas en el compartimiento dérmico son más complejas. Las SKPs (*skin-derived precursor cells*) se aislaron originalmente de piel embrionaria y adulta, mediante técnicas de cultivo celular similares a las utilizadas para establecer SC

neurales. Se ha planteado que las SKPs son consecuencia del cultivo *in vitro*, representan una población heterogénea que refleja la funcionalidad de distintos tipos celulares, con orígenes embrionarios diversos y asociadas a nichos dérmicos también diferentes (Agabalyan *et al.*, 2017). Las SKPs poseen capacidad *in vitro* de auto-renovación a largo plazo, forman colonias clonales de esferas y pueden diferenciarse a células de tipo neuronal [Nestina+,  $\beta$ III-tubulina+, NFM+ (Neurofilamento medio), NeuN+ (*Hexaribonucleotide Binding Protein-3*), GAD+ (*Glutamate decarboxylase*)], células gliales [(GFAP+ (*Glial fibrillary acidic protein*), CNPasa+ (*2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*)], músculo liso ( $\alpha$ -SMA+), adipocitos y fibroblastos dérmicos (Toma *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2004). Más aún, la diferenciación de SKPs neonatales al linaje glial genera células de SCH que *in vitro* mielinizan axones sensoriales, e *in vivo* mielinizan axones del CNS y PNS (McKenzie *et al.*, 2006; Biernaskie *et al.*, 2007). Las SKPs se han aislado tanto de piel glabra (Ruetze *et al.*, 2013) como de piel folicular (Toma *et al.*, 2001); y en humanos, la capacidad formadora de esferas disminuye con la edad (Gago *et al.*, 2009). *In vitro* SOX2 tiene un papel importante en la proliferación, capacidad esferogénica, y posiblemente en el mantenimiento de un estado celular indiferenciado de las SKPs (Suflita *et al.*, 2013). Por las propiedades antes descritas, a las SKPs se les consideró como células madre dérmicas adultas multipotentes (Toma *et al.*, 2001).

Las SKPs tienen propiedades similares a precursores embrionarios de la cresta neural (NCSC, *neural crest stem cells*) (Fernandes *et al.*, 2004). De hecho, en la región facial se ha propuesto que las SKPs provienen de células derivadas de la cresta neural, mientras que en la dermis dorsal derivan del mesodermo (Wong *et al.*, 2006; Biernaskie *et al.*, 2009) y en la dermis ventral provienen, al menos en parte, de la desdiferenciación de SCH terminales (Iribar *et al.*, 2017). En este sentido, se ha visto que la competencia neural de las SKPs puede provenir: i) de progenitores SOX2+ en la porción mesenquimal del HF (Jinno *et al.*, 2010; Krause *et al.*, 2014), ii) de SC asociadas por localización a la región del *bulge* del HF (HAP, *hair-follicle-associated pluripotent stem cells*), y iii) de células gliales asociadas a las terminaciones nerviosas (Wong *et al.*, 2006; Etxaniz *et al.*, 2014).

Por el papel de SOX2 en el mantenimiento de la multipotencialidad (Avilion *et al.*, 2003), en conjunto con la expresión de *Sox2* en cultivos esferogénicos de SKPs (Biernaskie *et al.*, 2009), se identificaron las células SOX2+, en la DP y la DS del mesénquima folicular, como las células dérmicas endógenas que originan a las SKPs. Parte de la propiedad de SC atribuida a éstas, proviene de una subpoblación SOX2+/ $\alpha$ -SMA+ localizada en una región adyacente a la DP, también llamada *dermal cup* (Figura 1.7). A esta subpoblación se le denomina hfDSC (*hair follicle-Dermal Stem Cells*), está restringida al nicho folicular, en el cual permanece a lo largo de varios ciclos de crecimiento del pelo, provee células a la DP y regenera la DS. Además, se ha propuesto que el compromiso de las hfDSC hacia células de la DP o células de la DS está mediado por SOX2 (Biernaskie *et al.*, 2009; Rahmani *et al.*, 2014). En el modelo de ratón *Sox2<sup>EGFP</sup>* (Ellis *et al.*, 2004), las células EGFP+ aisladas de la piel mediante FACS (*fluorescence activated cell sorting*) demostraron ser similares a las SKPs en diversos aspectos. Ambas tienen capacidad formadora de esferas *in vitro* que expresan los marcadores: Nestina, fibronectina, VCAN y  $\alpha$ -SMA; posteriormente se demostró que difieren a nivel transcripcional (Etxaniz *et al.*, 2014). En trasplantes seriados se demostró que las SKPs reconstituyen la dermis, inducen la morfogénesis del pelo, retienen multipotencialidad y capacidad de auto-renovación. De manera importante, los precursores dérmicos SOX2+ previamente aislados, migran al HF al ser trasplantados localizándose en la DP y la DS como nichos principales; también pueden migrar fuera este nicho, contribuyendo a otros linajes celulares dérmicos (Biernaskie *et al.*, 2009).

Mediante la expresión de GFP bajo el promotor de Nestina (modelo transgénico ND-GFP, *nestin driven GFP*), se identificaron células asociadas a la región del *bulge* del HF, a las que se les acuñó el nombre de HAP (Li *et al.*, 2003). Fenotípicamente se asemejan a las células gliales terminales en los complejos lanceolados del HF, tienen cuerpo celular pequeño y ovalado, con prolongaciones interconectadas entre sí (Yu *et al.*, 2006); también comparten morfología con la subpoblación de células SOX2+/Nestina+ en la DP que generan las SKPs (Liu *et al.*, 2011a; Uchugonova *et al.*, 2011). Aparte de *Nestina<sup>GFP</sup>*+, las HAP son K15- y CD34+ (marcador epitelial y SC, respectivamente) (Amoh *et al.*, 2005b). En el humano expresan los marcadores de SC neural NANOG y OCT4, así como también marcadores de cresta neural; además, tienen capacidad esferogénica y auto-renovación en

cultivo (Yu *et al.*, 2006). *In vitro* las HAP de ratón pueden diferenciarse a células neuronales, gliales, melanocitos, células de músculo liso y queratinocitos (Amoh *et al.*, 2005b); en el humano generan además progenie mesodérmica adiposa, condrocítica y osteogénica (Yu *et al.*, 2010). Tras un daño nervioso periférico en ratón, las HAP generan una progenie de SCH GFAP+ (Amoh *et al.*, 2005a); mientras que tras un corte en la médula espinal, las HAP trasplantadas en la región de la herida se diferencian a células gliales GFAP+/CNPase+ con capacidad mielinizante (Amoh *et al.*, 2008).

La plasticidad de las SCH permite establecer, a través de la desdiferenciación, una subpoblación de SCP con capacidad neural y regenerativa frente al daño. De hecho, las células dérmicas humanas con capacidad de diferenciación neural provienen de SCH P75NTR+/CD56(NCAM)+ que envuelven los nervios periféricos (Etxaniz *et al.*, 2014). En el ratón, la población celular SOX2+ dérmica con capacidad multipotente sobreexpresa los genes gliales: *p75ntr*, *ErbB3* (*Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3*), *Mpz* (*Myelin Protein Zero*), *Plp1*, *S100* y *Cdh2* (*N-cadherin*) (Etxaniz *et al.*, 2014). Fuera de la piel, tras el daño nervioso, las SCP guían el crecimiento axonal a través de *EphB2* (*Ephrin type B receptor 2*), en donde el contacto célula-célula entre las SCP requiere la localización de CDH2 que a su vez está regulada por SOX2 (Parrinello *et al.*, 2010; Cattin *et al.*, 2015). En otros contextos de regeneración tisular se ha reportado que las SCP ejercen señales paracrina sobre células mesenquimales. Tras la amputación del extremo de los dedos en el ratón, las SCP (*Sox2<sup>EGFP+</sup>*) segregan factores de crecimiento como OSM (*Oncostatin M*) y PDGF-AA que actúan sobre las células mesenquimales para formar un blastema regenerativo (Johnston *et al.*, 2016; Carr *et al.*, 2019). En la piel, la desdiferenciación y migración de SCP al lecho de heridas es dependiente de SOX2 (Johnston *et al.*, 2013); dentro del tejido de granulación, las células gliales activadas tienen un efecto paracrino mediado por TGF- $\beta$  que promueve la diferenciación de miofibroblastos, favoreciendo la contracción y el cierre de heridas cutáneas (Parfejevs *et al.*, 2018). Aunque los SCP dan lugar a una progenie de SCH maduras, no se ha observado que frente al daño se diferencien a otros linajes celulares (Parfejevs *et al.*, 2018).

Los niveles de expresión de *SOX2* regulan la potencialidad de estadios alternativos de células precursoras dérmicas que podrían establecerse entre las SCH y células perivasculares. De hecho, las células perivasculares en la piel tienen menor expresión de *SOX2* en comparación con las SCH (~40%) (Etxaniz *et al.*, 2014; Morikawa *et al.*, 2019). En glioblastoma, la disminución de la expresión de *SOX2* en SC induce la expresión de marcadores pericíticos y factores estimuladores de la angiogénesis (Guichet *et al.*, 2015). En el período embrionario del ratón, una subpoblación de células denominada *Boundary Cap Cells* (BC), migra fuera de la cresta neural a través de los nervios periféricos alojándose en la piel (Gresset *et al.*, 2015). Las BC son trazadas con los marcadores *Prss56* y *Krox20*, una vez que llegan a la piel, las células *Prss56+* se mantienen asociadas a los nervios dérmicos, mientras que las células *Krox20+* pierden el contacto con estructuras nerviosas para adquirir una localización perivascular (Radomska & Topilko, 2017); aunque este fenómeno ocurre durante el desarrollo entre E12.5-E13.5, da lugar a un 30% de los pericitos dérmicos postnatales (Topilko, 2019).

En el adulto, aún no se ha demostrado que la transición glial-perivascular ocurra en homeostasis, pero se ha descrito que las células tumorales CD133+ de glioblastoma pueden diferenciarse a pericitos, favoreciendo la función vascular que soporta el crecimiento tumoral (Cheng *et al.*, 2013). Además, en un modelo de trasplante de HF en la piel de ratones sin pelo, las células HAP Nestina+ dan lugar a la formación de estructuras vasculares que expresan los factores endoteliales CD31 y vWF (Amoh *et al.*, 2004). Las células perivasculares también se han propuesto como células madre mesenquimales y multipotentes, residentes en distintos tejidos. *In vitro* tienen capacidad de auto-renovación y diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico (Crisan *et al.*, 2008); mientras que *in vivo* pueden dar lugar a células adiposas (Tang *et al.*, 2008), células dendríticas foliculares en órganos linfoides (Krautler *et al.*, 2012), músculo esquelético (Dellavalle *et al.*, 2007), y algunos linajes neuronales (Dore-Duffy *et al.*, 2006). No obstante, en la literatura existe controversia acerca de la capacidad de SC que ha sido atribuida a las células perivasculares (Guimaraes-Camboa *et al.*, 2017; Vishvanath *et al.*, 2017).



El dWAT también es un nicho de SC, sin embargo poseen potencialidad restringida. Las SC adiposas se caracterizan por la expresión de los marcadores CD34 (*Hematopoietic progenitor cell antigen*), CD29 (*Integrin Subunit  $\beta 1$* ), Sca1 y CD24 (*Small cell lung carcinoma cluster 4 antigen*), mientras que los preadipocitos comprometidos pierden expresión de CD24 (Festa *et al.*, 2011; Rivera-Gonzalez *et al.*, 2016). Hasta el momento no se ha descrito algún papel directo de SOX2 en la regulación de las SC del dWAT. Sin embargo, el dWAT tiene un rol importante en la activación de las células madre epidérmicas residentes en el HF (Festa *et al.*, 2011), así como también en la cicatrización (Schmidt & Horsley, 2013). De hecho, la transdiferenciación de miofibroblastos hacia adipocitos en el lecho de heridas cutáneas pone en evidencia la importancia del dWAT, así como también, podría suponer un ejemplo de transdiferenciación *in vivo* como mecanismo pro-regenerativo (Plikus *et al.*, 2017).

## EL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento se define como la disminución funcional progresiva de los tejidos que ocurre con el paso del tiempo, y conlleva una disminución en la tasa de supervivencia y de reproducción del individuo (Flatt, 2012). Es un proceso sistémico y multifactorial, en el cual la disfuncionalidad tisular ocurre por la acumulación de daño celular, causado mediante diversos mecanismos celulares y/o moleculares, como: la inestabilidad genómica, el acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la homeostasis proteica, alteración nutricional, disfunción mitocondrial, senescencia, agotamiento de células madre y alteraciones en la comunicación intercelular (Lopez-Otin *et al.*, 2013).

En la disfuncionalidad tisular asociada al envejecimiento, hay una pérdida del potencial regenerativo subyacente de los tejidos que en homeostasis se mantiene por el correcto funcionamiento de las SC. Con el envejecimiento, tanto en ratón como en humano, disminuyen los niveles de expresión de *SOX2* en el cerebro, pulmones, corazón, riñones, bazo, hígado y células periféricas mononucleares de la sangre (Carrasco-Garcia *et al.*, 2019). Experimentalmente, la depleción inducida de las SC adultas que expresan *Sox2* [modelo animal *Sox2-TK* (Arnold *et al.*, 2011)] induce ciclos de regeneración tisular forzada

que conllevan al agotamiento de las SC, dando lugar a un fenotipo de envejecimiento prematuro sistémico (Vilas *et al.*, 2018).

Tabla 1.3 Cambios en la piel con el envejecimiento cronológico (Mine *et al.*, 2009; Cole *et al.*, 2018; Haydont *et al.*, 2019a).

Epidermis	↓ células de Langerhans
	↓ melanocitos activos
	↓ capacidad de re-epitelialización
	Grosor ↓ intrínseco - ↑ extrínseco
Unión dermo-epidérmica aplanada	
Dermis	↓ vasos sanguíneos y terminales nerviosas
	↑ tamaño de SG
	↓ número de SG funcionales
Folículo Piloso	↓ pigmentación del pelo
	↓ grosor de la fibra capilar
	↓ número (↓↓extrínseco)
dWAT	↓ volumen de grasa
	↓ contenido lipídico
Fibras Elásticas	↓ intrínseco (degradación) ↑ extrínseco (acumulación)
	↑ grosor FE y elaunina
	↑ modificaciones postraduccionales (daño proteico)
Fibras de Colágeno	↓ grosor ↑ espacio entre fibras
	↓ síntesis de colágeno (preferentemente tipo I)
ECM – Proteínas No Colagenosas	↓ perlecan, HA, versican, CCN2, POSTN
	↑ decorina truncada y fragmentación
Fibroblastos	↑ secreción VEGF (Fb papilares)
	↑ secreción de MMP/TIMPS (Fb papilares)
	↑ secreción de citoquinas

En la piel el envejecimiento se percibe con facilidad por la aparición de manchas, arrugas y flacidez (Haydont *et al.*, 2019a). El envejecimiento extrínseco está causado por factores ambientales, principalmente por la radiación solar ultravioleta; genera una textura áspera de la piel, arrugas profundas y pérdida de elasticidad, aumenta el grosor de la epidermis, y se pierden las fibras de colágeno VII-I de la unión dermo-epidérmica y dermis, respectivamente (Farage *et al.*, 2010). La característica principal del foto-envejecimiento es la elastosis, referida a la acumulación de FE aberrantes en la dermis profunda, producida

por un incremento en la actividad de MMP y serina-proteasas (Zhang & Duan, 2018). Por su parte, el envejecimiento cronológico de la piel se debe a factores intrínsecos metabólicos y genéticos, cuyo mecanismo de acción difiere del foto-envejecimiento, generando diversidad de alteraciones (Tabla 1.3).

En piel humana las SKPs están funcionalmente alteradas con la edad, tanto por un menor número de precursores, como por una reducción del potencial de diferenciación (Gago *et al.*, 2009). Por su parte, con el envejecimiento los Fb exhiben cambios nucleares (Haydont *et al.*, 2019b), reducción del citoplasma, pérdida de contacto con las fibras de colágeno circundantes (Varani *et al.*, 2006), aumento de la capacidad contráctil *in vitro* (Mine *et al.*, 2009; Haydont *et al.*, 2019c), y sensibilización al estrés oxidativo (Brun *et al.*, 2016a). Tanto en humano como en ratón, los Fb presentan cambios en su perfil transcriptómico y proteico con la edad, los cuales convergen moderadamente entre distintos autores (Coppé *et al.*, 2008; Waldera Lupa *et al.*, 2015; Kaisers *et al.*, 2017; Salzer *et al.*, 2018; Haydont *et al.*, 2019b; Haydont *et al.*, 2019c; Solé-Boldo *et al.*, 2019). Los Fb tienen alteraciones en la segregación de proteínas que forman y/o degradan la ECM, proteínas formadoras y/o reguladoras de adhesiones focales, citoesqueleto, LINC (*Linkers of nucleoskeleton and cytoskeleton*) y núcleo-esqueleto. En conjunto, todas las categorías anteriores forman el "esqueleto tisular" cuya alteración con la edad favorece la inestabilidad genómica y las modificaciones epigenéticas (Haydont *et al.*, 2019b). En humano, las proteínas KANK4 (*KN Motif And Ankyrin Repeat Domains 4*), ACAN (*Chondroitin Sulfate Proteoglycan Core Protein 1*), COLXI $\alpha$ I y PSG1 (*Pregnancy Specific beta-1- Glycoprotein 1*) que forman parte del esqueleto tisular, se han propuesto como biomarcadores del envejecimiento cronológico en la piel (Haydont *et al.*, 2019c).

La parada irreversible del ciclo celular (senescencia) es un mecanismo supresor tumoral, pero la persistencia de células senescentes a lo largo de la vida promueve la disfunción tisular asociada al envejecimiento (Lopez-Otin *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2018). El cese proliferativo ocurre con la inhibición de los complejos CDK (*cyclin-dependent kinase*) y la hipofosforilación de la proteína RB (*Retinoblastoma*). Los estímulos que promueven la senescencia activan diferentes rutas de señalización que convergen en la activación de

inhibidores de CDK y/o diferentes combinaciones de éstos, como por ejemplo p16<sup>INK4a</sup> (*Cdkn2a*), p15<sup>INK4b</sup> (*Cdkn2b*), p21 (*Cdkn1a*), p27<sup>Kip1</sup> (*Cdkn1b*) (Munoz-Espin & Serrano, 2014). De hecho, la sobreexpresión de *p16Ink4a* se considera un biomarcador del envejecimiento (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Kim & Sharpless, 2006) que se ha visto aumentado en diversos tejidos con la edad y con la disminución de *Sox2* (Carrasco-Garcia *et al.*, 2019).

Las células senescentes segregan factores, conjuntamente denominados SASP, que promueven la atracción e invasión de células inmunes. Los SASP, en particular TGFβ, pueden influir de forma paracrina sobre las células vecinas, teniendo un efecto directo en la modulación del microambiente tisular (Coppé *et al.*, 2008; Munoz-Espin & Serrano, 2014; Sun *et al.*, 2018). El SAASP (*skin aging-associated secretory proteins*) de las células senescentes dérmicas, es semejante al SASP tradicional en términos de proteínas inflamatorias y de degradación de la ECM; pero difiere en proteínas asociadas con el metabolismo y uniones intercelulares (Waldera Lupa *et al.*, 2015).

La ECM puede estar afectada por la disfuncionalidad de las SC, de las células dérmicas o por modificaciones postraduccionales que se acumulan con el tiempo. El colágeno tiene una vida media de ~15 años y puede ser producido/degradado a lo largo de la vida, sobre todo durante la cicatrización. La elastina es sintetizada y depositada mayormente durante el desarrollo postnatal, permaneciendo durante toda la vida del individuo (Sherratt, 2009; Cole *et al.*, 2018). La tasa de renovación extremadamente baja de estas proteínas las hace propensas a modificaciones postraduccionales durante el envejecimiento, así como también favorece la acumulación de fragmentos degradados (Naylor *et al.*, 2011; Cole *et al.*, 2018; Haydont *et al.*, 2019a).

Los cambios en el colágeno (Marcos-Garcés *et al.*, 2014) y elastina afectan las propiedades mecánicas del tejido, las cuales influyen en la estimulación mecánica que necesitan los Fb para sintetizar nueva ECM (Varani *et al.*, 2006). El alineamiento de la ECM modula aspectos de la movilidad celular, los cambios en la ECM con la edad mediados por HAPLN1 (*Hyaluronan And Proteoglycan Link Protein 1*) promueven la invasión de células tumorales, a la vez que impiden la movilización de células inmunes (Kaur *et al.*, 2019). La

ECM retiene proteínas y factores de señalización celular que son liberados cuando está alterada, promoviendo el fenotipo envejecido (Cole *et al.*, 2018). Las proteínas matricelulares son un grupo de proteínas extracelulares secretadas que no cumplen un papel estructural dentro de la ECM, sino que median las interacciones célula-ECM a través de la unión a receptores de membrana, moléculas bioactivas y a la propia ECM (Bornstein, 2009). De éstas, POSTN (*Periostin*) y CCN2 son proteínas matricelulares asociadas al envejecimiento en diversos contextos (Quan *et al.*, 2010; Egbert *et al.*, 2014; Graja *et al.*, 2018).

El envejecimiento afecta la función de nervios motores y sensitivos del PNS. En la piel, el número de fibras nerviosas intra-epidérmicas disminuye con la edad (Chang *et al.*, 2004; Collongues *et al.*, 2018) a la vez que se ramifican (Lauria *et al.*, 1999). La disminución en la inervación y el número de receptores sensoriales altera la sensibilidad cutánea (Besné *et al.*, 2002; Collongues *et al.*, 2018). Los umbrales de percepción térmica nociva y vibración aumentan, mientras la capacidad táctil de discriminación entre dos puntos se pierde (Montagna & Carlisle, 1979; Verdu *et al.*, 2000). Por otro lado, con la edad hay una reducción de fibras nerviosas periféricas mielinizadas y no-mielinizadas, así como también alteraciones en su electrofisiología. En particular, la expresión de MBP, PMP22 (*Peripheral Myelin Protein 22*) y MPZ disminuye, afectando la estructura de las vainas de mielina (Verdu *et al.*, 2000). Con la edad la regeneración nerviosa está alterada, en parte como consecuencia de una menor activación en las SCH. La degeneración de los nervios periféricos y neuropatías relacionadas con la edad, influyen sobre la capacidad cicatricial. Con la denervación sensorial cutánea se ha descrito que la migración de células al lecho de herida durante la fase inflamatoria es más lenta, así como también hay un retraso en la contracción de la herida, re-epitelialización, angiogénesis y re-inervación (Cheret *et al.*, 2013; Laverdet *et al.*, 2015).

El flujo sanguíneo cutáneo se reduce un 40% entre los 20 a los 70 años (Tsuchida, 1993), como consecuencia de la reducción en la densidad vascular, la pérdida de elasticidad de los capilares, y la alteración en la reactividad de la microvasculatura (Bentov & Reed, 2015). Desde períodos prenatales en el humano, hay una reducción con la edad

en la densidad de vasos sanguíneos cutáneos, positivos para los marcadores endoteliales vWF y CD31, que se asocia con menos Fb dérmicos proliferativos (Gunin *et al.*, 2015). De forma consistente, en la piel facial de los labios también hay una reducción en la densidad vascular con la edad (Gomi & Imamura, 2019). La respuesta de vasoconstricción autonómica en la piel es más lenta en el envejecimiento, afectando directamente la temperatura corporal (Thompson & Kenney, 2004). El flujo sanguíneo cutáneo es responsable del transporte de oxígeno, nutrientes, productos metabólicos y células del sistema inmune, por lo que alteraciones del mismo son particularmente importantes en homeostasis y en cicatrización.



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---





*Sox2* es un gen que regula las células madre en distintos tejidos, entre ellos la piel; por tanto, es un determinante clave en la homeostasis y regeneración tisular. Ya que sus funciones son dosis-dependientes, en este trabajo abordamos como hipótesis si con el envejecimiento existe un desequilibrio en las poblaciones de células precursoras dérmicas adultas que expresan distintos niveles de *Sox2*, generando un déficit regenerativo que subyace al envejecimiento dérmico. La aproximación propuesta involucra como objetivos:

- i) Caracterizar el agotamiento y funcionalidad de las células madre adultas residentes en la piel con la edad, mediante los modelos animales C57BL/6J y *Sox2<sup>EGFP</sup>*.
- ii) Caracterizar la relevancia de los niveles de expresión de *Sox2* en el fenotipo de las células madre dérmicas envejecidas.
- iii) Caracterizar la piel del ratón heterocigoto *Sox2<sup>EGFP</sup>* como modelo de envejecimiento prematuro.

Los avances en el conocimiento de las células madre y los mecanismos implicados en la reparación/regeneración dérmica, permitirán entender mejor otras áreas de gran relevancia clínica, como: la fibrosis y el remodelado del estroma; los cuales no sólo ocurren en relación a la edad, sino también en otras patologías como el cáncer de piel y las heridas crónicas.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---



## ANIMALES

La experimentación animal de este trabajo fue aprobada por el Comité de Bienestar Animal del Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia, de conformidad con la Directiva Europea 2010/63/UE y el Real Decreto 53/2013. Los animales se estabularon en zona convencional libre de patógenos en *racks* ventilados, con condiciones de temperatura, humedad y ciclo de luz controladas. Los modelos animales utilizados se describen en la Tabla 3.1

Tabla 3.1 Modelos animales

Cepa	Abreviatura	Descripción	Referencia
<i>B6;129S-Sox2<sup>tm2Hoch</sup>/J</i>	<i>Sox2<sup>EGFP</sup></i>	ORF ( <i>Open Reading Frame</i> ) de un alelo del gen <i>Sox2</i> sustituido por EGFP ( <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> )	(Ellis <i>et al.</i> , 2004; Arnold <i>et al.</i> , 2011)
<i>C57BL/6J</i>	C57	Sin alteración génica	<i>The Jackson Laboratory</i> , nº 000664

Como norma general se utilizaron animales jóvenes (<3 meses) y envejecidos (>15 meses), otras edades se indicarán cuando corresponda. A lo largo del trabajo, el grupo joven se denotará como "*young*" y el grupo envejecido como "*old*", utilizando los términos en inglés y castellano indistintamente.

Para el mantenimiento de la colonia se cruzaron animales homocigotos *Sox2<sup>+/+</sup>* con heterocigotos *Sox2<sup>+/EGFP</sup>*. Los animales homocigotos normales serán denotados "*wt*" (*wild type*) y los animales heterocigotos con un sólo alelo de *Sox2*, serán denotados como "*Sox2<sup>EGFP</sup>*".

## GENOTIPADO Y SACRIFICIO

Los animales se clasificaron en función de su genotipo. Se extrajo DNA de un trozo de cola de cada animal utilizando REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (XNAT, Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de EGFP se siguió el protocolo general de amplificación de GFP sugerido por *The Jackson Laboratory*. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 2% (A9539, Sigma-Aldrich). Se permitió el envejecimiento natural de los animales hasta la edad de sacrificio necesaria. Los animales, previamente anestesiados con isoflurano (8803934HO, Abbvie) se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>.

## INDUCCIÓN DE FASE ANÁGENA POR DEPILACIÓN

En aquellos casos donde se indujo el crecimiento del pelo, se anestesiaron los animales con isoflurano, manteniéndolos en una manta eléctrica durante todo el procedimiento para evitar la hipotermia. Con una maquinilla eléctrica se recortó el pelo de la zona dorsal y se aplicó cera tibia con una espátula, al endurecerse se retiró con cuidado de no tirar bruscamente la piel del animal. Se limpió la zona con agua tibia para retirar los restos de cera y se dejó recuperar al animal sobre una manta eléctrica. Los animales se sacrificaron 12 días después.

## DISECCIÓN DE LA PIEL

Una vez sacrificados el/los animales, se cortó el pelo dorsal y ventral con una maquinilla eléctrica. Se eliminaron los restos de pelo utilizando afeitadoras desechables de doble hoja. La zona de piel a diseccionar se limpió con solución alcohólica de clorhexidina 0,5% (731250, Bohm Lab) y etanol. Se pinzó la piel justo por encima de la cola (piel dorsal) o de los genitales (piel ventral) y con unas tijeras se realizó una incisión, introduciendo repetidas veces la tijera para separar por completo la piel de la fascia interna. Se hicieron incisiones laterales hasta las extremidades superiores y se retiró la piel.

## PRESERVACIÓN DEL TEJIDO

Según el uso experimental posterior, la piel se preservó de las siguientes formas:

### Para cultivo celular

Se colocó la piel inmediatamente en *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, 14175, Gibco) suplementada con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomina (P/S, P0781, Sigma-Aldrich) y 1 µg/ml Anfotericina B (15290018, Gibco). Se mantuvo a 4 °C hasta su procesamiento en campana de flujo laminar.

### Para extracción de RNA

Se colocó la piel en una placa p100 con la epidermis hacia abajo, con un bisturí se removió la grasa subcutánea incluyendo los vasos sanguíneos visibles. Se cortó la piel en cuadrados de aproximadamente 2x2 mm, los cuales se introdujeron en tubos *ependorf*® libres de RNAsas con 500 µl de *RNAlater*® (R0901, Sigma-Aldrich), manteniéndolos a 4 °C durante 24 horas. Transcurrido ese período, se retiró por completo el *RNAlater*® y se guardó la piel a -80 °C.

### Para histología e inmunofluorescencia

La piel se cortó en trozos de 0,8-1 x 0,5 cm con el lado largo en dirección rostro-caudal. Se colocó cada trozo con la epidermis hacia arriba sobre esponjas para histología (192922.04, Deltalab) dentro de cassettes histológicos. Se fijaron en Histofix® (256462, PanReac AppliChem) durante 24 horas a 4 °C.

Para histología: se colocaron las muestras en una procesadora de tejidos (MTM, SLEE medical), incluyendo cada trozo de piel en un bloque de parafina, orientado de manera perpendicular y con el lado largo hacia abajo.

Para IF: se lavaron las pieles con *Phosphate Buffered Saline* 1X (PBS10X, 44952, Palex) y se incubaron las muestras en 30% sacarosa (1.316.211.211, Panreac AppliChem) durante 24 horas a 4 °C. Cada trozo de piel se embebió en *Optimal cutting temperature compound*



(TissueTek®OCT™, 4583, Sakura) orientándolo de forma perpendicular con el lado largo hacia abajo dentro de moldes de plástico de congelación. El tejido se congeló de forma rápida, utilizando isopentano (1.06056.1000, Millipore) previamente enfriado dentro de un vaso de precipitado con nitrógeno líquido. El bloque de congelación se sumergió durante 5 segundos en el isopentano. Los bloques se mantuvieron a -80 °C hasta su uso posterior.

### Para análisis de tejido completo

Se cortó la piel en trozos de 1x1 cm, manteniendo en PBS 1X a 4°C. Las pieles se incubaron, con la epidermis hacia arriba, en 2 mg/ml de dispasa II (D4693, Sigma-Aldrich) durante 18 horas a 4 °C. Se retiró la epidermis con ayuda de pinzas y bisturí. La zona dérmica se lavó varias veces con PBS 1X. Se fijó la piel con 4% paraformaldehído (PFA, 15710-S, EMS), durante 2 horas a 4 °C. Se lavó varias veces con PBS 1X para retirar las trazas del fijador. Las incubaciones y lavados se hicieron en agitación suave. El tejido fijado se guardó a 4 °C en 0,2% azida sódica (S2002, Sigma-Aldrich) y se analizó en un período máximo de 8 semanas después de su fijación.

## MÉTODOS DE CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Todos los procedimientos de cultivo celular se realizaron en condiciones de esterilidad. Los cultivos se mantuvieron en incubadoras a 37 °C de temperatura, 5% CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa.

### Descongelamiento y mantenimiento de la línea 804G

Se utilizó un banco de trabajo celular de la línea comercial 804G (CVCL\_J122). El descongelamiento de las células se hizo de forma rápida, sumergiendo el vial de células un minuto en baño maría a 37 °C, o el tiempo necesario hasta observar una fase líquida que permitiera trasvasar el medio a un tubo de 15 ml. Se añadió 5 veces más volumen de medio completo: *Dulbecco's Modified Eagles medium-high glucose* (DMEM, D6546, Sigma-Aldrich) suplementado con 2mM L-glutamina (G7513, Sigma-Aldrich), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 10% suero fetal bovino (FBS, DE14-801F, Lonza). Se

centrifugó a 1500 rpm (revoluciones por minuto) por 5 minutos, descartando el sobrenadante que contenía medio de congelación [medio completo con 10% dimetilsulfóxido (DMSO, D2650, Sigma-Aldrich)]. Se diluyeron las células en 1 ml de medio completo, se estimó la viabilidad celular con azul de tripano (T8154, Sigma-Aldrich) y se sembraron en frascos de cultivo adherentes de 75 cm<sup>2</sup> a 25.000 células/cm<sup>2</sup>. Se hicieron pases cada 3-4 días o una vez alcanzada confluencia. Para ello, se retiró el medio de la placa de cultivo, se lavó con PBS 1X y se agregaron 3 ml de 0,25% tripsina-EDTA (T4049, Sigma-Aldrich) incubando a 37 °C durante 5 minutos. Se agregó el doble de volumen de medio completo, la suspensión celular se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y las células se resembraron a una dilución de 1/8 o 1/10 en medio completo. Se usaron hasta 35-40 pases.

## Preparación de matrices de laminina

Se trataron cubreobjetos con laminina secretada por las células 804G (Langhofer *et al.*, 1993). Las células se sembraron en cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro (11708701, Menzel®-Glaser) colocados en placas de 24 pocillos no adherentes, hasta alcanzar 100% de confluencia. Se retiraron las células mediante choque osmótico, manteniendo intacta la ECM. Los cubreobjetos se lavaron con PBS 1X. Se incubaron por 10 minutos en hidróxido de amonio 20mM (NH<sub>4</sub>OH, 320.145, Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente. Se aspiró la monocapa celular junto con el hidróxido de amonio. Los cubreobjetos se lavaron al menos 3 veces (10 minutos c/u) con agua ultrapura (Milli-Q®). En caso de haber restos celulares se repitió nuevamente el proceso; en caso contrario, los cubreobjetos se almacenaron a 4 °C con suficiente volumen de PBS 1X y se utilizaron durante la semana siguiente a su preparación.

## MÉTODOS DE CULTIVOS PRIMARIOS

### Aislamiento de células precursoras dérmicas de ratón

Se realizó a partir de piel dorsal, siguiendo protocolos previamente descritos (Toma *et al.*, 2001; Etxaniz *et al.*, 2014). Se limpió la piel con 70% etanol (20821.296, VWR) y se

colocó en una placa p100 con medio *Ham's F12 Nutrient Mix* (F12, N4888, Sigma-Aldrich). Se retiró la grasa subcutánea, los restos visibles de vasos sanguíneos y fragmentos de pelo. La piel se lavó al menos 6 veces con medio F12 cambiando siempre a placas nuevas. Se cortó en fragmentos de aproximadamente 4 mm<sup>2</sup>, los cuales se trasvasaron a un tubo de 15 ml conteniendo medio de digestión F12 con 1 mg/ml de colagenasa tipo XI (C9407, Sigma-Aldrich); por cada 1,5 ml de tejido se usaron 10 ml de medio de digestión. Los fragmentos de piel se incubaron entre 50-70 minutos, dependiendo del volumen de tejido inicial, a 37 °C en agitación constante a 180 rpm. La digestión enzimática se inactivó en hielo, agregando 2 volúmenes de medio de disociación DMEM/F12 (3:1) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 2mM L-glutamina. Los fragmentos digeridos se centrifugaron por 7 minutos a 1200 rpm. Se descartó el sobrenadante. Se agregó entre 3-5 ml de medio de disociación frío, disgregando de forma mecánica con pipetas serológicas de 5 ml, aspirando y expulsando los fragmentos repetidas veces durante 2 minutos en tubos de 50 ml. La suspensión celular con los fragmentos disociados se centrifugó 40 segundos a 1200 rpm, el sobrenadante conteniendo las células liberadas del tejido se pasó por un filtro celular de 40 µm, manteniendo en hielo la suspensión celular. Los ciclos de disociación mecánica se repitieron entre 3-10 veces, hasta disociar por completo todos los fragmentos de piel. Se centrifugó la suspensión celular durante 7 minutos a 1200 rpm. Se descartó el sobrenadante y se diluyeron las células en medio de proliferación DMEM/F12 (3:1) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomina, 2mM L-glutamina, 1µg/ml Anfotericina B, 2% B-27™ (17504-044, Gibco), 40 ng/ml *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF, PHG0023, Gibco), 20 ng/ml *Epidermal Growth Factor* (EGF, GF-080-8, Austral) y 0,8% metilcelulosa (HSC-001, R&D Systems). Se contaron las células por exclusión con azul de tripano y se sembraron en suspensión en placas p60 no adherentes, a 60.000-90.000 cel/cm<sup>2</sup>. Los cultivos primarios se mantuvieron durante 7-8 días, refrescando cada 2-3 días con 10% de medio de proliferación; los factores B-27™, bFGF y EGF se calcularon para el volumen total del cultivo.

## Disgregación de dermoesferas en suspensión

A los 7 días, los cultivos primarios de dermoesferas se disgregaron para el mantenimiento y expansión de las células precursoras. Se recogió en un tubo de 15 ml el medio de cultivo conteniendo las dermoesferas en suspensión, lavando las placas con 2 ml de PBS 1X. El medio se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavaron las dermoesferas con PBS 1X. Se centrifugaron con las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se agregaron 200-300  $\mu$ l de 0,25% tripsina-EDTA incubando por 3 minutos a 37 °C. Se agregó 5 veces más de volumen de medio de proliferación (sin factores), disgregando suavemente con una micropipeta. La suspensión se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se diluyó en medio de proliferación. Se sembraron las células a 20.000-25.000 cel/cm<sup>2</sup>, refrescando cada 2-3 días de la misma forma que en el apartado anterior.

Para hacer referencia al tiempo de cultivo en el cual se realizaron los experimentos, se usará la siguiente terminología: P0 (pase 0) denota el cultivo primario de células recién aisladas; P1 denota dermoesferas que han sido disgregadas una vez, P2 denota dermoesferas que han sido disgregadas dos veces. Seguidamente, se indicaran los días a los cuales se analizaron (Ej. P1D3: dermoesferas cultivadas durante 3 días después de 1 disgregación).

## Cuantificación del tamaño de las dermoesferas

Se usaron cultivos de dermoesferas a P1D7 sembrados a 25.000 cel/cm<sup>2</sup> en placas p60. Se fotografiaron de cada placa 10 campos al azar utilizando un objetivo de aumento 10x. Se midió el diámetro de las dermoesferas.

## Siembra de dermoesferas para IF

En un tubo de 15 ml se recogieron las dermoesferas en suspensión, se centrifugaron y diluyeron en medio de proliferación. Se sembraron 60  $\mu$ l de la suspensión en cubreobjetos con matriz de laminina, de forma que todo el volumen se mantuviera en el centro del cristal. Se incubó durante 20 minutos a 37 °C, controlando el tiempo para evitar

que las células migrasen fuera de las dermoesferas. Las esferas adheridas se lavaron con PBS 1X y se fijaron con 4% PFA durante 15 minutos a temperatura ambiente. En este punto se continuó con la IF de dermoesferas, o se guardaron en 0,2% azida sódica a 4 °C.

## Diferenciación neural de células precursoras dérmicas

Se sembraron 5.000 células (P2) en cubreobjetos tratados con laminina, cultivando en medio basal DMEM/F12 (3:1) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 2mM L-glutamina, 2% B-27™ y 1% de FBS. A los 4 días o alcanzada una confluencia del 80%, se substituyó el medio basal por medio de diferenciación glial DMEM/F12 (3:1) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 2mM L-glutamina, 1% de N-2 (17502-048, Gibco), 5 µM forskolina (F6886, Sigma-Aldrich) y 40 ng/µl *Heregulin*β1 (HRG1-β1, 100-03, Preprotech). Cada 3 días se retiró el 50% del volumen de medio y se agregó el mismo volumen de medio de diferenciación recién preparado. Al cabo de 14 días en condiciones de diferenciación neural, se lavaron las células con PBS 1X y se fijaron con 4% PFA durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se continuó con la IF de células en adhesión, o se guardaron en 0,2% azida sódica a 4 °C.

La capacidad de diferenciación se estimó en función del número de células positivas para el marcador S100 ó α-SMA. Por cada muestra biológica (C57 *young* N=5, *old* N=6; *Sox2*<sup>EGFP</sup> N=4 en ambas edades) se utilizaron al menos 3 cubreobjetos (réplicas técnicas) y se fotografiaron 10 campos al azar de cada uno.

## Diferenciación adiposa de células precursoras dérmicas

Las células usadas para diferenciación adiposa se crio-preservaron una vez aisladas del tejido (P0D0; *young* 1,5-2,4 meses y *old* 11,4-13,7 meses). Las células obtenidas de dermoesferas a P2 recién disgregadas, se sembraron a 15.000 cel/cm<sup>2</sup> en placas p24 adherentes. Se cultivaron durante 4 días en medio basal DMEM/F12 (3:1) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 2mM L-glutamina, 2% B-27™ y 10% de FBS. Transcurrido ese tiempo, se substituyó el medio basal por medio de diferenciación adipogénico DMEM/F12 (3:1) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 10% FBS, 1µM dexametasona (D4902, Sigma-Aldrich), 1 mM

isobutylmetilxantina (IBMX, I5879, Sigma-Aldrich) y 20 µg/ml insulina (I0516, Sigma-Aldrich). Los cultivos se mantuvieron durante 21 días, cambiando cada 3-4 días el 50% del volumen con medio fresco.

Se establecieron dos condiciones de cultivo por cada muestra: 1) Control (CTRL): al menos un pocillo se mantuvo con medio de diferenciación sin dexametasona, IBMX e insulina; 2) Diferenciación (DIFF): al menos 3 pocillos se mantuvieron con medio de diferenciación completo. La capacidad de diferenciación adiposa de los cultivos se evaluó a tiempo final mediante el análisis de la expresión génica relativa de los marcadores *Pparγ*, *Fabp4* y *Adipoq* (ver: Métodos de análisis de expresión génica, página 74). Las réplicas técnicas de los cultivos diferenciados se mantuvieron por separado durante el aislamiento del RNA. Para el proceso de retro-transcripción y PCR, las réplicas técnicas se combinaron en partes iguales en función de la concentración de ARN.

### Análisis de la población EGFP+ por citometría de flujo

Se disgregaron dermoesferas a P0D7 y se usaron 100.000 células para análisis por citometría de flujo. Se diluyó la suspensión celular en PBS 1X a 200 células/µl y se filtró (poro de 40 µm), manteniendo la suspensión en hielo hasta su análisis (20 minutos después de la disgregación). La suspensión celular se incubó con TO-PRO™-3 (T3605, Invitrogen) a 0,02 µM y durante 5 minutos en oscuridad. Las muestras se analizaron en un citómetro BD FACS Calibur. Se seleccionó la población en función del tamaño (FSC, forward scatter) y la complejidad (SSC, side scatter). Se seleccionaron las células viables por exclusión del colorante TO-PRO™-3. De las células viables se analizó la fluorescencia en los detectores FL1-H (530/30 nm) y FL4-H (661/16 nm). La región EGFP+ se estableció utilizando como control negativo células aisladas de animales wt *young* y *old* (n=3 por edad). Para calcular el porcentaje de eventos, la región EGFP+ se mantuvo constante en todas las muestras *Sox2<sup>EGFP</sup>* analizadas.

## MÉTODOS DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

### Aislamiento de RNA de piel ventral

Se colocaron 30 mg piel en tubos de 2 ml con fondo en U, se colocaron 2 bolas de acero inoxidable de 5 mm de diámetro por cada tubo (69989, Qiagen) y se agregaron 600 µl de buffer RLT. Se homogeneizó mecánicamente en un TissueLyser (Qiagen) mediante 3 ciclos de 30 segundos a 30 hercios cada uno. El tejido homogeneizado se pasó a un tubo de 2 ml nuevo, evitando arrastrar trozos no disociados. El RNA se aisló utilizando el kit comercial RNeasy® Mini Kit (74104, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron 30 µl de agua libre de RNAsa para eluir el RNA adherido en las columnas del kit.

### Aislamiento de RNA de células en cultivo

Se utilizó el método de extracción con trizol (TRI *Reagent*<sup>™</sup> *Solution*, AM9738, Invitrogen). Las células cultivadas en suspensión se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de trizol por cada placa de cultivo p60. Para células cultivadas en adhesión, se retiró el medio de la placa de cultivo y se agregaron 150 µl de trizol por cada pocillo p24. Se lisaron las células mecánicamente pipeteando repetidas veces, se pasó el lisado a un tubo *ependorf*® de 1,5 ml y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Todos los reactivos y centrifugaciones se hicieron a 4°C. Se agregaron 200 µl de cloroformo (C2432, Sigma-Aldrich) por cada 1 ml de trizol, agitando vigorosamente durante 15 segundos. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 12000 g por 15 minutos. Se pasó la fase acuosa superior a un tubo *ependorf*® nuevo. Se agregaron 500 µl de 2-propanol (I9516, Sigma-Aldrich) y 1 µl de glicógeno (AM9510, Invitrogen), mezclando suavemente por inversión. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g por 8 minutos. Se verificó visualmente la precipitación del RNA y con cuidado se retiró el sobrenadante. Se lavó el RNA precipitado con 1 ml de 75% etanol (ET00111000, Sharlab) preparado con agua libre de nucleasas (10977-035, Gibco). Se centrifugó a 7500 g por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Se realizó otro ciclo de centrifugación para fijar el RNA precipitado, removiendo el sobrenadante. Se dejó evaporar el etanol al aire durante

20 minutos, o en bomba de vacío durante 5 minutos. El RNA precipitado se diluyó en agua libre de RNAsa, manteniendo en hielo. Los volúmenes de reactivos se ajustaron proporcionalmente al volumen inicial de trizol.

## Cuantificación de la cantidad y la calidad del RNA

Se determinó la concentración de RNA mediante la absorbancia de la muestra a 260 nm (Nanodrop 1000, Thermo Fisher). La pureza de las muestras se evaluó mediante los ratios tradicionales A260/A280 (pureza respecto al DNA ~ 2,0) y A260/A230 (pureza de ácidos nucleicos 2,0-2,2). En algunos casos se determinó la calidad del RNA extraído mediante electroforesis, para ello se utilizó el *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (5067-1511, Agilent), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los análisis de expresión génica se hicieron con muestras de RIN (*RNA Integrity Number*) mayor a 5.

## Digestión de DNA contaminante en extractos de RNA

El RNA extraído se trató con Desoxiribonucleasa tipo I (*DNaseI* 18068-015, Invitrogen) para eliminar DNA contaminante. Las reacciones se prepararon en hielo según los volúmenes indicados en la Tabla 3.2, y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se inactivó la enzima añadiendo 1 µl de EDTA 25 mM, incubando a 65 °C por 10 minutos. Se cuantificó la concentración para verificar que no hubo digestión o pérdida del RNA.

Tabla 3.2 Protocolo para la digestión específica de DNA

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración o Volumen</b>
Muestra RNA	1000 ng (máximo 8 µl)
<i>Buffer</i> DNaseI 10x	1 µl
DNaseI 1 U/µl	1 µl
Agua libre de nucleasas	Completar hasta 10 µl finales



## Retrotranscripción (RT) de RNA a cDNA

Se convirtió el RNA en DNA complementario (cDNA) con el kit *High Capacity RNA-to-cDNA™* (4387406, Applied Biosystems). Se prepararon las reacciones en frío dispensando en tubos de PCR (72.991.002, Sarstedt). Se centrifugaron brevemente las mezclas y se llevó a cabo la reacción en un termociclador (C1000 *Thermal Cycler*, Bio-Rad). En la Tabla 3.3 se detallan los volúmenes y condiciones de reacción utilizadas. Las muestras se guardaron a -20 °C o se usaron inmediatamente.

Tabla 3.3 Protocolo de reacción y condiciones para la retrotranscripción de RNA

PROTOCOLO DE REACCIÓN RT	
Reactivo	Concentración o Volumen
RT <i>buffer</i> 2x	10 µl
Enzima 20x (MuV)	1 µl
Muestra RNA	1-9 µl (máximo 2 µg)
Agua libre de nucleasas	Completar hasta 20 µl

PROTOCOLO DE TERMOCICLADOR	
Temperatura (°C)	Tiempo (min)
37	60
95	5
4	Infinito

## Evaluación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Se cuantificaron los niveles de expresión génica con las tecnologías "*SYBR Green*" y "*TaqMan®*". En función del experimento sólo se usó una de ellas, sin comparar la expresión de genes evaluados por tecnologías diferentes. En ambos casos, las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en los equipos CFX96 o CFX384 *Touch Real-Time PCR detection System* (Bio-Rad), escogiendo el adecuado en función de las placas utilizadas en el diseño experimental (96 o 384 pocillos de reacción). Se utilizaron triplicados técnicos por cada muestra y gen evaluado.

Tabla 3.4 Protocolo qPCR para tecnología *TaqMan*

PROTOCOLO DE REACCIÓN <i>TaqMan</i>		
	Reactivo	Volumen
A	Sonda <i>TaqMan</i> 20x	0,5 µl
	<i>TaqMan™ Gene Expression Master Mix</i> 2x (4369510, Applied Biosystems)	5 µl
	Agua libre de nucleasas	2 µl
B	cDNA (4 ng/ µl)	2,5 µl (10 ng totales)

PROTOCOLO DE TERMOCICLADOR EN TIEMPO REAL		
Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Repeticiones
50	120	Repetir 40 ciclos
95	600	
95	15	
60	60	
Lectura fluorescencia FAM		

Tabla 3.5 Descripción de sondas *TaqMan* empleadas

Abrev.	Nº Sonda	Transcrito	Amplicón bp	Genómico
<i>Adipoq</i>	Mm00456425_m1	NM_009605.4	74	no
<i>Fabp4</i>	Mm00445878_m1	NM_024406.2	74	no
<i>Gapdh*</i>	Mm99999915_g1	NM_001289726.1	109	si
		NM_008084.3		
<i>Postn</i>	Mm01284919_m1	NM_001198765.1	62	no
		NM_001198766.1 NM_015784.3		
<i>Pparγ</i>	Mm01184322_m1	NM_011146.3	101	no
<i>Sdha*</i>	Mm01352366_m1	NM_023281.1	82	no
<i>Tbp*</i>	Mm00446971_m1	NM_013684.3	93	no

\* Genes endógenos usados para normalizar los genes de interés

qPCR por tecnología “*TaqMan*”: todos los reactivos se mantuvieron en oscuridad y en frío. Por cada gen a evaluar se preparó una mezcla de *buffer* de reacción y sonda *TaqMan* (Tabla 3.4A y Tabla 3.5). Se diluyó el cDNA de cada una de las muestras con agua libre de RNAsa (Tabla 3.4B). Se prepararon las reacciones en las placas correspondientes, dispensando primero la preparación de cada sonda y luego el cDNA. Se llevó a cabo la

reacción midiendo la señal de fluorescencia (*FAM*) después de cada ciclo de amplificado (Tabla 3.4).

Tabla 3.6 Protocolo qPCR para tecnología SYBR Green

<b>PROTOCOLO DE REACCIÓN SYBR GREEN</b>		
	<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
A	<i>Power SYBR™ Green PCR Master Mix</i> (4367659, Applied Biosystems)	6 µl
	Mezcla par de cebadores 5 µM*	1 µl
B	cDNA (4 ng/µl)	5 µl (20 ng totales)
<b>*MEZCLA PAR DE CEBADORES 5 µM</b>		
	Cebador <i>Fw (Forward)</i> 100 µM	5 µl
	Cebador <i>Rv (Reverse)</i> 100 µM	5 µl
	Agua libre de nucleasas	90 µl
<b>PROTOCOLO DE TERMOCICLADOR EN TIEMPO REAL</b>		
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Repeticiones</b>
50	120	Repetir 45 ciclos
95	600	
95	15	
60	60	
Lectura fluorescencia <i>SYBR</i>		<i>T<sub>m</sub></i>
65,0-95,0	0,05 °C/5 s	
Lectura Fluorescencia <i>SYBR</i>		

qPCR por tecnología "SYBR Green": se preparó una mezcla de *buffer* de reacción *SYBR Green* conteniendo cada par de cebadores de interés (Tabla 3.6A y Tabla 3.7). Se hizo la dilución correspondiente de cDNA en agua libre de RNAsa (Tabla 3.6B). Se prepararon las reacciones de qPCR en las placas correspondientes. Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo el programa descrito en la Tabla 3.6, se midió la fluorescencia para "SYBR" después de cada ciclo de reacción; al finalizar los ciclos se incluyó un paso para evaluar la curva de disociación de los cebadores (*melting curve*, *T<sub>m</sub>*). La primera vez que se utilizó cada par de cebadores se evaluó su eficiencia de amplificación. Para ello, se determinó el ciclo de amplificado (*C<sub>t</sub>*) en función de una cantidad inicial conocida de cDNA (0,04 ng a 40 ng). Se generó una recta patrón de la cual se calculó la ecuación de la recta lineal

ajustada a los datos ( $R^2 \geq 0,99$ ). Se determinó la eficiencia según la siguiente fórmula:  $Eficiencia = 10^{(-\frac{1}{m})}$ , donde "m" es la pendiente de la recta lineal (Page & Stromberg, 2011).

Tabla 3.7 Descripción de cebadores empleados con *SYBR Green*

Abrev.	Secuencia 5' - 3'	Transcrito	Amplicón bp	Genómico
<i>Cdkn1b</i> ( <i>p27</i> )	Fw ATGGGTCTCAGGCAAACCTCT Rv GTTCTGTTGGCCCTTTTGT	NM_009875.4	155	si
<i>Cdkn1a</i> ( <i>p21</i> )	Fw GTGGGTCTGACTCCAGCCC Rv CCTTCTCGTGAGACGCTTAC	NM_001111099.2 NM_007669.5	140	si
<i>Hprt*</i>	Fw AGTCCCAGCGTCGTGATTAG Rv TTTCCAAATCCTCGGCATAATGA	NM_013556.2	88	no
<i>Osm</i>	Fw ATGCAGACACGGCTTCTAAGA Rv TTGGAGCAGCCACGATTGG	NM_001013365.2	89	no
<i>Osmr</i>	Fw CATCCCGAAGCGAAGTCTTGG Rv GGCTGGGACAGTCCATTCTAAA	NM_001310469.1 NM_011019.3	110	no
<i>Sox2**</i>	Fw CACAACCTCGGAGATCAGCAA Rv CTCCGGGAAGCGTGTACTTA	NM_011443.4	190	si
<i>Tbp*</i>	Fw CCTTGTACCCTTACCAATGAC Rv ACAGCCAAGATTCACGGTAGA	NM_013684.3	119	no

\* Genes endógenos usados para normalizar los genes de interés

\*\*Secuencia de cebadores de (Matheu *et al.*, 2012)

## Cuantificación de la expresión génica relativa

Se calculó la media de los Ct provenientes de los triplicados técnicos, asegurando que cumplieran dos criterios: 1) desviación estándar menor a 0,25 y 2) coeficiente de variación menor al 2%. Los triplicados que no cumplieran estas condiciones se excluyeron de los análisis. Se calculó la expresión génica relativa en cada muestra, normalizando contra la media del grupo *wt young* y respecto a los genes endógenos, verificando previamente que la expresión de los genes endógenos escogidos se mantuviera constante entre los grupos de estudio. En los análisis de expresión génica utilizando tecnología *TaqMan* se asumió una eficiencia de reacción del 100% ( $E=2$ ), mientras que con el uso de *SYBR Green* se utilizó la eficiencia calculada de forma experimental para cada par de

cebadores ( $E \sim 2$ ), este valor se contempló dentro del cálculo del exponencial  $2^{\Delta Ct}$  (Page & Stromberg, 2011).

## MÉTODOS HISTOLÓGICOS DE EVALUACIÓN DEL TEJIDO DÉRMICO

Se usaron pieles dorsales parafinadas, cortadas en serie a 5  $\mu\text{m}$  en un microtomo *Microm* HM355S (Thermo Scientific), escogiendo cortes no consecutivos para hacer las tinciones histológicas. Se evaluaron animales wt y *Sox2<sup>EGFP</sup> young* de 68 días de edad (N=3 por genotipo) y animales *old* de 19-29,4 meses de edad (N=3 por genotipo). En la evaluación de FE se usó N=4 por genotipo del grupo *old*.

### Tinción de Hematoxilina-Eosina (HE)

Los cortes fueron teñidos por la Plataforma de Histología del IIS Biodonostia, en una teñidora automática. Se cuantificó cada parámetro en 6 cortes de piel por animal, fotografiando dos campos aleatorios de cada corte. El grosor de la epidermis, la dermis y el dWAT se midió en dos regiones de cada campo, perpendicularmente a la epidermis. Sólo se consideraron aquellos cortes con la estructura dérmica completa, incluyendo el PC. La celularidad se cuantificó como el número de núcleos celulares embebidos en la dermis interfolicular, sin considerar aquellos pertenecientes a SG y HF. Los HF se cuantificaron por campo y, al igual que la celularidad, se expresaron en función del área.

### Tinción con rojo sirio (PSR, *Picrosirius Red*)

Se realizó utilizando el kit comercial *Picro Sirius Red Stain* (ab150681, Abcam), se detalla el protocolo en la Tabla 3.8. La estructura de las fibras de colágeno dérmicas se evaluó en dos cortes de piel por animal, analizando 10 campos aleatorios mediante microscopía de luz polarizada. Por cada campo fotografiado, se calculó el índice de orientación de las fibras de colágeno en la región interfolicular de la dermis (Osman *et al.*, 2013). La programación necesaria para cuantificar el índice de orientación en las imágenes se realizó por Ignacio Prieto como Trabajo de Fin de Grado (Grado de Ingeniería Biomédica, Tecnun).

Tabla 3.8 Protocolo de tinción de fibras de colágeno con PSR

	<b>Reactivo o paso</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Desparafinación e hidratación	Colocar a 60 °C	20
	Xilol (28975.360, VWR)	5
	Xilol	5
	Etanol 100%	5
	Etanol 100%	5
	Etanol 50%	5
	Agua destilada	2
Tinción	PSR (kit)	60
Lavados y deshidratación	Ácido acético (kit)	rápido
	Ácido acético	rápido
	Etanol 100%	rápido
	Etanol 100%	2
	Etanol 100%	2
	Xilol	2
Montaje	Retirar del xilol, agregar 2 gotas de medio DPX (DP00500100, Scharlab) y colocar encima un cubreobjeto. Dejar secar.	

### Tinción con Verhoeff-Van Gieson (VVG)

La tinción de VVG para visualizar FE se realizó con el kit comercial *Elastic Stain Kit* (HT25A-1KT, Sigma-Aldrich). En la Tabla 3.9 se detalla el protocolo utilizado. Se evaluaron 4 cortes por animal, fotografiando 2 campos aleatorios de cada corte. Se evaluó el estado de las FE en dos regiones dérmicas por campo: alrededor de los HF y en la dermis interfolicular. Por cada HF se evaluó la presencia o ausencia de FE a su alrededor y la morfología de éstas (largas o fragmentadas). En la región interfolicular se cuantificó la cantidad de FE en función del área.

Tabla 3.9 Protocolo de tinción de fibras elásticas con VVG

	<b>Reactivo o paso</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Desparafinación e hidratación	Colocar a 60 °C	20
	Xilol	5
	Xilol	5
	Etanol 100%	5
	Etanol 100%	5
	Etanol 50%	5
	Agua destilada	2
Tinción	Solución de tinción de fibras elásticas (kit)*	10
Lavado	Agua destilada	Rápido
Diferenciación	Solución de cloruro férrico (kit)	20 pases
Lavado	Agua corriente	Rápido
	Etanol 95%	Rápido
	Agua destilada	Rápido
Contra-tinción	Solución de Van Gieson (Kit)	1'30''
Lavado	Etanol 95%	Rápido
	Etanol 100%	2
	Xilol	2
Montaje	Retirar del xilol, agregar 2 gotas de DPX y colocar sobre un cubreobjeto. Dejar secar.	
* Contiene hematoxilina, cloruro férrico y solución Yodada de Weigert		

## Inmunohistoquímica (IHQ)

Para la detección de POSTN en el dWAT, se siguió el protocolo mostrado en la Tabla 3.10. Para facilitar la cuantificación posterior, en todas las tandas de tinción se incluyeron dos controles: 1) sin incubación de anticuerpo primario ni DAB (3,3'Diaminobencidina) y 2) sin incubación con hematoxilina. La IHQ se realizó en 6 cortes de cada animal y se fotografiaron al menos dos campos aleatorios de cada corte. Se calculó la cantidad de tejido intersticial dentro del dWAT, como el porcentaje del área con señal positiva de hematoxilina. Referente al tejido intersticial, se calculó el área ocupada por POSTN en función de la señal positiva del cromógeno DAB. Se diseñó un procesado específico de imagen (Ruifrok & Johnston, 2001; Landini, 2014), desarrollado por Paula Castro como Trabajo Final de Grado (Grado de Ingeniería Biomédica, Tecnum).

Tabla 3.10 Protocolo de IHQ para la detección de POSTN en dWAT

	<b>Reactivo o paso</b>	<b>Tiempo (min)</b>
	Desparafinación e hidratación	Tabla 9
Recuperación antigénica	Calentar en microondas con 1mM citrato sódico (c9999, Sigma-Aldrich)	20
	Dejar enfriar a temperatura ambiente	20
	PBS 1X	20
Bloqueo 1	5% de peróxido de hidrógeno (Foret) diluido en metanol (221091.1612 PanReac AppliChem)	15
	PBS 1X	2
Bloqueo 2	5% FBS, 1% BSA y 0,5% Tween 20 (P2287, Sigma-Aldrich) diluidos en solución TBS*	20
Lavados	Solución TBS	2 (2 veces)
	Solución TBS/T**	5
Anticuerpo	<i>Rabbit-Periostin/OSF-2</i> (NBP1-30042SS, Novus Biological). Diluido 1/100 en solución de Bloqueo 2	Toda la noche a 4°C
	Dejar a temperatura ambiente	30
Lavados	Solución TBS	5 (3 veces)
	Solución TBS/T	5
Detección del anticuerpo: kit <i>Mach3 Rabbit HRP</i> (M3R531, Biocare)	3 gotas de sonda <i>rabbit-HRP</i>	10
	Solución TBS	5 (3 veces)
	Solución TBS/T	5
	3 gotas de polímero <i>rabbit-HRP</i>	10
	Solución TBS	5 (3 veces)
	Solución TBS/T	5
Revelado (SPR-DAB-060, Spring Bioscience)	Solución de revelado (50 gotas de sustrato DAB y 1 gota de cromógeno DAB)	10 (oscuridad)
	PBS 1X	Rápido (4 veces)
Contratinción	Hematoxilina (253949.1610, PanReac AppliChem)	10''
	Agua corriente	Rápido
Deshidratación y montaje		
* TBS preparado con 0,05M Tris-HCl pH 7,6 y 0,15 M NaCl		
** TBS/T preparado con 0,05% Tween 20 en TBS		



## MÉTODOS DE INMUNOFLUORESCENCIA (IF)

### IF en tejido completo

Se utilizaron preparaciones dérmicas sin la epidermis, de las cuales se cortaron trozos circulares de 2-4 mm de diámetro. Se bloqueó y permeabilizó el tejido con solución de bloqueo [0,5% Tritón X-100 (T8787, Sigma-Aldrich), 2% BSA y 10% FBS en PBS 1X], incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Se lavó el tejido con 0,2% *Tween 20* en PBS 1X durante 4 horas, cambiando la solución cada 20-30 minutos. Se incubó el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4 °C y en oscuridad. Se lavó el tejido al igual que en el paso anterior. Se incubó con 1 µg/ml de *Hoescht* (861405, Sigma-Aldrich) durante 2 minutos en oscuridad. Se lavó dos veces con 0,2% *Tween 20* durante 15 minutos cada vez y una vez con agua destilada. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación suave. El montaje se realizó colocando 2 gotas de Vectashield® sobre un portaobjetos, cada trozo de piel se colocó con la dermis hacia arriba y se dejó caer un cubreobjetos rectangular, cuidando de no presionar los cristales para no alterar la estructura del tejido. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente durante al menos 24 horas antes de adquirir las imágenes.

### IF en cortes congelados

Se utilizaron pieles congeladas en bloques de TissueTek®OCT™. Se cortaron en un criostato Leica CM1950 a 7 µm de grosor. Los cortes se realizaron de manera consecutiva y se guardaron a -80 °C hasta su uso para IF. Se escogieron cortes no consecutivos para garantizar que no se analizara la misma zona del tejido. Se evaluaron al menos 3 animales por grupo de estudio. Los cortes se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Se bloquearon y permeabilizaron en una solución de 0,3% Tritón X-100 y 10% FBS en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo primario diluido en 10% FBS en PBS 1X incubando por 1 hora a temperatura ambiente, o alternativamente toda la noche a 4 °C. Se lavó con PBS 1X y se añadió el anticuerpo secundario diluido en 10% FBS en PBS 1X, incubando por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavó con PBS

1X. Se incubó con 1 µg/ml de *Hoescht* por 1 minuto y se lavó con PBS 1X. Se colocaron los cortes en agua destilada antes de montar. Se agregaron 2 gotas de Fluoro-Gel (17985-10, EMS) en un cubreobjetos rectangular y se colocó el portaobjetos con los cortes encima, cuidando de no presionar el tejido y evitando burbujas de aire en la preparación. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente durante al menos 24 horas antes de adquirir las imágenes.

## IF en células a partir de cultivos primarios

- IF de dermoesferas: Las dermoesferas fijadas en cubreobjetos se lavaron con PBS 1X. Se bloquearon y permeabilizaron incubando con 0,2% Tritón X-100 y 6% FBS en PBS 1X durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo, incubando durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Se lavaron con PBS 1X y se agregó el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo, incubando por 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavaron con PBS 1X. Se incubaron en 1 µg/ml de *Hoescht* por 10 minutos. Se hizo un lavado final con agua destilada antes del montaje.

- IF de células en monocapa: Las células fijadas se permeabilizaron con 0,5% Tritón X-100 en PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS 1X y se bloquearon durante 20 minutos con 10% FBS en PBS 1X. Se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS 1X y se agregó el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo, incubando durante 1 hora en oscuridad. Se lavaron con PBS 1X. Se incubaron por 2 minutos con 1 µg/ml de *Hoescht*. Se realizaron dos lavados rápidos con PBS 1X y se mantuvo en agua destilada hasta el montaje.

En ambos casos los lavados e incubaciones se realizaron en agitación suave. Los cubreobjetos se montaron sobre una gota de Vectashield® en un portaobjetos, dejando secar a temperatura ambiente durante al menos 24 horas antes de adquirir las imágenes.

A continuación (Tabla 3.11) se detallan los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en IF. Entre paréntesis se indica marca, referencia comercial y dilución utilizada.

Tabla 3.11 Descripción de anticuerpos primarios y secundarios usados para IF

	<b>Marca</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>
<b>Anticuerpos primarios</b>			
P75NTR	Promega	G3231	1/500
CD31	BD	550274	1/50
Ki67	Abcam	Ab15580	1/200
P27	Abcam	Ab137736	1/500
S100	Dako	Z0311	1/400-1/500
SMA	Sigma-Aldrich	A2547	1/500
GFP	Abcam	Ab13970 y Ab6673	1/300
SOX2	Neuromics	GT15098	1/200
NESTIN	Aveslab	NES	1/500
CCN2	Abcam	Ab6992	1/200
POSTN	Novus Biological	NBP-30042ss	1/500
<b>Anticuerpos secundarios</b>			
Alexa fluor 488 donkey $\alpha$ -goat	Molecular probes	A11055	1/500
Alexa fluor 555 donkey $\alpha$ -goat	Molecular probes	A21432	1/200-1/500
Alexa fluor 555 goat $\alpha$ -rat	Molecular probes	A21434	1/500
Alexa fluor 555 goat $\alpha$ -mouse	Molecular probes	A21422	1/500
Alexa fluor 555 goat $\alpha$ -rabbit	Molecular probes	A21428	1/500
Alexa fluor 488 goat $\alpha$ -rabbit	Molecular probes	A11034	1/200-1/500
Alexa fluor 555 donkey $\alpha$ -rabbit	Molecular probes	A31572	1/200
Dylight 488 rabbit $\alpha$ -chicken	Abcam	ab96955	1/200-1/500

## MÉTODOS DE ADQUISICIÓN DE IMAGEN

Se utilizaron diferentes métodos de adquisición de imagen según la técnica empleada. El seguimiento de los cultivos celulares se realizó con un microscopio invertido simple. Las imágenes obtenidas a partir de material histológico o IF se adquirieron con un microscopio Nikon Eclipse 80i, utilizando luz de campo claro o filtros de fluorescencia específicos. En los casos donde se requirió microscopía confocal, se utilizó un equipo Zeiss LSM 510 (Plataforma de Imagen CICBiomaGUNE) o Zeiss LSM 800 (Plataforma de Imagen Universidad de León). La adquisición de imagen por luz polarizada para el análisis de las fibras de colágeno teñidas con PSR, se realizó en colaboración con Anna Maeva y Adam Strange (UCL Eastman Dental Institute).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa *GraphPad Prism v5.01*. La distribución normal de los datos se evaluó utilizando el ensayo de normalidad *D'Agostino & Pearson*. Los datos que se ajustaban a una distribución normal se compararon con un *t-test* no pareado, de lo contrario se utilizó el *test Mann-Whitney*. Cuando otro test estadístico haya sido utilizado, se indicará en su apartado correspondiente. En cada resultado y cuando corresponda, se indicarán las réplicas biológicas (N) y las réplicas técnicas (n). En todos los gráficos se muestra la media de los datos, a menos que sea indicado explícitamente. Se considera significación estadística  $p\text{-valor} < 0,05$ . En los casos donde se consideró relevante, se reporta en el texto la media de los datos y el error estándar ( $\bar{x} \pm SE$ ).

## ANÁLISIS DE IMAGEN

Los análisis de imagen se realizaron con los programas *ImageJ 1.49v* y *ZEN 2012 Blue Edition*. En caso de que alguna imagen haya sido modificada en parámetros de contraste y brillo, se cuidó de aplicar la misma modificación a todas las imágenes de los otros grupos comparativos.



## 4. RESULTADOS

---



## 4.1 Caracterización funcional *in vitro* de las células dérmicas precursoras con el envejecimiento

Las células dérmicas con capacidad multipotente y regenerativa están asociadas a nichos específicos en la piel, principalmente al plexo nervioso, vascular, y a los HFs. Con el objetivo de evaluar y cuantificar los cambios que presentan estas estructuras con el envejecimiento, se visualizó la red nerviosa y la red vascular en la piel de animales C57; para ello se utilizaron los marcadores P75NTR y CD31, respectivamente (Figura 4.1A). En la piel del ratón, el anticuerpo P75NTR permite identificar células de linaje neural, mientras que CD31 es utilizado como un marcador de células endoteliales vasculares (Etxaniz *et al.*, 2014; Goncharov *et al.*, 2017). En ambos casos, en la piel de ratones envejecidos, se observó una reducción cualitativa de la densidad nerviosa, de los vasos sanguíneos de distintos calibres, y posiblemente de los complejos lanceolados foliculares (Figura 4.1A, flecha). La cuantificación de las imágenes confirmó estas observaciones; encontrándose una reducción significativa con la edad del área ocupada por el plexo nervioso [Figura 4.1B, *young* 1,45 (FC  $\bar{x}$ )  $\pm$  0,16 (error estándar) *vs.* *old* 0,65 $\pm$ 0,05;  $p=0,001$ ] y por la red vascular (Figura 4.1C, *young* 1,36 $\pm$ 0,1 *vs.* *old* 0,58 $\pm$ 0,06;  $p<0,001$ ); así como también, una reducción en el número de complejos lanceolados (Figura 4.1D, *young* 0,57 $\pm$ 0,08 *vs.* *old* 0,16 $\pm$ 0,02;  $p<0,001$ ) que puede ser consecuencia de menos HF o de una reducción en la inervación de los HF existentes.

Como consecuencia directa de la alteración en la densidad nerviosa y vascular, cabe esperar una disminución en el número de células asociadas a tales nichos, así como también, una reducción en la celularidad dérmica total, tal como ha sido descrito en otros casos (Farage *et al.*, 2013). Sin embargo, los procesos relacionados con la funcionalidad celular, proliferación y senescencia no necesariamente deben verse afectados. Para caracterizar los cambios que ocurren en estos procesos con el envejecimiento, se aislaron células de piel dorsal total y se cultivaron en suspensión utilizando condiciones que favorecen el establecimiento de las células madre o precursoras dérmicas (Toma *et al.*, 2001). En suspensión, las células madre forman esferas que se recolectaron a distintos días para su análisis (Figura 4.2A). Las suspensiones celulares no siempre formaron esferas en



cultivo, y en caso de hacerlo diferían morfológicamente, permitiendo establecer 3 categorías de clasificación (Figura 4.2B). Transcurridos 7 días en cultivo primario (P0), se consideraron como "exitosos" (*successful*) aquellos cultivos donde se formaron esferas homogéneas en apariencia pero no necesariamente en tamaño, con un contorno bien definido, dentro de las cuales no era posible identificar células aisladas, el centro de las esferas exhibía una tonalidad más oscura. En los cultivos catalogados como "regulares", se observaron aglomeraciones de células refringentes que formaban esferas irregulares, con contornos heterogéneos y donde se podían distinguir células individuales dentro de las esferas, el color de éstas era brillante y por lo general el medio circundante presentaba detrito. En los cultivos "no exitosos" (*unsuccessful*) el medio era abundante en detrito, no formaron esferas y por lo general contenían trazas de fibras capilares.

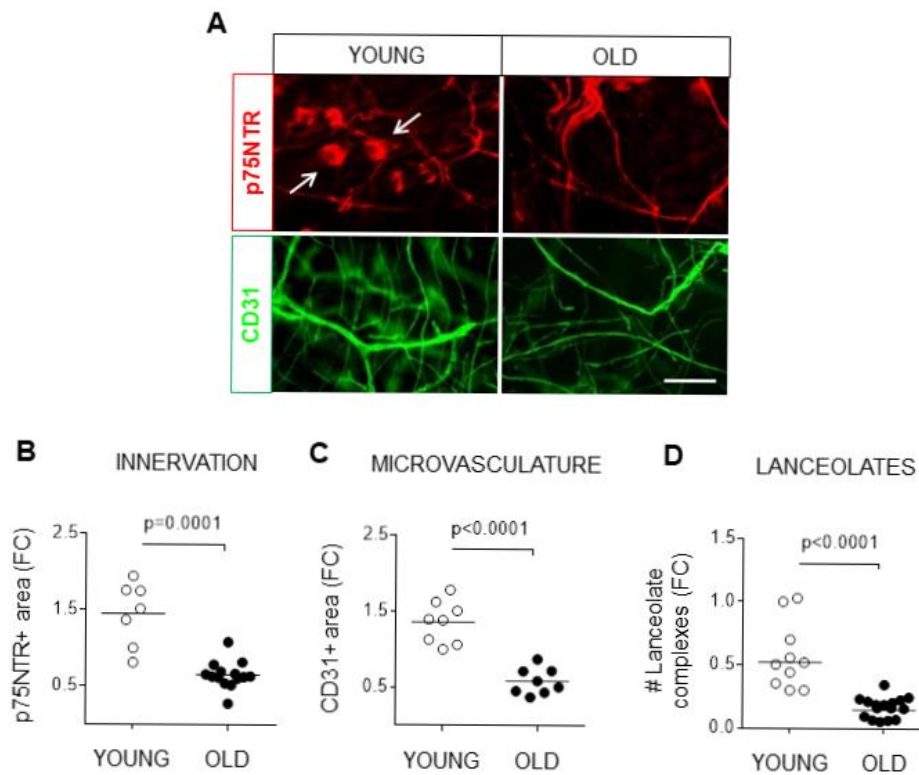


Figura 4.1 Con el envejecimiento se reducen los nichos de células madre en la piel del ratón C57. (A) Imágenes representativas de IF en tejido dérmico completo de piel dorsal, donde se observa la inervación (P75NTR, rojo) y la microvasculatura cutánea (CD31, verde). Las flechas indican los complejos lanceolados foliculares. Escala 50  $\mu$ m. Cuantificación de la densidad de (B) inervación y (C) microvasculatura, entendidas como el área con señal positiva del anticuerpo correspondiente en imágenes de IF de tejido completo (p75NTR: N=7 *young*, N=14 *old*, y CD31: N=8 *young*, N=8 *old*). (D) Cuantificación de estructuras lanceoladas p75NTR+ (N=10 *young*, N=16 *old*). (B-D) Las

cuantificaciones se expresan relativas a una muestra *young* aleatoria (FC, *fold change*). Cada punto representa el promedio de al menos 5 campos fotografiados al azar en una muestra biológica.

Para explorar si la edad del animal influye en el tipo de cultivo resultante (exitoso, regular o no exitoso), se categorizaron retrospectivamente los cultivos provenientes de ratones *young* y *old* (Figura 4.2C). Se observó que la mayoría de los cultivos establecidos a partir de animales *young* eran clasificados como exitosos, mientras que los provenientes de animales *old* presentaron menor tasa de éxito (proporción de 0,57 y 0,4 respectivamente). La piel de animales *young* dio lugar a menos cultivos con ausencia de esferas (no exitosos) en comparación con las pieles *old* (proporción de 0,21 vs. 0,4 respectivamente); mientras que la proporción de cultivos regulares se mantuvo similar en ambas condiciones de edad (proporción ~0,2).

La capacidad de formar esferas en suspensión así como el tamaño de éstas, se considera un reflejo de la actividad de las células madre o precursoras aisladas del tejido (Pastrana *et al.*, 2011). Sólo en cultivos considerados como exitosos, se midió el tamaño alcanzado por las dermoesferas a P1D7. En la Figura 4.3A se muestra la distribución de frecuencias relativas en función del tamaño alcanzado por las esferas en cultivo. Se observó que los tamaños de las esferas establecidas a partir de pieles *young* se distribuían en un rango entre 40-320  $\mu\text{m}$  (mediana ~54  $\mu\text{m}$ ), mientras que aquellas provenientes de pieles *old* alcanzaron tamaños entre 40-200  $\mu\text{m}$  (mediana ~69  $\mu\text{m}$ ), siendo la diferencia entre ambas distribuciones estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). La disminución con la edad en la capacidad de formar esferas y las diferencias de tamaño entre éstas, sugiere alteraciones en el número y en la capacidad proliferativa de las células precursoras dérmicas *in vitro*. De hecho, al analizar la expresión del marcador nuclear de proliferación Ki67 en las dermoesferas (Figura 4.3B-B'), se observa que en tiempos tempranos de cultivo (P1D3) la condición *young* tiene significativamente más células proliferativas respecto a las dermoesferas *old* ( $\bar{x} = 14,9 \pm 2\%$  vs.  $\bar{x} = 4,7 \pm 1\%$ , respectivamente. P-valor  $< 0,0001$ ), perdiéndose dicha diferencia a mayor tiempo de cultivo (P1D7). De manera importante, durante el cultivo las células dérmicas *young* disminuyen su proliferación ( $\bar{x} = 14,9 \pm 2\%$  P1D3 vs.  $\bar{x} = 5,6 \pm 0,7\%$  P1D7,  $p = 0,0005$ ), mientras que las dermoesferas *old* mantienen niveles de proliferación similares y bajos ( $\bar{x} = 4,7 \pm 1\%$  P1D3 vs.  $\bar{x} = 4 \pm 0,5\%$  P1D7).

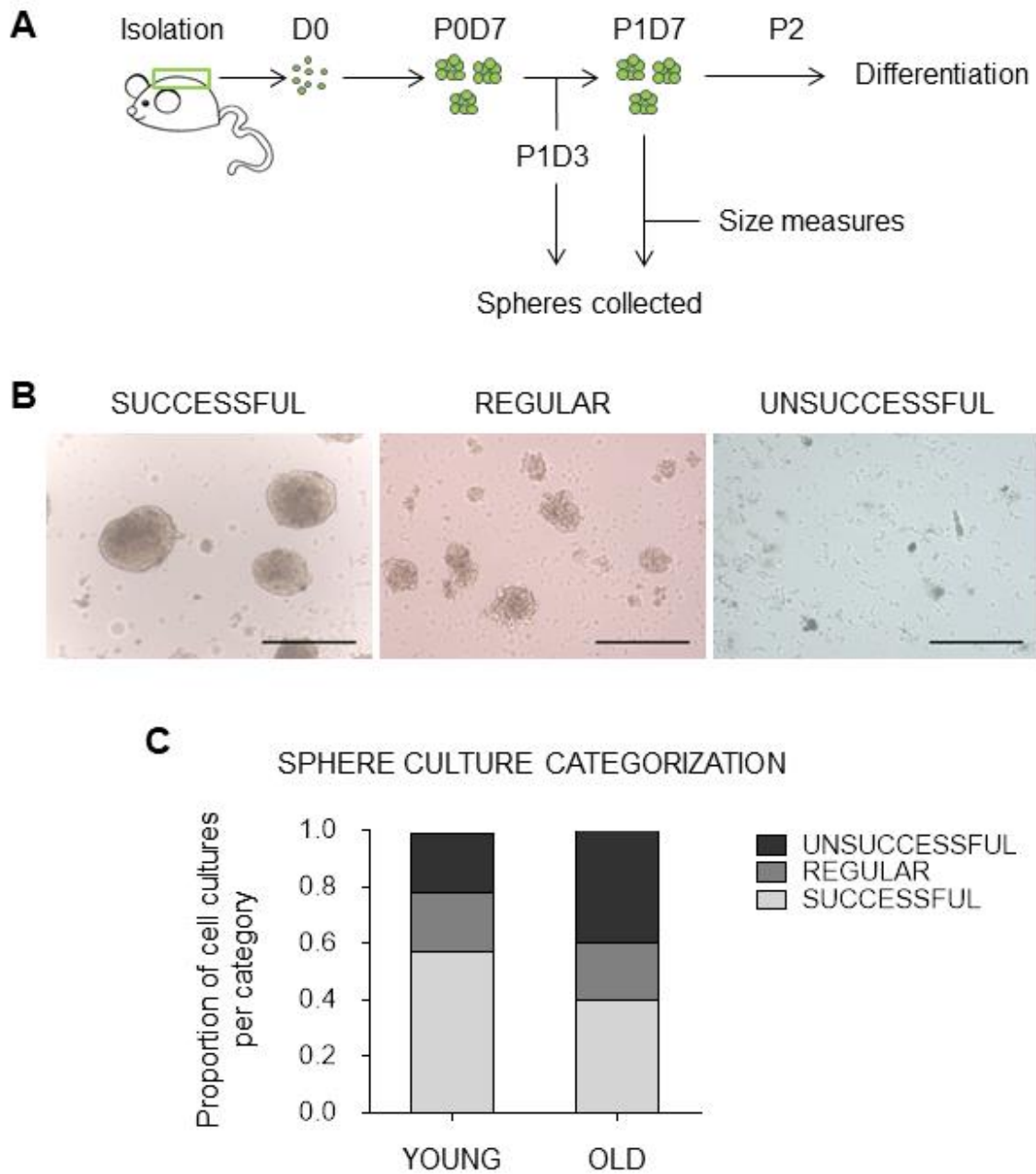


Figura 4.2 El envejecimiento altera el potencial esferogénico. (A) Esquema general de trabajo para el establecimiento y análisis de cultivos en suspensión. Las células se aislaron de piel dorsal de ratones C57 cultivándolas durante 7 días (P0D7). El éxito del cultivo (capacidad de formar esferas) se evaluó antes de su disgregación (P1). Se cultivaron las células durante otros 7 días (P1D7) y se midió el tamaño de las dermoesferas generadas, éstas se recogieron a P1D3 y P1D7, bien para RNA o IF. Se realizó una segunda disgregación (P2) y las células se cultivaron en adhesión en condiciones de diferenciación neurogénicas. (B) Imágenes representativas de los cultivos de dermoesferas, catalogados cualitativamente como exitosos (*successful*), regulares (*regular*) y no exitosos (*unsuccessful*). Escala 250  $\mu$ m. (C) Proporción de cultivos en cada categoría con respecto al total de cultivos realizados (N=19 *young*, N=10 *old*). Prueba estadística de  $X^2$  no significativa (p valor=0,53).

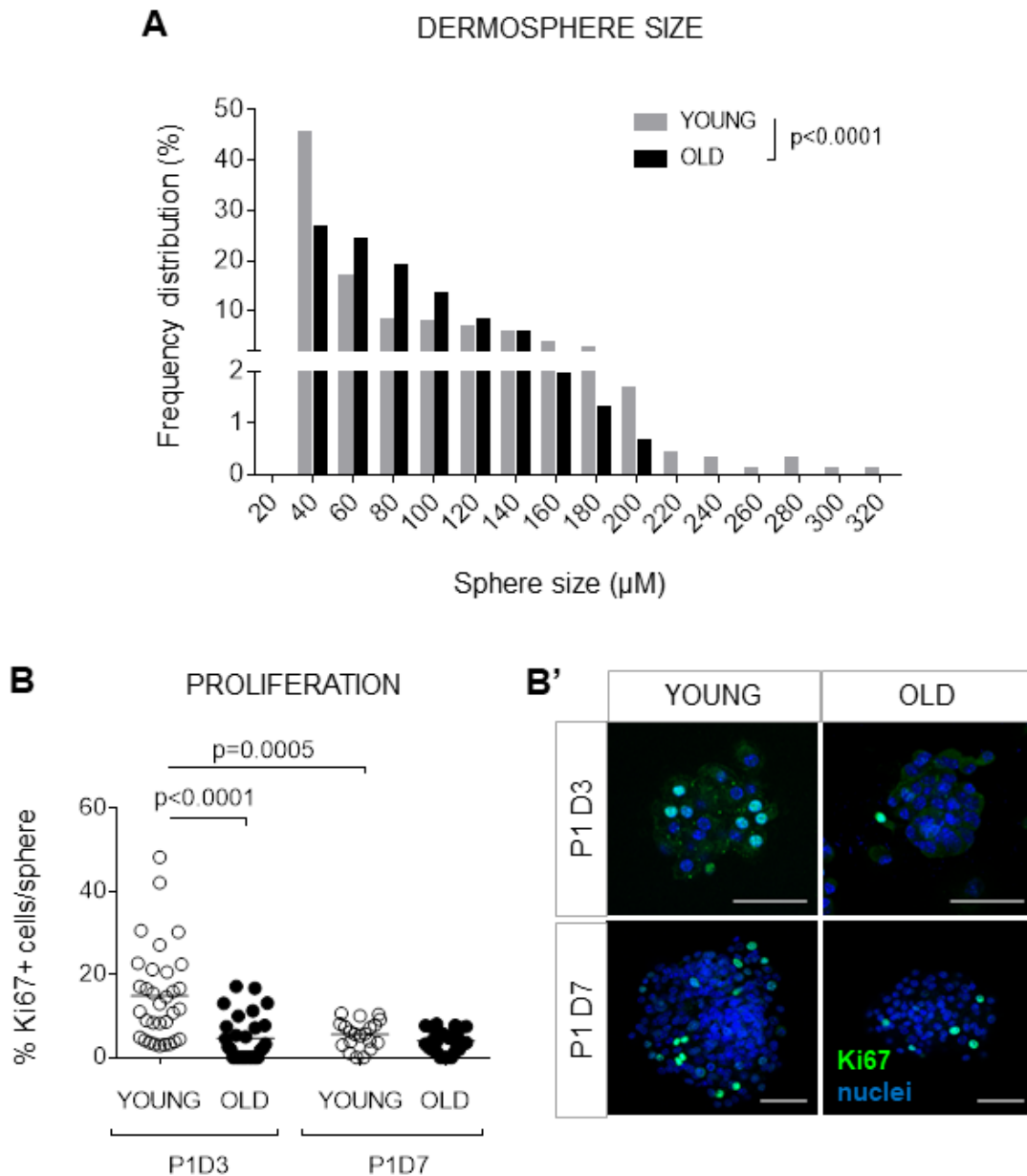


Figura 4.3 Alteraciones proliferativas en dermoesferas de animales C57 envejecidos. (A) Distribución de frecuencias del tamaño de las dermoesferas (diámetro) a P1D7; N=3 muestras biológicas independientes de cultivos exitosos, donde se midieron: n=1014 dermoesferas *young* y n=776 dermoesferas *old*. Se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov para comparar estadísticamente las distribuciones ( $p < 0.0001$ ). (B) Porcentaje de células proliferativas Ki67+ en dermoesferas a P1D3 y P1D7 [n=20-32 dermoesferas de N=5 (*young* P1D3, *old* P1D3/D7) y N=4 (*young* P1D7) muestras biológicas independientes]. (B') Imágenes confocales de un plano representativo en una dermoesfera por condición, evaluada mediante IF. Células proliferativas Ki67+ (verde) y núcleos (azul). Escala 50  $\mu\text{m}$ .

La disminución de la capacidad proliferativa asociada al envejecimiento puede estar relacionada con la parada del ciclo celular, a través de rutas de senescencia y/o

quiescencia, o bien con la diferenciación hacia determinados linajes celulares. Para evaluar estas posibilidades se analizó la expresión de los reguladores del ciclo celular *Cdkn1a* (p21) y *Cdkn1b* (p27). Se observó que tanto a P1D3 como a P1D7, las células precursoras aisladas de animales *old* sobre-expresaban de forma no significativa *Cdkn1a* en comparación con la condición *young* (Figura 4.4A). Contrario a lo esperado, la expresión relativa de *Cdkn1b* disminuyó significativamente en los cultivos *old* respecto a *young*, tanto a P1D3 como a P1D7 (Figura 4.4B). Al evaluar mediante IF la proteína p27, codificada por el gen *Cdkn1b* (Figura 4.4C-C'), se observó una disminución significativa en el porcentaje de células p27+ tanto en dermoesferas *young* ( $\bar{x}=60,7\pm 3\%$  P1D3 vs.  $\bar{x}=47,9\pm 2,8\%$  P1D7) como en dermoesferas *old* ( $\bar{x}=56,2\pm 3\%$  P1D3 vs.  $\bar{x}=22,7\pm 3,3\%$  P1D7) durante el cultivo. Más aún a P1D7, las dermoesferas *old* presentaron menos células p27+ en comparación con la condición *young* ( $\bar{x}=22,7\pm 3,3\%$  vs.  $\bar{x}=47,9\pm 2,8\%$ , respectivamente), coincidiendo con la disminución en la expresión de *Cdkn1b* (Figura 4.4B).

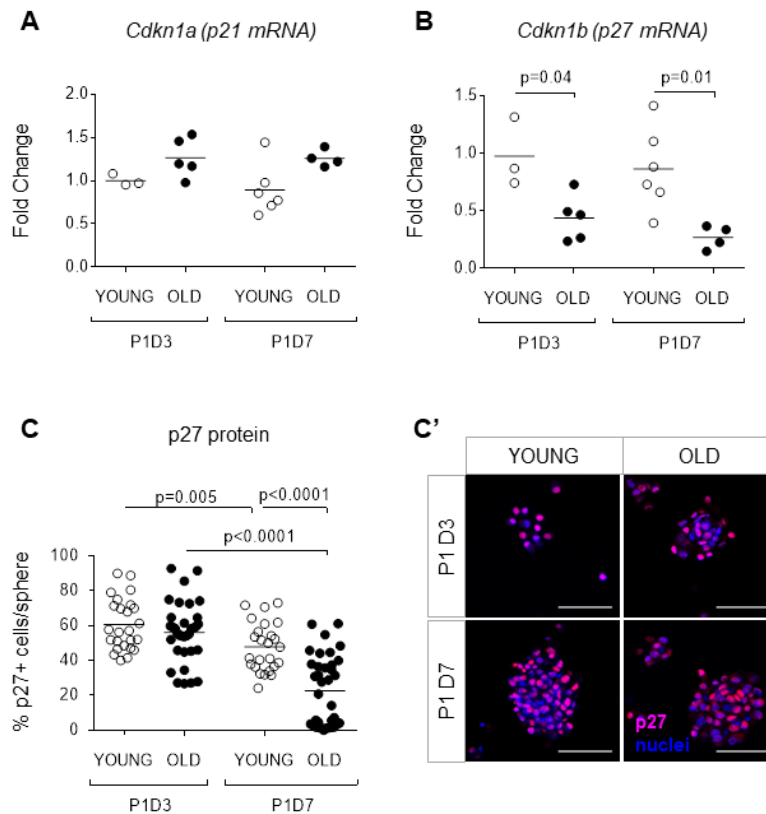


Figura 4.4 Análisis de la expresión *in vitro* de marcadores de senescencia con el envejecimiento. Niveles de expresión (mRNA) de los genes (A) *Cdkn1a* y (B) *Cdkn1b* en dermoesferas a P1D3 y

P1D7. La expresión de los genes de interés se normalizó contra dos genes endógenos (*Tbp* y *Hprt*) y se relativizó (*fold change*) contra el promedio del grupo *young* P1D3. Se muestran las réplicas biológicas. (C) Porcentaje de células p27+ en dermoesferas a P1D3 y P1D7 [n=25-36 dermoesferas de N=4 (*young* P1D3/D7, *old* P1D7) y N=3 (*old* P1D3) muestras biológicas independientes]. (C') Imágenes confocales de un plano representativo en una dermoesfera por condición, evaluada mediante IF. Células p27+ (rojo) y núcleos (azul). Escala 50  $\mu$ m.

Debido a que el potencial de diferenciación y mantenimiento de las células precursoras dérmicas es parcialmente regulado por el factor de transcripción *Sox2* (Etzaniz *et al.*, 2014), se decidió evaluar su expresión en las dermoesferas. En tejidos distintos a la piel, se ha reportado que la expresión de *Sox2* disminuye con el envejecimiento (Carrasco-García *et al.*, 2019); no obstante las células precursoras dérmicas *old* exhibieron sobreexpresión de *Sox2 in vitro* con respecto a los cultivos de dermoesferas *young* (Figura 4.5A), siendo esta diferencia pronunciada en tiempos tardíos de cultivo ( $\bar{x}=1,8$  (FC)  $\pm 0,5$  (error estándar) *old vs.*  $\bar{x}=0,6\pm 0,2$  *young*, P1D7,  $p=0,04$ ). Ya que *Sox2* modula el potencial de diferenciación hacia linajes neurales, se evaluó la capacidad *in vitro* de diferenciación de las células precursoras dérmicas en condiciones de cultivo neurogénicas (Toma *et al.*, 2001). Después de 14 días de diferenciación, en los cultivos de ambas edades se observaron células con morfología bipolar, alargadas y con expresión citoplasmática de la proteína glial S100 (Figura 4.5B); que al ser cuantificadas reflejó una reducción en la cantidad de células S100+ en cultivos *old* en comparación con la condición *young* ( $\bar{x}=22,3\pm 3,5\%$  vs.  $\bar{x}=35.1\pm 5,7\%$ , respectivamente. Figura 4.5B').

En conjunto, estos resultados muestran que el envejecimiento intrínseco afecta parámetros estructurales y funcionales de la piel. En el tejido, los nichos que albergan las células precursoras dérmicas se reducen. Esta alteración se refleja *in vitro* comprometiendo la capacidad esferogénica y proliferativa, proveniente al menos en parte de las células dérmicas precursoras; en un aumento de la senescencia reflejado en la sobreexpresión de *Cdkn1a*, pero no de *Cdkn1b*, y finalmente en la disminución de la capacidad de diferenciación neural, que podría estar mediada por los niveles de expresión de *Sox2*.

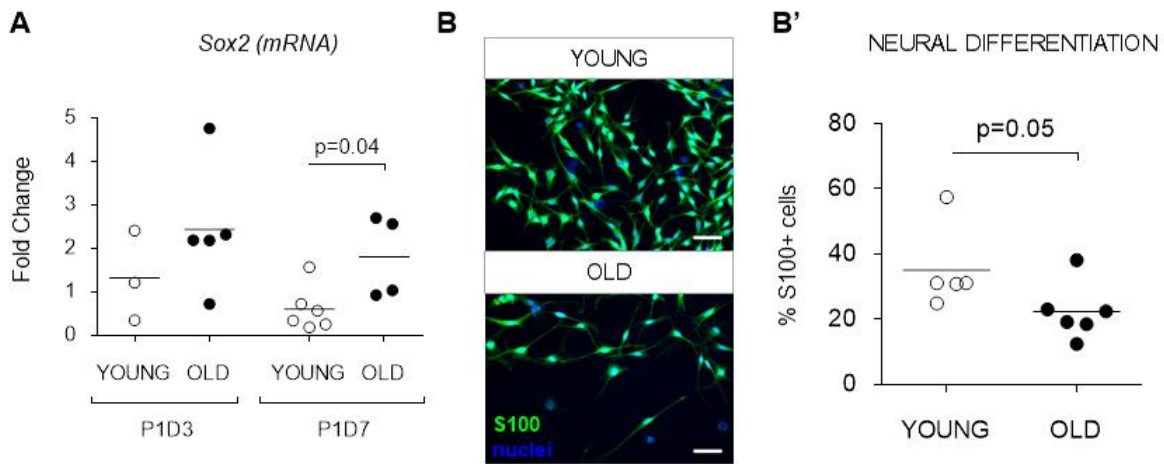


Figura 4.5 Alteración en el potencial de diferenciación de las células precursoras dérmicas con la edad. (A) Niveles de expresión (mRNA) de *Sox2* en dermoesferas a P1D3 y P1D7. La expresión de los genes de interés se normalizó contra dos genes endógenos (*Tbp* y *Hprt*) y se relativizó (*fold change*) contra el promedio del grupo *young* P1D3. Se muestran las réplicas biológicas. (B) Imágenes representativas de IF de células dérmicas *young* y *old* cultivadas en condiciones neurogénicas durante 14 días. Células S100+ (verde) y núcleos (azul). Escala 50  $\mu$ m. (B') Cuantificación (%) de células S100+ en cultivos diferenciados. Cada punto representa el porcentaje promedio de células S100+ en al menos 10 campos fotografiados al azar de una muestra biológica (*young* N=5 y *old* N=6).

## 4.2 Caracterización de la localización, número y funcionalidad *in vitro* de las células precursoras dérmicas *Sox2*<sup>+</sup> con el envejecimiento

En piel postnatal de ratón, *Sox2* se expresa en las células de Merkel, en SCH terminales de los complejos lanceolados, en células gliales asociadas a los nervios periféricos y en la DP de los HF *guardy awl/auchenne* (Agabalyan *et al.*, 2016). Los nichos que albergan estas células se han descrito utilizando el modelo de ratón *Sox2*<sup>EGFP</sup>, con excepción de algunos estudios (Su *et al.*, 2009; Johnston *et al.*, 2016), hasta el momento las investigaciones se han centrado en piel embrionaria o postnatal temprana (<3 meses). Para evaluar cómo está afectada la población de células precursoras dérmicas *Sox2*<sup>+</sup> con el envejecimiento, se utilizó el mismo modelo *Sox2*<sup>EGFP</sup>. En primer lugar, se confirmó que la expresión de SOX2 nuclear es coincidente con EGFP en la piel dorsal *old*, tal como sucede en la piel *Sox2*<sup>EGFP</sup> *young* (Iribar *et al.*, 2017). Mediante inmunofluorescencia, se encontró que ambas proteínas colocalizan en células subepidérmicas dispersas (Figura 4.6A-a'), en células con forma de lanza alrededor de los HFs (Figura 4.6B-b') y en los nervios gruesos del plexo dérmico profundo (Figura 4.6C). En éstos, se encontraron núcleos SOX2<sup>+</sup>/EGFP<sup>+</sup> (Figura 4.6C, flechas) y en algunos casos se detectaron prolongaciones citoplasmáticas SOX2<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> que no correspondían con núcleos circundantes, posiblemente por encontrarse en un plano diferente dentro del nervio (Figura 4.6C, asterisco); en todos los casos las células SOX2<sup>+</sup> detectadas estaban trazadas por la expresión de EGFP (*old*, n=2).

Habiendo confirmado que el envejecimiento no cambia la fidelidad de trazado del reportero en el modelo *Sox2*<sup>EGFP</sup>, se utilizó EGFP para caracterizar la ubicación de las células precursoras dérmicas *Sox2*<sup>EGFP</sup><sup>+</sup> con la edad. Tanto en piel *young* (<2 meses) como *old* (>18 meses), y en línea con lo reportado por otros autores en piel postnatal (Biernaskie *et al.*, 2009; Johnston *et al.*, 2013; Iribar *et al.*, 2017), la expresión de EGFP se encontró consistentemente (n=3 por edad) en: i) las células terminales de los complejos lanceolados, en las cuales EGFP exhibe alta intensidad de señal (Figura 4.7A-a' y B-b'); ii) la dermis interfolicular, correspondiendo por morfología a nervios finos del plexo nervioso dérmico, donde también hay alta intensidad del marcaje para EGFP (Figura 4.7A-B, flechas); y iii) células subepidérmicas cuyas prolongaciones se extienden hacia la epidermis (Figura 4.7A-



a'' y 2B-b''). Esporádicamente (observación no cuantificada), se identificaron DPs con intensidad media de EGFP en algunos HFs, tanto en piel *young* como *old* (Figura 4.7A-B). Morfológicamente se descartó que estas DPs pertenecieran a HFs anágenos, siendo posiblemente HFs tipo guard y awl/auchenne cuyas DPs mantienen expresión de *Sox2* durante la vida adulta (Driskell *et al.*, 2009).

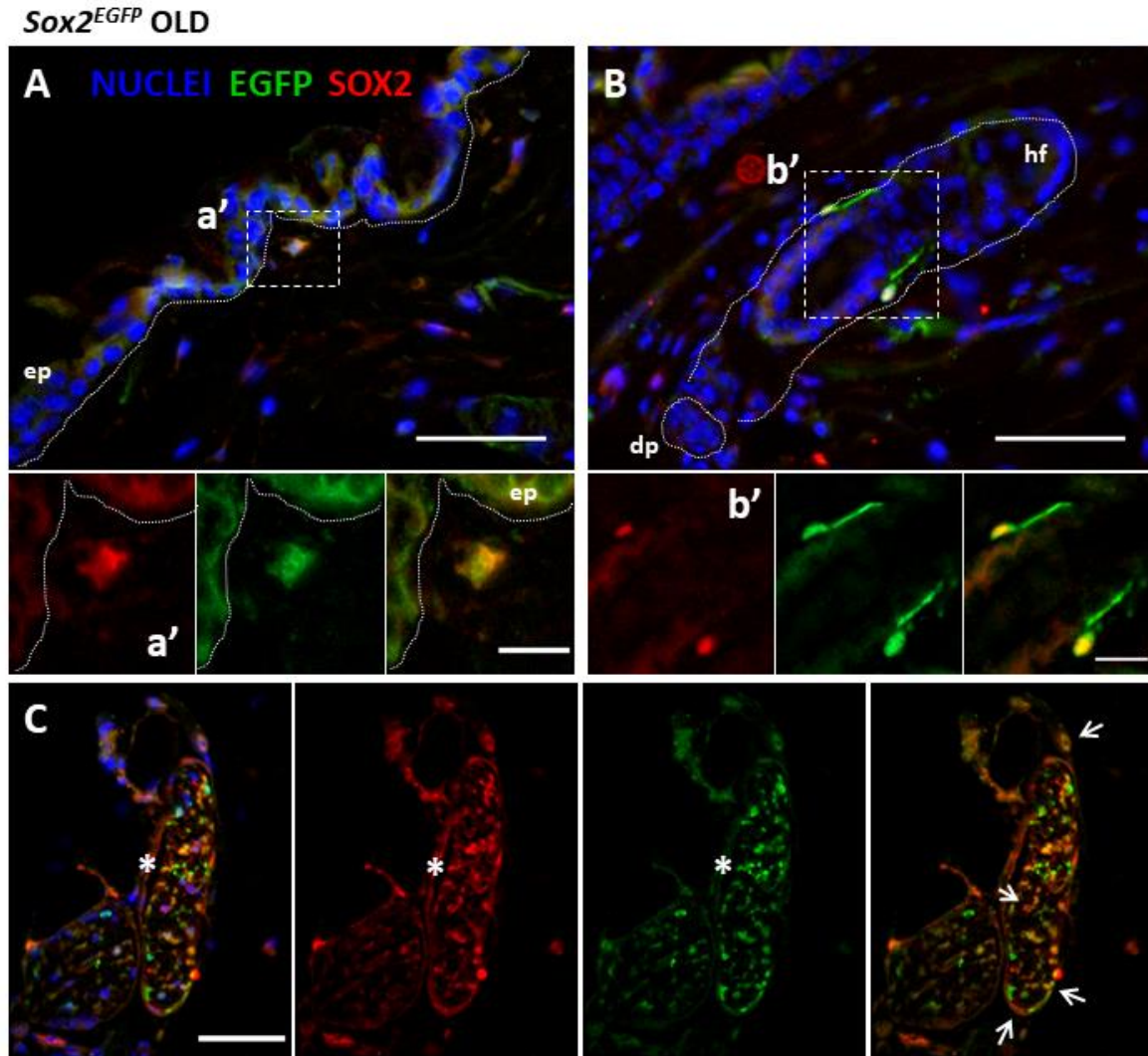
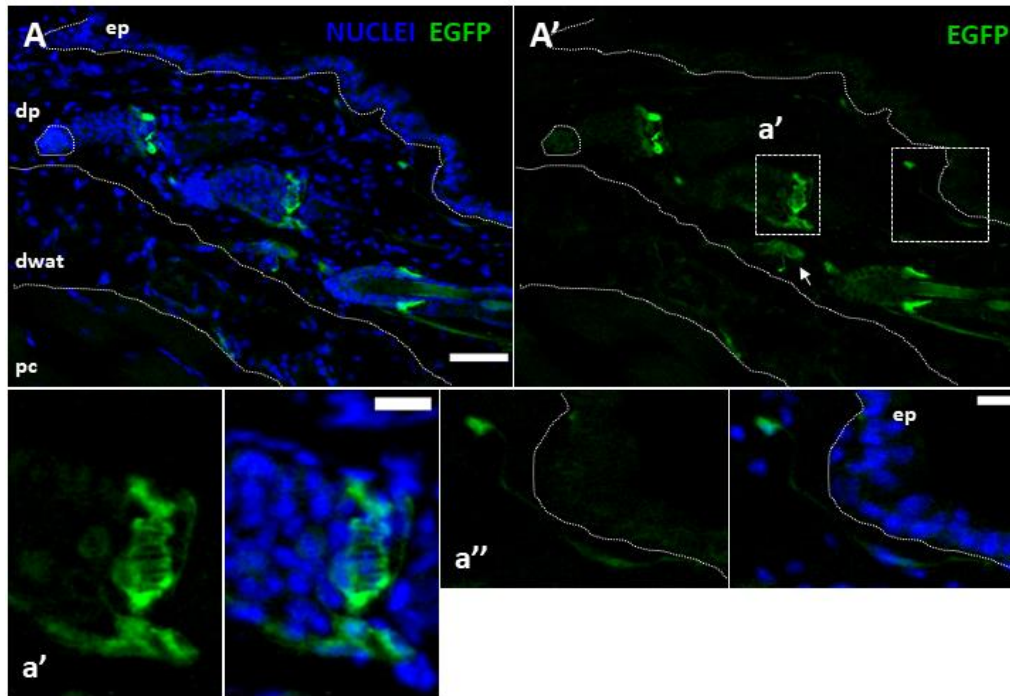


Figura 4.6 Con el envejecimiento se mantiene la expresión de EGFP bajo el promotor de *Sox2*. (A-C) Imágenes representativas de IF en piel dorsal congelada de ratones *old Sox2<sup>EGFP</sup>*, con marcaje para SOX2 (rojo), EGFP (verde) y núcleos (azul). Escala 50  $\mu$ m. (ep) epidermis, (dp) papila dérmica, (hf) folículo piloso. (a'-b') Regiones de interés seleccionadas de A y B, respectivamente. Escala 15  $\mu$ m. (C) Nervio grueso ubicado debajo del músculo *panniculus carnosus*. Dentro del nervio se distinguen procesos EGFP+/SOX2- (asterisco), junto con núcleos EGFP+/SOX2+ (flechas).

**Sox2<sup>EGFP</sup> YOUNG**



**Sox2<sup>EGFP</sup> OLD**

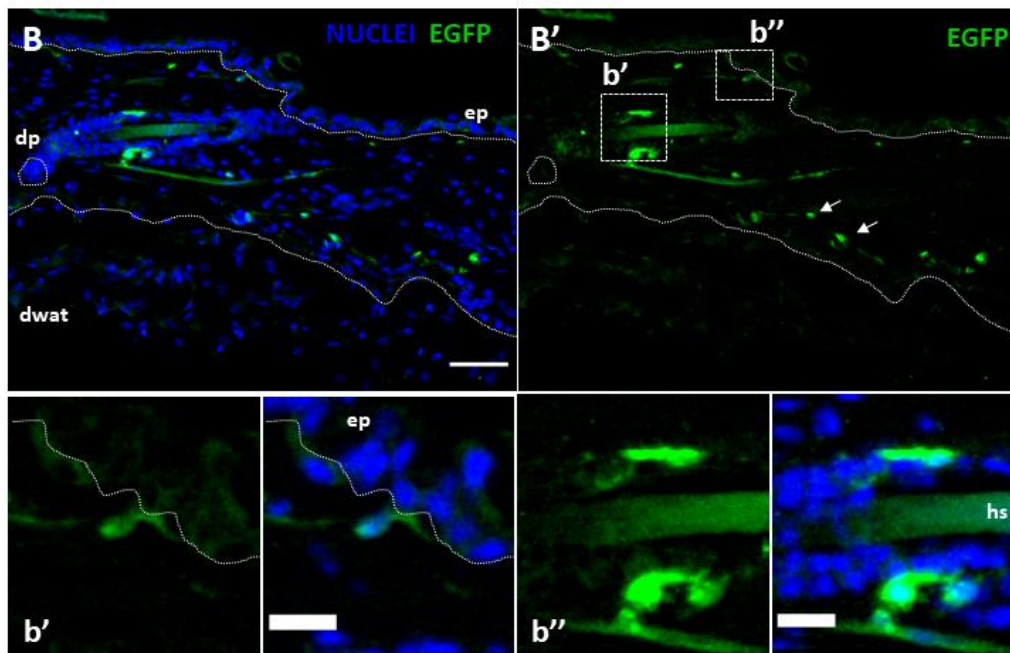


Figura 4.7 La localización de las células *Sox2<sup>EGFP</sup>*<sup>+</sup> no cambia con el envejecimiento. Imágenes representativas de IF en piel dorsal congelada de ratones (A-A') *young* y (B-B') *old Sox2<sup>EGFP</sup>*, con marcaje para EGFP (verde) y núcleos (azul). Escala 50  $\mu$ m. Células EGFP<sup>+</sup> interfoliculares (flechas). (ep) epidermis, (dp) papila dérmica, (dwat) tejido adiposo blanco dérmico, (pc) *panniculus carnosus*. Regiones de interés (a'-b') indican complejos lanceolados alrededor de los folículos pilosos, y (a''-b'') células del plexo subepidérmico. Escala 15  $\mu$ m.

Ya que con el envejecimiento las células  $Sox2^{EGFP+}$  se localizan en los mismos nichos dérmicos que en la piel *young*, se decidió evaluar si la expresión de marcadores asociados a la identidad celular, en cada uno de los compartimientos, también se mantiene con la edad. En el nicho folicular *young*, se observó que las células terminales EGFP+ de los complejos lanceolados coexpresan el marcador de célula madre neural nestina (NES) (Figura 4.8A-a') y el marcador glial P75NTR (Figura 4.8C-C', asterisco). La coexpresión de estas proteínas características del linaje neural, se mantiene en la piel *old* (Figura 4.8B-b' y E-E', asterisco). En los complejos lanceolados de pieles *old*, se detectaron células NES-/EGFP+ con una intensidad de señal media-baja de EGFP (Figura 4.8b', flechas). En la condición de envejecimiento, las células EGFP+ de los complejos lanceolados también coexpresan el marcador glial S100, sugiriendo que con el envejecimiento estas células retienen su identidad glial (Figura 4.9D-D').

Se comprobó que las células EGFP+ de la dermis interfolicular *young* y *old* corresponden a células gliales periféricas (EGFP+/ P75NTR+), las cuales están asociadas a los nervios finos del plexo nervioso dérmico (Figura 4.8C'-E', flecha vacía). Por su parte, las células EGFP+ en la región subepidérmica son P75NTR+ (Figura 4.8C', flechas) y S100+ (Figura 4.9C-C'), indicando una identidad glial no mielinizante; al menos mediante inmunofluorescencia, no se detectaron cambios *in vivo* en la expresión de estos marcadores con el envejecimiento (Figura 4.8E', flecha y Figura 4.9A-A'). No obstante, es posible que con la edad haya una disminución en el número de células subepidérmicas EGFP+ (observación sin cuantificar). En la piel adulta pilosa, las células de Merkel involucradas en la sensación táctil son SOX2+ y se encuentran a nivel subepidérmico en los HF de tipo *guard*; sin embargo, en ninguna de las pieles evaluadas se detectaron células EGFP+ similares en morfología y localización.

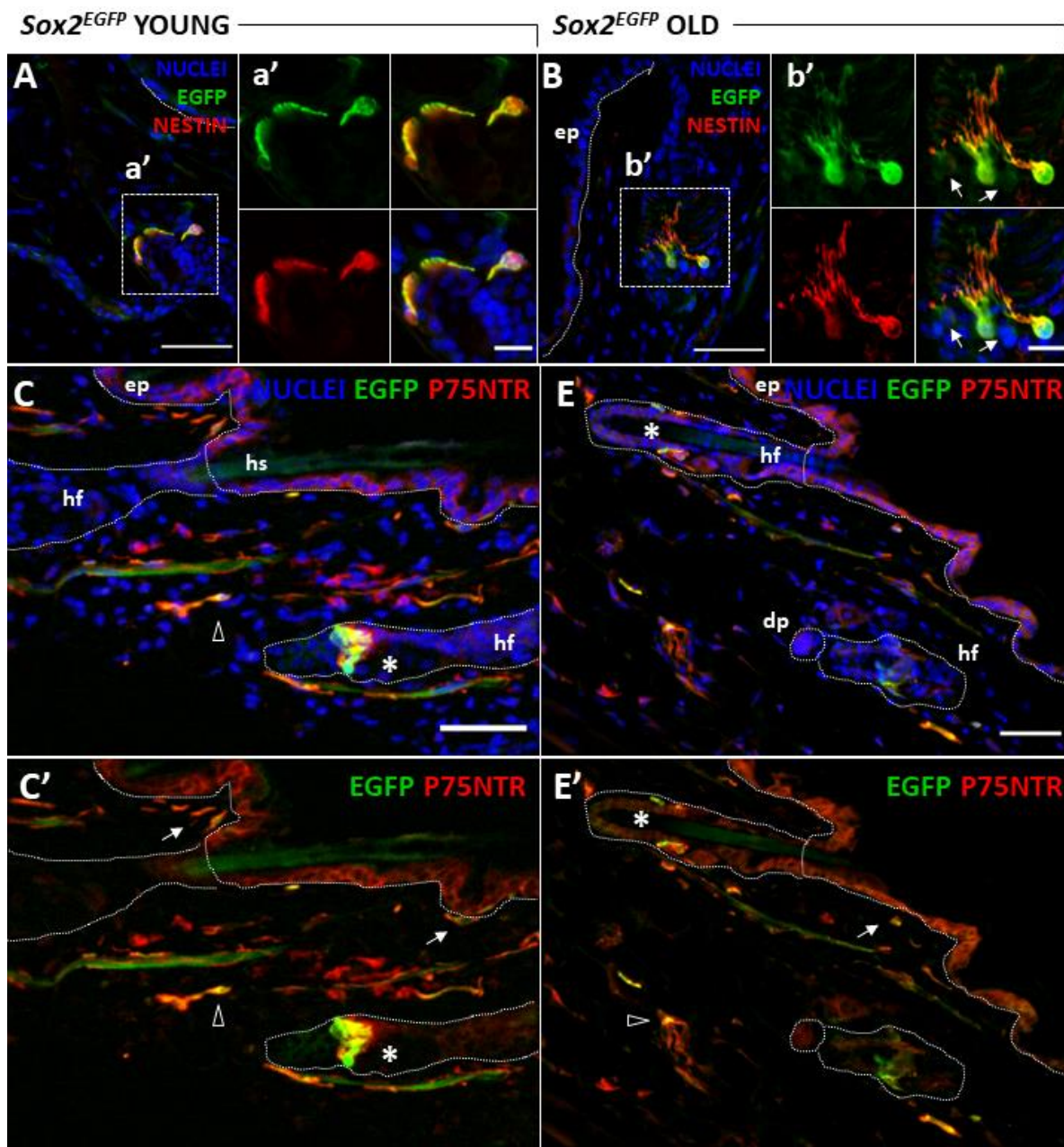


Figura 4.8 La coexpresión de EGFP con marcadores de célula madre neural y células gliales se mantiene con el envejecimiento. Imágenes representativas de IF en piel dorsal congelada de ratones (A) *young* y (B) *old Sox2<sup>EGFP</sup>*, con marcaje para EGFP (verde), NESTIN (rojo) y núcleos (azul). (a'-b') Regiones de interés seleccionadas de A y B, respectivamente, indicando células nerviosas de los complejos lanceolados. Se encontraron células con nivel de intensidad de EGFP medio-bajo (flechas). Piel dorsal de ratones (C-C') *young* y (E-E') *old Sox2<sup>EGFP</sup>*, con marcaje para EGFP (verde), P75NTR (rojo) y núcleos (azul). Se indican complejos lanceolados alrededor de los folículos (asterisco); células EGFP+/P75NTR+ en el plexo subepidérmico (flechas); y células EGFP+/P75NTR+ de nervios dérmicos finos (flecha vacía). Escala 50  $\mu\text{m}$ , excepto en a'-b' donde la escala corresponde a 15  $\mu\text{m}$ . (ep) epidermis, (hf) folículo piloso, (hs) fibra capilar, (dp) papila dérmica.

Con la edad se acorta la duración de la fase anágena del ciclo del pelo, mientras que la fase telógena se alarga (Muller-Rover *et al.*, 2001), disminuyendo la probabilidad de encontrar HFs en anagen. Sin embargo, tras un procedimiento de depilación se induce la entrada sincronizada de los HFs a su fase de crecimiento. En la Figura 4.9 se observa que doce días tras la depilación, los HFs de pieles *old* retienen la capacidad de entrada en anagen, con la consecuente sobre-expresión de EGFP en las DP de algunos HFs (Figura 4.9A-A', flechas vacías). El resto de células EGFP+ se asocian a los compartimentos previamente descritos. Se detectaron células EGFP+/P75NTR+ con marcaje intenso de ambos anticuerpos, exhibiendo una morfología alargada y con prolongaciones, que coincide con las células nerviosas interfoliculares descritas anteriormente (Figura 4.9B-B', cabezas de flechas); de forma importante, también se observaron células EGFP+/P75NTR- aplanadas y envolventes, sin prolongaciones evidentes que se asemejan a células perivasculares y poseen intensidad media-baja de EGFP (Figura 4.9B-B', flechas) (Etxaniz *et al.*, 2014; Iribar *et al.*, 2017).

Hasta el momento esta caracterización sugiere que el envejecimiento no afecta la localización de las células  $Sox2^{EGFP+}$ , ni la coexpresión de los marcadores de célula madre y de células gliales, al menos en condiciones basales. No obstante, la edad tiene un efecto sobre los nichos que albergan las células precursoras dérmicas (Figura 4.1), pudiendo afectar también la señalización y la capacidad de respuesta celular frente a estímulos que induzcan un entorno de reparación tisular. Considerando que i) las células  $Sox2^{EGFP+}$  son células precursoras dérmicas con capacidad regenerativa (Johnston *et al.*, 2013), ii) los niveles de expresión de *Sox2* regulan el compromiso celular hacia una identidad neural (Etxaniz *et al.*, 2014) y iii) en el envejecimiento está afectada la capacidad regenerativa de los tejidos, bien por una disminución en el número de células madre/precursoras y/o por alteraciones funcionales en las mismas; se decidió utilizar una aproximación *in vitro* para caracterizar con mayor profundidad el número y la capacidad funcional de las células precursoras dérmicas  $Sox2^{EGFP+}$  con el envejecimiento.

*Sox2*<sup>EGFP</sup> OLD

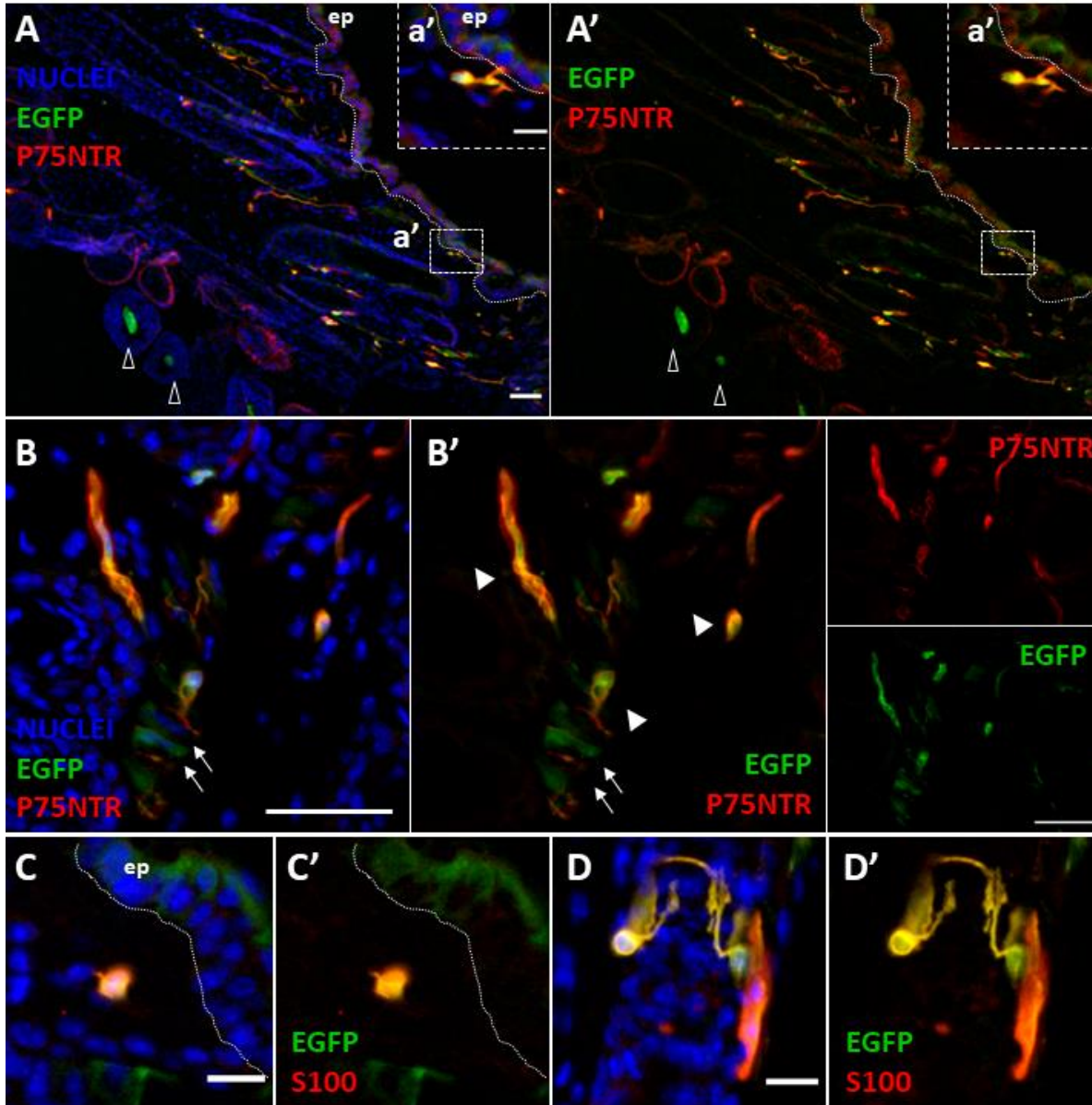


Figura 4.9 La piel envejecida en fase anágena mantiene la coexpresión de EGFP y marcadores gliales. Imágenes representativas de IF en piel dorsal congelada de ratones *old Sox2*<sup>EGFP</sup> en fase de anagen inducida (depilación). (A-B) Se muestra marcaje para EGFP (verde), P75NTR (rojo) y núcleos (azul). (a') detalle de una célula EGFP+/P75NTR+ del plexo subepidérmico. (A-A') Papilas dérmicas EGFP+ (flechas vacías). (B-B') Células EGFP+/P75NTR+ en la dermis profunda (cabezas de flechas), células EGFP+/P75NTR- (flechas). (C-D) Secciones de piel congelada con marcaje para EGFP (verde), S100 (rojo) y núcleos (azul); se observan células EGFP+/S100+ en (C-C') el plexo subepidérmico y (D-D') en los complejos lanceolados alrededor de los folículos pilosos. (A-A'-B-B') Escala 50  $\mu$ m. (a'-C-D) Escala 15  $\mu$ m. (ep) epidermis.

En primer lugar se aislaron células de piel dorsal de animales homocigotos wt y heterocigotos  $Sox2^{EGFP}$ , tanto *young* como *old*. Se cultivaron en suspensión para favorecer el enriquecimiento de las células precursoras dérmicas, y se evaluó su capacidad para formar dermoesferas en cultivo (Figura 4.10), siguiendo los mismos criterios descritos anteriormente (véase página 92 y Figura 4.2). Como reflejo del envejecimiento intrínseco de la piel, se observó que la mayoría de los cultivos establecidos a partir de células aisladas de ratones wt *young* se clasificaron como exitosos, mientras que aquellos establecidos a partir de células wt *old* presentaron menor tasa de éxito (*young* 65% vs. *old* 30%,  $p=0,02$ ); con el consecuente aumento en la obtención de cultivos no exitosos y/o regulares (*young* no exitosos 30% vs. *old* no exitosos y regulares 70%. Figura 4.10A). Aunque de manera no significativa, las células aisladas de ratones  $Sox2^{EGFP}$  siguieron la misma tendencia en cultivo; aquellas provenientes de animales *young* dieron lugar a más cultivos exitosos en comparación con las aisladas de pieles *old* (*young* 50% vs. *old* 32%), con un aumento concomitante en la obtención de cultivos no exitosos y regulares (*young* 50% vs. *old* 68%. Figura 4.10A). De forma importante, la heterocigosis de *Sox2* en sí misma parece influir negativamente en el éxito de establecer dermoesferas en cultivo, incluso en edades jóvenes (*young* wt 65% vs.  $Sox2^{EGFP}$  50%, no significativo).

Sólo de los cultivos catalogados como exitosos, se midió el tamaño alcanzado por las dermoesferas a P1D7. En la Figura 4.10B y Figura 4.10C se muestra la distribución de frecuencias relativas en función del tamaño. Se observó que los tamaños de las esferas establecidas a partir de pieles wt *young* se distribuían en un rango entre 30-245  $\mu\text{m}$  (mediana  $\sim 59 \mu\text{m}$ ), mientras que aquellas provenientes de pieles  $Sox2^{EGFP}$  *young* exhibieron tamaños más pequeños, de entre 30-136  $\mu\text{m}$  (mediana  $\sim 47 \mu\text{m}$ ), siendo la diferencia entre ambas distribuciones estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Por su parte, las dermoesferas establecidas a partir de pieles wt *old* se distribuían en un rango entre 30-262  $\mu\text{m}$  (mediana  $\sim 86 \mu\text{m}$ ), mientras que aquellas provenientes de pieles  $Sox2^{EGFP}$  *old* también exhibieron tamaños más pequeños, de entre 30-241  $\mu\text{m}$  (mediana  $\sim 64 \mu\text{m}$ ), siendo la diferencia entre ambas distribuciones estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Tanto en el genotipo wt (Figura 4.10B-C, barras negras) como en el genotipo  $Sox2^{EGFP}$

(Figura 4.10B-C, barras verdes), las dermoesferas *old* alcanzaron tamaños mayores que los cultivos de dermoesferas *young*.

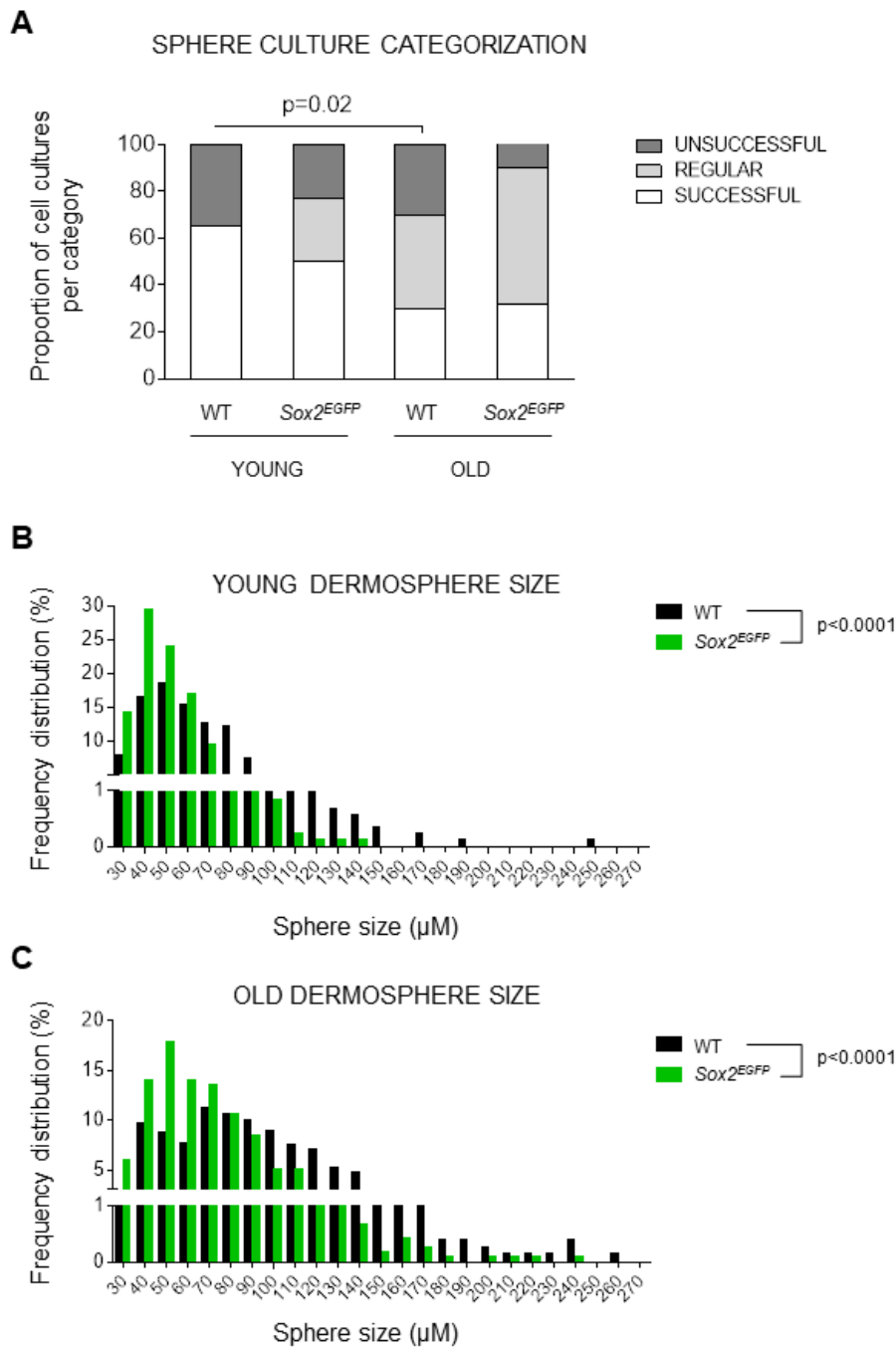


Figura 4.10 La capacidad esferogénica está afectada con el envejecimiento y con la heterocigosis de *Sox2*. (A) Proporción de cultivos esferogénicos catalogados como "exitosos" (successful), "regulares" (regular) y "no exitosos" (unsuccessful) a P0D7, establecidos a partir de piel de animales *young* y *old*, wt y *Sox2<sup>EGFP</sup>* (*young* wt N=17, *Sox2<sup>EGFP</sup>* N=18; *old* wt N=10, *Sox2<sup>EGFP</sup>* N=19). Los grupos se compararon estadísticamente con prueba de  $\chi^2$ . (B-C) Distribución de frecuencias del tamaño de las dermoesferas (diámetro) a P1D7, en cultivos de pieles (B) *young* y (C) *old*, de ratones wt y *Sox2<sup>EGFP</sup>*



(se midieron *young* wt n=908, *Sox2<sup>EGFP</sup>* n=840; *old* wt n=771, *Sox2<sup>EGFP</sup>* n=1197 dermoesferas, provenientes de N=4 muestras biológicas independientes, excepto en *old* wt donde N=3). Se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov para comparar estadísticamente las distribuciones.

Tal como se mostró en el capítulo anterior, la disminución en la eficiencia para establecer dermoesferas en cultivo y sus diferencias de tamaño, podrían estar relacionadas con cambios en el número y/o la funcionalidad de las células precursoras dérmicas. En este sentido, mediante citometría de flujo se cuantificó un menor porcentaje de células EGFP+ en piel total de animales *Sox2<sup>EGFP</sup>* *old* frente a la condición *young* (no significativo, Figura 4.11A-a'). Las condiciones utilizadas para el cultivo en suspensión favorecen el enriquecimiento de las células precursoras dérmicas, así como la desdiferenciación hacia estadios precursores mediante la sobreexpresión de *Sox2* (Toma *et al.*, 2001; Iribar *et al.*, 2017); en los cultivos primarios *young* y *old* se cuantificó un porcentaje mayor de células EGFP+ (Figura 4.11B-b') en comparación con células recién aisladas (Figura 4.11A-a'), sugiriendo que con la edad las células dérmicas retienen cierta capacidad de desdiferenciación, al menos *in vitro*. No obstante, la cantidad total de células EGFP+ en cultivo se mantuvo significativamente menor en la condición *old* ( $\bar{x}=1,04\pm 0,2\%$ ) con respecto a *young* ( $\bar{x}=2,02\pm 0,2\%$ ; Figura 4.11B-b').

Dado que los niveles de expresión de *Sox2* regulan el compromiso de linaje celular y el estado de desdiferenciación de las células precursoras dérmicas (Etxaniz *et al.*, 2014), se evaluó la población de células EGFP+ en función de los niveles de intensidad de fluorescencia del reportero [alta (*high-*), media (*med-*) y baja (*low-*)]. En la condición *old* respecto a *young*, se encontró una reducción significativa del porcentaje de células EGFP+, en los tres niveles de intensidad; independientemente de la edad, la población *high-Sox2<sup>EGFP</sup>* tiene menor proporción de células respecto a las demás fracciones (Figura 4.11C). Sin embargo, las poblaciones *high-Sox2<sup>EGFP</sup>*, *med-Sox2<sup>EGFP</sup>* y *low-Sox2<sup>EGFP</sup>* están afectadas de distinta forma en respuesta a la edad. Al comparar cada una de las fracciones *old* con la población respectiva *young* (*fold change young* = 1, línea punteada), se observa que las poblaciones *high-* y *med-Sox2<sup>EGFP</sup>* varían en promedio -0.6 y -0.5 veces respectivamente, mientras que la condición *low-Sox2<sup>EGFP</sup>* está +0.5 veces enriquecida (Figura 4.11D). En la Figura 4.11E, se observan comparativamente las regiones definidas mediante citometría de

flujo para cada una de las poblaciones celulares *young* y *old*, siendo evidente la disminución acusada de la fracción *high-Sox2<sup>EGFP</sup>* en la condición *old*. Estos datos apuntan a que con el envejecimiento hay una dinámica dentro de la población de células *Sox2<sup>EGFP</sup>*+, en la cual se pierde selectivamente la población con altos niveles de expresión de *Sox2*, mientras que parece preservarse la fracción de células con niveles más bajos de este factor de transcripción.

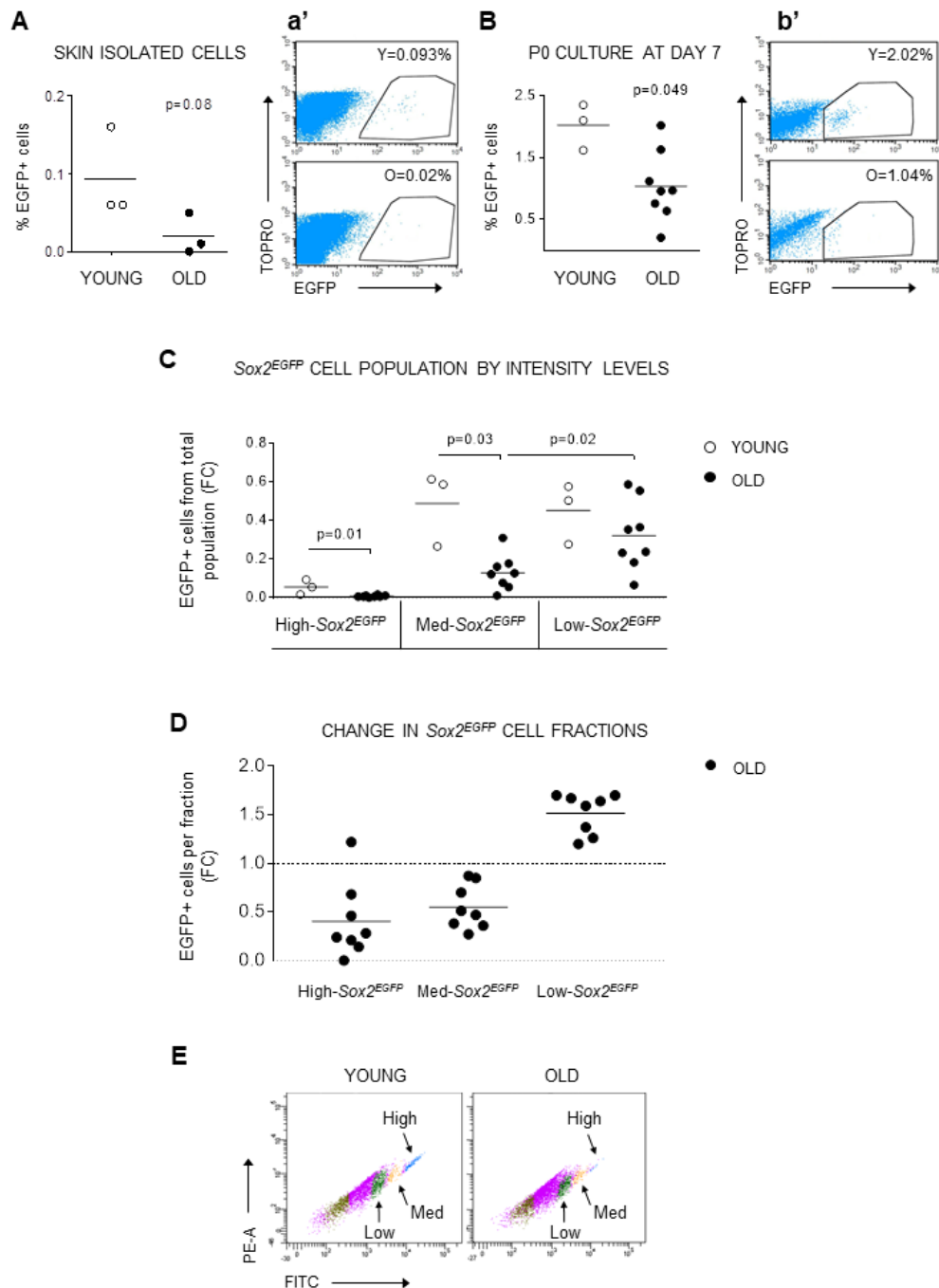


Figura 4.11 La población celular  $Sox2^{EGFP+}$  disminuye con el envejecimiento. Porcentaje (%) de células EGFP+ viables cuantificadas mediante citometría de flujo en (A) piel dorsal recién disgregada de ratones  $Sox2^{EGFP}$  (N=3, *young* y *old*) y (B) cultivos de dermoesferas  $Sox2^{EGFP}$  a P0D7 (*young* N=3 y *old* N=8). (a'-b') Población celular de interés EGFP+ seleccionada en una muestra representativa *young* (panel superior) y *old* (panel inferior). El porcentaje en los paneles corresponde al promedio de las muestras biológicas analizadas. (C) Cuantificación de la cantidad de células  $Sox2^{EGFP+}$  con respecto al total, en poblaciones celulares clasificadas en función de la intensidad de fluorescencia de EGFP; intensidad alta (*High-Sox2<sup>EGFP</sup>*), media (*Med-Sox2<sup>EGFP</sup>*) y baja (*Low-Sox2<sup>EGFP</sup>*). La cuantificación se expresa relativa (*fold change*) al promedio de células *young* EGFP+. (D) La cantidad de células de las poblaciones *old* con intensidad alta-, media- o baja- de  $Sox2^{EGFP}$  se expresa relativo (*fold change*) al porcentaje promedio de células *young* de la población correspondiente. La línea punteada indica la normalización de la población *young* contra sí misma. (B-C-D) *young* N=3 y *old* N=8 muestras biológicas independientes. (E) Paneles representativos de la población celular obtenida tras la disgregación de dermoesferas *young* (izquierda) y *old* (derecha) a P0D7; se indican las poblaciones con intensidad alta-, media- o baja- de  $Sox2^{EGFP}$ . Detectores FITC en eje X y PE-A en eje Y, escala exponencial.

Las células *high- y med/low-Sox2<sup>EGFP</sup>* exhiben características morfológicas diferentes que no dependen de la edad. Las células *high-Sox2<sup>EGFP</sup>* son alargadas con prolongaciones que en la mayoría de los casos rodean y penetran las dermoesferas (Figura 4.12A-A', cabeza de flecha). Comparativa y cualitativamente, la menor intensidad de EGFP en las células *med/low-Sox2<sup>EGFP</sup>* fue evidente, éstas presentaron una morfología circular y carente de prolongaciones, tanto en cultivos *young* como *old* (Figura 4.12A-B, flechas). Mediante inmunofluorescencia no fue posible distinguir entre células de las fracciones *med-* y *low-Sox2<sup>EGFP</sup>*, bien por la posible similitud morfológica entre ambas poblaciones celulares, o porque los bajos niveles de intensidad se acercan al umbral inferior de detección.

En congruencia con los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, se observó que el porcentaje de células *high-Sox2<sup>EGFP</sup>* por dermoesfera en los dos tiempos de cultivo evaluados era menor en la condición *old* ( $\bar{x}=4,3\pm 0,5\%$  P1D3 y  $\bar{x}=3,6\pm 0,6\%$  P1D7) respecto a *young* ( $\bar{x}=8\pm 1\%$  P1D3 y  $\bar{x}=4,6\pm 0,6\%$  P1D7); mientras que el porcentaje de células *med-Sox2<sup>EGFP</sup>*, era mayor en la misma comparativa (*old*  $\bar{x}=4,3\pm 0,7\%$  P1D3 y  $\bar{x}=3,2\pm 0,7\%$  P1D7 respecto a *young*  $\bar{x}=2,4\pm 0,7\%$  P1D3 y  $\bar{x}=2,2\pm 0,5\%$  P1D7. Figura 4.12C). De forma interesante, sólo en las dermoesferas *young* el porcentaje de células *high-Sox2<sup>EGFP</sup>* fue mayor respecto a la población *med-Sox2<sup>EGFP</sup>*, para ambos tiempos de cultivo (Figura 4.12C); esto podría sugerir que con el envejecimiento disminuye la capacidad de

desdiferenciación influyendo en el enriquecimiento de las células precursoras dérmicas, al menos en condiciones *in vitro*.

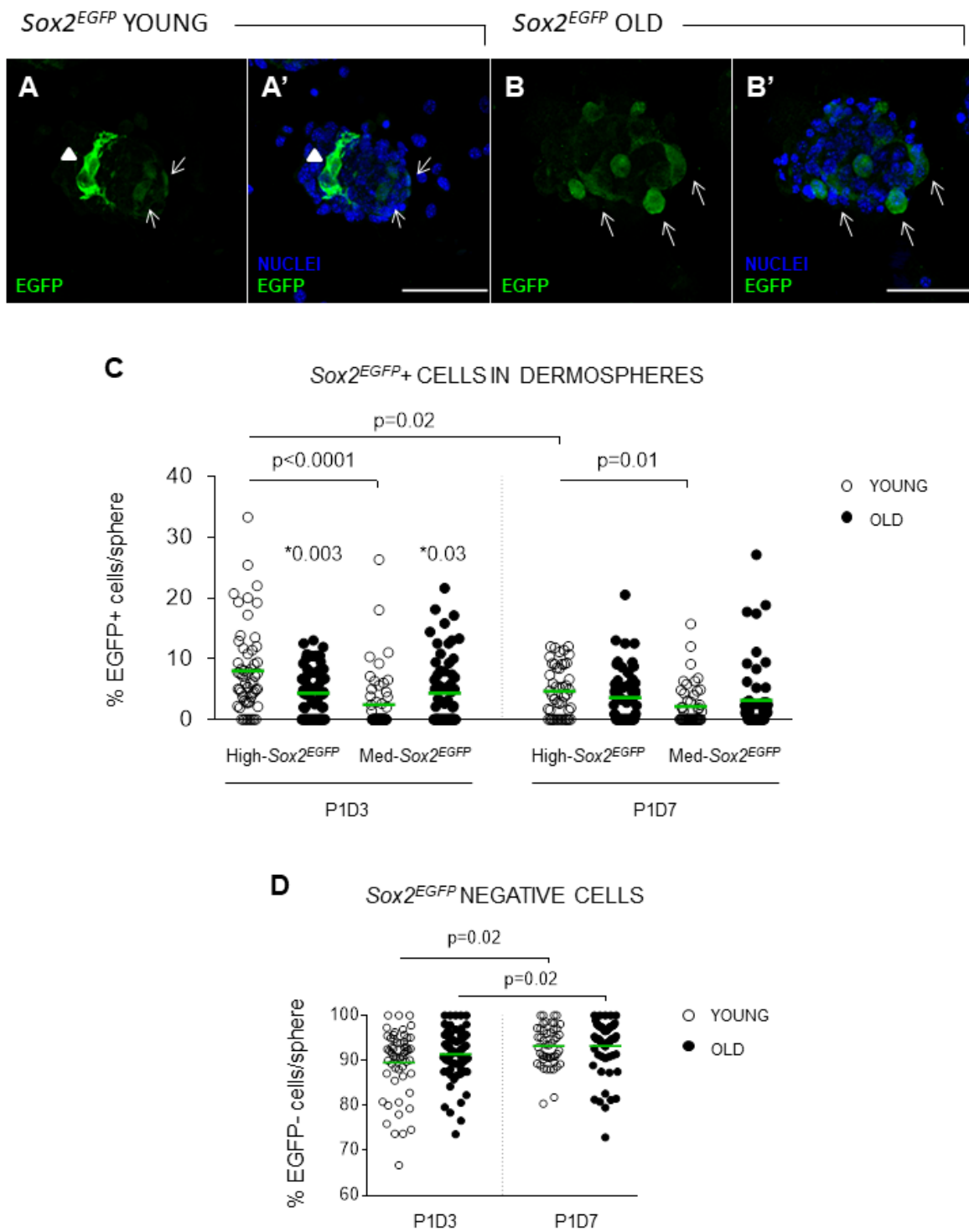


Figura 4.12 Caracterización *in vitro* de las poblaciones celulares con intensidad alta y media de  $Sox2^{EGFP}$ . (A-B) Imágenes representativas de cultivos de dermosferas (A-A') *young* y (B-B') *old*  $Sox2^{EGFP}$  a P1D7, con marcaje EGFP (verde) y núcleos (azul). Morfología típica de las células con

intensidad alta (cabezas de flecha) y media (flechas) de  $Sox2^{EGFP}$ . Escala 50  $\mu\text{m}$ . Porcentaje (%) de células (C) EGFP+ o (D) EGFP- cuantificadas en función de los núcleos, en dermoesferas *young* y *old* (n=48-64) a P1D3 y P1D7. Las células se catalogaron en función de la intensidad de EGFP (alta o media) y según la morfología mostrada en A-B (N=5 muestras biológicas independientes).

A su vez, precisamente la población *high-Sox2<sup>EGFP</sup> young* es la única que disminuye significativamente a lo largo del tiempo de cultivo ( $\bar{x}=8\pm 1\%$  a P1D3 vs.  $\bar{x}=4,6\pm 0,6\%$  a P1D7,  $p=0,02$ . Figura 4.12C), reforzando la idea de que la fracción celular con altos niveles de expresión de *Sox2*, podría ser selectivamente más sensible a cambios en respuesta a estímulos del medio. Por otra parte, la mayor cantidad de células que conforman las dermoesferas son negativas para EGFP (Figura 4.12D). En promedio, el porcentaje de células negativas para EGFP aumenta con el tiempo de cultivo (P1D7 vs. P1D3), tanto en la condición *young* como en *old*, siendo correlativo con una disminución del porcentaje promedio de células EGFP+ (Figura 4.12C, P1D7).

Se evaluó si los cambios encontrados en las poblaciones EGFP+ se deben a alteraciones en la proliferación. En las dermoesferas *young* (P1D7) algunas células con alta intensidad de marcaje de EGFP coexpresaban el marcador de proliferación Ki67, mientras que otras eran *high-Sox2<sup>EGFP</sup>/Ki67-* (Figura 4.13A, cabezas de flecha). Sin embargo, en los cultivos *old* era frecuente encontrar células *med-Sox2<sup>EGFP</sup>/Ki67+* (Figura 4.13B, flechas). En ambas edades, se encontraron células EGFP-/Ki67+ indicando la proliferación de otros tipos celulares aparte de las células precursoras dérmicas. Al cuantificar la proliferación total por dermoesferas (Figura 4.13C), inesperadamente se observó mayor porcentaje de células Ki67+ en *old* respecto a *young* (P1D3); mientras que en tiempos tardíos de cultivo (P1D7), disminuyó la proliferación celular en ambas edades. Esta tendencia, se debe principalmente a la proliferación por parte de células negativas para EGFP (Figura 4.13D), que a su vez son las que representan la mayor porción de células que conforman las dermoesferas (Figura 4.12D). En todos los cultivos empleados para los análisis la formación de dermoesferas fue exitosa (Figura 4.10A), por lo que cualquier alteración proliferativa en las células obtenidas a partir de pieles *old*, pudo haber supuesto una ventaja para el establecimiento de dichos cultivos.

Como se observó cualitativamente, la población celular EGFP+ también exhibió propiedades proliferativas (Figura 4.13E). De forma interesante, con el tiempo de cultivo (P1D7 vs P1D3) se incrementó la proliferación de las células *high-Sox2<sup>EGFP</sup>* en las dermoesferas *old*, mientras que la misma comparativa en células *young* no presentó cambios. Sin embargo, este aumento proliferativo no supuso un incremento en el total de células *high-Sox2<sup>EGFP</sup>* a P1D7 de los cultivos *old* (Figura 4.12C). Tanto a P1D3 como a P1D7, un mayor porcentaje de la población de células *med-Sox2<sup>EGFP</sup>* en los cultivos *old* eran Ki67+, lo cual representa una mayor proliferación respecto a la condición *young* (Figura 4.13E); contrario al caso anterior, esta proliferación si supuso un aumento de la proporción total de células *med-Sox2<sup>EGFP</sup>* (Figura 4.12C). Estos resultados refuerzan la idea de que las distintas poblaciones celulares que expresan *Sox2* tienen respuestas diferentes al cultivo *in vitro*, mientras que el envejecimiento parece selectivamente sobre aquella con mayor expresión de *Sox2*.

Como se vió que la edad afecta a la población celular EGFP+, en número y en proliferación, se evaluó la funcionalidad de las células según la capacidad de diferenciación a distintos linajes (Figura 4.14). Para ello, se relacionó la cantidad de células diferenciadas en condiciones de cultivo neurogénicas con el porcentaje inicial de células EGFP+ de cada muestra (Figura 4.14A-B). Se encontró que la capacidad de diferenciación a células bipolares con expresión positiva del marcador glial S100 o a células  $\alpha$ -SMA+ (Figura 4.14C) en los cultivos *young*, se correlaciona de forma positiva y negativa respectivamente, con el porcentaje inicial de células EGFP+ en dicho cultivo a P0D7. Mientras que en los cultivos *old* la diferenciación celular, al menos hacia los linajes evaluados, no parece atenerse al porcentaje inicial de células EGFP+ reflejando una alteración funcional en las mismas (Figura 4.14A-B-C').

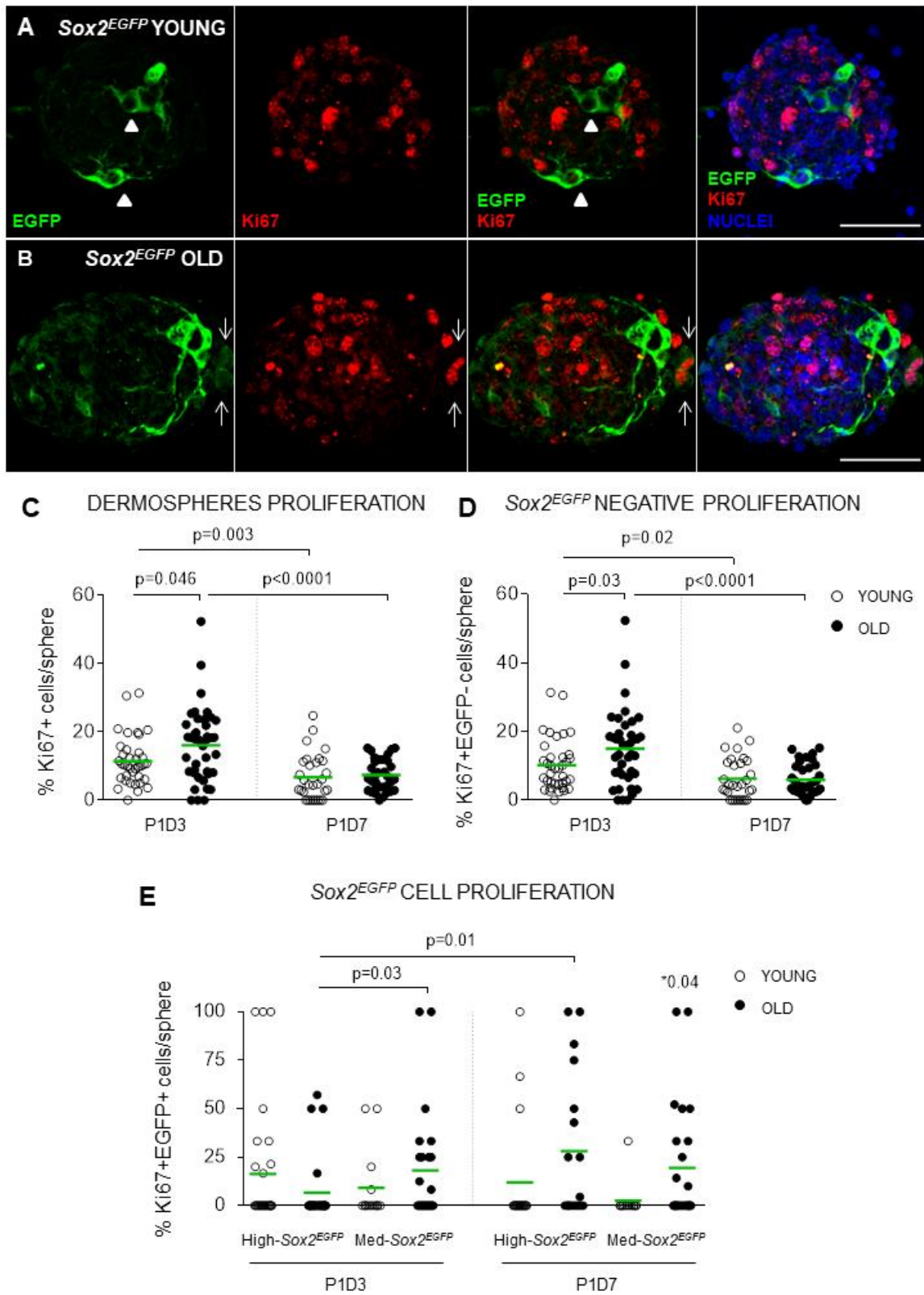


Figura 4.13 Caracterización *in vitro* de los cambios en la proliferación de las células *Sox2<sup>EGFP</sup>* con la edad. (A-B) Imágenes representativas de IF de dermosferas (A) *young* y (B) *old* a P1D7 de cultivo, con marcaje para EGFP (verde), Ki67 (rojo) y núcleos (azul). Células típicas *High-Sox2<sup>EGFP</sup>/Ki67-* en

dermoesferas *young* (cabezas de flecha); células *Med-Sox2<sup>EGFP</sup>/Ki67+* en dermoesferas *old* (flechas). Escala 50  $\mu$ m. (C-D) Cuantificación del porcentaje (%) por esfera de las células proliferativas totales Ki67+ y de las células proliferativas Ki67+/EGFP-, respectivamente, en cultivos *Sox2<sup>EGFP</sup>* (n=30-41) a P1D3 y P1D7. (E) Cuantificación de las células Ki67+/EGFP+ en dermoesferas *Sox2<sup>EGFP</sup>* (n=13-26), clasificadas según los niveles de intensidad alta (*High-Sox2<sup>EGFP</sup>*) y media (*Med-Sox2<sup>EGFP</sup>*) del reportero a P1D3 y P1D7. (C-E) *young* N=3 y *old* N=4 muestras biológicas independientes.

Debido a que la diferenciación mesodérmica se evaluó de manera colateral en los cultivos mantenidos en medio neurogénico, se cultivaron las células en condiciones proadiposas para explorar la capacidad de diferenciación hacia otro tipo celular mesodérmico. En este caso la diferenciación se evaluó mediante genes que se expresan en diferentes estadios del proceso adipogénico (*Ppar $\gamma$* , *Fabp4* y *Adipoq*) (Figura 4.14D-F) y se comparó respecto a cultivos wt. Se observó que en condiciones control (CTRL), los cultivos *young Sox2<sup>EGFP</sup>* tenían mayores niveles de expresión de los genes *Ppar $\gamma$* , *Fabp4* y *Adipoq* en comparación con los cultivos wt *young*. En condiciones de diferenciación proadipogénica (DIFF), los cultivos wt, tanto *young* como *old*, sobre-expresaron acentuadamente pero de forma no significativa, los tres genes evaluados en comparación con la condición CTRL. De forma interesante, en las células *Sox2<sup>EGFP</sup> young* las condiciones proadipogénicas en cultivo no inducen la sobre-expresión de *Ppar $\gamma$*  ni *Adipoq* con respecto al cultivo CTRL; sin embargo, en las células *Sox2<sup>EGFP</sup> old* se observa que las condiciones de cultivo promueven la diferenciación adiposa, tal como se refleja en la sobreexpresión de los genes *Fabp4* y *Adipoq*.

Estos resultados podrían indicar por un lado una predeterminación temprana de las células *Sox2<sup>EGFP</sup> (young)* hacia el linaje adiposo que compromete la capacidad de respuesta de las células frente a estímulos del medio. Por otro lado, considerando que las células *med/low-Sox2<sup>EGFP</sup>* pueden dar lugar a tipos celulares mesodérmicos, y que hemos descrito el enriquecimiento de esta población frente al envejecimiento, cabría esperar que sean los cultivos *old Sox2<sup>EGFP</sup>* aquellos que tengan mayor capacidad de diferenciación adiposa.



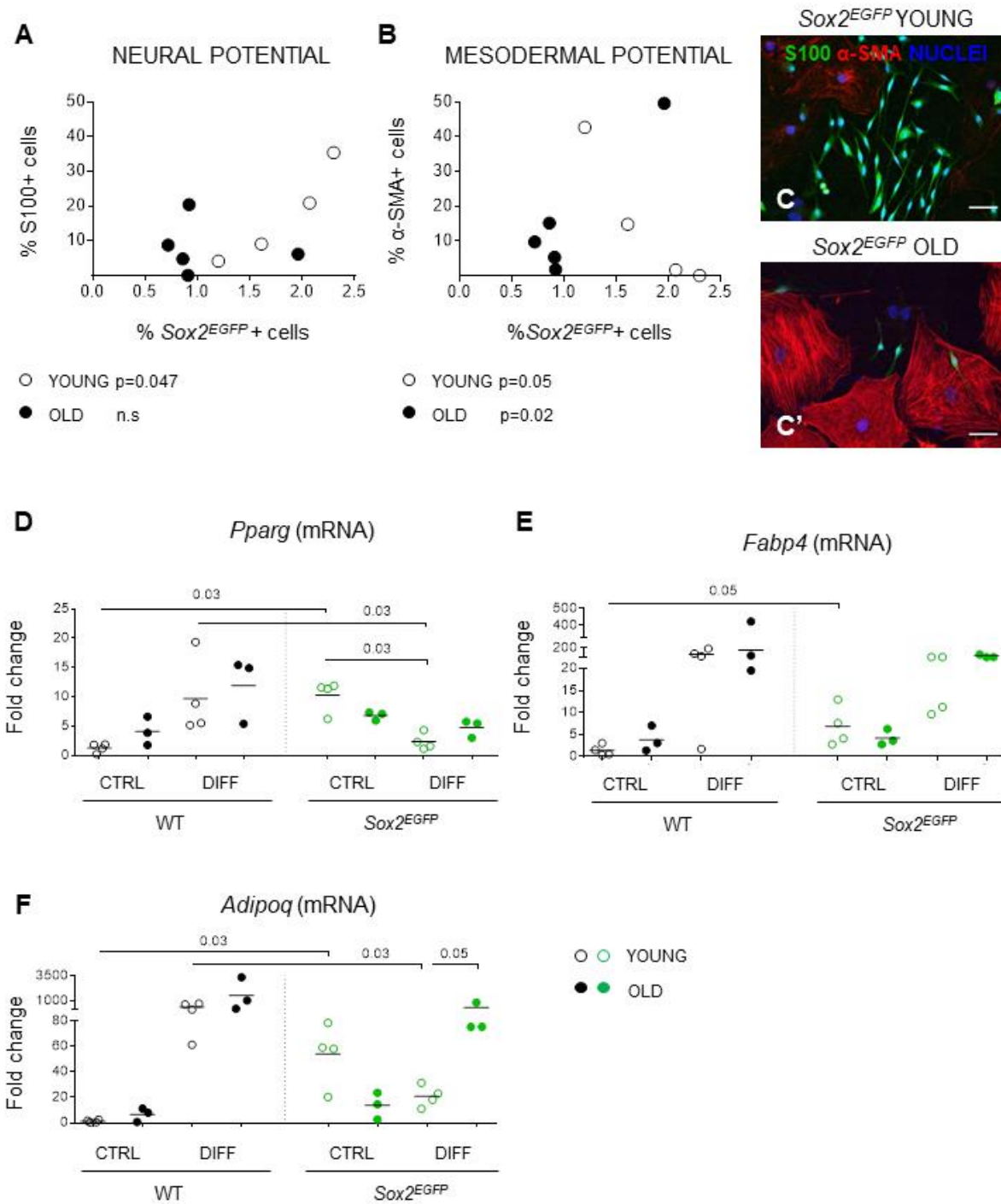


Figura 4.14 Cambios en la capacidad de diferenciación *in vitro* de las células dérmicas Sox2<sup>EGFP</sup> con el envejecimiento. Potencial de diferenciación de los cultivos Sox2<sup>EGFP</sup> (P2) hacia el linaje (A) neural y (B) mesodérmico, medido como el porcentaje (%) de células S100+ y α-SMA+, respectivamente, en función de la cantidad inicial de células EGFP+ en la muestra a tiempo POD7 (N=4 muestras biológicas independientes de ambas edades). p-valor correspondiente a correlación de Pearson (A) *young* R<sup>2</sup>=0,91, *old* R<sup>2</sup>=0,01; (B) *young* R<sup>2</sup>=0,91, *old* R<sup>2</sup>=0,87. Imágenes representativas de IF de células dérmicas de ratones Sox2<sup>EGFP</sup> (C) *young* y (C') *old*, tras 14 días cultivadas en condiciones neurogénicas, con marcaje para S100 (verde), α-SMA (rojo) y núcleos (azul). Escala 50 μm. (D-F)

Cuantificación relativa de los niveles de expresión (mRNA) génica de (D) *Ppar $\gamma$*  (E) *Fabp4* y (F) *Adipoq* en células dérmicas *young* y *old* provenientes de ratones wt y *Sox2<sup>EGFP</sup>*, tras 21 días en condiciones de cultivo adipogénicas. La expresión de los genes de interés se normalizó contra dos genes endógenos (*Tbp* y *Sdha*). La expresión génica en diferenciación (DIFF) se relativizó (*fold change*) contra la muestra control (CTRL) pareada. Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba *t-test* pareada (*young* wt/*Sox2<sup>EGFP</sup>* N=4 y *old* wt/*Sox2<sup>EGFP</sup>* N=3).

### 4.3 La alteración de la homeostasis dérmica durante el envejecimiento se acentúa con la heterocigosis de *Sox2*

La homeostasis dérmica resulta del adecuado funcionamiento de las células que forman parte del tejido, garantizando el mantenimiento de la capacidad regenerativa a lo largo de la vida. A su vez, la ECM que forma la estructura del tejido provee señales para la comunicación inter e intracelular, afectando directamente a todos los tipos celulares residentes en la piel, incluyendo las células madre/precursoras. Teniendo en cuenta que i) las células SOX2+ son células precursoras dérmicas, ii) parte de la homeostasis se mantiene por las células madre/precursoras residentes del tejido, y iii) el envejecimiento afecta *in vitro* a la población de células SOX2+; se evaluó el estado del tejido dérmico en relación al envejecimiento y heterocigosis de *Sox2* (modelo animal *Sox2<sup>EGFP</sup>*).

Mediante tinciones de hematoxilina-eosina, se realizó una caracterización histológica en secciones de piel dorsal de ratones wt y *Sox2<sup>EGFP</sup>* (Figura 4.15A), identificando cambios cualitativos en las distintas capas de la piel con el envejecimiento. Entre los cambios más notorios observados en la piel wt *old* respecto a *young*, se apreció una atenuación de las crestas papilares, una aparente reducción de la densidad folicular, menor compactación de las fibras de colágeno que forman la dermis y un estrechamiento de la capa de tejido adiposo dérmico (dWAT). Estos cambios se presentaron en las pieles de los animales *Sox2<sup>EGFP</sup>* desde edades tempranas (*young*), acentuándose con la edad (*old*), con excepción del dWAT donde se observó un aumento de grosor. Para cuantificar estas observaciones se midió el grosor de la epidermis, dermis y dWAT (Figura 4.15B-C-D, respectivamente). Se observó que en la piel wt *old* respecto a *young*, disminuye el grosor epidérmico ( $\bar{x}=20,1\pm 1,5 \mu\text{m}$  vs.  $\bar{x}=30,7\pm 2,7 \mu\text{m}$ , respectivamente), dérmico ( $\bar{x}=148,5\pm 3,5 \mu\text{m}$  vs.  $\bar{x}=181\pm 9,4 \mu\text{m}$ ) y del tejido adiposo ( $\bar{x}=110,3\pm 5,4 \mu\text{m}$  vs.  $\bar{x}=234,1\pm 10,6 \mu\text{m}$ ); mientras que en pieles *Sox2<sup>EGFP</sup>* únicamente la epidermis reduce su grosor (*old*  $\bar{x}=21,7\pm 1 \mu\text{m}$  vs. *young*  $\bar{x}=25,2\pm 0,7 \mu\text{m}$ ). Cabe destacar que tanto la epidermis como la dermis, eran más finas en las pieles *Sox2<sup>EGFP</sup>* *young* respecto al genotipo wt de la misma edad. De acuerdo con las observaciones cualitativas, el dWAT de pieles *Sox2<sup>EGFP</sup>* *old* presentó un engrosamiento en comparación con la edad *young* ( $\bar{x}=336,5\pm 15,9 \mu\text{m}$  vs.  $\bar{x}=247\pm 8,7 \mu\text{m}$ , respectivamente);

además, en la condición *young* el dWAT de la piel *Sox2<sup>EGFP</sup>* era ligeramente más grueso en comparación con el dWAT wt (no significativo).

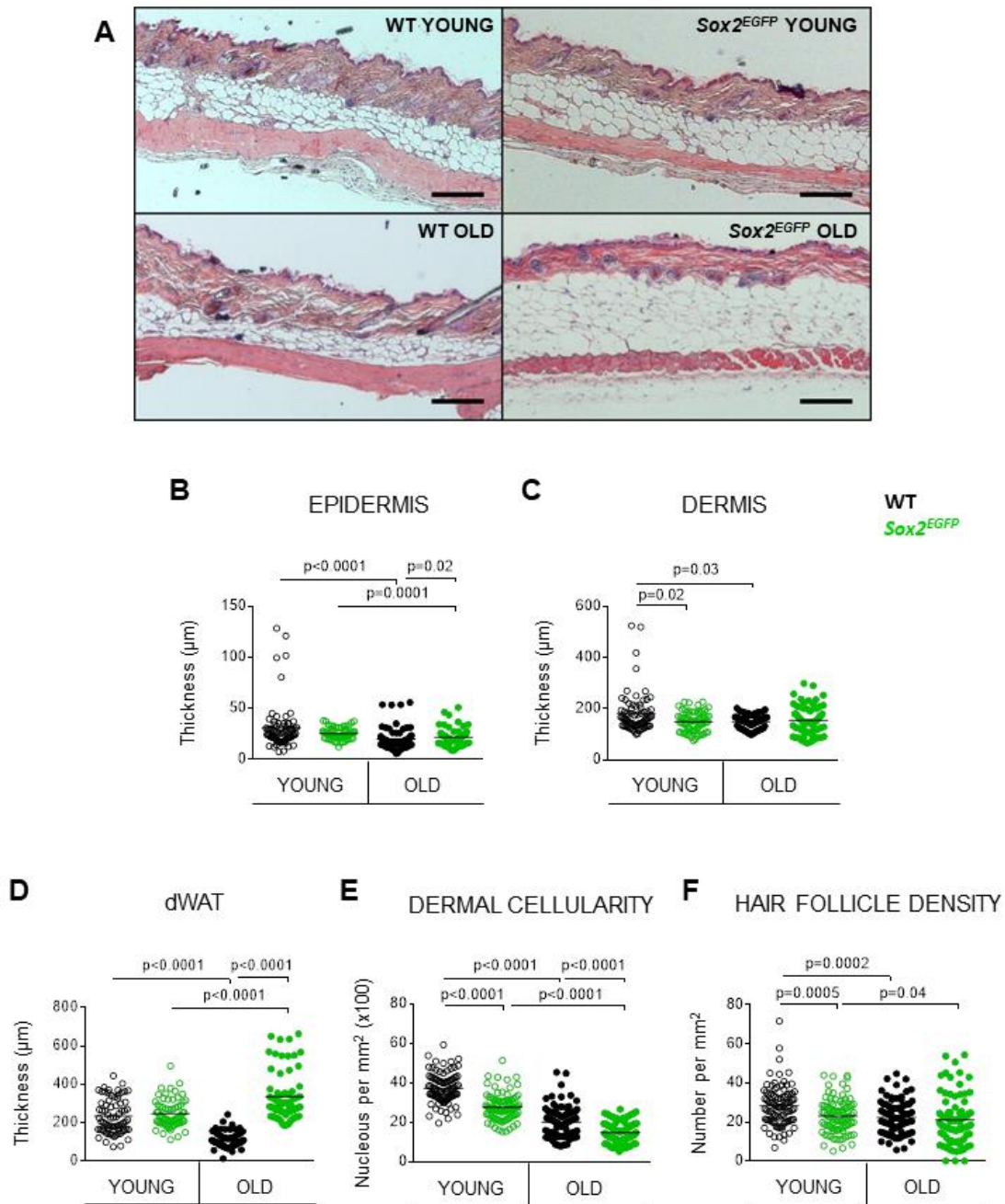


Figura 4.15 Caracterización de los cambios asociados a la edad en la piel wt y *Sox2<sup>EGFP</sup>*. (A) Imágenes en campo claro de cortes representativos de piel dorsal, teñidos con hematoxilina-eosina. Escala 200  $\mu\text{m}$ . Cuantificación del grosor ( $\mu\text{m}$ ) de las capas (B) epidérmica, (C) dérmica y (D) tejido adiposo blanco dérmico (dWAT) en pieles *young* y *old* de ratones wt (puntos negros) y *Sox2<sup>EGFP</sup>* (puntos verdes) ( $n=30-36$ , campos aleatorios). Cuantificación de la (E) celularidad ( $n=76-90$  campos aleatorios) y (F) densidad folicular ( $n=80-90$ , campos aleatorios) en un área dérmica constante.

Por otra parte, tanto en pieles wt como *Sox2<sup>EGFP</sup>* se encontró una reducción de la celularidad dérmica con el envejecimiento (Figura 4.15E), representada por todos aquellos núcleos inmersos en la dermis interfolicular; la disminución en el número de células dérmicas con el envejecimiento se encontró particularmente acusada en las pieles *Sox2<sup>EGFP</sup>* (*young*  $\bar{x}=27,7\pm 0,7$  vs. *old*  $\bar{x}=14,8\pm 0,6 \times 10^2$  núcleos por  $\text{mm}^2$ ). Tal como se apreció en las histologías de forma cualitativa, la densidad de folículos pilosos (Figura 4.15F) también se redujo con la edad en pieles wt y en pieles *Sox2<sup>EGFP</sup>*, siendo significativamente menor en edades *young* entre ambos genotipos (wt  $\bar{x}=28,31\pm 1,1$  vs.  $\bar{x}=23,12\pm 0,9$  HF por  $\text{mm}^2$ .  $p=0,0005$ ).

Ya que en el dWAT se observaron cambios dependientes del genotipo, y las diferencias de celularidad con el envejecimiento eran pronunciadas en las pieles *Sox2<sup>EGFP</sup>*, se decidió ahondar en aspectos relacionados con estos parámetros. Por un lado se analizó en piel total la expresión de genes representativos de diferentes estadios de maduración de las células adiposas. Con respecto a *Ppar $\gamma$*  (Figura 4.16A), gen regulador clave de la adipogénesis, no se encontraron cambios significativos más allá de una leve tendencia a disminuir con la edad en la piel wt. No obstante, esta tendencia se refleja en una disminución significativa en la condición wt *old* de la expresión de *Adipoq* (Figura 4.16C) que en otros contextos es regulada por *Ppar $\gamma$*  (Lowe *et al.*, 2011). La expresión de *Fabp4* está relacionada con estados intermedios y finales del proceso de diferenciación adiposa; de manera interesante, no se encontró sobre-expresión de este gen en pieles wt/*Sox2<sup>EGFP</sup>* *old*; sin embargo, su expresión está aumentada en pieles *Sox2<sup>EGFP</sup>* *young* con respecto al genotipo wt (Figura 4.16B).

Por otro lado, la celularidad está representada principalmente por fibroblastos dérmicos, encargados de secretar proteínas componentes de la ECM, como la elastina y el colágeno. Al evaluar el estado de las fibras elásticas (FE) dérmicas (Figura 4.17A), se encontró que las FE reticulares de las pieles wt *young* eran gruesas y discurrían paralelamente a la epidermis, mientras que las FE papilares eran más finas y abundantes, orientándose perpendicularmente a la superficie; las FE alrededor de los HFs eran largas y formaban una red densa, orientándose mayormente de forma perpendicular al canal

folicular. En el genotipo wt, las diferencias cualitativas más destacables observadas con el envejecimiento fueron la ausencia y el fraccionamiento de las FE. Estos cambios se observaron también en pieles *Sox2<sup>EGFP</sup>*, en edades *young* y *old*. Cabe destacar que en la condición *old Sox2<sup>EGFP</sup>*, se encontraron de forma exclusiva abultamientos a lo largo de las FE presentes, indicando la acumulación de modificaciones postraduccionales en las proteínas que componen las fibras.

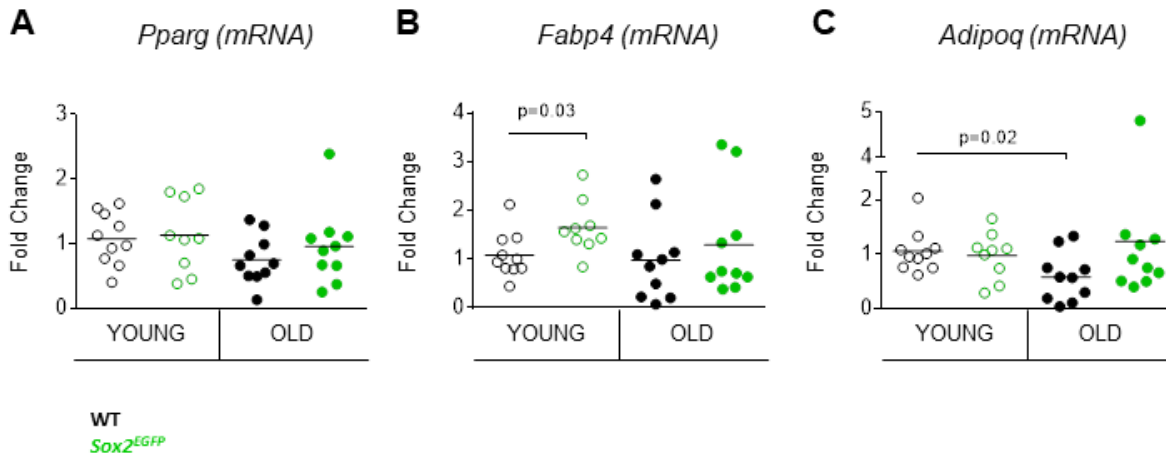


Figura 4.16 Expresión de marcadores adipogénicos en piel de ratones wt y *Sox2<sup>EGFP</sup>*. Expresión relativa (mRNA) de los genes (A) *Pparg* (B) *Fabp4* y (C) *Adipoq* en piel total. Los genes de interés se normalizaron respecto a 3 genes endógenos (*Tbp*, *Sdha*, *Gapdh*), y la expresión es relativa (*fold change*) al promedio del grupo *young* wt (N=10, excepto *young Sox2<sup>EGFP</sup>* donde N=9).

En línea con lo observado, la densidad de FE dérmicas (Figura 4.17B) se redujo con la edad en la piel wt (*young*  $\bar{x}=57,6\pm 4,2$  vs. *old*  $\bar{x}=34,8\pm 3,1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ); si bien la densidad de FE no disminuyó en pieles *Sox2<sup>EGFP</sup>* con el envejecimiento, la cantidad de éstas en la piel *young Sox2<sup>EGFP</sup>* fue significativamente menor en comparación con la condición wt *young* ( $\bar{x}=38,6\pm 2,5$  vs.  $\bar{x}=57,6\pm 4,2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ , respectivamente). Por otro lado, en la piel wt la proporción de HFs que presentan FE en sus alrededores no cambia con la edad (Figura 4.17C) pero las FE están fragmentadas, afectando a la calidad de las mismas (Figura 4.17D). En la piel *Sox2<sup>EGFP</sup>* *old* hay un aumento aparente en la cantidad de HFs rodeados de FE en comparación con la condición *young* (Figura 4.17C); sin embargo, las FE se encuentran fragmentadas desde edades tempranas (Figura 4.17D).

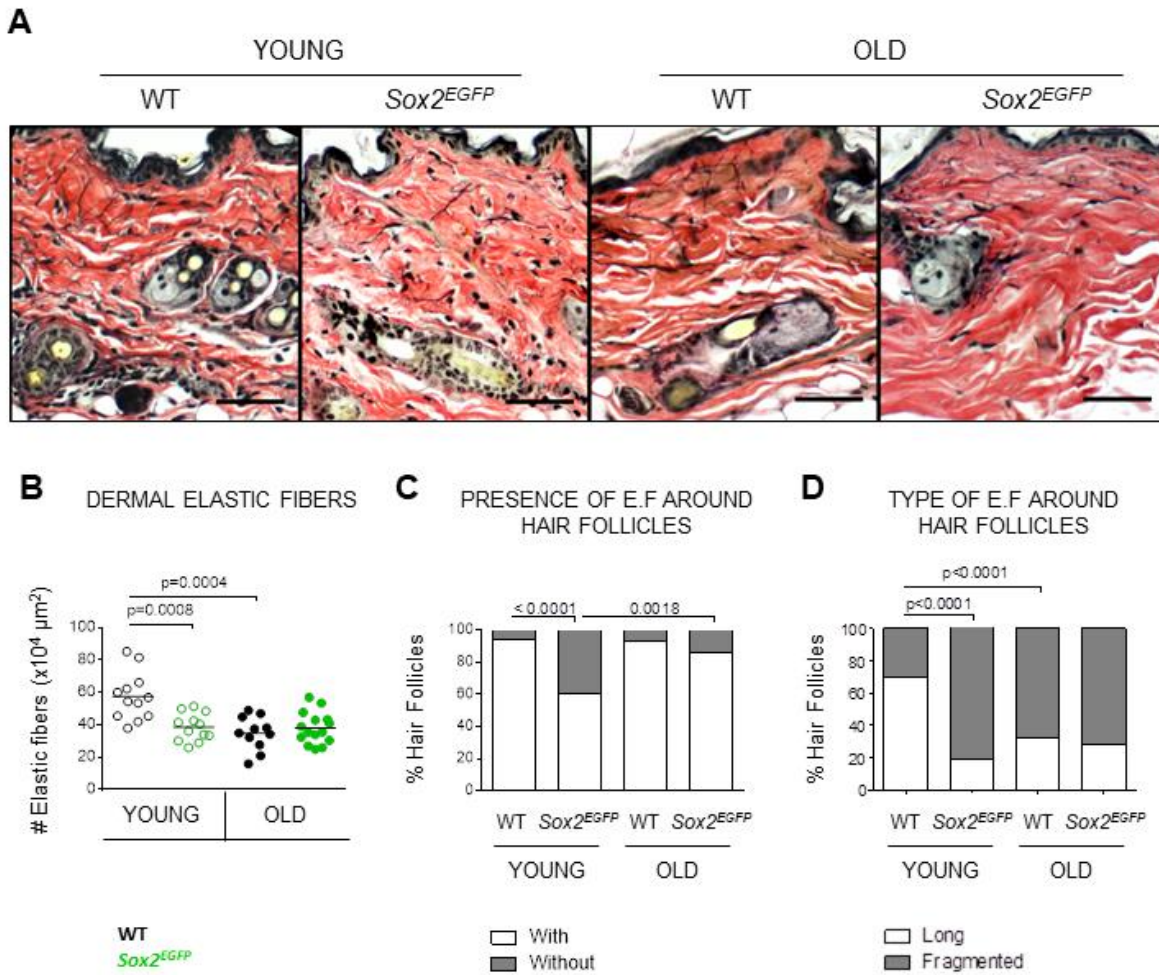


Figura 4.17 Alteración de las fibras elásticas (FE) en la piel del ratón *Sox2<sup>EGFP</sup>*. (A) Imágenes en campo claro de cortes representativos de piel dorsal, teñidos con Verhoeff-Van Gieson. Se observan: FE y núcleos (negro), colágeno (rojo), fibra capilar (amarillo). Escala 50  $\mu\text{m}$ . (B) Cuantificación por grupo de estudio de la densidad de FE en función de  $10^4 \mu\text{m}^2$  de área dérmica ( $n=1-4$  campos aleatorios). Las FE que rodean los folículos pilosos se evaluaron en función del (C) porcentaje de folículos con o sin FE circundantes ( $n=53-85$  folículos pilosos), y (D) apariencia de las FE rodeando el folículo, largas o fragmentadas ( $n=32-80$  folículos pilosos). (C-D) Prueba Fisher para la comparación estadística de los grupos.

El colágeno es el principal componente de la ECM dérmica y las alteraciones en la estructura de las fibras de colágeno están relacionadas con el envejecimiento de la piel (Varani *et al.*, 2006; Marcos-Garcés *et al.*, 2014). Al analizar la morfología de las fibras, se observó una menor compactación de las fibras de colágeno con la edad (Figura 4.15A). Para confirmar esta observación, se realizó una tinción con rojo sirio que en conjunto con microscopía de luz polarizada permite visualizar específicamente las fibras de colágeno (Figura 4.18A). En las pieles wt *young* se observó que el colágeno forma un entramado

denso, en el cual las fibras están organizadas perpendicularmente entre ellas (color rojo); con el envejecimiento (*wt old*), las fibras adquieren una orientación paralela, que confiere desorganización a la estructura (color amarillo). De manera interesante, el fenotipo estructural de las fibras de colágeno en pieles *young Sox2<sup>EGFP</sup>* es particularmente semejante a la piel *old wt*. Con el envejecimiento, las pieles *Sox2<sup>EGFP</sup>* presentan una estructura de la red de colágeno mucho más alterada, caracterizada por la rotura y pérdida acusada de las fibras (color verde). Al evaluar los ángulos de orientación de las fibras de colágeno en éstas imágenes (Osman *et al.*, 2013) (Figura 4.18B), se ve claramente que el índice de orientación de las fibras de colágeno disminuye con el envejecimiento y con la heterocigosis de *Sox2<sup>EGFP</sup>* desde edades tempranas.

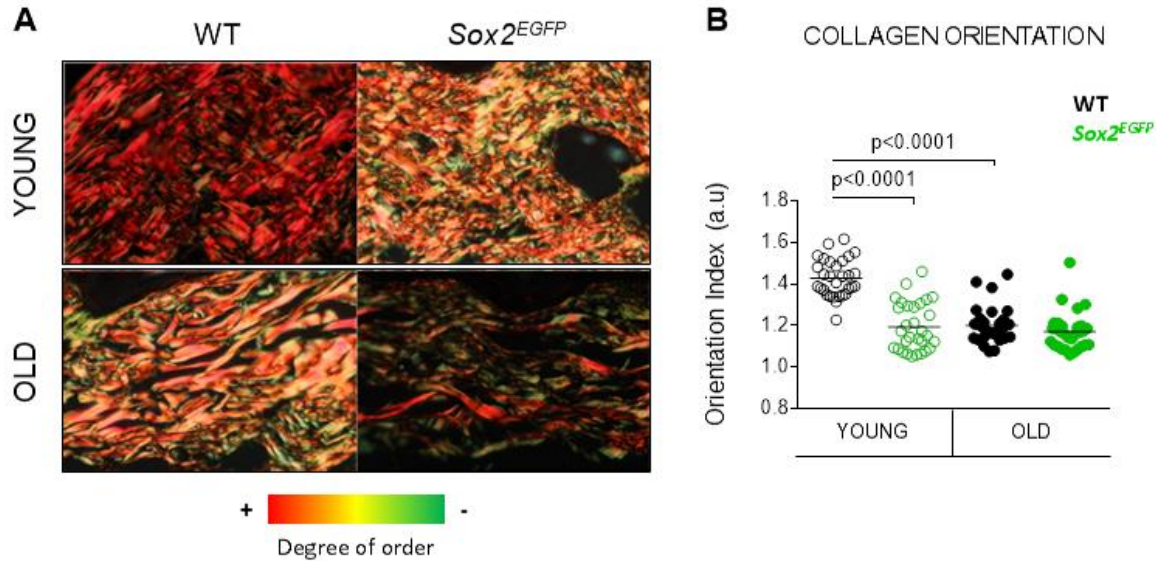


Figura 4.18 La arquitectura de las fibras de colágeno está alterada en la piel *Sox2<sup>EGFP</sup>*. (A) Imágenes de secciones representativas de piel dorsal de ratones *wt* y *Sox2<sup>EGFP</sup>*, *young* y *old*, teñidas con PSR y visualizadas con luz polarizada. Se observan fibras de colágeno organizadas (rojo), fibras de colágeno con organización intermedia (naranja-amarillo) y fibras fragmentadas o tejido no colagenoso (verde). (B) Cuantificación de la alineación de las fibras de colágeno en secciones teñidas con PSR y fotografiadas con luz polarizada. Índice de orientación alto indica fibras organizadas, alineadas perpendicularmente entre ellas (n=30 campos aleatorios).

El balance entre adipogénesis y actividad fibroblástica está descrito especialmente en procesos fibróticos y heridas crónicas (Schmidt & Horsley, 2013; Plikus *et al.*, 2017); en este sentido, las proteínas CCN2 y POSTN han sido vinculadas a la diferenciación, actividad y plasticidad de las células mesenquimales (Elliott *et al.*, 2012; Elliott *et al.*, 2015; Tsang *et al.*,



2020). En la piel, CCN2 está presente en la epidermis, en la dermis interfollicular y en la zona variable del HF, pero no en la DP; esta proteína se detectó en pieles de ambos genotipos, tanto en edades *young* como *old* (Figura 4.19A). Al cuantificar la cantidad relativa de CCN2 en la zona dérmica interfollicular, se observó que con el envejecimiento hay un aumento significativo en el área dérmica CCN2+ del genotipo wt, mientras que en las pieles *Sox2<sup>EGFP</sup> old* hubo una disminución del área CCN2+ en comparación con la piel *young* (Figura 4.19B). Dado el papel inhibitorio de la señalización por *Pparγ* en la regulación de CCN2 y en la síntesis de ácidos grasos (Fu *et al.*, 2001; Sha *et al.*, 2012), cabe destacar la correlación negativa entre el área dérmica relativa de CCN2 con el envejecimiento (Figura 4.19B) y el aumento de grosor del dWAT (Figura 4.15D). Así mismo, la reciente identificación de CCN2 como requisito para la diferenciación de miofibroblastos dérmicos (Tsang *et al.*, 2020), destaca el efecto de la pérdida de celularidad dérmica mostrada en nuestros resultados (Figura 4.15E).

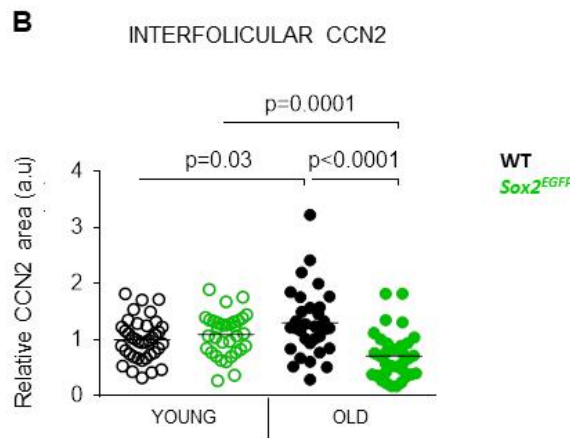
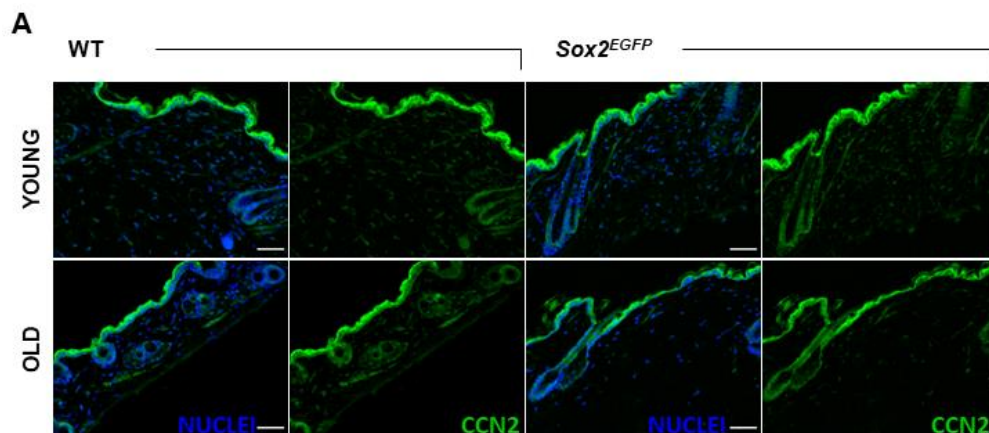


Figura 4.19 La cantidad de CCN2 dérmico cambia con la edad y está alterada en la piel  $Sox2^{EGFP}$ . (A) Imágenes representativas de IF de cortes congelados de piel dorsal *young* y *old* de ratones wt y  $Sox2^{EGFP}$ , con marcaje para CCN2 (verde) y núcleos (azul). Escala 50  $\mu$ m. (B) Cuantificación del área interfolicular CCN2+ en función de un área constante. Se expresa en unidades arbitrarias (a.u) relativas al área promedio CCN2+ del grupo *young* wt considerado como control (n=32-38 campos aleatorios).

Por su parte, la localización dérmica de POSTN se encontró en nichos diferentes con respecto a CCN2. En las pieles de ambos genotipos y edades, se encontró que la proteína POSTN se expresa particularmente en la región intersticial del dWAT (Figura 4.20A), en la dermis papilar y alrededor de los HF (Figura 4.20B), siendo evidente su localización extracelular. Al cuantificar la cantidad relativa de proteína en los diferentes compartimientos, se observó que en el dWAT de pieles  $Sox2^{EGFP}$  hay una disminución con el envejecimiento (*old* vs *young*) del área extracelular POSTN+ (Figura 4.20A'); mientras que tanto en la dermis papilar (Figura 4.20B') como en los HF (Figura 4.20B'') hay un aumento de ésta, siendo además significativamente mayor en comparación con las pieles wt. La acumulación diferencial de POSTN en las pieles wt y  $Sox2^{EGFP}$  envejecidas (*old*) parece ser un efecto a nivel proteico, si bien los niveles de expresión génica disminuyen con el envejecimiento, independientemente del genotipo (Figura 4.20C).

Estos resultados muestran que las alteraciones o modificaciones presentes en la estructura de la ECM dérmica son de alguna forma genotipo- dependientes, e indirectamente están vinculados a la actividad de los linajes celulares adiposo y fibroblástico. En este sentido, las células SOX2+ tienen un efecto paracrino sobre tipos celulares mesenquimales para promover su diferenciación hacia diferentes linajes, según sea requerido (Johnston *et al.*, 2016). La comunicación paracrina de las células SOX2+ está mediada, en parte, por Oncostatina M (OSM); de hecho, al evaluar los niveles de expresión génica de OSM (Figura 4.21A) y su receptor OSMR (Figura 4.21B), se observan diferencias dependientes del genotipo. Con el envejecimiento (*young* vs *old*), hay una disminución en la expresión génica de OSM/OSMR en pieles wt, mientras que hay un incremento en las pieles  $Sox2^{EGFP}$ .

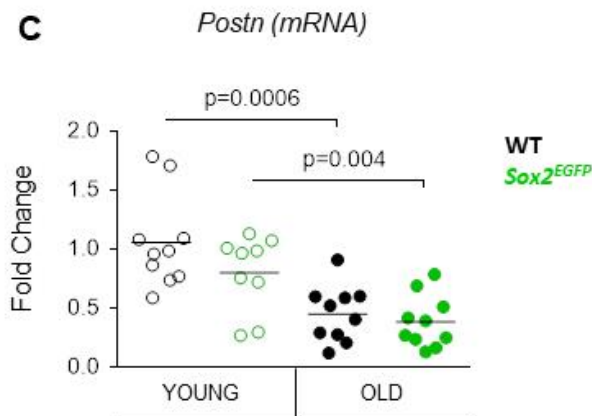
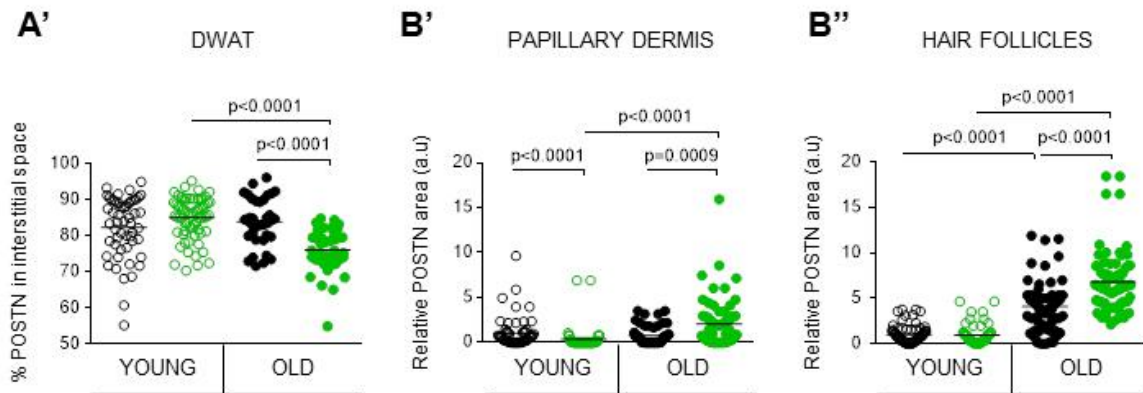
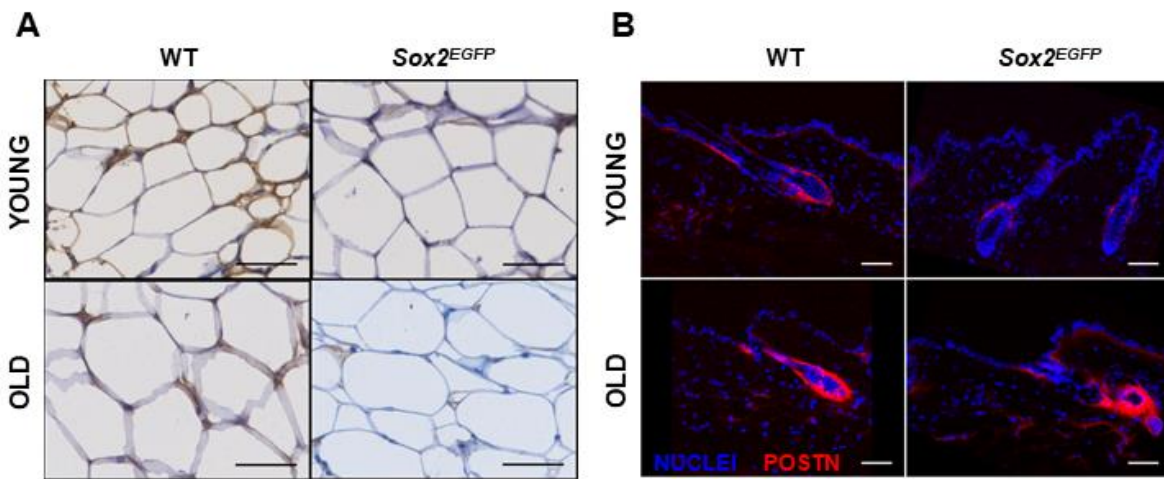


Figura 4.20 Con la edad y la heterocigosis de *Sox2*, POSTN se acumula de forma específica en distintos nichos dérmicos. (A) Imágenes del dWAT en secciones de piel dorsal *young* y *old* de ratones wt y *Sox2*<sup>EGFP</sup>, teñidas mediante IHQ para hematoxilina y POSTN. Se observa el tejido POSTN+ (marrón) y el tejido adiposo intersticial POSTN- (azul). Escala 50  $\mu$ m. (A') Porcentaje (%) del área POSTN+ relativa al tejido total intersticial en el dWAT (n=37-66 campos aleatorios). (B) Imágenes de IF representativas de cortes de piel congelados, con marcaje para POSTN (rojo) y núcleos (azul). Escala 50  $\mu$ m. En las imágenes se cuantificó el área POSTN+ en (B') la dermis papilar y

(B'') alrededor de los folículos pilosos. El área positiva se muestra en unidades arbitrarias (a.u) relativa al promedio del grupo control *young wt* (B' n=51-70; B'' n=57-73 campos aleatorios. N=3 wt y N=4 *Sox2<sup>EGFP</sup>*, *young* y *old*). (C) Cuantificación de los niveles de expresión (mRNA) de *Postn* en piel total. La expresión se normalizó frente a *Tbp* como gen endógeno, y es relativa (*fold change*) a la media del grupo control *young wt* (N=10, excepto en *young Sox2<sup>EGFP</sup>* donde N=9).

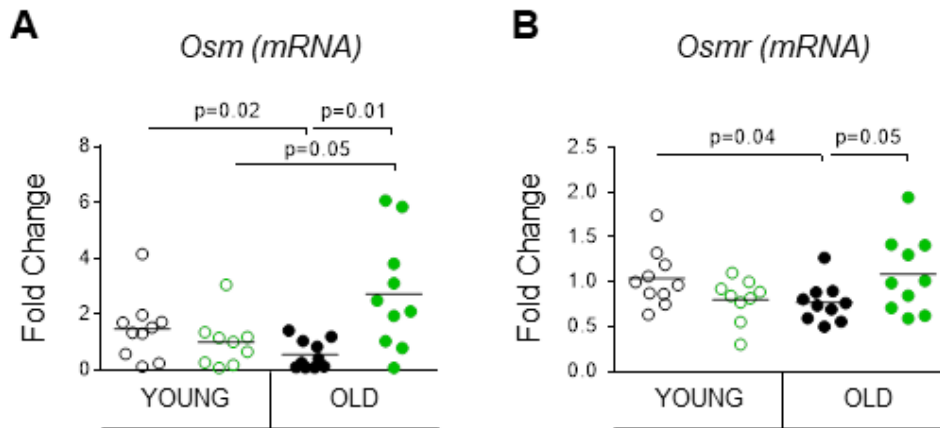


Figura 4.21 La ruta de señalización mediada por Osm/Osmr podría estar alterada frente al envejecimiento y heterocigosis de *Sox2*. Cuantificación de la expresión relativa (mRNA) de (A) *Osm* y (B) *Osmr* en piel total. La expresión de los genes de interés se normalizó respecto a dos genes endógenos (*Tbp* y *Hprt*) y la expresión es relativa (*fold change*) a la media del grupo control *young wt* (N=10, excepto en *young Sox2<sup>EGFP</sup>* donde N=9).

En conjunto, los resultados obtenidos plantean un papel clave de *Sox2* en la homeostasis cutánea a varios niveles. Por un lado, el envejecimiento dérmico prematuro, según aspectos histomorfológicos (Figura 4.15) y estructurales (Figura 4.17 y Figura 4.18) de la piel en animales *Sox2<sup>EGFP</sup>*, sugiere que la función de las células dérmicas/precursoras *Sox2+* se encuentra *upstream* (aguas arriba) de los eventos que regulan la deposición de la ECM. Por otro lado, el patrón diferencial genotipo-dependiente entre el envejecimiento de las pieles wt y las pieles *Sox2<sup>EGFP</sup>*, con respecto a proteínas matricelulares, en conjunto con las alteraciones del tejido adiposo, podrían indicar un desbalance entre la diferenciación y funcionalidad celular de los linajes fibroblásticos y adiposos, que podría estar mediado por *Sox2*.



## 5. DISCUSIÓN

---



En España, se espera que en el año 2068 un ~30% de la población sea mayor de 65 años, en comparación con el ~20% de la población actual de personas mayores (Abellán *et al.*, 2019). La mortalidad y morbilidad asociadas al envejecimiento son de especial interés social; de hecho, en los últimos años ha habido un incremento en la publicación de artículos científicos relacionados con la gerociencia, que pone de manifiesto la necesidad de entender el proceso y los mecanismos asociados al envejecimiento, para instaurar políticas de salud adecuadas.

La gerociencia es una rama biológica en pleno auge, cuyo postulado es el envejecimiento como factor de riesgo predominante para el desarrollo de enfermedades crónicas que normalmente se presentan asociadas a la edad avanzada, y que en última instancia afectan tanto a la calidad como a la expectativa de vida. La gerociencia se basa en una visión integrativa de siete pilares fundamentales: epigenética, inflamación, adaptación al estrés, proteostasis, células madre y regeneración, metabolismo y daño macromolecular (Kennedy *et al.*, 2014). Estos pilares abarcan procesos biológicos que están afectados con la edad y que, además de interconectados, son causantes de numerosas enfermedades. Los procesos biológicos contemplados incluyen la inestabilidad genómica, el acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, desregulación de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia, agotamiento de células madre, y alteración en la comunicación intercelular (Lopez-Otin *et al.*, 2013).

El objetivo de ahondar en los mecanismos que controlan estos procesos, es diseñar protocolos de intervención, para mejorar la calidad de vida; así, de las intervenciones donde se ha reportado un incremento en la esperanza de vida, se ha logrado prevenir o retrasar la pérdida de funcionalidad tisular y la aparición de enfermedades crónicas que se asocian a la edad (Kennedy *et al.*, 2014).

Durante el envejecimiento de la piel ocurren profundos cambios, a los cuales subyace la pérdida del potencial regenerativo tisular, como consecuencia de alteraciones funcionales en las células madre o precursoras residentes en la piel. Considerando la interrelación entre los pilares del envejecimiento, la disfuncionalidad de las células



madre/precursoras también podría considerarse una consecuencia de alteraciones genéticas y del microambiente que alberga a las células.

Teniendo en cuenta la gran heterogeneidad que exhibe la piel como tejido, no es de extrañar las numerosas poblaciones de células madre que se han descrito (Ghazizadeh & Taichman, 2001; Toma *et al.*, 2001; Levy *et al.*, 2005; Uchugonova *et al.*, 2011). Entre éstas, las células dérmicas con expresión de *Sox2* han demostrado tener capacidad regenerativa (Biernaskie *et al.*, 2007; Biernaskie *et al.*, 2009; Johnston *et al.*, 2013; Krause *et al.*, 2014; Johnston *et al.*, 2016; Agabalyan *et al.*, 2017; Carr *et al.*, 2019). La importancia de *Sox2* no está limitada al tejido dérmico, de hecho en la dermis son una minoría las células que expresan este factor de transcripción (Agabalyan *et al.*, 2016; Iribar *et al.*, 2017; Morikawa *et al.*, 2019), el cual es clave para la reprogramación celular *ex vivo* (Takahashi & Yamanaka, 2006) y ampliamente aceptado como un regulador de la multipotencialidad celular (Arnold *et al.*, 2011), desempeñando un papel importante en la homeostasis tisular.

Este trabajo está centrado en el pilar de células madre y regeneración tisular en el contexto del envejecimiento; mediante diversas estrategias, se abordó cómo afecta el envejecimiento cronológico a la población de células precursoras dérmicas *Sox2+*, en términos de agotamiento y funcionalidad. Además, considerando que: i) con la edad se ha reportado una disminución en los niveles de expresión de *Sox2* en distintos tejidos (Carrasco-García *et al.*, 2019) y ii) los efectos de *Sox2* son dosis-dependientes (Taranova *et al.*, 2006), se evaluó el animal heterocigoto  $Sox2^{EGFP}$  como posible modelo de envejecimiento cutáneo prematuro. El modelo animal  $Sox2^{EGFP}$  por un lado supone una herramienta que permite trazar las poblaciones celulares con expresión de *Sox2*, para evaluar su comportamiento y cambios asociados durante el proceso de envejecimiento. Por otro lado, la heterocigosis propia del modelo transgénico podría suponer alteraciones dérmicas como consecuencia de cambios en la dosis de SOX2 (Taranova *et al.*, 2006).

## 5.1 Con la edad hay alteraciones en la inervación y microvasculatura cutánea, sin afectar la localización de las células precursoras dérmicas.

Con el envejecimiento la homeostasis dérmica está alterada en diversos aspectos: el flujo sanguíneo cutáneo se reduce (Tsuchida, 1993), así como también la densidad vascular (Bentov & Reed, 2015) afectando el transporte de nutrientes y productos metabólicos; por otro lado, la densidad nerviosa y los receptores sensoriales se reducen por la degeneración progresiva de los nervios periféricos (Lauria *et al.*, 1999; Verdu *et al.*, 2000; Besné *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2004; Collongues *et al.*, 2018) afectando la capacidad sensorial y cicatricial (Cheret *et al.*, 2013; Laverdet *et al.*, 2015). De hecho, la cronicidad de las heridas cutáneas presenta elevada incidencia en este grupo poblacional (Gould *et al.*, 2015).

En concordancia con esto, y con cautela en la extrapolación de observaciones entre diferentes especies animales, nuestros resultados demuestran que la densidad nerviosa y vascular también se ve disminuida con la edad en la piel del ratón C57BL/6J. La disminución observada en la densidad de los complejos lanceolados inervando el folículo piloso probablemente se deba a una disminución en la densidad folicular. No obstante, en otros modelos animales se ha visto que la ablación de las células gliales terminales en los complejos lanceolados, provoca la retracción y degeneración de las fibras nerviosas periféricas foliculares (Li & Ginty, 2014); por lo que la alteración observada en los complejos lanceolados con la edad, también podría ser consecuencia de una pérdida específica de las células de Schwann terminales que envuelven estos complejos. Al respecto, con el envejecimiento no se observó ausencia de células terminales  $SOX2^{EGFP+}$  en los complejos lanceolados de los folículos pilosos.

En el ser humano adulto, las células dérmicas precursoras  $SOX2+$  pertenecen al linaje glial (células de Schwann) y perivascular (Etxaniz *et al.*, 2014), asociándose a las estructuras nerviosas y vasculares cutáneas, respectivamente. En la piel ventral de animales jóvenes  $Sox2^{EGFP}$ , se ha descrito que las células  $EGFP+$  están asociadas a los nervios periféricos, al plexo nervioso subepidérmico, a los complejos lanceolados de los folículos pilosos, y a algunas papilas dérmicas (Johnston *et al.*, 2013; Iribar *et al.*, 2017). Nuestros resultados son coincidentes con estas localizaciones, y de manera importante la asociación de las células

EGFP+ a tales nichos no cambia con el envejecimiento, e incluso mantienen la expresión de los marcadores (NES, P75NTR y S100) que definen a las células precursoras derivadas de la cresta neural (Johnston *et al.*, 2013). Aunque en algunos casos se detectaron células EGFP+ con localización adyacente al nicho vascular, es necesaria la evaluación de marcadores perivasculares, como  $\alpha$ -SMA, NG2, PDGFR $\beta$  (Morikawa & Ezaki, 2011; Goncharov *et al.*, 2017) que puedan confirmar su identidad y ubicación.

Recientemente se ha descrito una subpoblación de células gliales especializadas que median el proceso nociceptivo. Se ubican en la unión dermo-epidérmica y penetran la epidermis envolviendo los terminales nerviosos aferentes, involucrados en la percepción de estímulos nocivos térmicos y mecánicos; esta subpoblación glial es *Plp1+*, *Sox10+*, *S100+* y *Sox2-* (Abdo *et al.*, 2019). En este trabajo, se encontró de manera recurrente células EGFP+ en la piel dorsal de animales *Sox2<sup>EGFP</sup>*, coincidentes con las células de Schwann nociceptivas en términos de morfología, ubicación y expresión de marcadores gliales. Ya que las células de Schwann nociceptivas son de reciente caracterización (Abdo *et al.*, 2019) y con el envejecimiento el umbral de detección de los estímulos nociceptivos se incrementa (Gibson & Farrell, 2004), sería de especial interés evaluar los cambios con la edad en esta subpoblación celular.

5.2 Con el envejecimiento hay una reducción del número de células precursoras dérmicas y una posible alteración de la plasticidad celular *in vitro* mediada por *Sox2*.

La alteración de los compartimientos nervioso, vascular y folicular con la edad podría conllevar una reducción en el número de células que los componen, incluyendo células madre/precursoras residentes en el tejido; los datos de este trabajo muestran que con el envejecimiento efectivamente se reduce en número la población de células precursoras dérmicas *Sox2<sup>EGFP</sup>+*, tanto en tejido fresco como *in vitro*. La capacidad esferogénica en cultivos en suspensión, es una buena herramienta para comprobar cualitativamente la cantidad de células con propiedad madre/precursora en el tejido (Pastrana *et al.*, 2011),

aunque con ciertas consideraciones. Tradicionalmente, los ensayos esferogénicos, en particular de neuroesferas, se han usado como *readout* del número de células madre que hay *in vivo*, en base a la falsa suposición de que cada esfera deriva de una célula madre con capacidad clonal (Pastrana *et al.*, 2011). No obstante, la capacidad esferogénica *in vitro* se debe interpretar como el potencial que retienen las células para comportarse como célula madre/precursora una vez que son aisladas de su nicho *in vivo* (plasticidad celular); y el número de esferas generadas no debe extrapolarse fielmente al número inicial de células madre que residían en el tejido.

Tanto en humano (Gago *et al.*, 2009) como en ratón (resultados de este trabajo), con el envejecimiento disminuye la capacidad para establecer dermoesferas en cultivo, sugiriendo alteraciones en la plasticidad celular. A su vez, la pérdida del potencial esferogénico parece estar influenciada por la heterocigosis de *Sox2*, aún en edades jóvenes. Tal como se ha visto en humano y en ratón, la severidad de los fenotipos de anoftalmia y microftalmia, así como la proliferación y diferenciación de las células precursoras de la retina, son dependientes de la dosis de SOX2 (Fantes *et al.*, 2003; Hagstrom *et al.*, 2005; Taranova *et al.*, 2006). Por otro lado, la dediferenciación de las células de Schwann constituye una de las fuentes de origen de las células precursoras dérmicas en cultivo (Etxaniz *et al.*, 2014) y esta plasticidad también está regulada por la expresión de *Sox2* (Parrinello *et al.*, 2010; Boerboom *et al.*, 2017). Otros autores han reportado una reducción del 50% en la cantidad de proteína SOX2 en embriones del modelo heterocigoto *Sox2<sup>EGFP</sup>* con respecto a los animales *Sox2<sup>+/+</sup>* (Taranova *et al.*, 2006), por lo que las alteraciones en la capacidad esferogénica podrían ser consecuencia de la dosis de SOX2 y acentuarse con el envejecimiento. El análisis a nivel transcripcional y proteico de *Sox2* con la edad reforzaría esta hipótesis. De forma importante, el porcentaje de biopsias cuyas células retienen plasticidad suficiente con el envejecimiento para formar dermoesferas, son aquellas que se utilizaron para análisis posteriores, representando una ventaja intrínseca sobre aquellas pieles de las que no se logró establecer cultivos.

El aislamiento de las células precursoras dérmicas con capacidad multipotente, está basado en la misma estrategia de obtención que se utiliza para las células madre neurales

de la zona subventricular (SVZ) del cerebro (Toma *et al.*, 2001). En la SVZ, las células madre que se encuentran quiescentes *in vivo*, no responden a las señales del cultivo para dividirse y formar neuroesferas (Pastrana *et al.*, 2009), y el tamaño alcanzado por éstas es un reflejo de la capacidad de respuesta a los factores de crecimiento del medio, más que al estadio precursor en el cual se encuentran (Pastrana *et al.*, 2011). En este sentido, las células aisladas de animales jóvenes responden a los factores de crecimiento del cultivo, formando dermoesferas de gran tamaño (>200  $\mu\text{m}$ ), mientras que esta capacidad se ve menguada en el envejecimiento y con la heterocigosis de *Sox2*. De forma interesante, las dermoesferas en esta cepa responden de manera diferente al envejecimiento, si bien en esta condición son capaces de alcanzar tamaños similares a su contraparte wt. En conjunto, esto sugiere que en respuesta a los factores externos del medio, podría haber alteraciones en la proliferación celular que favorezcan el establecimiento de los cultivos provenientes de algunos individuos envejecidos.

De hecho, la inducción *in vivo* de la fase anágena de los HF en animales envejecidos y la consecuente expresión de EGFP en algunas DPs, indica que en ciertos contextos se preserva la potencialidad celular con la edad. En el adulto, sólo las DP de los HF *guardyawl auchene* son SOX2+ (Driskell *et al.*, 2009), mientras que durante la fase anágena hay una re-expresión de *Sox2* en las DPs de todos los HF (Biernaskie *et al.*, 2009); además, las células SOX2+ retienen la capacidad de migrar al nicho folicular e inducir el crecimiento de la fibra capilar en respuesta al trasplante seriado (Biernaskie *et al.*, 2009). En este sentido, sería necesario evaluar la proporción de DP por tipo de HF que retienen SOX2 a lo largo del proceso de envejecimiento, o que tienen la capacidad de inducirlo en respuesta a estímulos externos.

### 5.3 Alteraciones en las rutas de senescencia en las células precursoras dérmicas con el envejecimiento.

El envejecimiento y la senescencia son procesos que han sido ampliamente relacionados (Lopez-Otin *et al.*, 2013); de hecho, en la dermis humana hay una

acumulación con la edad de células senescentes  $\beta$ -galactosidasa+ que expresan p16<sup>INK4a</sup> (Brun *et al.*, 2016a). Las rutas que se activan en respuesta a distintos estímulos de daño celular, están mediadas por el supresor tumoral p53 (*Tumor protein p53*) y por los inhibidores del ciclo celular p21, p16, p15 y p27; la regulación del ciclo celular por éstos es clave en los procesos regenerativos (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Munoz-Espin & Serrano, 2014); por un lado, en un modelo animal mutante de p53 se genera un envejecimiento sistémico prematuro, incluida la piel, posiblemente por el agotamiento de las células madre mediante hiper-proliferación (Tyner *et al.*, 2002); mientras que la expresión sostenida de p21 en heridas cutáneas en personas mayores, evita la proliferación de los tipos celulares que favorecen la cicatrización (Jiang *et al.*, 2020). El aumento de p21 y la consecuente disminución proliferativa con la edad y con el tiempo de cultivo *in vitro*, en las células precursoras dérmicas murinas refuerzan estas evidencias, al menos en lo referido a las rutas dependientes de p53.

Así mismo, en cultivos de células precursoras dérmicas humanas la senescencia se ha relacionado con un déficit de p27<sup>Kip1</sup> y p15<sup>INK4b</sup> (Liu *et al.*, 2011b; Liu *et al.*, 2015). Ambos inhibidores funcionan de forma independiente a p53 (Munoz-Espin & Serrano, 2014). En este sentido, nuestros resultados apuntan a que el control de la senescencia *in vitro* de las células precursoras dérmicas de ratón no es dependiente de p53, si bien tanto a nivel transcripcional como proteico los niveles de *Cdkn1b* y de p27 nuclear, respectivamente, están disminuidos con la edad y el tiempo de cultivo. En línea con esto, la deficiencia en la isoforma TA de la proteína p63 (TAp63), perteneciente a la familia de p53, no afecta la expresión génica de p27 (Su *et al.*, 2009).

Aunque la principal función de p27 es el control del ciclo celular, también está involucrado en otros procesos (Hnit *et al.*, 2015). Por un lado, en distintos tipos de cáncer ocurre una inactivación de p27 a nivel proteico, sobretodo el de localización nuclear, y su baja expresión está asociada con la agresividad del cáncer y baja prognosis (Chu *et al.*, 2008); mientras que el modelo animal nulo de p27 presenta mayor formación tumoral (Fero *et al.*, 1996). Por otro lado, en diferentes contextos se ha reportado que p27

promueve la diferenciación neuronal (Bahrami *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2010) de manera independiente a su papel en el ciclo celular (Nguyen *et al.*, 2006).

En este sentido nuestros resultados podrían indicar un papel de p27 con la edad, en el control de la diferenciación de precursores dérmicos, no descrito hasta el momento. De hecho, la inhibición a nivel transcripcional (Hnit *et al.*, 2015) y proteico (Bretones *et al.*, 2011) de p27 está controlada por el factor de transcripción MYC (*v-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*) que, en conjunto con SOX2, es clave para el mantenimiento de la pluripotencia (Takahashi & Yamanaka, 2006). Sorprendentemente, las células precursoras dérmicas presentaron una mayor expresión *in vitro* de *Sox2* con la edad, así como también, una diferenciación neural alterada. SOX2 y MYC se regulan entre sí en distintos contextos (Roy *et al.*, 2011). Por un lado, la expresión de MYC es controlada por SOX2 en células madre mesenquimales humanas (Park *et al.*, 2012); mientras que en una subpoblación tumoral quimio-resistente de linfoma no-Hodgkin, MYC puede regular la actividad transcripcional de *SOX2* (Wu *et al.*, 2016). En ambos casos, el tipo de retroalimentación es positiva y mediada por distintos mecanismos.

Sería de especial interés evaluar cómo varían con la edad los niveles de expresión de MYC en cultivos de células precursoras dérmicas, y explorar un posible eje regulatorio MYC/SOX2/p27 sobre la diferenciación neural. En caso de ser así, se debe contemplar que este mecanismo sea dependiente del tejido y del tipo celular, si bien en el epitelio sensorial auditivo, SOX2 activa la transcripción de *Cdkn1b* en células post-mitóticas (Liu *et al.*, 2012). Mientras que en las células horizontales basales del epitelio sensorial olfatorio, en respuesta a un proceso de inflamación crónica se sobreexpresa *Sox2* y *Myc* regulando el mantenimiento de un estadio celular indiferenciado (Chen *et al.*, 2019).

Considerando que sólo aquellos cultivos exitosos han sido evaluados, de ser extrapolable esta situación al contexto *in vivo*, con la edad estaría comprometido no sólo el potencial regenerativo del tejido, sino también la susceptibilidad tumoral y la acumulación de células senescentes, por mecanismos independientes entre sí.

5.4 Con la edad, los cambios proliferativos conllevan al desequilibrio entre las poblaciones celulares con diferentes niveles de *Sox2*, afectando su potencialidad y funcionalidad.

Las células precursoras dérmicas tienen numerosas aplicaciones potenciales en terapias regenerativas (Agabalyan *et al.*, 2017) y para ello es de vital importancia su mantenimiento y enriquecimiento en cultivo *in vitro*. Nuestros resultados muestran que no sólo la proliferación celular disminuye a lo largo del tiempo en cultivo, sino también con la edad, en concordancia con lo reportado en células precursoras dérmicas humanas (Gago *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011b; Liu *et al.*, 2015). Sin embargo, las dermoesferas en cultivo son una mezcla heterogénea de células que se encuentran en varias etapas de diferenciación (Agabalyan *et al.*, 2017) y posiblemente en estadios celulares alternativos cuya potencialidad está mediada por SOX2, tal como ha sido propuesto con las células precursoras neurales humanas derivadas de piel (Etxaniz *et al.*, 2014), de ahí la importancia de caracterizar qué tipos celulares son responsables de la disminución en la capacidad proliferativa *in vitro*.

En línea con lo reportado previamente (Iribar *et al.*, 2017), en cultivos esferogénicos de piel joven se detectaron tres poblaciones celulares que difieren en sus niveles de expresión de *Sox2*, siendo posible el trazado de cada una de ellas, y que además también están presentes en piel envejecida. Sin embargo, nuestros resultados muestran que estas poblaciones celulares están afectadas diferencialmente con la edad, perdiéndose la población con mayores niveles de *Sox2*, a la cual se le atribuye una mayor capacidad precursora y un compromiso hacia el linaje neural (Etxaniz *et al.*, 2014); mientras que aquella con menores niveles de *Sox2* parece preservarse o enriquecerse con el envejecimiento, al menos *in vitro*. De manera importante, el desequilibrio que ocurre en estas poblaciones se deriva de alteraciones en la proliferación celular, tanto con la edad como con el tiempo de cultivo.

El balance entre la proliferación y la diferenciación de las células madre/precursoras residentes en el tejido, determina el comportamiento general de la población celular



responsable de mantener la renovación celular a lo largo del tiempo (Simons & Clevers, 2011). Si bien la proliferación es generalmente asociada con una capacidad pro-regenerativa, no en todas las circunstancias una mayor proliferación es sinónimo de ventaja (Lambrou & Remboutsika, 2014). De hecho, las células SOX2+ de la DP son poco proliferativas, pero al ser trasplantadas son las que contribuyen en mayor medida a la tricogenicidad (Driskell *et al.*, 2009). De forma importante, el nicho donde se localizan las células tiene un papel crucial, si bien *in vitro* las células SOX2+/CD133+ de la DP tienen una mayor proliferación que la observada *in vivo* (Driskell *et al.*, 2009). Además, una proliferación elevada y sostenida afecta al *pool* de células madre/precursoras promoviendo su agotamiento (Lopez-Otin *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2014). Nuestras observaciones apuntan en favor del agotamiento en el *pool* de células madre/precursoras dérmicas, como consecuencia de la proliferación diferencial entre las poblaciones con distintos niveles de expresión de *Sox2*; más aún, sería de especial interés evaluar en el tejido *in vivo*, durante el proceso de envejecimiento, la proliferación de las diferentes poblaciones celulares que expresan *Sox2*.

Las células precursoras *Sox2+* están involucradas en la cicatrización cutánea, y la depleción de células *Sox2+* durante el período de cicatrización disminuye la capacidad regenerativa del tejido. Además, durante el cierre de heridas las células asociadas a los nervios cutáneos se desdiferencian sobreexpresando *Sox2* y migran al lecho de la herida (Johnston *et al.*, 2013). De ser extrapolables, nuestros resultados plantean que la pérdida del potencial regenerativo que ocurre con el envejecimiento proviene no sólo de la disminución en el número de células precursoras, sino también de alteraciones en la capacidad proliferativa que generan un desequilibrio entre estadios celulares alternativos, cuyo compromiso de linaje y potencial de (des)diferenciación es regulado por *Sox2*.

En línea con esto, otros autores han demostrado que las células precursoras dérmicas tienen capacidad de diferenciarse *in vitro* a neuronas, glia, células de músculo liso y adipocitos (Toma *et al.*, 2001); de entre éstos, llama la atención que la capacidad de diferenciación se presenta hacia dos tipos de linajes: el neural y el mesodérmico. Si bien la población celular que expresa altos niveles de *Sox2* es responsable de la diferenciación

neural, el potencial mesodérmico proviene de las poblaciones con niveles bajos de expresión de *Sox2* (Etxaniz *et al.*, 2014). Más aún, en el individuo adulto las células precursoras dérmicas son capaces de integrarse al compartimiento adiposo, folicular e interfolicular tras el trasplante, diferenciándose a algunos de los tipos celulares que los componen (Biernaskie *et al.*, 2009). Con el envejecimiento, el desequilibrio producido entre las distintas poblaciones *Sox2*<sup>+</sup> implicaría una pérdida del potencial neural y el mantenimiento, o incluso incremento, del potencial de diferenciación hacia tipos celulares mesodérmicos. De hecho, nuestros resultados apuntan en tal dirección. Cabe acotar que el potencial mesodérmico evaluado a través del número de células  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> refleja estadios miofibroblásticos más que la diferenciación hacia tipos celulares específicos (Baum & Duffy, 2011).

De forma interesante, con la edad se adquiere un mayor compromiso adiposo, al menos *in vitro*, que se presenta desde edades tempranas en respuesta a la heterocigosis de *Sox2*; más aún, la capacidad de respuesta a la diferenciación adiposa parece agotarse en los animales *SOX2*<sup>EGFP</sup>. En línea con esto, recientemente se ha descrito que con el envejecimiento los fibroblastos dérmicos adquieren características adipogénicas que afectan su identidad celular (Salzer *et al.*, 2018). Por un lado, es posible que tipos celulares fibroblásticos formen parte del potencial de diferenciación adiposa del tejido; por otro lado, considerando que durante el desarrollo embrionario un precursor *Sox2*<sup>+</sup> da lugar a los fibroblastos reticulares y a los adipocitos del dWAT (Driskell *et al.*, 2013), se plantea que tanto la heterocigosis de *Sox2* como el envejecimiento puedan afectar el balance entre la diferenciación fibroblástica/adiposa. Esta situación podría ser especie dependiente, si bien con el envejecimiento intrínseco los fibroblastos dérmicos humanos no exhiben capacidad adipogénica con la edad (Brun *et al.*, 2016b), expresan genes típicos de tejidos más rígidos que la dermis, como los tendones y el cartílago. Así, la adquisición con la edad de características fenotípicas de otros linajes celulares podría estar también afectada por las fuerzas mecánicas propias de cada tejido (Haydont *et al.*, 2019b).

5.5 En el modelo  $Sox2^{EGFP}$  hay un desequilibrio en el compromiso de linaje que conlleva a alteraciones dérmicas estructurales.

Con el envejecimiento, bien sea extrínseco o intrínseco, ocurren profundos cambios en la piel; aunque los mecanismos involucrados difieren, todos ellos convergen en la reducción del grosor de todas las capas de la piel, la pérdida de celularidad y alteraciones de la matriz extracelular (Farage *et al.*, 2010). Nuestros resultados demuestran que la heterocigosis de  $Sox2$  acentúa estos cambios, en algunos casos incluso desde edades tempranas. De manera interesante, y en línea con los resultados *in vitro*, las alteraciones más acusadas se detectaron en el compartimiento adiposo y en la celularidad dérmica, representada por fibroblastos responsables de la síntesis de la matriz extracelular (Sorrell & Caplan, 2004).

Además de proveer el soporte necesario al tejido, la ECM juega un papel clave en la comunicación intercelular y en la señalización y mantenimiento del nicho donde se alojan las células madre/precursoras (Gattazzo *et al.*, 2014). En la piel de los animales  $SOX2^{EGFP}$  están afectados al menos dos de los componentes principales de la ECM: las fibras elásticas y el colágeno; cuyos cambios no han sido descritos anteriormente en este modelo. Las modificaciones postraduccionales y la degradación proteica de la ECM durante el proceso de envejecimiento, ocurren como consecuencia de una menor funcionalidad fibroblástica para secretar proteínas estructurales, y una mayor actividad de degradación, a través de metaloproteinasas secretadas por distintos tipos celulares en la piel (Quan & Fisher, 2015). Sin embargo, la presencia de estas alteraciones desde edades jóvenes en el modelo  $Sox2^{EGFP}$ , plantea que la dosis de  $Sox2$  tiene un efecto regulatorio *upstream* bien en términos de secreción o de degradación de la ECM. Tanto la pérdida de la funcionalidad fibroblástica como los cambios en la ECM con el envejecimiento, pueden tener mecanismos moleculares sumamente complejos e interrelacionados. De hecho, cualquier alteración en la ECM puede afectar el núcleo de los fibroblastos a través del llamado "esqueleto tisular" que comprende no sólo la matriz, sino también el citoesqueleto y el nucleoesqueleto, pudiendo afectar en última instancia la expresión génica (Haydont *et al.*, 2019b).

El incremento del dWAT con la edad y una concomitante disminución de la celularidad y de la capacidad fibroblástica, manifiestan *in vivo* el posible desequilibrio en el compromiso de linaje celular de precursores *Sox2*<sup>+</sup> durante el envejecimiento. Estos linajes celulares están relacionados desde el desarrollo embrionario (Driskell *et al.*, 2013), e incluso la transición miofibroblástica-adiposa en el lecho de heridas es uno de los pocos ejemplos de transdiferenciación espontánea que existen en vertebrados (Plikus *et al.*, 2017). Además, con la edad se ha reportado que los fibroblastos pueden adquirir características fenotípicas y funcionales de otros tipos celulares, mediante la pérdida de su propia identidad celular. En el ratón, los fibroblastos dérmicos envejecidos tienen un transcriptoma semejante a los fibroblastos reticulares pro-adipogénicos de animales neonatos; mientras que la expresión del marcador PPAR $\gamma$  pierde su restricción adipogénica y se detecta en células fibroblásticas (Salzer *et al.*, 2018). Aunque no explícitamente atribuido a una pérdida de identidad, en humano se ha visto que con la edad los grupos de fibroblastos funcionalmente diferentes dejan de ser clasificables en base a su firma transcriptómica, y además pierden contacto con otros tipos celulares en la piel (Solé-Boldo *et al.*, 2019). No obstante, aunque la funcionalidad fibroblástica sea adecuada, se ha visto que un incremento del tejido adiposo promueve la degradación de las fibras elásticas a través de la secreción de MMP9 (Ezure & Amano, 2015), mientras que *Sox2* tiene funciones inhibitorias en la diferenciación adiposa de células madre mesenquimales humanas (Schonitzer *et al.*, 2014).

Las proteínas matricelulares POSTN y CCN2 han sido relacionadas al envejecimiento en diferentes contextos. POSTN se encuentra principalmente en tejidos conectivos colagenosos, donde regula la estabilización de las fibras de colágeno a través de la activación de la enzima LOX (*lysyl oxidase*), necesaria para el entrecruzamiento de las fibras (Norris *et al.*, 2007; Maruhashi *et al.*, 2010). Durante el envejecimiento, hay una disminución de POSTN tanto en tejido adiposo (Graja *et al.*, 2018), como en piel; en ésta, el déficit de POSTN causa mayor susceptibilidad del colágeno a la degradación por MMPs (Egbert *et al.*, 2014). CCN2 está relacionada con la síntesis de colágeno; durante el envejecimiento una menor activación de los fibroblastos, mediada por TGF $\beta$ , resulta en la disminución de CCN2 y en menor actividad transcripcional de pro-colágeno tipo I (Quan *et al.*, 2010); mientras que en el cartílago CCN2 tiene un efecto anti-envejecimiento (Itoh *et al.*, 2013). La

sobreexpresión de POSTN y CCN2 está asociada a procesos fibróticos, mientras que la disminución de POSTN y CCN2 está asociada al déficit en la cicatrización de la piel mediado por TGF $\beta$ , regulando entre otros procesos la diferenciación de miofibroblastos (Elliott *et al.*, 2012; Elliott *et al.*, 2015; Elliott *et al.*, 2019). De hecho, la depleción específica de CCN2 en SKPs de ratón, caracterizados por la expresión de *Sox2*, previene la diferenciación hacia el linaje fibroblástico pero no hacia rutas adiposas o neurales (Tsang *et al.*, 2020). En línea con esto, y tal como sucede en heridas (Elliott *et al.*, 2019), nuestros resultados plantean que ambas proteínas matricelulares podrían mediar el balance entre la diferenciación adipogénica y un fenotipo pro-fibrótico por parte de las células precursoras residentes en el tejido.

Por otro lado, oncostatina M (OSM) es una citoquina perteneciente a la familia de interleukina 6 (Il-6) que media la respuesta inflamatoria y los procesos fibróticos en distintos tejidos (Stawski & Trojanowska, 2019). De hecho en la piel, tanto OSM como su receptor (OSMR), están elevados a nivel transcripcional en condiciones patológicas, como la psoriasis y la dermatitis atópica (Boniface *et al.*, 2007). Nuestros resultados plantean que el aumento del dWAT frente a la heterocigosis de *Sox2* podría favorecer un estado inflamatorio del tejido. De hecho, algunos estudios muestran que los adipocitos segregan OSM, aunque esto no es consistente en la literatura (Komori *et al.*, 2013; 2014; Sanchez-Infantes *et al.*, 2014; Elks *et al.*, 2016); sin embargo, OSMR está presente en el tejido adiposo (Sanchez-Infantes *et al.*, 2014; Elks *et al.*, 2016). A pesar de las diferencias funcionales y morfológicas entre el dWAT y otros depósitos grasos (Driskell *et al.*, 2014), se ha descrito un estado pro-inflamatorio en el WAT inguinal y del epidídimo en ratones con depleción de OSMR específicamente en adipocitos (Elks *et al.*, 2016). La elevación de OSM y posiblemente de las rutas de señalización asociadas, podría tener implicaciones sobre la expresión de CCN2, tal como se ha visto en el riñón (Sarkozi *et al.*, 2012), así como también, en la síntesis de proteínas de la ECM (Duncan *et al.*, 1995); por otro lado, OSM es una de las moléculas que ha sido propuesta como mediadora de la comunicación paracrina entre las células de Schwann desdiferenciadas y las células mesenquimales, en procesos tisulares regenerativos (Johnston *et al.*, 2016).

## 5.6 Consideraciones finales

Cuando por factores extrínsecos y/o intrínsecos se altera al menos un componente necesario en la homeostasis del tejido, se afectan en cascada los demás componentes, más aún cuando dicha alteración es persistente o no es reparada. La Figura 5.1 recapitula este concepto, y un ejemplo que ilustra esta idea ha sido descrito recientemente en el HF del ratón. En respuesta al daño en el DNA, las SC residentes en el *bulge* del HF (HFSC, *hair follicle stem cells*) pierden potencial de diferenciación comprometiéndose hacia el linaje epidérmico, abandonan el nicho folicular y causan la miniaturización del HF y de la fibra capilar. Este mecanismo es mediado por la proteólisis del colágeno XVII (COL17A1) que compone los hemidesmosomas (Matsumura *et al.*, 2016). La alteración de las HFSC, en conjunto con la fragilidad dentro del nicho por la alteración del COL17A1, afecta la función de los melanocitos y fibroblastos circundantes promoviendo el envejecimiento de la piel (Liu *et al.*, 2019). Por otro lado, el control de la proliferación y quiescencia es clave en el agotamiento de las SC (Lay *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Aunque *in vivo* el número de HFSC no se ve afectado con la edad, *in vitro* tienen menor proliferación y capacidad formadora de colonias (Giangreco *et al.*, 2008; Doles *et al.*, 2012).



Figura 5.1 Relación entre los componentes que mantienen la homeostasis de la piel. SC: células madre, ECM: matriz extracelular.

El funcionamiento de las SC y su potencial de diferenciación hacia distintos linajes, mantiene el suministro de células dérmicas cuando se necesitan. Las células dérmicas son responsables de la síntesis de ECM que además de estructurar el tejido, retiene factores liberados por todos los tipos celulares de la piel. A través de interacciones célula-ECM y de

los factores retenidos en ésta, la ECM modula mecánica y molecularmente el microambiente donde se localizan las SC, ejerciendo un efecto directo en la proliferación, diferenciación y migración celular. Si cualquiera de estos factores está alterado, bien sea por: reducción del número de células, pérdida de funcionalidad, aumento de senescencia, modificaciones de la ECM, entre otros; se genera un efecto en cadena que afecta la funcionalidad de la piel, produciendo los cambios asociados al envejecimiento (Gattazzo *et al.*, 2014; Keyes & Fuchs, 2018; Haydont *et al.*, 2019a).

## 6. CONCLUSIONES

---





1. La ubicación de las células madre/precursoras dérmicas y la expresión de marcadores gliales asociados a su identidad celular se mantiene invariable con el envejecimiento.
2. *In vitro*, la sobreexpresión del inhibidor del ciclo celular p27 y de *Sox2* en células precursoras dérmicas envejecidas del modelo C57Bl/6J, y la pérdida concomitante del potencial neural podrían indicar un papel de p27 en la regulación de la diferenciación celular.
3. Tanto *in vivo* como *in vitro* el envejecimiento natural correlaciona con la disminución de la población celular total trazada con *Sox2*, afectando el potencial regenerativo del tejido. Específicamente, el envejecimiento afecta en mayor medida a la subpoblación celular con mayores niveles de expresión de *Sox2*.
4. El mantenimiento selectivo con la edad de la población celular con niveles medios-bajos de *Sox2* supone un desequilibrio en los linajes celulares derivados de ésta, exhibiendo un mayor compromiso adiposo, incluso desde edades tempranas.
5. El desequilibrio en el *pool* de células precursoras dérmicas trazadas por su expresión de *Sox2* es consecuencia, al menos en parte, de alteraciones en la capacidad proliferativa *in vitro* de cada una de las subpoblaciones celulares.
6. La piel del modelo animal *Sox2<sup>EGFP</sup>* presenta signos de envejecimiento prematuro en términos de menor grosor dérmico, disminución acusada de la celularidad y densidad folicular; así como también, cambios prematuros en la estructura de las fibras de colágeno y las fibras elásticas que asemejan fenotípicamente las características de una matriz extracelular envejecida.
7. Los niveles de *Sox2* podrían mediar cambios en la identidad celular entre los linajes fibroblástico y adiposo, estando este último favorecido durante el envejecimiento. Más aún, las proteínas matricelulares CCN2 y POSTN podrían ser reguladores de este

proceso, promoviendo el destino de las células precursoras hacia las rutas adipogénicas en detrimento de la celularidad dérmica.

8. La acumulación de tejido adiposo dérmico con el envejecimiento, en el modelo heterocigoto de *Sox2*, favorecería el desarrollo de procesos inflamatorios en el tejido, mediados por oncostatina M y su receptor OSMR.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---



- Abdo, H., Calvo-Enrique, L., Lopez, J.M., Song, J., Zhang, M.D., Usoskin, D., El Manira, A., Adameyko, I., Hjerling-Leffler, J. & Ernfors, P. (2019) Specialized cutaneous Schwann cells initiate pain sensation. *Science (New York, N.Y.)*, **365**, 695-699.
- Abellán, A., Aceituno, P., Pérez, J., Ramiro, D., Ayala, A. & Pujol, R. (2019) Un perfil de las personas mayores en España, 2019. Indicadores estadísticos básicos *Informes Envejecimiento en red*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, pp. 38.
- Abraira, V.E. & Ginty, D.D. (2013) The sensory neurons of touch. *Neuron*, **79**, 618-639.
- Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J.B., Pereira, J.A., Topilko, P., Müller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., Usoskin, D., Suter, U., Birchmeier, C. & Ernfors, P. (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., Lubke, M., Muller, T., Birchmeier, C., Suter, U., Zaitoun, I., Takahashi, Y. & Ernfors, P. (2012) Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. *Development*, **139**, 397-410.
- Agabalyan, N.A., Hagner, A., Rahmani, W. & Biernaskie, J. (2016) Chapter 16 - SOX2 in the Skin. In Kondoh, H., Lovell-Badge, R. (eds) *Sox2*. Academic Press, Boston, pp. 281-300.
- Agabalyan, N.A., Rosin, N.L., Rahmani, W. & 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.
- Amoh, Y., Li, L., Campillo, R., Kawahara, K., Katsuoka, K., Penman, S. & Hoffman, R.M. (2005a) Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 17734-17738.
- Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K. & Hoffman, R.M. (2008) Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle*, **7**, 1865-1869.
- Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K., Penman, S. & Hoffman, R.M. (2005b) Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 5530.
- Amoh, Y., Li, L., Yang, M., Moossa, A.R., Katsuoka, K., Penman, S. & Hoffman, R.M. (2004) Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 13291.

- Armulik, A., Genove, G. & 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. & Hochedlinger, K. (2011) Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell*, **9**, 317-329.
- Atmatzidis, D.H., Lambert, W.C. & Lambert, M.W. (2017) Langerhans cell: exciting developments in health and disease. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, **31**, 1817-1824.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N. & Lovell-Badge, R. (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, **17**, 126-140.
- Bahrami, A.R., Matin, M.M. & Andrews, P.W. (2005) The CDK inhibitor p27 enhances neural differentiation in pluripotent NTERA2 human EC cells, but does not permit differentiation of 2102Ep nullipotent human EC cells. *Mechanisms of development*, **122**, 1034-1042.
- Bardot, E.S., Valdes, V.J., Zhang, J., Perdigoto, C.N., Nicolis, S., Hearn, S.A., Silva, J.M. & Ezhkova, E. (2013) Polycomb subunits Ezh1 and Ezh2 regulate the Merkel cell differentiation program in skin stem cells. *Embo j*, **32**, 1990-2000.
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V. & Wolf, R. (2012) Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*, **30**, 257-262.
- Baum, J. & Duffy, H.S. (2011) Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *Journal of cardiovascular pharmacology*, **57**, 376-379.
- Bentov, I. & Reed, M.J. (2015) The effect of aging on the cutaneous microvasculature. *Microvasc Res*, **100**, 25-31.
- Besné, I., Descombes, C. & Breton, L. (2002) Effect of Age and Anatomical Site on Density of Sensory Innervation in Human Epidermis. *Archives of Dermatology*, **138**, 1445-1450.
- Biernaskie, J., Paris, M., Morozova, O., Fagan, B.M., Marra, M., Pevny, L. & 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., Sparling, J.S., Liu, J., Shannon, C.P., Plemel, J.R., Xie, Y., Miller, F.D. & Tetzlaff, W. (2007) Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 9545-9559.

- Blanpain, C. & Fuchs, E. (2006) Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **22**, 339-373.
- Boerboom, A., Dion, V., Chariot, A. & Franzen, R. (2017) Molecular Mechanisms Involved in Schwann Cell Plasticity. *Front Mol Neurosci*, **10**, 38-38.
- Boniface, K., Diveu, C., Morel, F., Pedretti, N., Froger, J., Ravon, E., Garcia, M., Venereau, E., Preisser, L., Guignouard, E., Guillet, G., Dagregorio, G., Pene, J., Moles, J.P., Yssel, H., Chevalier, S., Bernard, F.X., Gascan, H. & Lecron, J.C. (2007) Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **178**, 4615-4622.
- Bornstein, P. (2009) Matricellular proteins: an overview. *Journal of Cell Communication and Signaling*, **3**, 163.
- Boumahdi, S., Driessens, G., Lapouge, G., Rorive, S., Nassar, D., Le Mercier, M., Delatte, B., Caauwe, A., Lenglez, S., Nkusi, E., Brohee, S., Salmon, I., Dubois, C., del Marmol, V., Fuks, F., Beck, B. & Blanpain, C. (2014) SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature*, **511**, 246-250.
- Braverman, I.M. (2000) The cutaneous microcirculation. *J Investig Dermatol Symp Proc*, **5**, 3-9.
- Bretones, G., Acosta, J.C., Caraballo, J.M., Ferrandiz, N., Gomez-Casares, M.T., Albajar, M., Blanco, R., Ruiz, P., Hung, W.C., Albero, M.P., Perez-Roger, I. & Leon, J. (2011) SKP2 oncogene is a direct MYC target gene and MYC down-regulates p27(KIP1) through SKP2 in human leukemia cells. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 9815-9825.
- Brown, T.M. & Krishnamurthy, K. (2019) Histology, Dermis *StatPearls*, Treasure Island (FL).
- Brun, C., Jean-Louis, F., Oddos, T., Bagot, M., Bensussan, A. & Michel, L. (2016a) Phenotypic and functional changes in dermal primary fibroblasts isolated from intrinsically aged human skin. *Exp Dermatol*, **25**, 113-119.
- Brun, C., Ly Ka So, S., Maginiot, F., Bensussan, A., Michel, L., Larghero, J., Wong, H., Oddos, T. & Cras, A. (2016b) Intrinsically aged dermal fibroblasts fail to differentiate into adipogenic lineage. *Experimental Dermatology*, **25**, 906-909.
- Camargo, C.P. & Gemperli, R. (2018) Chapter 47 - Endothelial Function in Skin Microcirculation. In Da Luz, P.L., Libby, P., Chagas, A.C.P., Laurindo, F.R.M. (eds) *Endothelium and Cardiovascular Diseases*. Academic Press, pp. 673-679.
- Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 729-740.
- Carr, M.J., Toma, J.S., Johnston, A.P.W., Steadman, P.E., Yuzwa, S.A., Mahmud, N., Frankland, P.W., Kaplan, D.R. & Miller, F.D. (2019) Mesenchymal Precursor Cells in Adult Nerves Contribute to Mammalian Tissue Repair and Regeneration. *Cell Stem Cell*, **24**, 240-256 e249.



- 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. & Matheu, A. (2019) SOX2 expression diminishes with ageing in several tissues in mice and humans. *Mech Ageing Dev*, **177**, 30-36.
- Cattin, A.L., Burden, J.J., Van Emmenis, L., Mackenzie, F.E., Hoving, J.J., Garcia Calavia, N., Guo, Y., McLaughlin, M., Rosenberg, L.H., Quereda, V., Jamecna, D., Napoli, I., Parrinello, S., Enver, T., Ruhrberg, C. & Lloyd, A.C. (2015) Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell*, **162**, 1127-1139.
- Cauna, N. & Ross, L.L. (1960) The fine structure of Meissner's touch corpuscles of human fingers. *J Biophys Biochem Cytol*, **8**, 467-482.
- Chagastelles, P.C. & Nardi, N.B. (2011) Biology of stem cells: an overview. *Kidney Int Suppl (2011)*, **1**, 63-67.
- Chang, Y.C., Lin, W.M. & Hsieh, S.T. (2004) Effects of aging on human skin innervation. *Neuroreport*, **15**, 149-153.
- Chen, M., Reed, R.R. & Lane, A.P. (2019) Chronic Inflammation Directs an Olfactory Stem Cell Functional Switch from Neuroregeneration to Immune Defense. *Cell Stem Cell*, **25**, 501-513.e505.
- Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J.K., Fang, X., Sloan, A.E., Mao, Y., Lathia, J.D., Min, W., McLendon, R.E., Rich, J.N. & Bao, S. (2013) Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*, **153**, 139-152.
- Cheret, J., Lebonvallet, N., Carre, J.L., Misery, L. & Le Gall-Ianotto, C. (2013) Role of neuropeptides, neurotrophins, and neurohormones in skin wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, **21**, 772-788.
- Chiche, A., Le Roux, I., von Joest, M., Sakai, H., Aguin, S.B., Cazin, C., Salam, R., Fiette, L., Alegria, O., Flamant, P., Tajbakhsh, S. & Li, H. (2017) Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell*, **20**, 407-414 e404.
- Chu, I.M., Hengst, L. & Slingerland, J.M. (2008) The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, **8**, 253-267.
- Cimadamore, F., Fishwick, K., Giusto, E., Gnedeva, K., Cattarossi, G., Miller, A., Pluchino, S., Brill, L.M., Bronner-Fraser, M. & 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.

- Clavel, C., Grisanti, L., Zemla, R., Rezza, A., Barros, R., Sennett, R., Mazloom, A.R., Chung, C.Y., Cai, X., Cai, C.L., Pevny, L., Nicolis, S., Ma'ayan, A. & Rendl, M. (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.
- Cole, M.A., Quan, T., Voorhees, J.J. & Fisher, G.J. (2018) Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. *J Cell Commun Signal*, **12**, 35-43.
- Collongues, N., Samama, B., Schmidt-Mutter, C., Chamard-Witkowski, L., Debouverie, M., Chanson, J.-B., Antal, M.-C., Benardais, K., de Seze, J., Velten, M. & Boehm, N. (2018) Quantitative and qualitative normative dataset for intraepidermal nerve fibers using skin biopsy. *PLOS ONE*, **13**, e0191614.
- Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y. & Campisi, J. (2008) Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLOS Biology*, **6**, e301.
- Cotta-Pereira, G., Guerra Rodrigo, F. & Bittencourt-Sampaio, S. (1976) Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol*, **66**, 143-148.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B.M., Badyrak, S., Buhring, H.J., Jacobino, J.P., Lazzari, L., Huard, J. & Peault, B. (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, **3**, 301-313.
- Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B.G., Messina, G., Morosetti, R., Li, S., Belicchi, M., Peretti, G., Chamberlain, J.S., Wright, W.E., Torrente, Y., Ferrari, S., Bianco, P. & Cossu, G. (2007) Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*, **9**, 255-267.
- Doles, J., Storer, M., Cozzuto, L., Roma, G. & Keyes, W.M. (2012) Age-associated inflammation inhibits epidermal stem cell function. *Genes Dev*, **26**, 2144-2153.
- Donati, G., Proserpio, V., Lichtenberger, B.M., Natsuga, K., Sinclair, R., Fujiwara, H. & Watt, F.M. (2014) Epidermal Wnt/beta-catenin signaling regulates adipocyte differentiation via secretion of adipogenic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, E1501-1509.
- Dore-Duffy, P., Katychhev, A., Wang, X. & Van Buren, E. (2006) CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **26**, 613-624.

- Driskell, R.R., Giangreco, A., Jensen, K.B., Mulder, K.W. & Watt, F.M. (2009) Sox2-positive dermal papilla cells specify hair follicle type in mammalian epidermis. *Development*, **136**, 2815-2823.
- Driskell, R.R., Jahoda, C.A., Chuong, C.M., Watt, F.M. & Horsley, V. (2014) Defining dermal adipose tissue. *Exp Dermatol*, **23**, 629-631.
- Driskell, R.R., Lichtenberger, B.M., Hoste, E., Kretzschmar, K., Simons, B.D., Charalambous, M., Ferron, S.R., Herault, Y., Pavlovic, G., Ferguson-Smith, A.C. & Watt, F.M. (2013) Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*, **504**, 277-281.
- Driskell, R.R. & Watt, F.M. (2015) Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in cell biology*, **25**, 92-99.
- Dubin, A.E. & Patapoutian, A. (2010) Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*, **120**, 3760-3772.
- Duncan, M.R., Hasan, A. & Berman, B. (1995) Oncostatin M stimulates collagen and glycosaminoglycan production by cultured normal dermal fibroblasts: insensitivity of sclerodermal and keloidal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, **104**, 128-133.
- Egbert, M., Ruetze, M., Sattler, M., Wenck, H., Gallinat, S., Lucius, R. & Weise, J.M. (2014) The matricellular protein periostin contributes to proper collagen function and is downregulated during skin aging. *J Dermatol Sci*, **73**, 40-48.
- Elks, C.M., Zhao, P., Grant, R.W., Hang, H., Bailey, J.L., Burk, D.H., McNulty, M.A., Mynatt, R.L. & Stephens, J.M. (2016) Loss of Oncostatin M Signaling in Adipocytes Induces Insulin Resistance and Adipose Tissue Inflammation in Vivo. *The Journal of biological chemistry*, **291**, 17066-17076.
- Elliott, C.G., Forbes, T.L., Leask, A. & Hamilton, D.W. (2015) Inflammatory microenvironment and tumor necrosis factor alpha as modulators of periostin and CCN2 expression in human non-healing skin wounds and dermal fibroblasts. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, **43**, 71-84.
- Elliott, C.G., Wang, J., Guo, X., Xu, S.-w., Eastwood, M., Guan, J., Leask, A., Conway, S.J. & Hamilton, D.W. (2012) Periostin modulates myofibroblast differentiation during full-thickness cutaneous wound repair. *Journal of cell science*, **125**, 121-132.
- Elliott, C.G., Wang, J., Walker, J.T., Michelsons, S., Dunmore-Buyze, J., Drangova, M., Leask, A. & Hamilton, D.W. (2019) Periostin and CCN2 Scaffolds Promote the Wound Healing Response in the Skin of Diabetic Mice. *Tissue engineering. Part A*, **25**, 1326-1339.
- Ellis, P., Fagan, B.M., Magness, S.T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M. & 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.

- Etzaniz, U., Perez-San Vicente, A., Gago-Lopez, N., Garcia-Dominguez, M., Iribar, H., Aduriz, A., Perez-Lopez, V., Burgoa, I., Irizar, H., Munoz-Culla, M., Vallejo-Illarramendi, A., Leis, O., Matheu, A., Martin, A.G., Otaegui, D., Lopez-Mato, M.P., Gutierrez-Rivera, A., MacLellan, R. & Izeta, A. (2014) Neural-competent cells of adult human dermis belong to the Schwann lineage. *Stem Cell Reports*, **3**, 774-788.
- Ezure, T. & Amano, S. (2015) Increment of subcutaneous adipose tissue is associated with decrease of elastic fibres in the dermal layer. *Exp Dermatol*, **24**, 924-929.
- Fantes, J., Ragge, N.K., Lynch, S.A., McGill, N.I., Collin, J.R., Howard-Peebles, P.N., Hayward, C., Vivian, A.J., Williamson, K., van Heyningen, V. & FitzPatrick, D.R. (2003) Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nature genetics*, **33**, 461-463.
- Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P. & Maibach, H.I. (2013) Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, **2**, 5-10.
- Farage, M.A., Miller, K.W. & Maibach, H.I. (2010) Degenerative Changes in Aging Skin. In Farage, M.A., Miller, K.W., Maibach, H.I. (eds) *Textbook of Aging Skin*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 25-35.
- Fernandes, K.J., McKenzie, I.A., Mill, P., Smith, K.M., Akhavan, M., Barnabe-Heider, F., Biernaskie, J., Junek, A., Kobayashi, N.R., Toma, J.G., Kaplan, D.R., Labosky, P.A., Rafuse, V., Hui, C.C. & Miller, F.D. (2004) A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol*, **6**, 1082-1093.
- Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Broudy, V., Perlmutter, R.M., Kaushansky, K. & Roberts, J.M. (1996) A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*, **85**, 733-744.
- Festa, E., Fretz, J., Berry, R., Schmidt, B., Rodeheffer, M., Horowitz, M. & Horsley, V. (2011) Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell*, **146**, 761-771.
- Flatt, T. (2012) A New Definition of Aging? *Frontiers in Genetics*, **3**.
- Foster, A.R., Nicu, C., Schneider, M.R., Hinde, E. & Paus, R. (2018) Dermal white adipose tissue undergoes major morphological changes during the spontaneous and induced murine hair follicle cycling: a reappraisal. *Arch Dermatol Res*, **310**, 453-462.
- Fu, M., Zhang, J., Zhu, X., Myles, D.E., Willson, T.M., Liu, X. & Chen, Y.E. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 45888-45894.
- Gago, N., Perez-Lopez, V., Sanz-Jaka, J.P., Cormenzana, P., Eizaguirre, I., Bernad, A. & Izeta, A. (2009) Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells*, **27**, 1164-1172.

- Gattazzo, F., Urciuolo, A. & Bonaldo, P. (2014) Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*, **1840**, 2506-2519.
- Geyfman, M., Plikus, M.V., Treffeisen, E., Andersen, B. & Paus, R. (2015) Resting no more: re-defining telogen, the maintenance stage of the hair growth cycle. *Biol Rev Camb Philos Soc*, **90**, 1179-1196.
- Ghazizadeh, S. & Taichman, L.B. (2001) Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J*, **20**, 1215-1222.
- Ghazizadeh, S. & Taichman, L.B. (2005) Organization of stem cells and their progeny in human epidermis. *J Invest Dermatol*, **124**, 367-372.
- Giangreco, A., Qin, M., Pintar, J.E. & Watt, F.M. (2008) Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging. *Aging Cell*, **7**, 250-259.
- Gibbons, C.H. & Freeman, R. (2012) Chapter 85 - Cutaneous Autonomic Innervation: Assessment by Skin Biopsy. In Robertson, D., Biaggioni, I., Burnstock, G., Low, P.A., Paton, J.F.R. (eds) *Primer on the Autonomic Nervous System (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 413-417.
- Gibson, S.J. & Farrell, M. (2004) A review of age differences in the neurophysiology of nociception and the perceptual experience of pain. *The Clinical journal of pain*, **20**, 227-239.
- Gomi, T. & Imamura, T. (2019) Age-related changes in the vasculature of the dermis of the upper lip vermilion. *Aging (Albany NY)*, **11**, 3551-3560.
- Goncharov, N.V., Nadeev, A.D., Jenkins, R.O. & Avdonin, P.V. (2017) Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State. *Oxid Med Cell Longev*, **2017**, 9759735-9759735.
- Gould, L., Abadir, P., Brem, H., Carter, M., Conner-Kerr, T., Davidson, J., DiPietro, L., Falanga, V., Fife, C., Gardner, S., Grice, E., Harmon, J., Hazzard, W.R., High, K.P., Houghton, P., Jacobson, N., Kirsner, R.S., Kovacs, E.J., Margolis, D., McFarland Horne, F., Reed, M.J., Sullivan, D.H., Thom, S., Tomic-Canic, M., Walston, J., Whitney, J.A., Williams, J., Zieman, S. & Schmader, K. (2015) Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research. *J Am Geriatr Soc*, **63**, 427-438.
- Graja, A., Garcia-Carrizo, F., Jank, A.M., Gohlke, S., Ambrosi, T.H., Jonas, W., Ussar, S., Kern, M., Schurmann, A., Aleksandrova, K., Bluher, M. & Schulz, T.J. (2018) Loss of periostin occurs in aging adipose tissue of mice and its genetic ablation impairs adipose tissue lipid metabolism. *Aging Cell*, **17**, e12810.
- Gresset, A., Couplier, F., Gerschenfeld, G., Jourdon, A., Matesic, G., Richard, L., Vallat, J.M., Charnay, P. & Topilko, P. (2015) Boundary Caps Give Rise to Neurogenic Stem Cells and Terminal Glia in the Skin. *Stem Cell Reports*, **5**, 278-290.

- Grisanti, L., Clavel, C., Cai, X., Rezza, A., Tsai, S.Y., Sennett, R., Mumau, M., Cai, C.L. & Rendl, M. (2013) Tbx18 targets dermal condensates for labeling, isolation, and gene ablation during embryonic hair follicle formation. *J Invest Dermatol*, **133**, 344-353.
- Guerrero-Juarez, C.F. & Plikus, M.V. (2018) Emerging nonmetabolic functions of skin fat. *Nat Rev Endocrinol*, **14**, 163-173.
- Guichet, P.O., Guelfi, S., Teigell, M., Hoppe, L., Bakalara, N., Bauchet, L., Duffau, H., Lamszus, K., Rothhut, B. & Hugnot, J.P. (2015) Notch1 stimulation induces a vascularization switch with pericyte-like cell differentiation of glioblastoma stem cells. *Stem Cells*, **33**, 21-34.
- Guimaraes-Camboa, N., Cattaneo, P., Sun, Y., Moore-Morris, T., Gu, Y., Dalton, N.D., Rockenstein, E., Masliah, E., Peterson, K.L., Stallcup, W.B., Chen, J. & Evans, S.M. (2017) Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo. *Cell Stem Cell*, **20**, 345-359 e345.
- Gunin, A.G., Petrov, V.V., Vasilieva, O.V. & Golubtsova, N.N. (2015) Age-related changes of blood vessels in the human dermis. *Advances in Gerontology*, **5**, 65-71.
- Hagstrom, S.A., Pauer, G.J., Reid, J., Simpson, E., Crowe, S., Maumenee, I.H. & Traboulsi, E.I. (2005) SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. *American journal of medical genetics. Part A*, **138a**, 95-98.
- Halata, Z. (1977) The ultrastructure of the sensory nerve endings in the articular capsule of the knee joint of the domestic cat (Ruffini corpuscles and Pacinian corpuscles). *Journal of anatomy*, **124**, 717-729.
- Ham, A.W. & Cormack, D.H. (1987) *Ham's histology*. Lippincott, Philadelphia.
- Harper, R.A. & Grove, G. (1979) Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, **204**, 526-527.
- Harty, B.L. & Monk, K.R. (2017) Unwrapping the unappreciated: recent progress in Remak Schwann cell biology. *Curr Opin Neurobiol*, **47**, 131-137.
- Haydont, V., Bernard, B.A. & Fortunel, N.O. (2019a) Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mech Ageing Dev*, **177**, 150-156.
- Haydont, V., Neiveyans, V., Fortunel, N.O. & Asselineau, D. (2019b) Transcriptome profiling of human papillary and reticular fibroblasts from adult interfollicular dermis pinpoints the 'tissue skeleton' gene network as a component of skin chronoegeing. *Mech Ageing Dev*, **179**, 60-77.
- Haydont, V., Neiveyans, V., Zucchi, H., Fortunel, N.O. & Asselineau, D. (2019c) Genome-wide profiling of adult human papillary and reticular fibroblasts identifies ACAN, Col XI alpha1, and PSG1 as general biomarkers of dermis ageing, and KANK4 as an

- exemplary effector of papillary fibroblast ageing, related to contractility. *Mech Ageing Dev*, **177**, 157-181.
- Higgins, C.A., Roger, M.F., Hill, R.P., Ali-Khan, A.S., Garlick, J.A., Christiano, A.M. & Jahoda, C.A.B. (2017) Multifaceted role of hair follicle dermal cells in bioengineered skins. *The British journal of dermatology*, **176**, 1259-1269.
- Higgins, C.A., Westgate, G.E. & Jahoda, C.A.B. (2009) From Telogen to Exogen: Mechanisms Underlying Formation and Subsequent Loss of the Hair Club Fiber. *Journal of Investigative Dermatology*, **129**, 2100-2108.
- Hnit, S.S., Xie, C., Yao, M., Holst, J., Bensoussan, A., De Souza, P., Li, Z. & Dong, Q. (2015) p27(Kip1) signaling: Transcriptional and post-translational regulation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **68**, 9-14.
- Hsu, Y.C., Li, L. & Fuchs, E. (2014a) Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med*, **20**, 847-856.
- Hsu, Y.C., Li, L. & Fuchs, E. (2014b) Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration. *Cell*, **157**, 935-949.
- Imanishi, N., Kishi, K., Chang, H., Nakajima, H. & Aiso, S. (2008) Three-dimensional venous anatomy of the dermis observed using stereography. *J Anat*, **212**, 669-673.
- Iribar, H., Perez-Lopez, V., Etxaniz, U., Gutierrez-Rivera, A. & Izeta, A. (2017) Schwann Cells in the Ventral Dermis Do Not Derive from Myf5-Expressing Precursors. *Stem Cell Reports*, **9**, 1477-1487.
- Itoh, S., Hattori, T., Tomita, N., Aoyama, E., Yutani, Y., Yamashiro, T. & Takigawa, M. (2013) CCN family member 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) has anti-aging effects that protect articular cartilage from age-related degenerative changes. *PLoS One*, **8**, e71156.
- Janson, D.G., Saintigny, G., van Adrichem, A., Mahe, C. & El Ghalbzouri, A. (2012) Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts. *J Invest Dermatol*, **132**, 2565-2572.
- Jenkins, B.A. & Lumpkin, E.A. (2017) Developing a sense of touch. *Development*, **144**, 4078-4090.
- Jessen, K.R. & Mirsky, R. (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 671-682.
- Jiang, D., de Vries, J.C., Muschhammer, J., Schatz, S., Ye, H., Hein, T., Fidan, M., Romanov, V.S., Rinkevich, Y. & Scharffetter-Kochanek, K. (2020) Local and transient inhibition of p21 expression ameliorates age-related delayed wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, **28**, 49-60.

- Jinno, H., Morozova, O., Jones, K.L., Biernaskie, J.A., Paris, M., Hosokawa, R., Rudnicki, M.A., Chai, Y., Rossi, F., Marra, M.A. & Miller, F.D. (2010) Convergent genesis of an adult neural crest-like dermal stem cell from distinct developmental origins. *Stem Cells*, **28**, 2027-2040.
- Johnston, A.P., Naska, S., Jones, K., Jinno, H., Kaplan, D.R. & Miller, F.D. (2013) Sox2-mediated regulation of adult neural crest precursors and skin repair. *Stem Cell Reports*, **1**, 38-45.
- Johnston, A.P., Yuzwa, S.A., Carr, M.J., Mahmud, N., Storer, M.A., Krause, M.P., Jones, K., Paul, S., Kaplan, D.R. & Miller, F.D. (2016) Dedifferentiated Schwann Cell Precursors Secreting Paracrine Factors Are Required for Regeneration of the Mammalian Digit Tip. *Cell Stem Cell*, **19**, 433-448.
- Jopling, C., Boue, S. & Izpisua Belmonte, J.C. (2011) Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 79-89.
- Kadler, K.E., Hill, A. & Canty-Laird, E.G. (2008) Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Current Opinion in Cell Biology*, **20**, 495-501.
- Kaisers, W., Boukamp, P., Stark, H.-J., Schwender, H., Tigges, J., Krutmann, J. & Schaal, H. (2017) Age, gender and UV-exposition related effects on gene expression in in vivo aged short term cultivated human dermal fibroblasts. *PLOS ONE*, **12**, e0175657.
- Kassner, A., Hansen, U., Miosge, N., Reinhardt, D.P., Aigner, T., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P. & Grässel, S. (2003) Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix Biology*, **22**, 131-143.
- Kastriti, M.E. & Adameyko, I. (2017) Specification, plasticity and evolutionary origin of peripheral glial cells. *Curr Opin Neurobiol*, **47**, 196-202.
- Kaur, A., Ecker, B.L., Douglass, S.M., Kugel, C.H., 3rd, Webster, M.R., Almeida, F.V., Somasundaram, R., Hayden, J., Ban, E., Ahmadzadeh, H., Franco-Barraza, J., Shah, N., Mellis, I.A., Keeney, F., Kossenkov, A., Tang, H.Y., Yin, X., Liu, Q., Xu, X., Fane, M., Brafford, P., Herlyn, M., Speicher, D.W., Wargo, J.A., Tetzlaff, M.T., Haydu, L.E., Raj, A., Shenoy, V., Cukierman, E. & Weeraratna, A.T. (2019) Remodeling of the Collagen Matrix in Aging Skin Promotes Melanoma Metastasis and Affects Immune Cell Motility. *Cancer discovery*, **9**, 64-81.
- Kennedy, B.K., Berger, S.L., Brunet, A., Campisi, J., Cuervo, A.M., Epel, E.S., Franceschi, C., Lithgow, G.J., Morimoto, R.I., Pessin, J.E., Rando, T.A., Richardson, A., Schadt, E.E., Wyss-Coray, T. & Sierra, F. (2014) Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*, **159**, 709-713.
- Keyes, B.E. & Fuchs, E. (2018) Stem cells: Aging and transcriptional fingerprints. *The Journal of cell biology*, **217**, 79-92.



- Kim, W.Y. & Sharpless, N.E. (2006) The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, **127**, 265-275.
- Komori, T., Tanaka, M., Senba, E., Miyajima, A. & Morikawa, Y. (2013) Lack of oncostatin M receptor beta leads to adipose tissue inflammation and insulin resistance by switching macrophage phenotype. *The Journal of biological chemistry*, **288**, 21861-21875.
- Komori, T., Tanaka, M., Senba, E., Miyajima, A. & Morikawa, Y. (2014) Deficiency of oncostatin M receptor beta (OSMRbeta) exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *The Journal of biological chemistry*, **289**, 13821-13837.
- Krafts, K.P. (2010) Tissue repair: The hidden drama. *Organogenesis*, **6**, 225-233.
- Krause, M.P., Dworski, S., Feinberg, K., Jones, K., Johnston, A.P.W., Paul, S., Paris, M., Peles, E., Bagli, D., Forrest, C.R., Kaplan, D.R. & Miller, F.D. (2014) Direct genesis of functional rodent and human schwann cells from skin mesenchymal precursors. *Stem cell reports*, **3**, 85-100.
- Krautler, N.J., Kana, V., Kranich, J., Tian, Y., Perera, D., Lemm, D., Schwarz, P., Armulik, A., Browning, J.L., Tallquist, M., Buch, T., Oliveira-Martins, J.B., Zhu, C., Hermann, M., Wagner, U., Brink, R., Heikenwalder, M. & Aguzzi, A. (2012) Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. *Cell*, **150**, 194-206.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L. & Sharpless, N.E. (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*, **114**, 1299-1307.
- Laga, A.C., Lai, C.Y., Zhan, Q., Huang, S.J., Velazquez, E.F., Yang, Q., Hsu, M.Y. & Murphy, G.F. (2010) Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: relevance to melanocyte and merkel cell biology. *The American journal of pathology*, **176**, 903-913.
- Lambrou, G. & Remboutsika, E. (2014) Proliferation versus regeneration: the good, the bad and the ugly. *Frontiers in Physiology*, **5**.
- Landini, G. (2014) How to correct background illumination in brightfield microscopy.
- Langhofer, M., Hopkinson, S.B. & 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 ( Pt 3)**, 753-764.
- Lauria, G., Holland, N., Hauer, P., Cornblath, D.R., Griffin, J.W. & McArthur, J.C. (1999) Epidermal innervation: changes with aging, topographic location, and in sensory neuropathy. *Journal of the Neurological Sciences*, **164**, 172-178.

- Laverdet, B., Danigo, A., Girard, D., Magy, L., Demiot, C. & Desmouliere, A. (2015) Skin innervation: important roles during normal and pathological cutaneous repair. *Histol Histopathol*, **30**, 875-892.
- Lay, K., Kume, T. & Fuchs, E. (2016) FOXC1 maintains the hair follicle stem cell niche and governs stem cell quiescence to preserve long-term tissue-regenerating potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, E1506-1515.
- Le, N., Nagarajan, R., Wang, J.Y., Araki, T., Schmidt, R.E. & Milbrandt, J. (2005) Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 2596-2601.
- Legue, E. & Nicolas, J.F. (2005) Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors. *Development*, **132**, 4143-4154.
- Lesko, M.H., Driskell, R.R., Kretzschmar, K., Goldie, S.J. & Watt, F.M. (2013) Sox2 modulates the function of two distinct cell lineages in mouse skin. *Dev Biol*, **382**, 15-26.
- Levy, V., Lindon, C., Harfe, B.D. & Morgan, B.A. (2005) Distinct Stem Cell Populations Regenerate the Follicle and Interfollicular Epidermis. *Developmental Cell*, **9**, 855-861.
- Li, K.N., Jain, P., He, C.H., Eun, F.C., Kang, S. & Tumber, T. (2019) Skin vasculature and hair follicle cross-talking associated with stem cell activation and tissue homeostasis. *Elife*, **8**.
- Li, L. & Ginty, D.D. (2014) The structure and organization of lanceolate mechanosensory complexes at mouse hair follicles. *Elife*, **3**, e01901.
- Li, L., Mignone, J., Yang, M., Matic, M., Penman, S., Enikolopov, G. & Hoffman, R.M. (2003) Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 9958-9961.
- Li, L., Rutlin, M., Abraira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., Woodbury, C.J. & Ginty, D.D. (2011) The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell*, **147**, 1615-1627.
- Lichtenberger, B.M., Mastrogiannaki, M. & Watt, F.M. (2016) Epidermal  $\beta$ -catenin activation remodels the dermis via paracrine signalling to distinct fibroblast lineages. *Nature Communications*, **7**, 10537.
- Liu, F., Uchugonova, A., Kimura, H., Zhang, C., Zhao, M., Zhang, L., Koenig, K., Duong, J., Aki, R., Saito, N., Mii, S., Amoh, Y., Katsuoka, K. & Hoffman, R.M. (2011a) 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*, **10**, 830-839.

- Liu, N., Matsumura, H., Kato, T., Ichinose, S., Takada, A., Namiki, T., Asakawa, K., Morinaga, H., Mohri, Y., De Arcangelis, A., Geroges-Labouesse, E., Nanba, D. & Nishimura, E.K. (2019) Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. *Nature*, **568**, 344-350.
- Liu, S., Liu, S., Wang, X., Zhou, J., Cao, Y., Wang, F. & Duan, E. (2011b) The PI3K-Akt pathway inhibits senescence and promotes self-renewal of human skin-derived precursors in vitro. *Aging Cell*, **10**, 661-674.
- Liu, S., Wang, X., Zhao, Q., Liu, S., Zhang, H., Shi, J., Li, N., Lei, X., Zhao, H., Deng, Z., Cao, Y., Ning, L., Xia, G. & Duan, E. (2015) Senescence of human skin-derived precursors regulated by Akt-FOXO3-p27(KIP1)/p15(INK4b) signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **72**, 2949-2960.
- Liu, Z., Walters, B.J., Owen, T., Brimble, M.A., Steigelman, K.A., Zhang, L., Mellado Lagarde, M.M., Valentine, M.B., Yu, Y., Cox, B.C. & Zuo, J. (2012) Regulation of p27Kip1 by Sox2 maintains quiescence of inner pillar cells in the murine auditory sensory epithelium. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 10530-10540.
- Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging. *Cell*, **153**, 1194-1217.
- Lowe, C.E., O'Rahilly, S. & Rochford, J.J. (2011) Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci*, **124**, 2681-2686.
- Mackenzie, I.C. (1997) Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *J Invest Dermatol*, **109**, 377-383.
- Marcos-Garcés, V., Molina Aguilar, P., Bea Serrano, C., García Bustos, V., Benavent Seguí, J., Ferrández Izquierdo, A. & Ruiz-Saurí, A. (2014) Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing – a morphometric and comparative study. *Journal of Anatomy*, **225**, 98-108.
- Marks, J.G. & Miller, J.J. (2019) 2 - Structure and Function of the Skin. In Marks, J.G., Miller, J.J. (eds) *Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology (Sixth Edition)*. Content Repository Only!, London, pp. 2-10.
- Marshall, K.L., Clary, R.C., Baba, Y., Orlowsky, R.L., Gerling, G.J. & Lumpkin, E.A. (2016) Touch Receptors Undergo Rapid Remodeling in Healthy Skin. *Cell Rep*, **17**, 1719-1727.
- Maruhashi, T., Kii, I., Saito, M. & Kudo, A. (2010) Interaction between Periostin and BMP-1 Promotes Proteolytic Activation of Lysyl Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 13294-13303.
- Matheu, A., Collado, M., Wise, C., Manterola, L., Cekaite, L., Tye, A.J., Canamero, M., Bujanda, L., Schedl, A., Cheah, K.S.E., Skotheim, R.I., Lothe, R.A., López de Munain, A., Briscoe, J., Serrano, M. & Lovell-Badge, R. (2012) Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer Res*, **72**, 1301-1315.

- Matsumura, H., Mohri, Y., Binh, N.T., Morinaga, H., Fukuda, M., Ito, M., Kurata, S., Hoeijmakers, J. & Nishimura, E.K. (2016) Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. *Science (New York, N.Y.)*, **351**, aad4395.
- McKenzie, I.A., Biernaskie, J., Toma, J.G., Midha, R. & Miller, F.D. (2006) Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 6651-6660.
- Mercurio, S., Serra, L. & Nicolis, S.K. (2019) More than just Stem Cells: Functional Roles of the Transcription Factor Sox2 in Differentiated Glia and Neurons. *Int J Mol Sci*, **20**.
- Metz, E.P. & Rizzino, A. (2019) Sox2 dosage: A critical determinant in the functions of Sox2 in both normal and tumor cells. *Journal of cellular physiology*, **234**, 19298-19306.
- Mine, S., Fortunel, N.O., Pigeon, H. & Asselineau, D. (2009) Aging Alters Functionally Human Dermal Papillary Fibroblasts but Not Reticular Fibroblasts: A New View of Skin Morphogenesis and Aging. *PLOS ONE*, **3**, e4066.
- Mok, K.W., Saxena, N., Heitman, N., Grisanti, L., Srivastava, D., Muraro, M.J., Jacob, T., Sennett, R., Wang, Z., Su, Y., Yang, L.M., Ma'ayan, A., Ornitz, D.M., Kasper, M. & Rendl, M. (2019) Dermal Condensate Niche Fate Specification Occurs Prior to Formation and Is Placode Progenitor Dependent. *Dev Cell*, **48**, 32-48 e35.
- Montagna, W. (1967) Comparative anatomy and physiology of the skin. *Arch Dermatol*, **96**, 357-363.
- Montagna, W. (1971) Cutaneous comparative biology. *Arch Dermatol*, **104**, 577-591.
- Montagna, W. & Carlisle, K. (1979) Structural Changes in Aging Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, **73**, 47-53.
- Montagna, W. & Parakkal, P.F. (1974) 6 - Cutaneous Innervation. In Montagna, W., Parakkal, P.F. (eds) *The Structure & Function of Skin (Third Edition)*. Academic Press, pp. 157-171.
- Morikawa, S. & Ezaki, T. (2011) Phenotypic changes and possible angiogenic roles of pericytes during wound healing in the mouse skin. *Histol Histopathol*, **26**, 979-995.
- Morikawa, S., Iribar, H., Gutierrez-Rivera, A., Ezaki, T. & Izeta, A. (2019) Pericytes in Cutaneous Wound Healing. *Adv Exp Med Biol*, **1147**, 1-63.
- Morrison, K.M., Miesegaes, G.R., Lumpkin, E.A. & Maricich, S.M. (2009) Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Dev Biol*, **336**, 76-83.
- Mosteiro, L., Pantoja, C., de Martino, A. & Serrano, M. (2018) Senescence promotes in vivo reprogramming through p16(INK)(4a) and IL-6. *Aging Cell*, **17**.

- Moulin, V., Auger, F.A., Garrel, D. & Germain, L. (2000) Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. *Burns*, **26**, 3-12.
- Muller-Rover, S., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmuller, S., Foitzik, K., McKay, I.A., Stenn, K.S. & Paus, R. (2001) A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol*, **117**, 3-15.
- Munoz-Espin, D. & Serrano, M. (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **15**, 482-496.
- Naldaiz-Gastesi, N., Bahri, O.A., Lopez de Munain, A., McCullagh, K.J.A. & Izeta, A. (2018) The panniculus carnosus muscle: an evolutionary enigma at the intersection of distinct research fields. *J Anat*.
- Nauroy, P., Barruche, V., Marchand, L., Nindorera-Badara, S., Bordes, S., Closs, B. & Ruggiero, F. (2017) Human Dermal Fibroblast Subpopulations Display Distinct Gene Signatures Related to Cell Behaviors and Matrisome. *Journal of Investigative Dermatology*, **137**, 1787-1789.
- Naylor, E.C., Watson, R.E. & Sherratt, M.J. (2011) Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*, **69**, 249-256.
- Nguyen, L., Besson, A., Heng, J.I., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., Philpott, A., Roberts, J.M. & Guillemot, F. (2006) p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev*, **20**, 1511-1524.
- Niemann, C. & Horsley, V. (2012) Development and homeostasis of the sebaceous gland. *Semin Cell Dev Biol*, **23**, 928-936.
- Nolano, M., Provitera, V., Caporaso, G., Stancanelli, A., Leandri, M., Biasiotta, A., Cruccu, G., Santoro, L. & Truini, A. (2013) Cutaneous innervation of the human face as assessed by skin biopsy. *J Anat*, **222**, 161-169.
- Norris, R.A., Damon, B., Mironov, V., Kasyanov, V., Ramamurthi, A., Moreno-Rodriguez, R., Trusk, T., Potts, J.D., Goodwin, R.L., Davis, J., Hoffman, S., Wen, X., Sugi, Y., Kern, C.B., Mjaatvedt, C.H., Turner, D.K., Oka, T., Conway, S.J., Molkentin, J.D., Forgacs, G. & Markwald, R.R. (2007) Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *Journal of Cellular Biochemistry*, **101**, 695-711.
- Novak, D., Huser, L., Elton, J.J., Umansky, V., Altevogt, P. & Utikal, J. (2019) SOX2 in development and cancer biology. *Semin Cancer Biol*.
- Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., Araoka, T., Vazquez-Ferrer, E., Donoso, D., Roman, J.L., Xu, J., Rodriguez Esteban, C., Nunez, G., Nunez Delicado, E., Campistol, J.M., Guillen, I., Guillen, P. & Izpisua Belmonte, J.C. (2016) In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell*, **167**, 1719-1733 e1712.

- Oh, J., Lee, Y.D. & Wagers, A.J. (2014) Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nature Medicine*, **20**, 870-880.
- Osman, O.S., Selway, J.L., Harikumar, P.E., Stocker, C.J., Wargent, E.T., Cawthorne, M.A., Jassim, S. & Langlands, K. (2013) A novel method to assess collagen architecture in skin. *BMC Bioinformatics*, **14**, 260.
- Page, R.B. & Stromberg, A.J. (2011) Linear methods for analysis and quality control of relative expression ratios from quantitative real-time polymerase chain reaction experiments. *ScientificWorldJournal*, **11**, 1383-1393.
- Parfejevs, V., Debbache, J., Shakhova, O., Schaefer, S.M., Glausch, M., Wegner, M., Suter, U., Riekstina, U., Werner, S. & Sommer, L. (2018) Injury-activated glial cells promote wound healing of the adult skin in mice. *Nat Commun*, **9**, 236.
- Park, S.B., Seo, K.W., So, A.Y., Seo, M.S., Yu, K.R., Kang, S.K. & Kang, K.S. (2012) SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell death and differentiation*, **19**, 534-545.
- Parrinello, S., Napoli, I., Ribeiro, S., Wingfield Digby, P., Fedorova, M., Parkinson, D.B., Doddrell, R.D., Nakayama, M., Adams, R.H. & Lloyd, A.C. (2010) EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell*, **143**, 145-155.
- Pastrana, E., Cheng, L.C. & Doetsch, F. (2009) Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 6387-6392.
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V. & Doetsch, F. (2011) Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*, **8**, 486-498.
- Pesaresi, M., Bonilla-Pons, S.A. & Cosma, M.P. (2018) In vivo somatic cell reprogramming for tissue regeneration: the emerging role of the local microenvironment. *Curr Opin Cell Biol*, **55**, 119-128.
- Peters, E.M., Botchkarev, V.A., Muller-Rover, S., Moll, I., Rice, F.L. & Paus, R. (2002) Developmental timing of hair follicle and dorsal skin innervation in mice. *J Comp Neurol*, **448**, 28-52.
- Pevny, L.H. & Nicolis, S.K. (2010) Sox2 roles in neural stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **42**, 421-424.
- Philippeos, C., Telerman, S.B., Oules, B., Pisco, A.O., Shaw, T.J., Elgueta, R., Lombardi, G., Driskell, R.R., Soldin, M., Lynch, M.D. & Watt, F.M. (2018) Spatial and Single-Cell Transcriptional Profiling Identifies Functionally Distinct Human Dermal Fibroblast Subpopulations. *J Invest Dermatol*, **138**, 811-825.
- Plikus, M.V., Guerrero-Juarez, C.F., Ito, M., Li, Y.R., Dedhia, P.H., Zheng, Y., Shao, M., Gay, D.L., Ramos, R., Hsi, T.C., Oh, J.W., Wang, X., Ramirez, A., Konopelski, S.E., Elzein, A.,

- Wang, A., Supapannachart, R.J., Lee, H.L., Lim, C.H., Nace, A., Guo, A., Treffeisen, E., Andl, T., Ramirez, R.N., Murad, R., Offermanns, S., Metzger, D., Chambon, P., Widgerow, A.D., Tuan, T.L., Mortazavi, A., Gupta, R.K., Hamilton, B.A., Millar, S.E., Seale, P., Pear, W.S., Lazar, M.A. & Cotsarelis, G. (2017) Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science (New York, N.Y.)*, **355**, 748-752.
- Quan, T. & Fisher, G.J. (2015) Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology*, **61**, 427-434.
- Quan, T., Shao, Y., He, T., Voorhees, J.J. & Fisher, G.J. (2010) Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin. *J Invest Dermatol*, **130**, 415-424.
- Radomska, K.J. & Topilko, P. (2017) Boundary cap cells in development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, **47**, 209-215.
- Rahmani, W., Abbasi, S., Hagner, A., Raharjo, E., Kumar, R., Hotta, A., Magness, S., Metzger, D. & 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.
- Rajagopal, J. & Stanger, B.Z. (2016) Plasticity in the Adult: How Should the Waddington Diagram Be Applied to Regenerating Tissues? *Dev Cell*, **36**, 133-137.
- Reinisch, C.M. & 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.
- Rezza, A., Sennett, R. & Rendl, M. (2014) Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Curr Top Dev Biol*, **107**, 333-372.
- Rinkevich, Y., Walmsley, G.G., Hu, M.S., Maan, Z.N., Newman, A.M., Drukker, M., Januszyk, M., Krampitz, G.W., Gurtner, G.C., Lorenz, H.P., Weissman, I.L. & Longaker, M.T. (2015) Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science (New York, N.Y.)*, **348**, aaa2151.
- Rippa, A.L., Kalabusheva, E.P. & Vorotelyak, E.A. (2019) Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells*, **8**.
- Rivera-Gonzalez, G.C., Shook, B.A., Andrae, J., Holtrup, B., Bollag, K., Betsholtz, C., Rodeheffer, M.S. & Horsley, V. (2016) Skin Adipocyte Stem Cell Self-Renewal Is Regulated by a PDGFA/AKT-Signaling Axis. *Cell Stem Cell*, **19**, 738-751.
- Ross, M.H. & Pawlina, W. (2016) *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Wolters Kluwer Health, Philadelphia.

- Roudaut, Y., Lonigro, A., Coste, B., Hao, J., Delmas, P. & Crest, M. (2012) Touch sense: functional organization and molecular determinants of mechanosensitive receptors. *Channels (Austin)*, **6**, 234-245.
- Roy, S.S., Hsu, C.H., Wen, Z.H., Lin, C.S. & Chakraborty, C. (2011) A hypothetical relationship between the nuclear reprogramming factors for induced pluripotent stem (iPS) cells generation--bioinformatic and algorithmic approach. *Medical hypotheses*, **76**, 507-511.
- Ruetze, M., Knauer, T., Gallinat, S., Wenck, H., Achterberg, V., Maerz, A., Deppert, W. & Knott, A. (2013) A novel niche for skin derived precursors in non-follicular skin. *J Dermatol Sci*, **69**, 132-139.
- Ruifrok, A.C. & Johnston, D.A. (2001) Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*, **23**, 291-299.
- Salzer, M.C., Lafzi, A., Berenguer-Llargo, A., Youssif, C., Castellanos, A., Solanas, G., Peixoto, F.O., Stephan-Otto Attolini, C., Prats, N., Aguilera, M., Martin-Caballero, J., Heyn, H. & Benitah, S.A. (2018) Identity Noise and Adipogenic Traits Characterize Dermal Fibroblast Aging. *Cell*, **175**, 1575-1590 e1522.
- Sanchez-Infantes, D., White, U.A., Elks, C.M., Morrison, R.F., Gimble, J.M., Considine, R.V., Ferrante, A.W., Ravussin, E. & Stephens, J.M. (2014) Oncostatin m is produced in adipose tissue and is regulated in conditions of obesity and type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **99**, E217-225.
- Sarkar, A. & Hochedlinger, K. (2013) The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*, **12**, 15-30.
- Sarkozi, R., Flucher, K., Haller, V.M., Pirklbauer, M., Mayer, G. & Schramek, H. (2012) Oncostatin M inhibits TGF-beta1-induced CTGF expression via STAT3 in human proximal tubular cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **424**, 801-806.
- Scadden, D.T. (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, **441**, 1075-1079.
- Schlake, T. (2007) Determination of hair structure and shape. *Semin Cell Dev Biol*, **18**, 267-273.
- Schmidt, B.A. & Horsley, V. (2013) Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Development (Cambridge, England)*, **140**, 1517-1527.
- Schneider, M.R., Schmidt-Ullrich, R. & Paus, R. (2009) The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol*, **19**, R132-142.
- Schonitzer, V., Wirtz, R., Ulrich, V., Berger, T., Karl, A., Mutschler, W., Schieker, M. & Bocker, W. (2014) Sox2 is a potent inhibitor of osteogenic and adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cellular reprogramming*, **16**, 355-365.



- Scudellari, M. (2016) How iPS cells changed the world. *Nature*, **534**, 310-312.
- Sennett, R., Wang, Z., Rezza, A., Grisanti, L., Roitershtein, N., Sicchio, C., Mok, K.W., Heitman, N.J., Clavel, C., Ma'ayan, A. & Rendl, M. (2015) An Integrated Transcriptome Atlas of Embryonic Hair Follicle Progenitors, Their Niche, and the Developing Skin. *Dev Cell*, **34**, 577-591.
- Sepúlveda Saavedra, J. & Soto Domínguez, A. (2014) *Texto atlas de Histología, biología celular y tisular*. MacGraw Hill, Mexico, D. F.
- Sha, W., Thompson, K., South, J., Baron, M. & Leask, A. (2012) Loss of PPARgamma expression by fibroblasts enhances dermal wound closure. *Fibrogenesis & tissue repair*, **5**, 5.
- Sherratt, M.J. (2009) Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age (Dordr)*, **31**, 305-325.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A. & Till, J.E. (1963) THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. *Journal of cellular and comparative physiology*, **62**, 327-336.
- Simons, B.D. & Clevers, H. (2011) Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell*, **145**, 851-862.
- Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, P.M., Schallreuter, K.U., Paus, R. & Tobin, D.J. (2005) Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol*, **124**, 13-21.
- Smola, H., Stark, H.J., Thiekotter, G., Mirancea, N., Krieg, T. & Fusenig, N.E. (1998) Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp Cell Res*, **239**, 399-410.
- Solé-Boldo, L., Raddatz, G., Schütz, S., Mallm, J.-P., Rippe, K., Lonsdorf, A.S., Rodríguez-Paredes, M. & Lyko, F. (2019) Single-cell transcriptomes of the aging human skin reveal loss of fibroblast priming. *bioRxiv*, 633131.
- Sontheimer, R.D. (2014) Skin is not the largest organ. *J Invest Dermatol*, **134**, 581-582.
- Sorrell, J.M., Baber, M.A. & Caplan, A.I. (1996) Construction of a bilayered dermal equivalent containing human papillary and reticular dermal fibroblasts: use of fluorescent vital dyes. *Tissue Eng*, **2**, 39-49.
- Sorrell, J.M., Baber, M.A. & 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. *Journal of cellular physiology*, **200**, 134-145.
- Sorrell, J.M. & Caplan, A.I. (2004) Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci*, **117**, 667-675.
- Sorrell, J.M. & Caplan, A.I. (2009) Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol*, **276**, 161-214.

- Sriram, G., Bigliardi, P.L. & Bigliardi-Qi, M. (2015) Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur J Cell Biol*, **94**, 483-512.
- Stawski, L. & Trojanowska, M. (2019) Oncostatin M and its role in fibrosis. *Connect Tissue Res*, **60**, 40-49.
- Su, X., Paris, M., Gi, Y.J., Tsai, K.Y., Cho, M.S., Lin, Y.L., Biernaskie, J.A., Sinha, S., Prives, C., Pevny, L.H., Miller, F.D. & Flores, E.R. (2009) TAp63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. *Cell Stem Cell*, **5**, 64-75.
- Suflita, M.T., Pfaltzgraff, E.R., Mundell, N.A., Pevny, L.H. & Labosky, P.A. (2013) Ground-state transcriptional requirements for skin-derived precursors. *Stem Cells Dev*, **22**, 1779-1788.
- Sun, Y., Coppé, J.-P. & Lam, E.W.F. (2018) Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends in Molecular Medicine*, **24**, 871-885.
- Sundberg, J.P., Potter, C.S. & King, L.E. (2012) Chapter 2.4 - Skin and Adnexa of the Laboratory Mouse. In Hedrich, H.J. (ed) *The Laboratory Mouse (Second Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 193-208.
- Tabib, T., Morse, C., Wang, T., Chen, W. & Lafyatis, R. (2018) SFRP2/DPP4 and FMO1/LSP1 Define Major Fibroblast Populations in Human Skin. *J Invest Dermatol*, **138**, 802-810.
- Takahashi-Iwanaga, H. (2000) Three-dimensional microanatomy of longitudinal lanceolate endings in rat vibrissae. *J Comp Neurol*, **426**, 259-269.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676.
- Takemoto, T., Uchikawa, M., Yoshida, M., Bell, D.M., Lovell-Badge, R., Papaioannou, V.E. & Kondoh, H. (2011) Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells. *Nature*, **470**, 394-398.
- Tang, W., Zeve, D., Suh, J.M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R.E., Tallquist, M.D. & Graff, J.M. (2008) White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science (New York, N.Y.)*, **322**, 583-586.
- Taranova, O.V., Magness, S.T., Fagan, B.M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S.R. & Pevny, L.H. (2006) SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev*, **20**, 1187-1202.
- Tasseff, R., Bheda-Malge, A., DiColandrea, T., Bascom, C.C., Isfort, R.J. & Gelinis, R. (2014) Mouse hair cycle expression dynamics modeled as coupled mesenchymal and epithelial oscillators. *PLoS Comput Biol*, **10**, e1003914.

- Terlecki-Zaniewicz, L., Pils, V., Bobbili, M.R., Lammermann, I., Perrotta, I., Grillenberger, T., Schwestka, J., Weiss, K., Pum, D., Arcalis, E., Schwingenschuh, S., Birngruber, T., Brandstetter, M., Heuser, T., Schosserer, M., Morizot, F., Mildner, M., Stoger, E., Tschachler, E., Weinmullner, R., Gruber, F. & Grillari, J. (2019) Extracellular Vesicles in Human Skin: Cross-Talk from Senescent Fibroblasts to Keratinocytes by miRNAs. *J Invest Dermatol*.
- Thompson, C.S. & Kenney, W.L. (2004) Altered neurotransmitter control of reflex vasoconstriction in aged human skin. *The Journal of physiology*, **558**, 697-704.
- Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R. & Miller, F.D. (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*, **3**, 778-784.
- Topilko, P. (2019) Neural crest derived boundary cap cells: A source of pericytes to the developing peripheral vasculature. *Morphologie*, **103**, 71-72.
- Tsang, M., Quesnel, K., Vincent, K., Hutchenreuther, J., Postovit, L.M. & Leask, A. (2020) Insights into Fibroblast Plasticity: Cellular Communication Network 2 Is Required for Activation of Cancer-Associated Fibroblasts in a Murine Model of Melanoma. *The American journal of pathology*, **190**, 206-221.
- Tschachler, E., Reinisch, C.M., Mayer, C., Paiha, K., Lassmann, H. & 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.
- Tsuchida, Y. (1993) The effect of aging and arteriosclerosis on human skin blood flow. *J Dermatol Sci*, **5**, 175-181.
- Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Park, S.H., Thompson, T., Karsenty, G., Bradley, A. & Donehower, L.A. (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, **415**, 45-53.
- Uchugonova, A., Duong, J., Zhang, N., König, K. & Hoffman, R.M. (2011) The bulge area is the origin of nestin-expressing pluripotent stem cells of the hair follicle. *Journal of Cellular Biochemistry*, **112**, 2046-2050.
- Uong, A. & Zon, L.I. (2010) Melanocytes in development and cancer. *Journal of cellular physiology*, **222**, 38-41.
- Varani, J., Dame, M.K., Rittie, L., Fligel, S.E., Kang, S., Fisher, G.J. & Voorhees, J.J. (2006) Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *The American journal of pathology*, **168**, 1861-1868.

- Verdu, E., Ceballos, D., Vilches, J.J. & Navarro, X. (2000) Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*, **5**, 191-208.
- Vilas, J.M., Carneiro, C., Da Silva-Alvarez, S., Ferreiros, A., Gonzalez, P., Gomez, M., Ortega, S., Serrano, M., Garcia-Caballero, T., Gonzalez-Barcia, M., Vidal, A. & Collado, M. (2018) Adult Sox2+ stem cell exhaustion in mice results in cellular senescence and premature aging. *Aging Cell*, **17**, e12834.
- Vishvanath, L., Long, J.Z., Spiegelman, B.M. & Gupta, R.K. (2017) Do Adipocytes Emerge from Mural Progenitors? *Cell Stem Cell*, **20**, 585-586.
- Vorstandlechner, V., Laggner, M., Kalinina, P., Haslik, W., Radtke, C., Shaw, L., Lichtenberger, B.M., Tschachler, E., Ankersmit, H.J. & Mildner, M. (2020) Deciphering the functional heterogeneity of skin fibroblasts using single-cell RNA sequencing. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- Waddington, C.H. (1957) *The strategy of the genes; a discussion of some aspects of theoretical biology*. Macmillan, New York,.
- Waldera Lupa, D.M., Kalfalah, F., Safferling, K., Boukamp, P., Poschmann, G., Volpi, E., Götz-Rösch, C., Bernerd, F., Haag, L., Huebenthal, U., Fritsche, E., Boege, F., Grabe, N., Tigges, J., Stühler, K. & Krutmann, J. (2015) Characterization of Skin Aging-Associated Secreted Proteins (SAASP) Produced by Dermal Fibroblasts Isolated from Intrinsically Aged Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, **135**, 1954-1968.
- Wang, J., Dodd, C., Shankowsky, H.A., Scott, P.G., Tredget, E.E. & Wound Healing Research, G. (2008) Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *Lab Invest*, **88**, 1278-1290.
- Wang, L., Siegenthaler, J.A., Dowell, R.D. & Yi, R. (2016) Foxc1 reinforces quiescence in self-renewing hair follicle stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, **351**, 613-617.
- Watt, F.M. & Fujiwara, H. (2011) Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**.
- Weddell, G. (1945) THE ANATOMY OF CUTANEOUS SENSIBILITY. *British Medical Bulletin*, **3**, 167-172.
- Weddell, G. & Miller, S. (1962) Cutaneous sensibility. *Annual review of physiology*, **24**, 199-222.
- Wegner, M. & Stolt, C.C. (2005) From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci*, **28**, 583-588.
- Wei, J.C.J., Edwards, G.A., Martin, D.J., Huang, H., Crichton, M.L. & Kendall, M.A.F. (2017) Allometric scaling of skin thickness, elasticity, viscoelasticity to mass for micro-

- medical device translation: from mice, rats, rabbits, pigs to humans. *Sci Rep*, **7**, 15885.
- Weina, K., Wu, H., Knappe, N., Orouji, E., Novak, D., Bernhardt, M., Huser, L., Larribere, L., Umansky, V., Gebhardt, C. & Utikal, J. (2016) TGF-beta induces SOX2 expression in a time-dependent manner in human melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*, **29**, 453-458.
- Wojciechowicz, K., Gledhill, K., Ambler, C.A., Manning, C.B. & Jahoda, C.A. (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., Beermann, F., Barrandon, Y. & Sommer, L. (2006) Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *The Journal of Cell Biology*, **175**, 1005.
- Woo, S.H., Lumpkin, E.A. & Patapoutian, A. (2015) Merkel cells and neurons keep in touch. *Trends in cell biology*, **25**, 74-81.
- Wu, C., Zhang, H.F., Gupta, N., Alshareef, A., Wang, Q., Huang, Y.H., Lewis, J.T., Douglas, D.N., Kneteman, N.M. & Lai, R. (2016) A positive feedback loop involving the Wnt/beta-catenin/MYC/Sox2 axis defines a highly tumorigenic cell subpopulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Journal of hematology & oncology*, **9**, 120.
- Yoshida, Y., Soma, T. & Kishimoto, J. (2019) Characterization of human dermal sheath cells reveals CD36-expressing perivascular cells associated with capillary blood vessel formation in hair follicles. *Biochemical and biophysical research communications*, **516**, 945-950.
- Yu, H., Fang, D., Kumar, S.M., Li, L., Nguyen, T.K., Acs, G., Herlyn, M. & Xu, X. (2006) Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *The American journal of pathology*, **168**, 1879-1888.
- Yu, H., Kumar, S.M., Kossenkov, A.V., Showe, L. & Xu, X. (2010) Stem Cells with Neural Crest Characteristics Derived from the Bulge Region of Cultured Human Hair Follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, **130**, 1227-1236.
- Zhang, S. & Cui, W. (2014) Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells*, **6**, 305-311.
- Zhang, S. & Duan, E. (2018) Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplant*, **27**, 729-738.
- Zheng, Y.-L., Li, B.-S., Rudrabhatla, P., Shukla, V., Amin, N.D., Maric, D., Kesavapany, S., Kanungo, J., Pareek, T.K., Takahashi, S., Grant, P., Kulkarni, A.B. & Pant, H.C. (2010)

Phosphorylation of p27Kip1 at Thr187 by cyclin-dependent kinase 5 modulates neural stem cell differentiation. *Mol Biol Cell*, **21**, 3601-3614.

Zimmerman, A., Bai, L. & Ginty, D.D. (2014) The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science (New York, N.Y.)*, **346**, 950-954.

Zwick, R.K., Guerrero-Juarez, C.F., Horsley, V. & Plikus, M.V. (2018) Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab*, **27**, 68-83.



## 8. ANEXOS

---





## 1. Publicaciones científicas durante el período de esta Tesis:

Yndriago L., Izeta A. (2017) "Shh... Sweat gland in progress!" *Experimental Dermatology*, Jun;26(6):548-549. DOI: 10.1111/exd.13154

Han Y., Eipel M., Franzen J., Sakk V., Dethmers-Ausema B., Yndriago L., Izeta A., de Haan G., Geiger H., Wagner W. (2018) "Epigenetic age-predictor for mice based on three CpG sites" *Elife*. Aug 24;7. DOI: 10.7554/eLife.37462

Keren A, Izeta A, Bertoloni M, Keren Y, Ullman Y, Yndriago L, Gerovska D, Araúzo-Bravo M, Paus R, Gilhar A. (2020) "Human organ rejuvenation by VEGF-A: Lessons from the skin". In preparation.

**2. Asistencia y contribuciones a congresos derivadas de esta Tesis** (El autor ponente del trabajo se indica subrayado):

- Simposio Internacional de la *Société Française de Cosmétologie Peau & Âge*. Yndriago L, Iribar H, Prieto I, Pérez-López V, Gardeazabal L, Maeva A, Strange A, Gutiérrez-Rivera A, Matheu A e Izeta A. *Characterization of aged dermal stem cell phenotype: implications for skin homeostasis*. París, Francia (2019). Comunicación oral. La asistencia a este congreso fue gracias a la ayuda económica concedida por la SFC.

- 27º Congreso Annual de *European Society of Gene & Cell Therapy*. Yndriago L, Iribar H, Prieto I, Pérez-López V, Gardeazabal L, Maeva A, Strange A, Gutiérrez-Rivera A, Abaurrea A, Muñoz-Caffarel M, Moreno-Cugnon L, Matheu A e Izeta. *Characterization of aged dermal stem cell phenotype: implications for skin homeostasis*. Barcelona, España (2019) Comunicación poster.

- 49º Conferencia Anual *European Society for Dermatological Research*. Yndriago L, Iribar H, Prieto I, Pérez-López V, Gardeazabal L, Maeva A, Strange A, Gutiérrez-Rivera A, Matheu A e Izeta A. *Characterization of aged dermal stem cell phenotype: implications for skin homeostasis*. Burdeos, Francia (2019). Comunicación oral. La asistencia a este congreso fue gracias a una beca concedida por la empresa farmacéutica Lilly.

- 49º Conferencia Anual *European Society for Dermatological Research*. Gardeazabal L, Yndriago L, Crespo-Barreda A, Martin-Duque P, Aldazabal J, Paredes J e Izeta A. *Topical use of exosomes from human maternal milk accelerates acute cutaneous wound healing*. Burdeos, Francia (2019). Comunicación poster.
- 9º Congreso Bianual de la Sociedad Española de Terapia Génica y Celular (SETGyC). Yndriago, L., Gardeazabal, L., Iribar, H., Perez-Lopez, V., Gutierrez-Rivera, A., Izeta, A. *Age-associated dermal stem cell niche dysfunction correlates with reduced Sox2 levels*. Mallorca, España (2018). Comunicación oral.
- 9º Conferencia Internacional *Skin Ageing and Challenges*. Izeta, A., Yndriago, L., Gardeazabal, L., Iribar, H., Perez-Lopez, V., Gutierrez-Rivera, A. *Age-associated dermal stem cell niche dysfunction correlates with reduced Sox2 expression levels*. Porto, Portugal (2018). Comunicación oral.
- 9º Conferencia Internacional *Skin Ageing and Challenges*. Keren, A., Yndriago, L., Izeta, A., Gerovska, D., Arauzo-Bravo, M.J., Paus, R., Gilhar A. *VEGF mediates rejuvenation of aged human skin xenografts in young mice*. Porto, Portugal (2018). Comunicación oral.
- IUBMB *focused meeting on "Molecular Aspects of Aging and Longevity"*. Yndriago, L., Iribar, H., Gutierrez-Rivera, A., Perez-López, V., Izeta, A. *Functional characterization of the impaired dermal stem cell phenotype in aged mice*. Atenas, Grecia (2017). Comunicación poster. La asistencia a este congreso fue gracias a una beca concedida por la red *EuroCell Net*.
- 2ª Conferencia Internacional *Stem Cells and Cancer*. Yndriago, L., Iribar, H., Gutierrez-Rivera, A., Perez-López, V., Izeta, A. *Are SOX2 expression levels involved in dermal stem cell aging?* Lyon, Francia (2016). Comunicación poster
- Congreso annual de la *Société Française de Thérapie Cellulaire et Génique*. Yndriago L; Iribar H; Gutiérrez-Rivera A; Pérez-López V; Izeta A. *Are SOX2 expression levels involved in dermal stem cell aging?* Marsella, Francia (2016). Comunicación poster.

### **3. Dirección de trabajos de fin de grado y formación de estudiantes en prácticas**

- Dirección del trabajo de fin de grado de Paula Castro Cordero (Grado en Ingeniería Biomédica, Escuela de Ingenieros de la Universidad de Navarra), titulado: "*Quantification of POSTN levels in dermal white adipose tissue during ageing*", desarrollado desde enero a julio 2019.
- Dirección del trabajo de prácticas de Paula Castro Cordero (Grado en Ingeniería Biomédica, Escuela de Ingenieros de la Universidad de Navarra), titulado: "Cuantificación de estructuras nerviosas y vasculares en la piel dorsal de ratones envejecidos", desarrollado desde junio a agosto 2019.
- Dirección del trabajo de prácticas de Amaia Garmendia (Grado en Ingeniería Biomédica, Escuela de Ingenieros de la Universidad de Navarra), titulado: "*Quantification of POSTN levels in the dermis of Sox2<sup>+/EGFP</sup> transgenic mice during aging*", desarrollado desde junio a agosto del 2019.
- Soporte experimental y metodológico para el trabajo de fin de grado de Ignacio Prieto (Grado en Ingeniería Biomédica, Escuela de Ingenieros de la Universidad de Navarra). Desde febrero a agosto del 2018.
- Soporte experimental y metodológico para las prácticas de verano de Sarah Rey (Grado en Biología UPV/EHU). Agosto del 2017.